

Université de Montréal

**Contribution à l'Étude de la Physiopathologie des Effets Secondaires Associés
aux iECA : Approche Expérimentale et Clinique des Mécanismes Régulant
l'Activité Pharmacologique des Kinines**

par

Marie Eve MOREAU

Faculté de pharmacie

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D)
en Sciences pharmaceutiques option analyse**

Décembre 2007

© Marie Eve MOREAU, 2007



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

Cette thèse intitulée :

**Contribution à l'Étude de la Physiopathologie des Effets Secondaires Associés
aux iECA : Approche Expérimentale et Clinique des Mécanismes Régulant
l'Activité Pharmacologique des Kinines**

présentée par
Marie Eve MOREAU

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-François Bouchard, B.Pharm, Ph.D., président-rapporteur

Albert Adam, B.Pharm, Ph.D., directeur de recherche

Pascal Dubreuil, D.M.V., Ph.D., codirecteur

Philippe Raymond, B.Pharm, Ph.D., membre du jury

Christian Drouet, M.D., examinateur externe

Résumé français et mots clés

La classe thérapeutique regroupant les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (iECA) a su démontrer au fil des ans sa grande efficacité dans le traitement de diverses affections cardiovasculaires. Toutefois, les iECA ne sont pas dénués d'effets indésirables. Ces agents pharmacologiques sont à l'origine d'effets secondaires aigus dont la nature varie avec le contexte clinique : des épisodes d'angioœdème ont été rapportés chez des patients hypertendus et insuffisants cardiaques ainsi que chez des patients atteints d'accident vasculaire cérébral sous traitement fibrinolytique; des réactions anaphylactoïdes associées aux séances d'hémodialyse et des réactions d'hypotension sévères observées lors de transfusion de différents produits sanguins ont aussi été décrit. La nature multifactorielle des effets secondaires liés aux iECA ainsi que la susceptibilité individuelle font en sorte que les effets proinflammatoires de la bradykinine (BK) sont traditionnellement à l'origine de ces réactions indésirables.

Les études menées antérieurement en laboratoire et visant une approche physiopathologique ont montré que ces effets secondaires aigus résultent de la conjonction de différents facteurs qui affectent la synthèse, le métabolisme et l'action pharmacologique de la BK et surtout de la des-Arginine⁹-BK (des-Arg⁹-BK), médiateurs potentiels de ces complications rares mais potentiellement mortelles. Comme ces travaux ont décrit une anomalie du métabolisme des kinines portant de façon préférentielle sur la des-Arg⁹-BK due à une activité diminuée ou nulle de l'aminopeptidase P, seule voie métabolique plasmatique en présence d'un iECA, et

que le caractère inductible du récepteur B_1 au cours d'un processus inflammatoire permet d'imputer à la des-Arg⁹-BK un rôle potentiel comme médiateur de ces types de réactions indésirables, nous avons voulu préciser la nature multifactorielle de ces complications aiguës associées aux iECA. Pour ce faire, nous avons étudié de façon plus approfondie leurs aspects pharmacologiques soit d'une part en précisant la régulation de l'expression du gène codant pour le récepteur B_1 afin de mieux comprendre la signification physiopathologique d'une accumulation de son agoniste, la des-Arg⁹-BK, et d'autre part en explorant de nouvelles voies kinino-formatrices.

Ainsi, dans le cadre du présent travail, nous avons d'abord comparé l'effet d'un traitement chronique et aigu au moyen d'un iECA à celui du lipopolysaccharide (LPS) sur l'expression du récepteur B_1 . Dans cette approche expérimentale, l'administration chronique d'un iECA chez le porc associé à une hausse théorique des taux de BK a induit l'expression du récepteur B_1 au niveau de différents tissus dont la zone oropharyngée, site de prédilection de la réaction angioœdémateuse, chez le porc. Cependant, cette synthèse du récepteur B_1 nous a amené à nous interroger sur le mécanisme particulier sous-tendant celle-ci puisqu'elle ne semblait pas dépendre de l'inflammation chez les animaux traités au moyen d'un iECA.

Différents facteurs sont susceptibles d'induire la synthèse du récepteur B_1 . Nous avons alors entrepris l'étude de différents agents pharmacologiques sur le niveau d'expression du récepteur B_1 dans un modèle de cellules de muscle lisse de l'artère ombilicale humaine en culture. Cette caractérisation a permis de définir l'importance et la spécificité des voies de signalisation proposées régulant ce récepteur inductible couplé à la protéine G. Ainsi, il a été possible de déterminer les mécanismes

impliqués dans le processus fonctionnel de régulation à la hausse de l'expression du récepteur B₁ et par quels systèmes de seconds messagers ils sont relayés.

La suite de nos travaux a porté sur l'exploration d'autres voies métaboliques potentiellement responsables de la libération de kinines au niveau plasmatique et qui peuvent être à l'origine de la kininogénèse dans les effets indésirables associés aux iECA. L'activation du système de contact est considérée comme la voie kinino-formatrice principale du plasma mais le mécanisme kinino-formateur associé aux réactions d'hypotension sévères est cependant plus complexe, il dépend également du produit transfusé et aussi du receveur. Pour ce faire, nous avons documenté la concentration de kinines immunoréactives et pharmacologiquement actives dans des concentrés plaquettaires, prélevés dans les conditions requises, leucoréduits ou non et conservés à température ambiante. Ainsi, il a été possible de confirmer que le processus de leucoréduction est responsable d'une kinino-formation, modeste cependant, avec épuisement du kininogène de haut poids moléculaire et impliquant des médiateurs plasmatiques. Suite à l'activation *in vitro* du système de contact des plasmas correspondant aux concentrés plaquettaires, l'évaluation des profils cinétiques de génération des kinines suggère l'implication possible de deux mécanismes différents : l'activation du système de contact lors de la filtration et de la conservation, et peut-être l'activation de la fibrinolyse.

Ces résultats nous ont amené à comparer le pouvoir kinino-formateur des voies alternes de la kininogénèse, notamment par le biais de d'autres protéases à sérine ainsi que par l'activation des voies de la coagulation et de la fibrinolyse. Nous avons démontré que dans un système purifié la plasmine possède un effet comparable à la

kallicréine plasmatique sur la libération de la BK mais que cette dernière est plus faiblement libérée par le facteur Xa. Dans le cas de la thrombine, il y a eu formation de la BK mais aussi de la kallidine à partir du kininogène de haut et de faible poids moléculaire. Dans l'étude du tracé thromboélastographique du sang total, nous avons montré, tel que rapporté pour le plasma, que l'activation du système de contact est la voie principale conduisant à la libération de la BK. Le pouvoir kinino-formateur résultant de l'activation de la voie du facteur tissulaire est mineur lorsque comparé à la précédente. De plus, l'activation de la fibrinolyse par l'addition de l'activateur tissulaire plasminogène recombinant (rt-PA) simultanément avec l'activation des voies de la coagulation quant à elle n'a pas modifié de façon significative le profil métabolique de la BK mais s'accompagnait d'une vague tardive et importante de la des-Arg⁹-BK. Les résultats obtenus dans cette étude ouvrent donc des perspectives nouvelles sur l'existence possible de voies alternatives pour la génération de kinines. En conclusion, ce travail de doctorat principalement consacré à la régulation de l'expression du récepteur B₁ et aux voies kinino-formatrices alternes contribuent de façon significative à la connaissance de la physiopathologie multifactorielle des effets secondaires aigus associés aux iECA.

Mots clés : Kinines, bradykinine, des-Arginine⁹-BK, récepteur B₁, inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, angioœdème, réaction d'hypotension sévère, réaction anaphylactoïde, métallopeptidases

Résumé anglais et mots clés

The angiotensin I-converting enzyme inhibitors (ACEi) have emerged as a first-line therapy for a range of cardiovascular and renal diseases. Despite their clinical effectiveness, ACEi can cause acute side effects which depend on the clinical context : angioedema, anaphylactoid reactions caused by hemodialysis and severe hypotension reactions occurring during blood product transfusions. The multifactorial nature of ACEi-associated side effects and individual susceptibility are traditionally explained by the pro-inflammatory effects of bradykinin (BK).

Previous experiments conducted in the laboratory, using a pathophysiological approach, showed that these acute side effects are a consequence of the interaction between different factors affecting synthesis, metabolism and pharmacological action of BK and in particular, of des-Arginine⁹-BK (des-Arg⁹-BK), rare potential mediators that can potentially be life-threatening. To address the pathophysiology of these adverse reactions and explore the role of kinins, we studied their pharmacological properties in depth, first by detailing the regulation of B₁ receptor expression and by extension, the pathophysiological relevance of the accumulation of its agonist, des-Arg⁹-BK, and secondly by exploring novel kinin-forming pathways.

Therefore, in the present thesis, we first compared the effect of both chronic and acute treatment with either ACEi or lipopolysaccharide (LPS) on B₁ receptor gene expression. With this experimental approach, the chronic treatment of an animal with ACEi, associated with a theoretical increase of BK levels, induces the expression of an immunoreactive form of the B₁ receptor in different tissues

including the oropharynx, the preferred site of angioedematous reactions in the pig. Since the induction of B₁ synthesis did not seem to rely on inflammation in animals treated with ACEi, we decided to investigate the nature of the underlying mechanism.

Since several factors can induce the synthesis of B₁ receptor, we studied the effect of different pharmacological agents on B₁ receptor expression levels in a human muscle cells line model of umbilical artery. This characterization allowed us to define the importance and specificity of the signalling pathways regulating this G protein-coupled inducible receptor. Hence, it was possible to determine the mechanisms responsible for the increase in B₁ receptor levels as well as to delineate which secondary messengers were involved in this signalling pathway.

We then explored alternate kinin-forming pathways that might synthesize and release kinins into the plasma and therefore promote the undesirable effects associated with ACEi treatment. The contact system activation is considered to be the most important kinin synthesis pathway but another pathway, induced during severe hypotensive reactions, is more complex and depends on the transfused product and also upon the recipient. To study this pathway, we measured the concentration of immunoreactive and pharmacologically active kinins in platelet-enriched samples, obtained under standard conditions, with or without leukocyte depletion and stored at room temperature. In this manner, we have confirmed that the leukoreduction process is responsible for weak kinin synthesis, with a decrease in high-molecular-weight kininogen and involvement of plasma mediators. In addition, upon *in vitro* activation of the contact system in plasmas corresponding to platelet concentrates,

examination of kinin synthesis kinetic profiles suggested the implication of two distinct mechanisms : activation of the contact system during filtration and storage, or activation of fibrinolysis.

These results prompted us to compare the kinin-forming capacity of alternative pathways, namely via other serine proteases which play a pivotal role in the tissue factor and in the contact activation pathways of coagulation, and fibrinolysis. We demonstrated that in a purified system, the effects of plasmin and kallikrein to BK release are similar but that this same release is diminished by factor Xa. In the case of thrombin, there is synthesis of BK, but also of kallidin from high- and low-molecular-weight kininogens. In the study of whole blood thromboelastographic profile, we showed that, like in plasma, the kinin-forming capacity of the contact coagulation pathway was higher than that of the tissue factor pathway. These results not only confirm the kinetic parameters obtained in a purified system but also show that the anti-proteases present in whole blood are not able to completely inhibit the generation of kinins. The kinin synthesis potential resulting from tissue factor pathway activation is minor when compared to the previous one. Moreover, activation of fibrinolysis by addition of recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) simultaneously with the triggering of the coagulation pathways does not significantly modify the metabolic profiles of BK but has a dramatic effect on that of des-Arg⁹-BK. Therefore, the results obtained in this study open up the possibility that novel alternative kinin-forming pathways might exist.

In conclusion, the work presented in this thesis, mainly related to the regulation of the B₁ receptor expression and alternative kinin-forming pathways, and significantly

contributes to the knowledge of the multifactorial physiopathology of ACEi-linked acute side effects.

Keywords : Kinins, bradykinin, des-Arginine⁹-BK, B₁ receptor, angiotensin I-converting enzyme inhibitor, angioedema, severe hypotension reaction, anaphylactoid reaction, métallopeptidases

Table des matières

Résumé français et mots clés.....	iii
Résumé anglais et mots clés.....	vii
Table des matières.....	xi
Liste des tableaux.....	xvi
Liste des figures.....	xix
Liste des abréviations.....	xxii
Dédicace.....	xxvii
Remerciements.....	xxviii
Pensée.....	xxx

CHAPITRE PREMIER. INTRODUCTION.....32

I- Les Kinines33

1. Nature des kinines.....	33
2. Propriétés pharmacologiques : Récepteurs des kinines.....	35
2.1 Classification pharmacologique.....	37
2.1.1 Ordre potentiel des agonistes.....	37
2.1.2 Affinité des antagonistes.....	38
2.2 Classification moléculaire.....	41
2.2.1 Organisation et structure des gènes des récepteurs.....	41
2.2.2 Expression, désensibilisation et régulation des récepteurs.....	42
2.2.3 Seconds messagers.....	48
2.2.4 Rôle du récepteur B ₁	52
2.3 Effets pharmacologiques des kinines.....	55
3. Régulation de l'activité pharmacologique des kinines.....	57
3.1 Les systèmes kinino-formateurs.....	57
3.1.1 Les kininogènes : Précurseurs des kinines.....	60
3.1.2 Système kallibréine-kinine plasmatique.....	63

3.1.2.1 Prékallicroïne	63
3.1.2.2 Activation du système de contact du plasma.....	64
3.1.3 Système kallicroïne-kinine tissulaire	66
3.1.4 Autres mécanismes kinino-formateurs	67
3.1.5 Régulation de l'activité kininogénase	68
3.2 Métabolisme des kinines.....	69
3.2.1 Enzyme de conversion de l'angiotensine I.....	71
3.2.1.1 Définition et structure.....	71
3.2.1.2 Synthèse, régulation et localisation.....	73
3.2.1.3 Propriétés.....	74
3.2.1.3.1 Angiotensine <i>vs</i> kininase	74
3.2.1.3.2 Polymorphisme <i>I/D</i> de l'ECA	75
3.2.1.3.3 ECA2 <i>vs</i> ECA	76
3.2.1.3.4 Activité GPIase	77
3.2.2 Aminopeptidase P.....	78
3.2.2.1 Définition.....	78
3.2.2.2 Synthèse, localisation et propriétés	79
3.2.2.3 Régulation génétique	80
3.2.3 Carboxypeptidase M et N.....	81
3.2.4 Autres peptidases : Néprilysine, Aminopeptidase N, Dipeptidyl-peptidase IV et Carboxypeptidase U.....	81

II- Importances Physiopathologiques des Kinines85

1. Kinines et inflammation.....	85
2. Pouvoir cardioprotecteur des kinines.....	87
2.1 Les inhibiteurs de l'ECA	88
2.1.1 Définition des iECA.....	89
2.2 Indications cliniques des iECA	90
2.3 Effets pharmacologiques des iECA.....	91
2.3.1 Effets bénéfiques des iECA : rôle des kinines.....	92
2.3.2 BK, iECA et hypertension artérielle	92

2.3.3 Hypertrophie cardiaque, ischémie cardiaque et athérosclérose.....	93
2.3.4 Insuffisance cardiaque.....	94
2.3.5 Homéostasie rénale.....	95
3. Kinines et effets indésirables associés aux iECA.....	96
3.1 Les effets indésirables aigus des iECA.....	97
3.1.1 L'angioœdème chez le patient hypertendu et le patient insuffisant cardiaque.....	97
3.1.1.1 Définition, symptomatologie et incidence.....	97
3.1.1.2 Mécanismes physiopathologiques possibles.....	101
3.1.2 Les réactions d'hypersensibilité.....	103
3.1.2.1 Anaphylaxie <i>vs</i> anaphylactoïde.....	103
3.1.2.2 La réaction anaphylactoïde en hémodialyse.....	105
3.1.2.3 La réaction d'hypotension sévère en transfusion.....	106
3.1.2.4 Mécanismes physiopathologiques des RA et RHS.....	107
4. Les inhibiteurs des vasopeptidases.....	109
4.1 Définition et incidence.....	109

III- Le Système Kallibréine-Kinine comme Cible Thérapeutique.. 112

1. Le système kinino-formateur plasmatique.....	112
1.1 Contrôle de la voie kinino-formatrice.....	112
1.1.1 Inhibiteurs des protéases à sérine.....	112
1.1.2 DX88.....	115
1.1.3 Androgènes atténués.....	116
1.1.4 Agents antifibrinolytiques.....	116
1.1.5 Antagoniste du récepteur B ₂ : Icatibant [®] , HOE140.....	117
1.2 Traitement antithrombotique et les kinines.....	118
2. Métabolisme des kinines.....	120
3. Les récepteurs des kinines comme cible thérapeutique.....	121
3.1 Les récepteurs des kinines : B ₁ et B ₂	122
3.1.1 Diabète.....	122
3.1.2 Maladies cardiovasculaires.....	122

3.1.3 Inflammation, douleur et applications neurologiques123
 3.1.4 Angioœdème.....124

IV- Objectifs de l'Étude..... 126

PARTIE I :

**CHAPITRE II. EXPRESSION OF METALLOPEPTIDASES AND KININ RECEPTORS
 IN SWINE OROPHARYNGEAL TISSUES : EFFECTS OF
 ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME INHIBITION AND
 INFLAMMATION..... 130**

**CHAPITRE III. ROLE OF NUCLEAR FACTOR- κ B AND PROTEIN KINASE C
 SIGNALING IN THE EXPRESSION OF THE KININ B1 RECEPTOR
 IN HUMAN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS 142**

PARTIE II :

**CHAPITRE IV. GENERATION OF KININS DURING PREPARATION AND STORAGE
 OF WHOLE BLOOD-DERIVED PLATELET CONCENTRATES ... 152**

**CHAPITRE V. CONTRIBUTION OF COAGULATION AND FIBRINOLYSIS IN THE
 GENERATION OF KININS..... 165**

Abstract167
 5.1 Introduction168
 5.2 Materials and Methods170
 5.2.1 Reagents170
 5.2.2 Kinin releasing capacity of different coagulation factors and plasmin
 170
 5.2.2.1 Kinetic parameters of the different kininogenase activities .170
 5.2.2.2 Identification of the NH₂-part of immunoreactive BK.....172
 5.2.2.3 Pharmacological characterization of immunoreactive BK ..172
 5.2.3 Kinin-forming capacity associated with the contact and the tissue
 factor coagulation pathways and with fibrinolysis in whole blood..173

5.2.3.1 Blood samples	173
5.2.3.2 Activation of the tissue factor and of the contact coagulation pathways and fibrinolysis.....	173
5.2.3.2 Measurement of immunoreactive kinins.....	174
5.3.4 Statistical analysis	175
5.3 Results.....	176
5.3.1 Kinin releasing capacity of different coagulation factors and plasmin	176
5.3.1.1 Kinetic parameters of the different kininogenase activities .	176
5.3.1.2 Characterization of immunoreactive BK by HPLC coupled with immunograms.....	176
5.3.1.3 Specificity of thrombin	177
5.3.1.4 Radioreceptor assay of immunoreactive BK generated by the action of purified serine proteases on pure kininogens	177
5.3.2 Kinin-forming capacity associated with the tissue factor and contact coagulation pathways and with the fibrinolysis pathway in whole blood	178
5.3.2.1 Activation of the tissue factor and contact pathways and of fibrinolysis.....	178
5.3.2.2 Characterization of immunoreactive kinins by HPLC	179
5.4 Discussion	180
Addendum	185
Acknowledgments.....	185
Dedication.....	185
References.....	186
Figure Legends	189
CHAPITRE VI. DISCUSSION & CONCLUSION	197
CHAPITRE VII. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	211
CHAPITRE VIII. ANNEXES	240

Liste des tableaux

(Lorsque soulignés, les numéros de page correspondent à la pagination de la publication originale, non de cette thèse)

CHAPITRE PREMIER. INTRODUCTION.

Tableau I. Séquence en acides aminés des kinines chez l’humain34

Tableau II. Nomenclature et propriétés des récepteurs des kinines chez l’humain selon « International Union of Pharmacology (IUPHAR) ». (Tableau adapté de (Gabra, Couture et al. 2003; Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005))36

Tableau III. Classification des différentes formes d’angiœdème. (Tableau adapté de (Bouillet, Ponard et al. 2000; Bouillet, Ponard et al. 2004)99

Tableau IV. Agents étiologiques potentiels à l’origine du choc anaphylactique et du choc anaphylactoïde introduits par voie systémique, locale ou digestive. (Tableau adapté de (Kemp and Lockey 2002))105

Tableau V. Caractéristiques des patients hypertendus ou insuffisants cardiaques ayant présenté un AO lors d’un traitement par énalapril ou par omapatrilat (études OCTAVE et OVERTURE) (Packer, Califf et al. 2002; Kostis, Packer et al. 2004; Kostis, Kim et al. 2005)111

CHAPITRE II. EXPRESSION OF METALLOPEPTIDASES AND KININ RECEPTORS IN SWINE OROPHARYNGEAL TISSUES: EFFECTS OF ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME INHIBITION AND INFLAMMATION.

Table 1. Oligonucleotides for real-time PCR. Sequences are derived from GenBank accession numbers AF017079 (GAPDH), AF540788 [B₁ receptor (B₁R)], AB051422 [B₂ receptor (B₂R)], U55039 (mAPP), and NM_000902 (NEP)1067

Table 2.	Enzymatic activity of ACE, APP, and carboxypeptidase N (CPN) (nmol·min ⁻¹ ·ml ⁻¹) in plasma before treatment (T ₀) and prior to sacrifice (T _s) <u>1068</u>
Table 3.	Log of normalized ratios for métallopeptidases in oropharyngeal and kidney tissues <u>1071</u>
Table 4.	Log of normalized ratios for kinin B ₂ receptor in oropharyngeal and kidney tissues <u>1072</u>
Table 5.	Metallopeptidases activities in tissues from control animals ... <u>1072</u>

CHAPITRE III. ROLE OF NUCLEAR FACTOR- κ B AND PROTEIN KINASE C SIGNALING IN THE EXPRESSION OF THE KININ B₁ RECEPTOR IN HUMAN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS.

Table 1.	Oligonucleotides for real-time PCR. Sequences derived from GenBank accession numbers NM_002046 (GAPDH) and NM_000710 (B ₁ receptor) <u>951</u>
-----------------	---

CHAPITRE IV. GENERATION OF KININS DURING PREPARATION AND STORAGE OF WHOLE BLOOD-DERIVED PLATELET CONCENTRATES.

Table 1.	PLT content, WBC count, and volume of unfiltered and filtered PCs and PPPs before storage <u>412</u>
Table 2.	Distribution of BK levels in unfiltered and filtered PCs during storage at 20 to 24°C <u>414</u>
Table 3.	The variability of BK and des-Arg ⁹ -BK levels in unfiltered and filtered PCs during storage at 20 to 24°C <u>414</u>
Table 4.	BK levels (pg/mL) in unfiltered and filtered PCs and PPPs during 5 days of storage at 20 to 24°C with continuous agitation <u>416</u>

CHAPITRE V. CONTRIBUTION OF COAGULATION AND FIBRINOLYSIS IN THE GENERATION OF KININS.

Table 1. Incubation conditions and kinetic constants for the hydrolysis of HK and LK by kallikrein, plasmin, factors IIa and Xa for immunoreactive BK191

Liste des figures

(Lorsque soulignés, les numéros de page correspondent à la pagination de la publication originale, non de cette thèse)

CHAPITRE PREMIER. INTRODUCTION.

- Figure 1.** Représentation schématique de la séquence en acides aminés constituant les récepteurs B₁ (A) et B₂ (B) humains. (Figure adaptée de (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005))45
- Figure 2.** Voies de signalisation et transduction des signaux associées à l'activation des récepteurs B₁ et B₂ des kinines. (Figure adaptée de (Moreau, Garbacki et al. 2005))51
- Figure 3.** Système kallibréine-kinine et les interactions avec la cascade intrinsèque et extrinsèque de la coagulation ainsi que la fibrinolyse. (Figure adaptée de (Moreau, Garbacki et al. 2005)) ..59
- Figure 4.** Schéma de la structure et des fonctions du KHPM chez l'humain. (Figure adaptée de (Tayeh, Olson et al. 1994))62
- Figure 5.** Les systèmes kallibréine-kinine et rénine-angiotensine où l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) assure une interaction entre les deux systèmes72
- Figure 6.** Cibles pharmacologiques qui modulent l'activité du système kallibréine-kinine. (Figure adaptée de (Moreau, Garbacki et al. 2005))113

CHAPITRE II. EXPRESSION OF METALLOPEPTIDASES AND KININ RECEPTORS IN SWINE OROPHARYNGEAL TISSUES: EFFECTS OF ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME INHIBITION AND INFLAMMATION.

- Figure 1.** Systemic inflammatory response1068
- Figure 2.** AUC of immunoreactive bradykinin and des-Arg⁹-BK1069
- Figure 3.** Amplification specificity by real-time PCR1070

Figure 4. Log of the normalized ratio B₁ receptor mRNA/GAPDH mRNA in oropharyngeal tissues and kidneys1071

Figure 5. Immunohistochemistry in porcine lingual tissue1073

CHAPITRE III. ROLE OF NUCLEAR FACTOR-κB AND PROTEIN KINASE C SIGNALING IN THE EXPRESSION OF THE KININ B₁ RECEPTOR IN HUMAN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS.

Figure 1. Specific binding of [³H]Lys-des-Arg⁹-BK to serum-starved human umbilical artery SMCs further treated for 4 h with the indicated stimuli before the binding assays951

Figure 2. Ancillary radioligand binding experiments involving serum-starved smooth muscle cells952

Figure 3. Effect of drugs or drug combinations (1 h) on the subcellular localization of NF-κB subunits in serum-starved SMCs: sample photographic record of the immunofluorescence of p65 (original magnification, 400×)952

Figure 4. NF-κB regulation of B₁ receptor expression in human SMCs ..953

Figure 5. Effect of inhibitory drugs on the stimulated cell surface B₁ receptor density in SMCs estimated using the specific binding of [³H]Lys-des-Arg⁹-BK (1 nM)953

Figure 6. Silencing of NF-κB p65 in human SMCs953

Figure 7. Effect of actinomycin D (2 μM, 3 h) on the B₁ receptor mRNA/GAPDH mRNA ratio determined by real-time RT-PCR in HUA SMCs prestimulated with IL-1β (5 ng/ml, 1 h), FBS or human serum (HS) (20%, 1 h), PMA (1 μM, 1 h), CHX (71 μM, 1 h) or Lys-des-Arg⁹-BK (100 nM, 1 h)954

Figure 8. Effect of inhibitory drugs on B₁ receptor mRNA regulated by IL-1β (5 ng/ml), FBS (20%), or PMA (1 μM) in SMCs954

Figure 9. Schematic representation of the regulation of B₁ receptor expression in SMCs955

CHAPITRE IV. GENERATION OF KININS DURING PREPARATION AND STORAGE OF WHOLE BLOOD-DERIVED PLATELET CONCENTRATES.

Figure 1. Preparation of PCs and PPPs from whole blood by centrifugation411

Figure 2. Log data for BK and des-Arg⁹-BK in unfiltered and filtered PCs during 7 days storage415

Figure 3. Generation of BK during *in vitro* contact activation of plasma from two pools of three PPPs each416

Figure 4. Typical elution profile of immunoreactive kinins after HPLC ..417

CHAPITRE V. CONTRIBUTION OF COAGULATION AND FIBRINOLYSIS IN THE GENERATION OF KININS.

Figure 1. Typical elution profile of immunoreactive kinins after HPLC chromatography192

Figure 2. Specificity of the kininogenase activity of thrombin193

Figure 3. Kinetic profiles of BK and des-Arg⁹-BK comparatively with thrombus formation194

Figure 4. Kinetic profiles of BK and des-Arg⁹-BK presented in parallel with thrombus formation and lysis195

Figure 5. Area under the curves (AUC) of immunoreactive BK and des-Arg⁹-BK196

Liste des abréviations

-A-	Abz :	acide <i>o</i> -aminobenzoïque
	AC :	adénylate cyclase
	ACE :	angiotensin I-converting enzyme; enzyme de conversion de l'angiotensine I
	ACEi :	ACE inhibitor(s); inhibiteur(s) de l'ACE
	ADN :	acide désoxyribonucléique
	ADNc :	ADN complémentaire
	AE :	angioedema; angioœdème
	AMPc :	adénosine-5 ¹ -monophosphate cyclique
	ANG :	angiotensine
	ANP :	atrial natriuretic peptide; peptide natriurétique atrial
	AO :	angioœdème
	AOA :	angioœdème acquis
	AOH :	angioœdème héréditaire
	APN :	aminopeptidase N
	APP :	aminopeptidase P
	APPc :	APP cytosolique
	APPm :	APP membranaire
	ARNm :	acide ribonucléique messenger
	AT1 :	récepteur 1 de l'angiotensine II
	AUC :	area under the curve; aire sous la courbe
-B-	B ₁ R :	B ₁ receptor; récepteur B ₁
	B ₂ R :	B ₂ receptor; récepteur B ₂
	BK :	bradykinine
	B _{max} :	cell surface abundance
-C-	C1INH :	inhibiteur de la C1-estérase
	Ca ²⁺ :	calcium
	CHAPS :	acide 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-

	propanesulfonique
CHX :	cycloheximide
CGRP :	calcitonine-gene related peptide
CML :	cellules du muscle lisse
CNP :	C-natriuretic peptide; peptide natriurétique-C
COX-2 :	cyclooxygénase-2
Cp :	crossing point
CP2D :	citrate-monobasic sodium phosphate-dextrose
CPM :	carboxypeptidase M
CPN :	carboxypeptidase N
CPU :	carboxypeptidase U
CV :	coefficient de variation
-D- Da :	dalton
DAG :	diacylglycérol
des-Arg ⁹ -BK :	des-Arginine ⁹ -bradykinine
des-Arg ¹⁰ -KD :	des-Arginine ¹⁰ -kallidine
DMSO :	diméthyl sulfoxyde
Dnp :	2,4-dinitrophényl
DPP IV :	dipeptidyl-peptidase IV
DRY :	Asp-Arg-Tyr; aspartate-arginine-tyrosine
-E- ECA :	enzyme de conversion de l'angiotensine I
ECA2 :	enzyme de conversion de l'angiotensine I-2
ED50 :	effective dose 50
EDHF :	facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EIA :	immunoessai enzymatique
eNOS :	NO-synthase endothéliale
ER :	réticulum endoplasmique
-F- FBS :	fetal bovine serum; sérum fœtal bovin
FT :	facteur tissulaire
FX :	facteur X de la coagulation
FXI :	facteur XI de la coagulation

	FXIa :	facteur XI activé
	FXII :	facteur XII de la coagulation, facteur de Hageman
	FXIIa :	facteur XII activé
-G-	GAPDH :	glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
	GC :	guanylate cyclase
	GF109203x :	3-[1-[3-(diméthylamino)propyl]-1 <i>H</i> -indol-3-yl]-4-(1 <i>H</i> -pyrrole-2,5-dione monohydrochloride
	GFP :	green fluorescent protein; protéine fluorescente verte
	GMPc :	guanosine-5 ¹ -monophosphate cyclique
	GPI :	glycosylphosphatidylinositol
-H-	H :	histidine
	HEK293 :	human embryonic kidney 203 cells; cellules embryonnaires humaines de reins
	HEXXH :	His-Glu-XX-His; histidine-glutamate-XX-histidine
	HK :	high-molecular-weight kininogen; kininogènes de haut poids moléculaire
	HUA :	human umbilical artery; artère ombilicale humaine
-I-	iECA :	inhibiteur(s) de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I
	Ig :	immunoglobuline
	IL :	interleukine
	IP :	récepteur des prostaglandines I
	IP ₃ :	inositol-1,4,5-triphosphate
	iVP :	inhibiteur(s) des vasopeptidases
-J-	JAK :	janus kinase
	JNK :	kinase c-Jun
-K-	K :	lysine
	K ⁺ :	potassium
	k_{cat} :	turnover number, catalytic constant; constante catalytique
	K_D :	affinity constant; constante d'affinité
	KD :	kallidine
	kDa :	kilo Dalton

	KFPM :	kininogène de faible poids moléculaire
	KHPM :	kininogène de haut poids moléculaire
	K_i :	constante d'inhibition
	KK :	kallicréine
	K_m :	constante de Michaelis-Menten
-L-	LK :	low-molecular-weight kininogen; kininogènes de faible poids moléculaire
	LPS :	lipopolysaccharide
-M-	MAPK :	mitogen-activated protein-kinases
	mAPP :	membrane-bound aminopeptidase P; aminopeptidase P membranaire
	Mn^{2+} :	manganèse
-N-	NEP :	neutral endopeptidase 24.11, neprilysin; néprilysine
	NF- κ B :	nuclear transcription factor- κ B; facteur de transcription nucléaire- κ B
	NO :	nitric oxide; monoxyde d'azote
	NOS :	NO-synthase
	NPXXY :	Asn-Pro-XX-Tyr; asparagine-proline-XX-tyrosine
-O-	Oic :	acide octahydroindole-2-carboxylique
-P-	P :	proline
	PAI-1 :	plasminogen activator inhibitor-1; inhibiteur de l'activateur tissulaire du plasminogène-1
	PC(s) :	platelet concentrate(s); concentré(s) plaquettaire(s)
	PG :	prostaglandine
	PKA :	protein kinase A; protéine kinase A
	PKC :	protein kinase C; protéine kinase C
	PKG :	protein kinase G; protéine kinase G
	PKK :	pré-kallicréine ou pro-kallicréine
	PLA ₂ :	phospholipase A ₂
	PLC :	phospholypase C
	PLT :	platelet; plaquettes

	PMA :	phorbol 12-myristate 13-acetate
	PPP(s) :	PLT-poor plasma; plasma pauvre en plaquettes
	PRP :	platelet-rich plasma; plasma riche en plaquettes
-R-	RA :	réaction anaphylactoïde
	RHS :	réaction d'hypotension sévère
-S-	Sar :	sarcosine
	siRNA :	small interfering RNA
	SMC(s) :	smooth muscle cell(s); cellules du muscle lisse
	SNP :	single nucleotide polymorphism; polymorphisme nucléotidique
	STAT :	signaux transducteurs et activateurs de la voie de la transcription
-T-	t ^{1/2} :	half-life; temps de demi-vie
	TFA :	acide trifluoroacétique
	TFPI :	tissue factor pathway inhibitor; inhibiteur de la voie du facteur tissulaire
	Thi :	β-(2-thiényl)alanine
	Tic :	acide tétrahydroisoquinoline-3-carboxylique
	TNF-α :	tumor necrosis factor α; facteur de nécrose tumorale α
	(r)t-PA :	(recombinant) tissue-plasminogen activator; activateur tissulaire du plasminogène (recombinant)
-U-	u-PA :	urokinase-plasminogen activator; activateur de l'urokinase plasminogène
-V-	VP :	vasopeptidase(s)
	vWF :	facteur von Willebrand
-W-	WBCs :	white blood cells; globules blancs
-Y-	YFP :	yellow fluorescent protein; protéine fluorescente jaune
-Z-	Zn :	zinc

À mes parents

Remerciements

Une thèse est le résultat d'un travail de longue haleine. C'est le fruit de multiples discussions au cours de diverses collaborations...

Cette thèse n'aurait vu le jour sans la confiance, la patience et la générosité de mon directeur de recherche, *Albert Adam*, professeur titulaire de la Faculté de pharmacie, qui m'a accueilli dans son laboratoire afin d'entreprendre des études de doctorat. Au cours de toutes ces années, monsieur Adam m'a guidé, encouragé, conseillé et a su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, tout en y gardant un œil critique et avisé. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour sa grande disponibilité, sa rigueur scientifique ainsi que pour avoir cru en mes capacités. J'espère que cette thèse sera un remerciement suffisant au soutien et à la confiance sans cesse renouvelée dont il a fait preuve en mon égard.

Je remercie également le Dr *Pascal Dubreuil* de la Faculté de médecine vétérinaire, qui en agissant à titre de codirecteur, a su m'initier à une toute autre discipline.

De plus, j'aimerais souligner la contribution importante réalisée par les Drs *François Marceau* du Centre de recherche en rhumatologie et immunologie de Québec, et *Georges-Etienne Rivard* de l'hôpital Ste-Justine. Je les remercie sincèrement de m'avoir témoigné confiance et j'éprouve un profond respect pour leur travail, leur parcours ainsi que pour leurs qualités humaines.

Je remercie tous ceux et celles sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Je pense ici à *Nicole Gervais* pour son soutien technique, à messieurs *Yves Lepage* et

○ *Aliguel Chagnon* du département de mathématiques et statistique pour leur aide précieuse et finalement, à *Justin Rousselle*, *Nancy Rodrigue* et aux stagiaires qui ont participé activement à la partie expérimentale de ce travail.

Faire un doctorat est une échappée solitaire au milieu de compagnons de fortune (ou d'infortune...) et on ne se rend pas toujours compte à quel point ils peuvent être importants dans le travail et dans la vie, jusqu'au jour où nos chemins se séparent. Merci à *Isabelle*, que je n'ai connu que trop tard; à *Anik*, une partenaire de travail hors pair; et à *Karine*, pour son amitié. Un merci tout particulier à *Giuseppe* en témoignage du temps qu'il m'a accordé lors de mes premières années au laboratoire ainsi que pour son aide, ses nombreux et justicieux conseils, son soutien sans faille et son amitié.

Cela va de soi, j'adresse toute ma gratitude à mes parents, *Denis* et *Monna*, à ma sœur, *Amélie*, ainsi qu'à mon oncle *Harold*, qui ont, dans l'ombre ou la lumière, participé à ma réalisation personnelle et à celle de cette thèse. Merci pour leur irremplaçable et inconditionnel soutien. Ils ont toujours été présents pour écarter les doutes, soigner les blessures et partager les joies. Cette thèse est un peu la leur aussi.

Mes remerciements vont également à ma « deuxième famille », *Rock*, *Ad* et leurs enfants, *Isaac* et *Aude*, mes amis, mes complices, qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de cette aventure.

Finalement, merci à Vétoquinol Canada, à Bayer Canada, à la Faculté des études supérieures et principalement à *Albert Adam* pour leur appui financier.

Impossible n'est pas français

Napoléon Bonaparte

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION

I- Les Kinines

1. Nature des kinines

Chez la majorité des mammifères, le terme « kinine » fait référence au nonapeptide bradykinine (BK), au décapeptide kallidine (KD) et à leurs métabolites actifs dépourvus de l'arginine en position carboxy-terminale, des-arginine⁹-BK (des-Arg⁹-BK) et des-arginine¹⁰-KD (des-Arg¹⁰-KD) (**Tableau I**). La première mise en évidence et identification de la BK a été réalisée par Rocha e Silva et collaborateurs (Rocha e Silva, Beraldo et al. 1949; Konzett and Stuermer 1960; Lewis 1960), toutefois ce ne fut qu'en 1960 qu'elle sera isolée pour la première fois et que sa structure primaire sera établie (Elliott, Lewis et al. 1960; Elliott, Horton et al. 1961). La BK comporte 5 acides aminés différents, soit l'arginine, la proline, la glycine, la phénylalanine et la sérine en proportion molaire 2:3:1:2:1 alors que la KD possède un résidu lysine en position amino-terminale. La famille des kinines regroupe donc des peptides effecteurs possédant 8 à 10 acides aminés dont la structure primaire et les propriétés pharmacologiques sont similaires. Contrairement à d'autres médiateurs, les kinines ne sont pas préformées, mais sont générées localement à partir de leur précurseur sous l'action de différentes kininogénases. Elles doivent donc être considérées comme des substances autocrines ou paracrines plutôt que comme des hormones et sont parmi les premiers médiateurs de l'inflammation libérés au niveau d'un tissu lésé (Bhoola, Figueroa et al. 1992).

Des travaux effectués à la fois dans des modèles expérimentaux et chez l'homme suggèrent qu'une diminution de la synthèse de ce peptide favoriserait le

développement de l'hypertension artérielle. Hormis son implication dans les processus inflammatoires, la BK serait produite à la suite de stimuli nociceptifs et possède donc le statut de neuromédiateur. Des données expérimentales suggèrent qu'elle est emmagasinée dans des neurones du système nerveux central au niveau duquel elle pourrait jouer ce rôle dans certaines fonctions cérébrales, en particulier dans le contrôle des informations nociceptives et de la pression artérielle mais aussi comme régulateur de plusieurs fonctions vasculaires et rénales (Gabra, Couture et al. 2003). De plus, la littérature récente met en lumière de «nouveaux effets» de la BK dans le contrôle de la prolifération cellulaire et de la synthèse des protéines matricielles (Bascands, Schanstra et al. 2003). Les kinines jouent un rôle crucial dans différents processus physiopathologiques tant au niveau clinique que fondamental. Donc, ce sont des médiateurs qui peuvent agir sur les cellules endothéliales mais aussi sur le muscle lisse, les neurones sensoriels afférents et d'autres tissus (Bhoola, Figueroa et al. 1992; Blais, Marceau et al. 2000; Campbell 2001; Couture, Harrison et al. 2001; Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005).

Tableau I. *Séquence en acides aminés des kinines chez l'humain.*

Kinines	Séquences Peptidiques									
<u>Agonistes B₂ :</u>										
Bradykinine (BK)	Arg ¹ -	Pro ² -	Pro ³ -	Gly ⁴ -	Phe ⁵ -	Ser ⁶ -	Pro ⁷ -	Phe ⁸ -	Arg ⁹ -	
Kallidine (KD)	Lys-	Arg ¹ -	Pro ² -	Pro ³ -	Gly ⁴ -	Phe ⁵ -	Ser ⁶ -	Pro ⁷ -	Phe ⁸ -	Arg ⁹ -
<u>Agonistes B₁ :</u>										
des-Arg ⁹ -BK	Arg ¹ -	Pro ² -	Pro ³ -	Gly ⁴ -	Phe ⁵ -	Ser ⁶ -	Pro ⁷ -	Phe ⁸ -		
des-Arg ¹⁰ -KD	Lys-	Arg ¹ -	Pro ² -	Pro ³ -	Gly ⁴ -	Phe ⁵ -	Ser ⁶ -	Pro ⁷ -	Phe ⁸ -	

2. Propriétés pharmacologiques : Récepteurs des kinines

Les kinines sont dotées d'une variété d'effets biologiques tous relayés par l'activation de deux types de récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G : le récepteur B₂, constitutif et le récepteur B₁, inductible en présence de cytokines, d'endotoxines ou de lésions tissulaires (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). Leur présence à la surface de différents types cellulaires et tissus est responsable de leurs activités pharmacologiques variées associées aux kinines. Ces récepteurs ont été initialement définis selon des critères pharmacologiques avant leur caractérisation moléculaire par l'usage d'agonistes et d'antagonistes peptidiques et non peptidiques (Regoli, Barabe et al. 1977; Regoli and Barabe 1980; Regoli, Drapeau et al. 1986; Regoli, Rizzi et al. 2001). Par leur profil pharmacologique, il a été possible de confirmer l'existence de deux types de récepteurs. Ces récepteurs ont des caractéristiques similaires mais distinctes confirmées génétiquement en 1992 et 1994 (Hess, Borkowski et al. 1992; Menke, Borkowski et al. 1994).

Deux classes de ligand pour les récepteurs des kinines correspondant à chacun des types de récepteur (B₁ et B₂) sont connues : la BK et la KD sont des agonistes endogènes du récepteur B₂, alors que la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD sont les agonistes préférentiels du récepteur B₁ (Marceau, Hess et al. 1998; Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). Un résumé des propriétés de ces récepteurs est énuméré au

Tableau II.

Tableau II. *Nomenclature et propriétés des récepteurs des kinines chez l'humain selon « International Union of Pharmacology (IUPHAR) ». (Tableau adapté de (Gabra, Couture et al. 2003; Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005)).*

	Récepteur B ₁	Récepteur B ₂
Nom par IUPHAR	B ₁	B ₂
Famille	Récepteur heptahélicoïdal	Récepteur heptahélicoïdal
Protéine G	G α_q /G α_i	G α_q /G α_i
Gène/chromosome-locus	<i>BDKRB1</i> /14q32.2	<i>BDKRB2</i> /14q32.2
Nombre d'acides aminés	353	391 ^a
<u>Régulation primaire</u>		
Expression	Inductible	Constitutive
Signalisation	Aucune désensibilisation ou limitée	Désensibilisation
<u>Agoniste/Antagoniste</u>		
Agoniste sélectif	Lys-des-Arginine ⁹ -BK	BK
Structure	Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg
Antagoniste sélectif	Lys-[Leu ⁸]des-Arginine ⁹ -BK	HOE140 (Icatibant)

^a incluant la séquence en amino-terminal codée par l'exon 2 (27 résidus) (AbdAlla, Godovac-Zimmermann et al. 1996)

Ces récepteurs se différencient par la nature de leurs agonistes et antagonistes mais aussi par leur structure moléculaire et leur mode d'expression. Le récepteur B₂ est responsable des réponses des kinines observées lors des processus inflammatoires et douloureux (Couture, Harrison et al. 2001; Gabra, Couture et al. 2003) mais également des effets vasoactifs de la BK. De plus, la participation du récepteur B₂ aux effets vasculaires bénéfiques des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (iECA) utilisés dans le traitement des maladies cardiovasculaires, effets cardioprotecteurs et antihypertenseurs des iECA, est généralement bien acceptée et

démontrée tant dans des modèles expérimentaux que chez l'homme (Linz, Wiemer et al. 1995; Perez, Molinaro et al. 2001). Ce récepteur est donc responsable des réponses à court terme des kinines dû à la désensibilisation du récepteur. Le récepteur B₁ participerait, quant à lui, à la phase chronique de ces réponses, serait responsable des actions localisées à long terme et jouerait un rôle stratégique dans les maladies ayant une forte composante immune telles que l'arthrite rhumatoïde et la sclérose en plaque (Farmer, McMillan et al. 1991; Blais, Couture et al. 1997; Prat, Weinrib et al. 1999; Prat, Biernacki et al. 2000).

2.1 Classification pharmacologique

2.1.1 Ordre potentiel des agonistes

Le récepteur B₂ possède une grande affinité pour les kinines dites « natives » générées dans le plasma et les tissus par la kallibréine plasmatique ou tissulaire, soit la BK et la KD (Blais, Marceau et al. 2000; Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005; Moreau, Garbacki et al. 2005). Ces kinines comportent un résidu arginine à l'extrémité carboxy-terminale qui est essentiel à son interaction avec les récepteurs B₂ constitutivement exprimés (Regoli and Barabe 1980). Bien que les récepteurs B₁ aient une certaine affinité pour la KD chez le lapin, ils lient préférentiellement les métabolites dérivés des kinines natives où le résidu arginine en position carboxy-terminale a été clivé (Babiuk, Marceau et al. 1982). En effet, le récepteur B₁ est spécifique aux métabolites de la BK et de la KD, la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD, générés par des carboxypeptidases (Marceau, Hess et al. 1998; Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). Aucun des fragments de la BK ne conserve toutefois une affinité significative pour le récepteur B₂. Pour le récepteur B₁ humain et de certains

mammifères (lapin, porcin, bovin mais non les rongeurs utilisés en laboratoire), des-Arg¹⁰-KD serait le seul agoniste naturel tandis que des-Arg⁹-BK serait d'affinité plus faible (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005; Morissette and Marceau 2006).

Quelques agonistes synthétiques du récepteur B₁ ont aussi été décrits dans la littérature. Sar-[D-Phe⁸]des-Arg⁹-BK représente ce genre de molécule; il a été construit afin d'améliorer la résistance des agonistes du récepteur B₁ aux peptidases telles que l'ECA, l'endopeptidase neutre et l'aminopeptidase P (Drapeau, deBlois et al. 1991; Marceau, Hess et al. 1998). Malgré cette résistance au métabolisme enzymatique, l'utilisation d'un agoniste pour le traitement des affections cardiovasculaires est peu envisageable dû à leur effet proinflammatoire.

2.1.2 Affinité des antagonistes

Les tentatives de développer des peptides analogues comme antagonistes des récepteurs des kinines datent de la fin des années 1970. Les antagonistes pour le récepteur B₁ ont été découverts par Regoli et ses collaborateurs presque 10 ans avant les antagonistes pour le récepteur B₂, ce qui justifie la nomenclature des récepteurs puisque le récepteur B₁ fut le premier à être complètement caractérisé pharmacologiquement (Regoli, Barabe et al. 1977). Le développement de peptides antagonistes sélectifs a été crucial pour démontrer l'existence des deux types de récepteurs des kinines (Regoli and Barabe 1980; Vavrek and Stewart 1985).

Les premiers composés développés pour antagoniser les effets pharmacologiques de la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD avec une spécificité pour le récepteur B₁ inclus les prototypes suivants : [Leu⁸]des-Arg⁹-BK et Lys-[Leu⁸]des-Arg⁹-BK (Regoli, Barabe et

al. 1977). Cette première génération de peptides antagonistes sélectifs des récepteurs B_1 a été obtenue en substituant le résidu phénylalanine en position carboxy-terminale par des acides aminés avec une chaîne aliphatique ou hydrocarbonée saturée dans les séquences d'agonistes originaux (Regoli, Barabe et al. 1977; Regoli and Barabe 1980). Toutefois, ces premiers prototypes, largement employés pour étudier le rôle des récepteurs B_1 dans l'inflammation et la nociception, démontrent des propriétés relevant beaucoup plus d'un agoniste partiel chez certaines espèces, spécialement chez les rongeurs (Marceau, Hess et al. 1998). Ceci engendre des complications au niveau pratique puisqu'une des applications thérapeutiques potentielles des antagonistes du récepteur B_1 pourrait être l'analgésie mais les études s'effectuent majoritairement chez ces modèles. La seconde génération d'antagonistes du récepteur B_1 inclut un résidu lysine en position amino-terminale et les modifications apportées au prototype de la première génération permet une plus grande affinité pour le récepteur B_1 ainsi qu'une amélioration de la stabilité et de la sélectivité de l'antagoniste pour ce récepteur (Marceau, Hess et al. 1998; Regoli, Nsa Allogho et al. 1998; Regoli, Rizzi et al. 2001). Cette seconde génération d'antagonistes peptidiques du récepteur B_1 garde tout de même un intérêt thérapeutique potentiel pour le traitement de l'inflammation et la douleur (Marceau and Regoli 2004).

La première génération d'antagonistes du récepteur B_2 fut découverte par Vavrek et Stewart en 1985, ils ont été les premiers à montrer que le remplacement d'une proline en position 7 par un résidu D-phénylalanine (D-[Phe⁷]-BK) pourrait être un analogue de transition acceptable (Vavrek and Stewart 1985). Cependant, ces premiers composés peptidiques possèdent une activité antagoniste/agoniste partielle.

Ce problème fut partiellement résolu avec l'ajout d'un acide aminé non-naturel β -(2-thiényl)alanine (Thi) modifiant le squelette peptidique. La rigidité ainsi acquise permet une orientation spatiale optimisée de la région carboxy-terminale essentielle à l'activité antagoniste. Subséquemment, le remplacement de la D-Phe⁷ par l'acide tétrahydroisoquinoline-3-carboxylique (Tic) et de la Thi⁸ par l'acide octahydroindole-2-carboxylique (Oic) entraîne le développement de la seconde génération d'antagonistes peptidiques du récepteur B₂ qui ont un potentiel et une stabilité *in vivo* améliorés (Lembeck, Griesbacher et al. 1991). Le représentant de cette vague d'antagonistes est le HOE140 (Icatibant, D-Arg-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK). L'activité inhibitrice de ce composé a été rapportée dans plus de 700 articles de recherche et au-delà de 15 études cliniques (Hock, Wirth et al. 1991). De plus, le peptide HOE140 a eu quelques succès cliniques comme médicament dans le traitement de l'asthme bronchique et les rhinites allergiques (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). Administré de façon systémique, HOE140 est actuellement sous essais cliniques pour le traitement de l'angioœdème héréditaire (Rosenkrans, Russmann et al. 2004; Bas, Bier et al. 2006; Bas, Adams et al. 2007; Bork, Frank et al. 2007).

Les efforts pour synthétiser une troisième génération d'antagonistes des récepteurs des kinines ont été orientés vers le développement d'antagonistes non-peptidiques. La synthèse du premier antagoniste non-peptidique pour le récepteur B₂ humain, WIN 64338, a été décrite en 1993 (Salvino, Seoane et al. 1993; Sawutz, Salvino et al. 1994). Un regard plus pointu sur la structure de la plupart des séries d'antagonistes non-peptidiques du récepteur B₁ récemment publiés révèle la présence possible d'un

squelette moléculaire commun semblable à celui présent dans un sous-ensemble d'antagonistes non-peptidiques du récepteur B₂ (Marceau 2005). Ainsi, la conclusion selon laquelle ces antagonistes non-peptidiques des kinines possèdent une certaine similarité amène l'hypothèse que ces structures peuvent interagir avec l'un ou l'autre des récepteurs, ou même possèdent une affinité pour les deux récepteurs (Fortin and Marceau 2006). Bien que les récepteurs B₁ et B₂ aient des effets similaires dans l'hyperalgésie chez différents modèles d'inflammation expérimentale, l'efficacité thérapeutique potentielle d'un antagoniste dit « mixte » pour les récepteurs B₁ et B₂ demeure indéterminée.

Finalement, bien que le domaine de la pharmacologie des kinines ait fait un progrès impressionnant depuis les 30 dernières années, l'utilité clinique réelle du développement de modulateurs pour les récepteurs des kinines n'est pas entièrement résolue et demeure toujours en investigation.

2.2 Classification moléculaire

2.2.1 Organisation et structure des gènes des récepteurs

Les récepteurs des kinines possèdent sept domaines transmembranaires et appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (G_{αq}/11 et G_{αi}). Les gènes codant pour les récepteurs B₂ et B₁ ont été clonés et sont localisés en tandem sur le chromosome 14, séparés seulement par 20 kilobases (**Figure 1**) (Kammerer, Braun et al. 1995; Bachvarov, Hess et al. 1996). La séquence en acides aminés du récepteur B₁ humain (353 acides aminés) n'est identique qu'à seulement 36% à celle du récepteur B₂ humain (364 acides aminés), tandis que l'homologie n'est que de 30 % entre les récepteurs B₂ (366 acides aminés) et B₁ (334 acides aminés)

chez la souris (Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003; Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). La structure de ces deux récepteurs est composée de trois sites consensus de glycosylation dans le domaine extracellulaire, de motifs DRY (Asp-Arg-Tyr) et NPXXY (Asn-Pro-XX-Tyr), ainsi que de sites de phosphorylation et d'acylation au niveau cytosolique (Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003; Gabra, Couture et al. 2003). La particularité du récepteur B₂ réside entre autre de la présence de sites putatifs de phosphorylation et d'acylation contenant des résidus sérine et thréonine à son extrémité carboxy-terminale (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005).

2.2.2 Expression, désensibilisation et régulation des récepteurs

Le modèle d'expression des récepteurs B₁ et B₂ diffère l'un de l'autre. Le récepteur de type B₂, activé sélectivement par la BK et la KD, est distribué de façon ubiquitaire et exprimé par de multiples tissus sains dont notamment à la surface des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, des fibroblastes, des cellules mésangiales et épithéliales, certains neurones, des astrocytes et des polynucléaires neutrophiles (Bhoola, Figueroa et al. 1992). Le récepteur B₂ est constitutif mais subit une désensibilisation rapide après la liaison de son agoniste impliquant une phosphorylation des résidus sérine et tyrosine situés à son extrémité carboxy-terminale (Faussner, Proud et al. 1998; Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). Une internalisation du récepteur suivra la désensibilisation via l'association transitoire, favorisée par la BK, des protéines G α_q et G α_i , avec les cavéoles (de Weerd and Leeb-Lundberg 1997). En effet, suite à son activation par la BK, le récepteur B₂ ainsi que la sous-unité α de la protéine G qui lui est associée subissent une internalisation

(Austin, Faussner et al. 1997; de Weerd and Leeb-Lundberg 1997). La présence d'un résidu cystéine (Cys³²⁴) dans la partie cytoplasmique carboxy-terminale du récepteur B₂ serait en grande partie responsable de l'internalisation et de la séquestration du récepteur contrôlée par son ligand (Faussner, Proud et al. 1996; Moreau, Garbacki et al. 2005). Le récepteur B₂ est l'élément clé de la majorité des réponses pharmacologiques des kinines observées dans la phase aiguë de l'inflammation et de la douleur (Dray 1997; Couture, Harrisson et al. 2001). Cette fonctionnalité aiguë est probablement le résultat d'une puissante réponse suite à une stimulation du récepteur par l'agoniste mais dont la durée d'action est très courte subissant une perte de réponses fonctionnelles par le biais, d'une part, d'une rapide association et dissociation du ligand, d'autre part par le biais d'une séquestration suivie d'une internalisation et finalement, d'une régulation négative du récepteur lors du maintien à long terme de la stimulation (Couture, Harrisson et al. 2001). Après une stimulation de longue durée, il est possible d'assister à une régulation à la baisse de l'ARNm du récepteur B₂ (Blaukat, Alla et al. 1996; Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005).

Le récepteur B₁ est exprimé dans divers types cellulaires incluant les fibroblastes, les cellules mésangiales, les cellules endothéliales de l'artère pulmonaire et de l'aorte, les macrophages, les cellules musculaires lisses et les ostéoblastes (Bhoola, Figueroa et al. 1992; Couture, Harrisson et al. 2001). Mais le récepteur de type B₁ est majoritairement non détectable en conditions physiologiques, il est inductible et rapidement exprimé dans des situations pathologiques où son expression se voit augmentée par des endotoxines bactériennes, des cytokines inflammatoires principalement l'interleukine-1 β (IL-1 β), l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur de nécrose

tumorale α (TNF- α), des stimulus nociceptifs ou un traitement par un iECA comme nos travaux ont pu le démontrer chez l'animal (Marceau, Hess et al. 1998; Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005; Moreau, Dubreuil et al. 2005). L'induction du récepteur par les cytokines est médiée par la voie des MAP-kinases (particulièrement la protéine kinase p38 activée et la kinase c-Jun amino-terminale (JNK)) et par le facteur de transcription nucléaire (NF- κ B) (Larrivee, Bachvarov et al. 1998; Campos, Souza et al. 1999; Ganju, Davis et al. 2001; Medeiros, Cabrini et al. 2004).

L'expression du récepteur B₁, induite et amplifiée à la suite de lésions tissulaires ou d'une inflammation, entraîne la liaison avec une forte affinité des kinines dont le résidu arginine en position carboxy-terminale est manquant (Regoli and Barabe 1980). Toutefois, chez certaines espèces comme le chien, le récepteur B₁ est constitutif et son activation cause une hypotension, une natriurèse et une vasodilatation rénale (Lortie, Regoli et al. 1992; Nakhostine, Ribuot et al. 1993). À l'inverse du récepteur B₂, le récepteur B₁ ne semble pas être désensibilisé et peut être induit par son propre agoniste (Schanstra, Bataille et al. 1998). Suite à son activation, il produit une réponse et des signaux persistants avec une résistance à l'endocytose associée à une dissociation lente du ligand. Contrairement au récepteur B₂, le récepteur B₁ participe à la phase chronique de la réponse inflammatoire locale et de la douleur où la BK pourrait initier la réponse inflammatoire via le récepteur B₂, relayé par la suite par la des-Arg⁹-BK stimulant son récepteur B₁ (Decarie, Adam et al. 1996; Blais, Marceau et al. 2000).

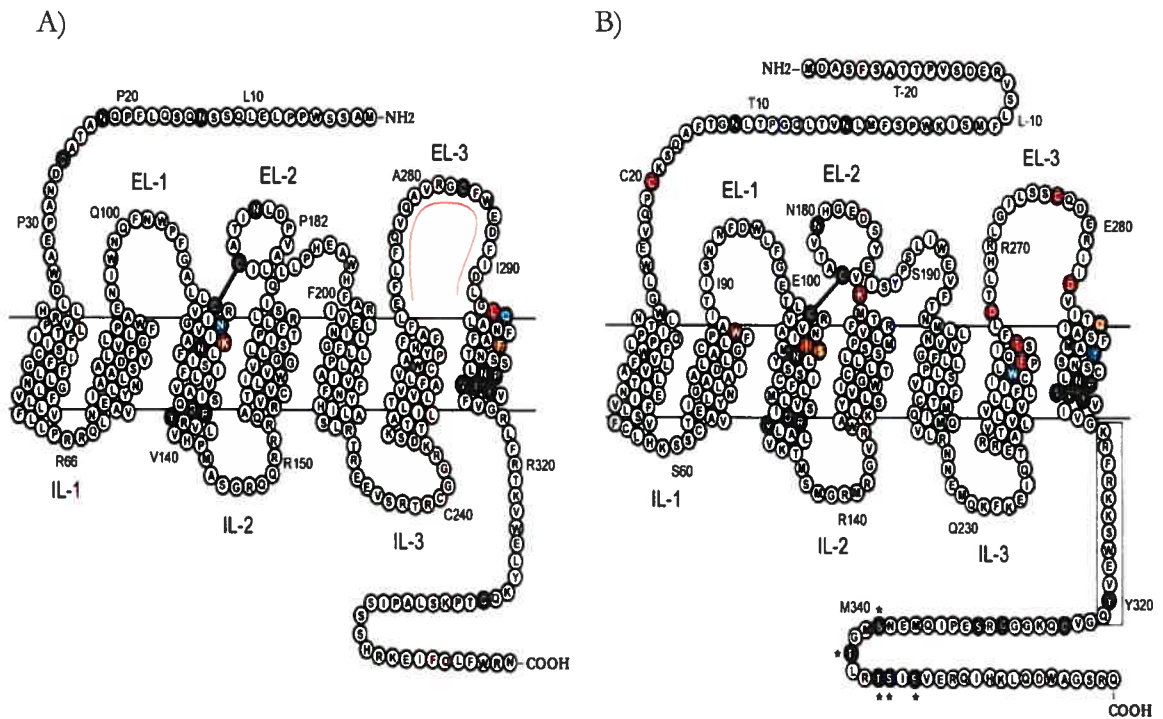


Figure 1.

Représentation schématique de la séquence en acides aminés constituant les récepteurs B_1 (A) et B_2 (B) humains. EL : boucles extracellulaires; IL : boucles intracellulaires; résidus en rouge ou ligne rouge : agoniste; bleu : antagoniste; orange : agoniste et antagoniste. Pour le récepteur B_2 , la séquence comprise dans le rectangle représente l'hélice « putative » 8 et * indique le groupe de résidus sérines et thréonines phosphorylés par différentes kinases et important pour la désensibilisation du récepteur. (Figure adaptée de (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005)).

L'activation des facteurs de transcription est extrêmement importante dans la régulation de l'expression du récepteur B₁ et démontre que la production de cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β est secondaire à la translocation de NF- κ B, facteur transcriptionnel pivot responsable du contrôle de l'expression de plus de 200 gènes incluant ceux impliqués pour les cytokines pro-inflammatoires et plusieurs autres molécules dont le récepteur B₁ (Barnes and Karin 1997; Ghosh, May et al. 1998; Liu, Ye et al. 1999; Li and Verma 2002; Chen, Egan et al. 2003). Une synergie semble même exister entre le ligand du récepteur B₁ et l'IL-1 β afin d'augmenter l'expression du récepteur (Phagoo, Poole et al. 1999).

Des études menées *in vivo* dans un modèle d'hyperalgésie inflammatoire suggèrent que le récepteur B₁ peut également être induit suite à l'activation du récepteur B₂ et ce, via la production autocrine de cytokines ou suite à la désensibilisation par séquestration du récepteur B₂ (Couture, Harrisson et al. 2001). Une autre étude portant sur les effets d'un traitement chronique aux iECA chez le rat et sur l'expression fonctionnelle des récepteurs B₁ et B₂, responsables 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, Schanstra et al. 2002). L'habileté des iECA à stimuler le récepteur B₁ a une pertinence évidente due à son utilisation répandue pour traiter l'hypertension et une variété de désordres cardiovasculaires comme dans les cas d'infarctus du myocarde. Il a aussi été démontré que la liaison de l'inhibiteur à l'ECA entraîne l'activation de la voie JNK

qui mène à une augmentation de l'expression protéinique de l'ECA et de la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Kohlstedt, Brandes et al. 2004; Kohlstedt, Busse et al. 2005; Kohlstedt, Kellner et al. 2006). Toutefois, l'activation de cette voie ou d'une autre via la signalisation directe de l'ECA ne peut être tenue responsable de l'activation du récepteur B₁ comme les travaux de Skidgel et ses collaborateurs l'ont démontré (Ignjatovic, Tan et al. 2002; Ignjatovic, Stanisavljevic et al. 2004; Skidgel, Stanisavljevic et al. 2006). Leur conclusion est donc que la plupart des iECA activent directement le récepteur B₁ et que la région contenant la séquence HEXXH (His-Glu-XX-His) est importante pour cet effet. Il fut aussi démontré que par l'activation du récepteur B₂, le NF-κB pouvait directement être activé et à son tour induire l'expression du récepteur B₁ (Phagoo, Poole et al. 1999). Paradoxalement, l'invalidation expérimentale du gène codant pour le récepteur B₂ chez la souris entraîne une surexpression des récepteurs B₁ (Duka, Kintsurashvili et al. 2001; Marin-Castano, Schanstra et al. 2002). Malgré ces observations, Sabourin et ses collaborateurs ont réalisé des études *in vivo* et *in vitro*, chez le lapin et sur des cellules en culture, démontrant que suite à la stimulation des récepteurs B₁ et B₂ par des ligands exogènes ou endogènes et même suite à l'utilisation d'antagonistes, aucun effet significatif sur l'expression mutuelle des récepteurs n'est observé et l'existence d'un mécanisme d'autorégulation réciproque entre ces deux récepteurs demeure ambiguë (Sabourin, Guay et al. 2001). Les mécanismes précis impliqués dans le processus fonctionnel de régulation de l'expression du récepteur B₁ demeurent toujours à être clarifiés.

2.2.3 Seconds messagers

La transduction des voies de signalisation pour les récepteurs des kinines afin de transmettre leur réponse au niveau intracellulaire est relayée par des systèmes de seconds messagers différents selon le type cellulaire. Comme ces récepteurs font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, groupe hétérotrimérique de protéines intracellulaires, ils peuvent être liés à différentes protéines G telles que $G\alpha_q$, $G\alpha_i$, $G\alpha_s$ ou $G\alpha_{12/13}$ constituées d'une sous-unité α et de deux sous-unités β et γ indissociables. Ainsi, selon la protéine G couplée au récepteur, le signal émis peut être inhibiteur ou activateur. Parmi les mécanismes de transduction de signaux, notons l'activation directe ou indirecte de l'adénylate cyclase (AC) et de la guanylate cyclase (GC), menant respectivement à la formation de l'adénosine-5'-monophosphate cyclique (AMPC) et de la guanosine-5'-monophosphate cyclique (GMPc), l'activation de canaux ioniques et l'activation des phospholipases A_2 et C (Figure 2).

Les actions biologiques engendrées par les récepteurs une fois leurs agonistes liés résultent de l'activation d'une part des protéines $G\alpha$ et $\beta\gamma$ d'autre part devenant aptes à moduler l'activité de différents effecteurs intracellulaires, mènent à la stimulation de la phospholipase C qui induit la formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG), impliqués respectivement dans la libération biphasique de calcium intracellulaire, soit par le réticulum endoplasmique et l'activation des canaux calciques, et dans l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). L'augmentation des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire libre dans le lit vasculaire active la NO-synthase endothéliale (eNOS) initiant la production de

monoxyde d'azote (NO) dépendante de la voie calcium-calmoduline. La diffusion du NO à travers la membrane des cellules entraîne l'activation de la GC soluble présente dans les cellules musculaires lisses. Ainsi, la GC activée peut permettre la formation de GMPc responsable de la relaxation des cellules musculaires lisses et de la dilatation des vaisseaux. Outre le Ca^{2+} , la MAP-kinase activée par la PKC stimule aussi la phosphorylation de la phospholipase A_2 . De l'acide arachidonique est engendré par l'activité de la phospholipase A_2 à partir des phospholipides membranaires et est métabolisé en éicosanoïdes. Les principales prostaglandines ainsi formées, variant en fonction de la variété cellulaire étudiée, sont : les prostaglandines E_2 et I_2 , les leucotriènes et le facteur d'agrégation plaquettaire (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). La formation de ces prostaglandines a pour effet d'activer à leur tour, par l'intermédiaire de leurs récepteurs, l'AC des cellules musculaires lisses. L'accumulation d'AMPc intracellulaire engendrée par l'AC activée entraîne également une relaxation vasculaire. L'inhibition de l'AC et une diminution concomitante de l'AMPc, via l'activation de la $G\alpha_s$, ont aussi été rapportés pour les deux récepteurs dans des systèmes cellulaires spécifiques (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). La voie de la phospholipase A_2 engendre aussi la production du facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) qui semble être un métabolite d'une troisième voie de la cascade de l'acide arachidonique, les monooxygénases cytochrome P450 dépendantes; les deux autres voies de la cascade étant celles de la lipoxigénase et la cyclooxygénase (Campbell, Gebremedhin et al. 1996). Ce facteur, de par sa capacité à hyperpolariser la cellule musculaire lisse en augmentant la

probabilité d'ouverture des canaux potassiques, agirait de concert avec le NO provoquant la vasorelaxation dépendante de l'endothélium.

De nombreux travaux ont montré que la liaison de la BK au récepteur B₂ activait les voies de signalisation dites « classiques » des récepteurs couplés aux protéines G (phospholipases C et A₂, NO) par l'intermédiaire des protéines G α_i et G α_q décrites précédemment. Par contre, de nouvelles voies de signalisation dites « alternatives » du récepteur B₂, apparemment indépendantes des protéines G, ont été mises en évidence (Duchene, Schanstra et al. 2002). En effet, récemment il a été suggéré que le récepteur B₂ serait également lié à d'autres voies de transduction de signaux, incluant l'activation de protéines cytoplasmiques à activité tyrosine kinase (Velarde, Ullian et al. 1999) et l'activation de la MAP-kinase qui succède à la phosphorylation de la tyrosine du récepteur du facteur de croissance épidermique suivie de l'activation de la Ras-kinase ou de l'activation directe de la PKC et de Raf, une sérine/thréonine kinase (Adomeit, Graness et al. 1999).

Les mécanismes de transduction secondaire à l'activation du récepteur B₁ sont essentiellement les mêmes que pour le récepteur B₂. Le récepteur B₁ interagit directement avec les protéines G α_q et G α_i , et la liaison des kinines carboxytronquées stimule la synthèse de prostaglandines et est également associée à la hausse de Ca²⁺ intracellulaire. Par contre, la stimulation de ce récepteur est principalement associée à l'activation de la phospholipase C et à la voie des phosphoinositols bien que l'on y retrouve aussi la phospholipase A₂ et la MAP-kinase (Marceau, Hess et al. 1998; Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005).

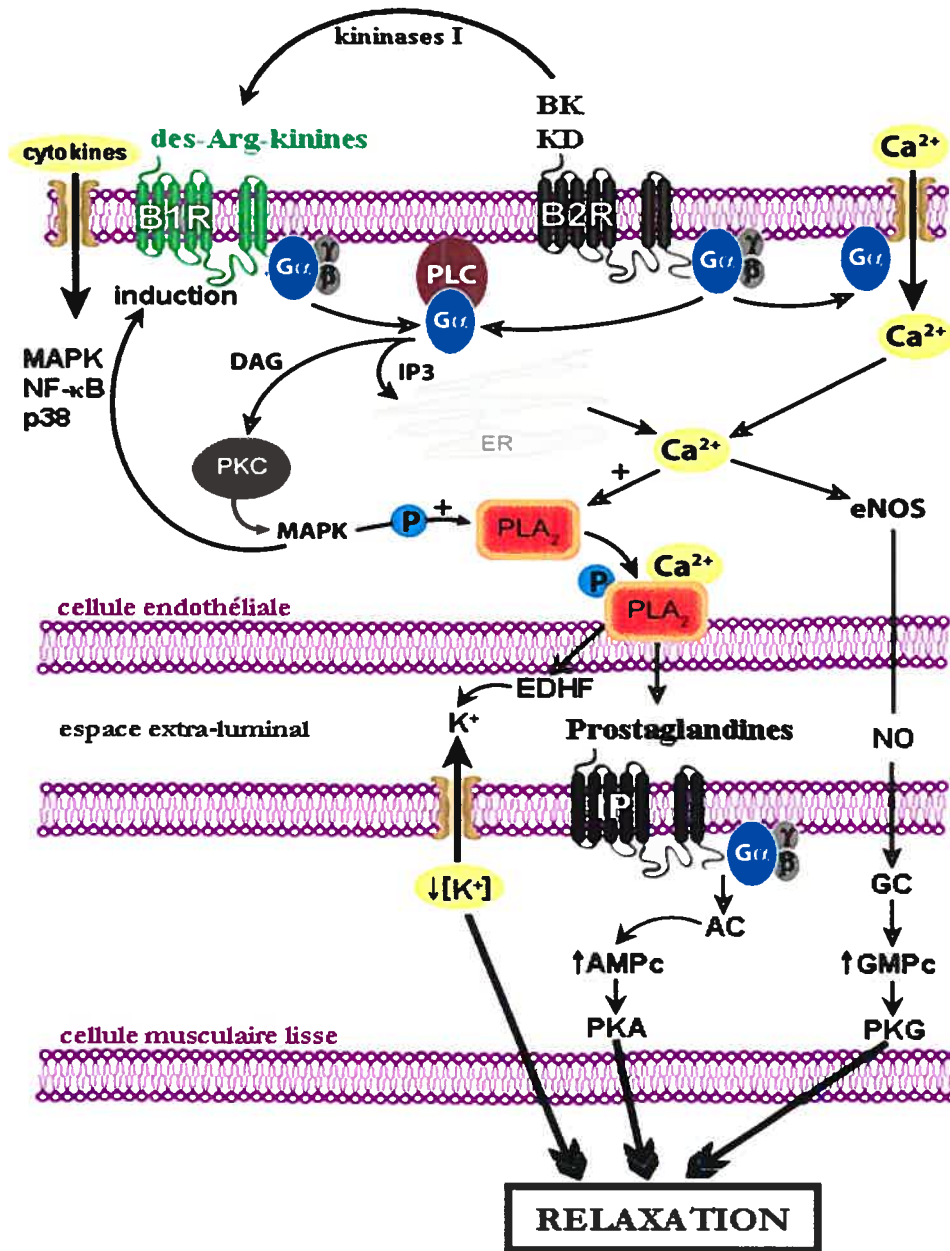


Figure 2.

Voies de signalisation et transduction des signaux associées à l'activation des récepteurs B₁ et B₂ des kinines. Les récepteurs B₁ (inductibles) et B₂ (constitutifs) activent, en fonction du type cellulaire, toutes les voies classiques de signalisation et sont impliqués dans le contrôle de plusieurs grandes fonctions périphériques et centrales. (Figure adaptée de (Moreau, Garbacki et al. 2005)).

2.2.4 Rôle du récepteur B₁

La régulation pathologique induisant l'expression du récepteur B₁ au niveau vasculaire a été observée dans un bon nombre de systèmes expérimentaux en relation avec l'infarctus du myocarde (Tschope, Spillmann et al. 2004), le diabète (Lawson, Gabra et al. 2005), l'irrigation tumorale (Cardoso, Lobao-Soares et al. 2004), l'hypertension (Farias, Feres et al. 2004; Hagiwara, Murakami et al. 2004) et l'angiogénèse d'origine ischémique ou inflammatoire (Hu and Fan 1993; Emanuelli, Bonaria Salis et al. 2002). Dans les tissus vasculaires humains, cette induction a aussi été démontrée dans des lésions athéromateuses (Raidoo, Ramsaroop et al. 1997) et dans l'endothélium des vaisseaux coronariens suite à un infarctus du myocarde (Liesmaa, Kuoppala et al. 2005). Les données expérimentales actuelles suggèrent que le récepteur B₁ est principalement impliqué dans la douleur persistante lors d'inflammation mais son rôle potentiel dans le contrôle de la douleur aiguë chez l'homme reste toutefois à être démontré.

Malgré certaines études démontrant une expression basale du récepteur B₁ dans les ganglions sensoriels, dans les terminaisons nerveuses centrales et périphériques des neurones sensoriels (fibres A δ et C) chez le rat, de même que dans la corne dorsale chez l'homme (Couture, Harrisson et al. 2001) et au niveau de la moelle épinière de la souris (Pesquero, Araujo et al. 2000), le rôle physiologique de ce récepteur dans le contrôle des informations douloureuses, chez l'animal sain, demeure tout de même incertain. En effet, il a été démontré que les agonistes du récepteur B₁, des kinines n'agissent pas sur la nociception chez des rats normaux ou dans des modèles aigus d'inflammation (Calixto, Cabrini et al. 2000). Dans ces conditions, les agonistes

n'entraînent aucune production de seconds messagers, ni la libération de neuropeptides (Dray 1997; Couture, Harrisson et al. 2001). De plus, il fut possible d'induire une analgésie à l'aide d'antagonistes pharmacologiques du récepteur B₁ dans des modèles animaux d'hyperalgésie persistante, d'origine inflammatoire, ou lors de douleur viscérale assidue. La déduction de ces résultats est que l'induction du récepteur B₁ s'effectue sur des cellules autres que les neurones sensoriels (macrophages, fibroblastes ou les cellules endothéliales), entraînant ainsi la libération de médiateurs (prostaglandines, cytokines et NO) qui eux sensibilisent ou activent les nocicepteurs (Dray 1997; Couture, Harrisson et al. 2001).

Une corrélation semble exister entre l'activité du récepteur B₁ et son expression sur les lymphocytes T. Lors d'études effectuées chez des patients atteints de la sclérose en plaque, il a été démontré que l'interféron- γ agissait à titre d'inducteur auprès du récepteur B₁ en plus de la présence du récepteur sur les lymphocytes T dérivés du sang de ces patients (Prat, Weinrib et al. 1999; Prat, Biernacki et al. 2000). L'expression du récepteur à la surface des lymphocytes serait potentialisée par les cytokines pro-inflammatoires (interféron- γ et TNF- α) présentes en concentration plasmique élevée dans cette maladie. Il a été suggéré que le récepteur B₁ joue un rôle protecteur dans les cas de sclérose en plaque, par l'entremise d'une réduction de la sécrétion d'IL-8 mais aussi par un effet direct anti-migratoire sur les lymphocytes T empêchant l'infiltration des cellules immunes dans le cerveau. Le résultat est qu'aucun déclenchement d'un processus inflammatoire amenant une démyélinisation n'a lieu.

L'implication du récepteur B_1 dans l'œdème a été étudiée à l'aide de modèles d'arthrite aiguë et chronique chez le rat où l'induction du récepteur par les cytokines ou le lipopolysaccharide a été notée dans l'œdème de la patte de l'animal (Campos, Souza et al. 1998; Bhoola, Ramsaroop et al. 2001; Couture, Harrisson et al. 2001). La réponse inflammatoire observée et relayée par le récepteur B_1 a été attribuée à la libération de neuropeptides pro-inflammatoires tels que la substance P et le « calcitonine-gene related peptide » (CGRP), à la production de médiateurs d'origine mastocytaire comme la sérotonine ainsi que la synthèse de prostaglandines. Dans le modèle d'inflammation à la carragénine chez le rat utilisé par Décarie et ses collaborateurs, le rôle des kinines dans la formation de l'œdème a été démontré à l'aide d'un inhibiteur de l'ECA et d'un antagoniste du récepteur B_2 (Decarie, Adam et al. 1996). Dans cette étude, l'utilisation d'un antagoniste sélectif au récepteur B_2 (HOE140) a permis de confirmer la participation de la BK dans les symptômes associés à la réaction inflammatoire aiguë puisque l'œdème induit par la carragénine est diminué en présence de l'antagoniste. De plus, par ce modèle, il a été montré que le récepteur B_1 n'est pas impliqué dans l'évolution de la première phase de la réaction inflammatoire locale en accord avec plusieurs évidences suggérant que le récepteur B_1 ne joue pas un rôle dans la phase aiguë de l'inflammation (Dray and Perkins 1993; Perkins, Campbell et al. 1993; Perkins and Kelly 1993; Davis and Perkins 1994; Campos, Mata et al. 1995). En effet, l'induction du récepteur B_1 semble avoir lieu suite à une deuxième administration de l'agent phlogogène où la réaction produite devient sensible à l'ajout d'un antagoniste du récepteur. De plus, l'injection locale de la carragénine mène à l'activation du système de contact et à la cascade d'événements

résultant à la production de BK et à la formation de l'œdème (Damas and Remacle-Volon 1982; Decarie, Drapeau et al. 1994). Ce type d'observation fut aussi confirmé par Raymond et ses collaborateurs (Raymond, Decarie et al. 1996). Le récepteur B₁ a donc un rôle à jouer au niveau de la composante cellulaire de la réponse inflammatoire mais dans la phase chronique de cette réaction.

Le récepteur B₁ semble donc exercer une dualité fonctionnelle se manifestant par une action protectrice (vis-à-vis de la sclérose en plaques par exemple) ou délétère (dans le cas de la douleur et de l'inflammation). Toutefois, l'action physiologique exacte que joue le récepteur B₁ n'est pas encore très bien élucidée.

2.3 Effets pharmacologiques des kinines

Les kinines sont impliquées dans plusieurs processus pathologiques et physiologiques via la stimulation de leur récepteur. En vertu de leur habileté à activer les cellules endothéliales entraînant : la production de monoxyde d'azote et la mobilisation de l'acide arachidonique, une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire (Vanhoutte 1989), la relâche de l'activateur tissulaire du plasminogène (t-PA) (Smith, Gilbert et al. 1985), l'inhibition de l'activation des plaquettes induite par la thrombine (Hasan, Amenta et al. 1996); les kinines participent via la stimulation de leurs récepteurs aux processus physiologiques (régulation de la pression sanguine, fonctions rénale et cardiaque) et pathologiques comme l'inflammation. C'est par la localisation diversifiée de leurs récepteurs au niveau de différents tissus et types cellulaires, entre autres dans le système cardiovasculaire, le tractus urinaire et intestinal, que les kinines exercent des activités pharmacologiques variées. La réponse

associée à leur stimulation via les kinines est la cause de plusieurs processus biologiques. Les effets vasodilatateurs, natriurétiques et pro-inflammatoires de la BK sont connus de longue date : vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire, stimulation des connections nerveuses sensorielles et sympathiques (fibres nociceptives) et contraction des fibres musculaires lisses incluant l'habilité de dilater les parois vasculaires périphériques directement et indirectement (résultant en hypotension), de promouvoir la constriction des voies pulmonaires (évoquant un bronchospasme) et d'induire le relâchement d'histamine à partir des mastocytes qui sont des médiateurs des réactions d'hypotension sévères (Bhoola, Figueroa et al. 1992; Bascands and Girolami 1996; Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). Il est connu que la liaison de la BK à son récepteur B₂ entraîne le relâchement d'agents vasodilatateurs comme les prostaglandines, le NO et le EDHF (Bhoola, Figueroa et al. 1992), lesquels influencent la pression sanguine et le tonus vasculaire, mais peuvent également causer la douleur et augmenter la perméabilité des capillaires lors de l'inflammation (Bhoola, Figueroa et al. 1992).

Les kinines exercent aussi des effets antiprolifératifs (Linz and Scholkens 1992) et contribuent à plusieurs des effets de l'inhibition de l'ECA (Gainer, Morrow et al. 1998; Minai, Matsumoto et al. 2001). Le rôle bénéfique des kinines dans les effets cardioprotecteurs et antihypertenseurs des iECA est bien documenté (Linz and Scholkens 1992; Linz, Wiemer et al. 1995; Blais, Drapeau et al. 1997; Tschope, Gohlke et al. 1997; Perez, Molinaro et al. 2001; Dumoulin, Adam et al. 2005). En effet, le phénomène de cardioprotection comme un effet antihypertrophique observé en présence des iECA implique la participation de la BK endogène où celle-ci aurait

possiblement une action antiproliférative sur les cellules musculaires lisses vasculaires en plus d'un effet protecteur de l'intégrité de la paroi vasculaire lors d'une ischémie myocardique (Linz, Wiemer et al. 1995; Linz, Wiemer et al. 1995; Perez, Molinaro et al. 2001). Les effets antihypertenseurs des iECA ont aussi été attribués en partie à la BK puisque des études ont montré que la perfusion de BK entraînait une diminution de la pression sanguine artérielle (Linz, Wiemer et al. 1995; Perez, Molinaro et al. 2001). L'activité tonique vasodépressive de la BK a été confirmée par l'ajout d'antagonistes du récepteur B₂.

3. Régulation de l'activité pharmacologique des kinines

L'activité biologique des kinines peut être régulée à différents niveaux : au niveau de leurs récepteurs comme discuté précédemment, lors de leur formation par le système kallibréine-kinine ou de leur métabolisme par diverses métallopeptidases. Cette partie de chapitre abordera donc les systèmes kinino-formateurs ainsi que le métabolisme des kinines.

3.1 Les systèmes kinino-formateurs

L'intérêt scientifique pour le système kallibréine-kinine est expliqué en partie par la dualité et la complexité de ce système. Ce système est laborieux par sa distribution importante; plusieurs de ses composantes sont présentes dans le plasma mais aussi sur les cellules sanguines telles que les plaquettes et les leucocytes, dans une variété de tissus ou de sécrétions exocrines. Le système kallibréine-kinine représente une

cascade métabolique qui lorsqu'il est activé entraîne la libération des kinines. Ce complexe multi-protéinique comporte des protéases à sérine, kalllicréines plasmatiques et tissulaires, qui vont permettre la libération des kinines par l'hydrolyse des kininogènes de haut et de faible poids moléculaire (KHPM et KFPM) (Bhoola, Figueroa et al. 1992).

Classiquement, il y a deux principales voies par lesquelles les kinines sont générées. Le système kalllicréine-kinine plasmatique initie l'activation de la voie intrinsèque de la coagulation. La seconde voie possible implique la kalllicréine tissulaire et son substrat, le KFPM. Chacun de ces systèmes enzymatiques peut jouer différents rôles physiologiques. La BK et la KD sont donc les produits *in vivo* de deux voies biochimiques distinctes, l'une plasmique et l'autre tissulaire.

La **Figure 3** illustre les deux voies métaboliques classiques, plasmatique et tissulaire, qui peuvent conduire à la libération des kinines mais aussi celles correspondant à des voies dites spéculatives ou expérimentales médiées par les facteurs de la coagulation ou de la fibrinolyse.

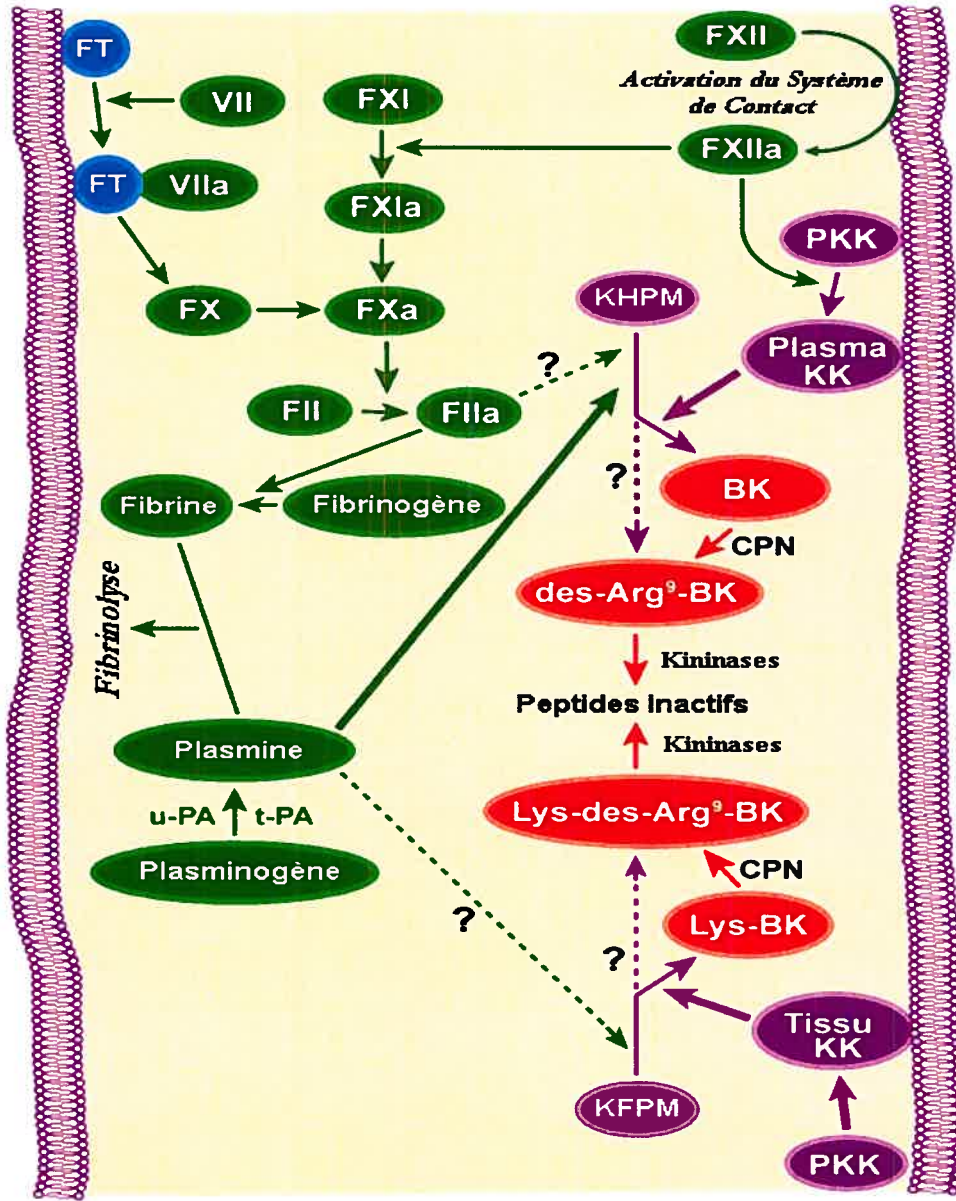


Figure 3.

Système kallibréine-kinine et les interactions avec la cascade intrinsèque et extrinsèque de la coagulation ainsi que la fibrinolyse. Les flèches représentent les voies établies alors que les lignes pointillées correspondent à l'activation de voies spéculatives ou expérimentales. FT : facteur tissulaire; PKK : pré- ou pro-kallibréine; CPN : carboxypeptidase N; t-PA : activateur tissulaire du plasminogène; u-PA : activateur de l'urokinase plasminogène. (Figure adaptée de (Moreau, Garbacki et al. 2005)).

3.1.1 Les kininogènes : Précurseurs des kinines

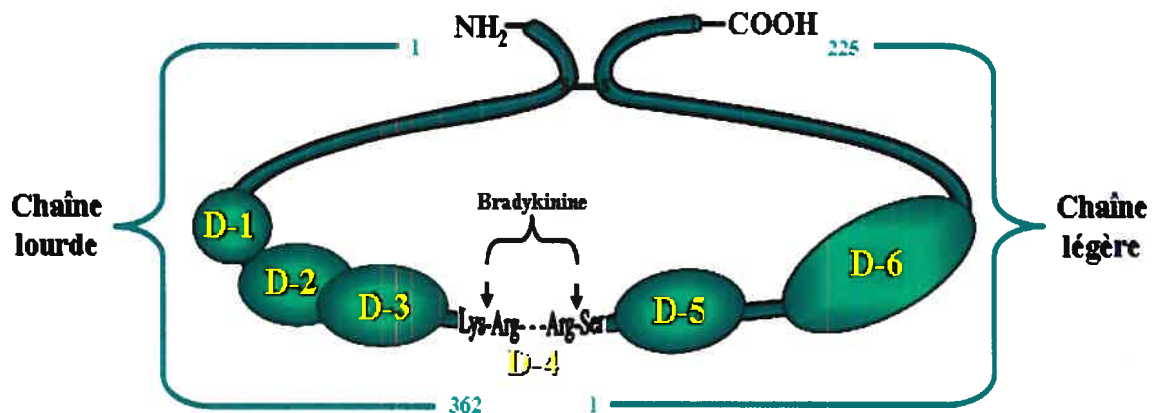
Le KHPM et KFPM, précurseurs des kinines (BK et KD), sont issus à partir d'un même gène localisé au chromosome 3q26→qter (Kitamura, Kitagawa et al. 1985; Takagaki, Kitamura et al. 1985). Ce gène est constitué de 11 exons dont les 9 premiers codent pour la chaîne lourde commune aux deux types de kininogènes alors que le 10^{ème} exon code pour la séquence kinino-formatrice et la chaîne légère du KHPM (Kitamura, Kitagawa et al. 1985; Takagaki, Kitamura et al. 1985). La chaîne légère du KFPM, différente par sa masse moléculaire et ses fonctions de celle du KHPM, est codée par l'exon 11. Les deux ARNm des kininogènes dérivent donc d'un épissage alternatif et d'une polyadénylation à partir d'un seul gène chez l'humain, le rat et le bovin mais non chez la souris qui possède deux gènes codant pour les kininogènes (Cardoso, Garrett et al. 2004).

Les deux types de kininogène partagent une structure moléculaire semblable. Ils sont constitués d'une chaîne lourde identique et d'une chaîne légère qui les différencie. La chaîne lourde, partie amino-terminale des kininogènes, comporte trois domaines répétitifs (D-1, D-2 et D-3) qui confèrent aux deux kininogènes la propriété d'inhiber l'activité enzymatique des thiols protéases et de lier les ions Ca^{2+} (Salvesen, Parkes et al. 1986; Higashiyama, Ohkubo et al. 1987; Jiang, Muller-Esterl et al. 1992; Meloni, Gustafson et al. 1992; Herwald, Hasan et al. 1995). Le quatrième domaine, D-4, comporte la séquence kinino-formatrice alors que les domaines 5 et 6, formant la chaîne légère (partie carboxy-terminale), sont spécifiques au KHPM et sont responsables des propriétés pro-coagulantes du KHPM (Müller-Esterl, Iwanaga et al.

1986; Tait and Fujikawa 1987; DeLa Cadena and Colman 1991; Hasan, Cines et al. 1995; Colman, Jameson et al. 2000).

Le KFPM diffère du KHPM par son domaine 5 qui constitue sa chaîne légère et dont la fonction reste à être déterminée ainsi que par l'absence d'un domaine 6. Les différentes fonctions attribuées à chacun des domaines sont résumées à la **Figure 4**. Indépendamment de son rôle de précurseur des kinines, les kininogènes possèdent d'autres propriétés régulatrices. Ils inhibent de nombreuses enzymes comme la cathepsine, la calpaïne et la papaïne. Par ailleurs, ils sont capables de se lier au facteur XI, de se fixer sur les plaquettes et les polynucléaires neutrophiles et exercent ainsi des propriétés antithrombotiques.

Le KHPM est relargué dans la circulation sanguine par les hépatocytes et exerce une fonction essentielle dans l'activation du système de contact (Bhoola, Figueroa et al. 1992). Le KFPM est synthétisé par le foie et les reins, mais aussi par les glandes salivaires et les cellules endothéliales et est le substrat préférentiel de la kallibréine tissulaire (Kaplan, Joseph et al. 2002).



- D-1:** Domaine de liaison au Ca^{2+}
- D-2, D-3:** Domaines inhibiteurs des protéases à cystéine
- D-3:** Domaine de liaison aux plaquettes et cellules endothéliales
- D-4:** Domaine kinino-formateur
- D-5:** Domaine riche en acides aminés cationiques (H, P et K) pour la fixation aux surfaces chargées négativement, possède une séquence pour la liaison de l'héparine
- D-6:** Domaine de fixation avec la prékallikréine plasmatique et le facteur XI

Figure 4.

Schéma de la structure et des fonctions du KHPM chez l'humain. Les flèches à la verticale représentent les sites de clivage de la kallikréine; les nombres indiquent la position des acides aminés dans la chaîne lourde et légère; D-1 à D-6 représentent les six domaines fonctionnels du kininogène. (Figure adaptée de (Tayeh, Olson et al. 1994)).

3.1.2 Système kallibréine-kinine plasmatique

Le système kallibréine-kinine plasmatique, aussi nommé système de contact du plasma, est composé de 3 pro-enzymes à sérine (facteur XII ou facteur de Hageman, facteur XI et pré-kallibréine) et le précurseur des kinines KHPM. Le système kallibréine-kinine est un système peptidergique complexe comprenant les enzymes de synthèse appelées kallibréines, leurs substrats, les kininogènes et les peptides vasoactifs, appelés kinines.

3.1.2.1 Prékallibréine

La localisation chromosomique du gène humain codant pour la kallibréine plasmatique est définie par la région q34-q35 sur le chromosome 4 (Beaubien, Rosinski-Chupin et al. 1991). La kallibréine plasmatique (EC 3.4.21.34), protéase à sérine, est codée par le gène *KLKB1* et synthétisée par le foie. Elle est principalement sécrétée par les hépatocytes comme précurseur inactif, pré-kallibréine (PKK), et forme un complexe hétérodimère lié au KHPM avec une stoichiométrie molaire de 1 : 1 (Mandle, Colman et al. 1976; Bhoola, Figueroa et al. 1992). La PKK est une α -globuline à simple chaîne qui est présente dans le plasma humain ainsi que dans celui d'autres espèces animales à une concentration de 35-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Environ 80 à 90% de la PKK se retrouve normalement complexée au KHPM (Mandle, Colman et al. 1976; Reddigari and Kaplan 1989). La PKK plasmatique et le facteur XI sont liés au KHPM dans la circulation et forme la base structurale d'un complexe relié à des protéines à la surface des cellules endothéliales, des plaquettes et des neutrophiles (Colman, Pixley et al. 1997; Kaplan, Joseph et al. 2001). L'interaction entre le KHPM

et la PKK plasmatique dans ce complexe mène à l'activation rapide de la PKK et génère ainsi une protéase active, la kallicréine plasmatique, possiblement par une prolylcarboxypeptidase clivant la PKK au lien Arg³⁷¹-Ile³⁷² (Shariat-Madar, Mahdi et al. 2002). La kallicréine est composée d'une chaîne lourde, amino-terminale, de 371 acides aminés (MM : 55 kDa) et d'une chaîne légère, carboxy-terminale, de 248 acides aminés (MM : 30 à 36 kDa), reliées 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, Joseph et al. 2002). La kallicréine est connue pour avoir trois grandes fonctions : elle engendre la formation de kinines à partir des kininogènes, elle participe à la fibrinolyse en activant le plasminogène et par un mécanisme de « feedback », elle agit sur la phase de contact de la coagulation en amplifiant l'activation du facteur XII.

3.1.2.2 Activation du système de contact du plasma

Le système de contact du plasma est considéré jusqu'à présent comme le principal mécanisme de kininogénèse plasmatique. L'activation des cascades de la voie intrinsèque de la coagulation et du système de contact est catalysée par le facteur XIIa et la kallicréine plasmatique où l'activation du facteur XII en facteur XIIa s'effectue suite à l'adhésion du facteur XII à une surface électronégative provoquant un changement de conformation de la protéine la rendant plus sensible à son auto-protéolyse et son auto-activation (Griffin 1978; Miller, Silverberg et al. 1980). Classiquement, la présence d'une surface chargée négativement entraîne l'activation du facteur XII qui à son tour interagit avec la PKK liée au KHPM afin de former la

kallicréine plasmatique protéolytiquement activée qui amène le relâchement de kinines au site d'activation du système de contact. Donc, une fois la kallicréine activée, elle agit sur la libération de kinines en formant un peptide actif pharmacologiquement, la BK, à partir du KHPM qui est clivé en deux étapes consécutives (Kaplan, Joseph et al. 1997). Premièrement, le KHPM est clivé au lien Arg³⁸⁹-Ser³⁹⁰ de son domaine 4, libérant la portion carboxy-terminale de la séquence BK et laissant la BK attachée à la partie carboxy-terminale de la chaîne lourde par sa partie amino-terminale. Ensuite, la séquence Leu³⁷⁸-Met-Lys-Arg³⁸¹ est clivée au lien Lys³⁸⁰-Arg³⁸¹ pour libérer la BK du KHPM (Mori, Sakamoto et al. 1981).

Ce mécanisme de libération de kinines est celui observé *ex vivo* ou *in vitro* lors de circulations sanguines extracorporelles, ou expérimentalement lors de la mise en présence du plasma avec des billes de verre (Kaplan, Joseph et al. 1997; Kaplan, Joseph et al. 1998). *In vitro*, il a été démontré expérimentalement que l'injection de substances non-physiologiques telles que la carragénine et le dextran de sulfate peut activer le système de contact du plasma (Kaplan, Joseph et al. 2002). Par contre, la surface physiologique naturelle demeure incertaine.

Il a été suggéré qu'une protéase à la surface des cellules endothéliales autre que le facteur XIIa active la PKK en kallicréine. Cette voie est actuellement en processus d'élucidation et il est encore trop tôt pour dire jusqu'à quel point cette prolylcarboxypeptidase contribue à l'activation de la kallicréine *in vivo* (Kaplan, Joseph et al. 2001). De plus, l'initiation de l'activation du système kallicréine-kinine *in vivo* semble être engendrée par un autre mécanisme dépendant celui-ci de la liaison des éléments constituant la cascade d'activation du système de contact à la surface de

cellules, c'est-à-dire suite à la liaison spécifique du KHPM sur les leucocytes, les plaquettes, les cellules endothéliales et les myocytes (Zhao, Qiu et al. 2001). C'est par l'entremise d'un complexe multimérique membranaire composé par la cytokératine 1, le récepteur gC1q et le récepteur de l'activateur de l'urokinase plasminogène (u-PAR) que la chaîne lourde (domaine 3) et légère (domaine 5) du KHPM formerait un lien avec les cellules endothéliales (Reddigari, Kuna et al. 1993; Hasan, Cines et al. 1995; Herwald, Hasan et al. 1995). Cette interaction serait zinc-dépendante, saturable et réversible (Schmaier, Kuo et al. 1988; van Iwaarden, de Groot et al. 1988) et entraînerait l'activation de la PKK en kallibréine et vraisemblablement la libération de la BK à partir du KHPM (Nishikawa, Shibayama et al. 1992; Motta, Rojkaer et al. 1998; Zhao, Qiu et al. 2001).

3.1.3 Système kallibréine-kinine tissulaire

La kallibréine tissulaire (EC 3.4.21.35) est une glycoprotéine qui diffère de la kallibréine du plasma. Cette protéase à sérine tissulaire est codée par un des gènes de la famille des kallibréines, *KLK1*, localisé sur le chromosome 19 de l'humain au locus q13.2-q31.4 (Mahabeer and Bhoola 2000; Clements, Hooper et al. 2001). La kallibréine tissulaire est largement synthétisée et distribuée (reins, vaisseaux sanguins, pancréas, système nerveux central, glandes salivaires, etc.) suggérant ainsi une fonction paracrine (Bhoola, Figueroa et al. 1992; Marcondes and Antunes 2005). De par sa localisation, une exploration expérimentale de cette voie demeure toujours aujourd'hui ardue. L'origine de la kallibréine tissulaire détectée dans l'urine serait probablement de glandes exocrines telles que les surrénales. Cette enzyme est

synthétisée comme une pro-enzyme, pro-kallicréine, étant inefficacement activée par la plasmine ou la kallicréine plasmatique (Kaplan, Joseph et al. 1998). L'inactivation du gène codant pour la kallicréine tissulaire chez la souris a montré l'importance du système kallicréine-kinine dans la physiologie vasculaire : les souris déficientes en kallicréine ont, en effet, un dysfonctionnement endothélial avec une perte de la vasodilatation liée au flux, un processus important de régulation de l'apport sanguin aux organes (Bergaya, Meneton et al. 2001; Meneton, Bloch-Faure et al. 2001). La présence du système tissulaire rend possible l'existence d'un contrôle autocrine et paracrine du tonus vasculaire et de la prolifération des cellules musculaires vasculaires lisses.

La kallicréine tissulaire a comme substrat préférentiel le KFPM mais il semblerait qu'elle puisse aussi agir sur le KHPM. En clivant les liens Met³⁷⁹-Lys³⁸⁰ en position amino-terminale et Arg³⁸⁹-Ser³⁹⁰ en position carboxy-terminale du domaine 4 du KFPM, la kallicréine tissulaire libère ainsi la KD (Fogaca, Melo et al. 2004).

3.1.4 Autres mécanismes kinino-formateurs

En plus de kallicréine plasmatique et tissulaire, d'autres voies non spécifiques médiées par les facteurs de la coagulation, de la fibrinolyse ou encore par diverses protéases microbiennes ont possiblement une capacité kinino-formatrice. La plasmine par exemple, qui est responsable de la lyse des caillots de fibrine, est capable de libérer la BK à partir des kininogènes (Dobrovolsky and Titaeva 2002; Molinaro, Gervais et al. 2002). En effet, *in vitro*, la plasmine est capable de libérer la BK à partir du KHPM et du KFPM, tout comme la kallicréine plasmatique. Ce

pouvoir kinino-formateur de la plasmine a pu être confirmé pour le plasma humain (Molinaro, Gervais et al. 2002).

3.1.5 Régulation de l'activité kininogénase

La régulation du système kallibréine-kinine par les membres de la superfamille d'inhibiteurs de protéase à sérine désignée sous le terme de serpin, « serine protease inhibitor », groupe d'enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques des protéines, ajoute à la complexité de ce système aussi bien que ses multiples relations avec d'autres voies enzymatiques importantes comme le système rénine-angiotensine et les voies de la coagulation et du complément. Ces inhibiteurs de protéase à sérine sont l'inhibiteur du C1 estérase (C1INH), l'antithrombine III, α_2 -macroglobuline, α_2 -antiplasmine et α_1 -antitrypsine (Schapira, Scott et al. 1982; van der Graaf, Koedam et al. 1983; Kaplan, Joseph et al. 1997). Ces enzymes inactivent les protéases par liaison covalente entre le site de fixation de l'enzyme et le site actif de l'inhibiteur, inhibiteur qui imite le substrat naturel de ces protéases.

In vitro, le C1INH inactive un certain nombre de protéases comprenant le C1r et C1s, la kallibréine, le facteur XII, la plasmine et le facteur XI de la coagulation. Dans le plasma, le C1INH contribue à l'inhibition de C1r et C1s, du facteur XIIa et XIIb, de la kallibréine et du facteur XI (Wuillemin, Minnema et al. 1995; Cugno, Cicardi et al. 1997). Il a donc un rôle biologique important dans la régulation de l'activation du système du complément, de la libération de kinine et moindré dans la régulation de la coagulation et de la fibrinolyse. Le C1INH demeure tout de même le principal régulateur du système de contact en neutralisant l'activité de la kallibréine

plasmatique (Pixley, Schapira et al. 1985). Avec l' α_2 -macroglobuline, le C1INH compte pour plus de 90% de l'inhibition de l'activité de la kallibréine dans le plasma. Le mécanisme de régulation de l'activité de la kallibréine tissulaire demeure en partie inconnu. Par contre, il semblerait que l'activité protéasique de la kallibréine tissulaire circulante serait inhibée par différentes antiprotéases dont principalement l' α_1 -antitrypsine, l'aprotinine et la kallistatine (Zhou, Chao et al. 1992; Margolius 1996). De plus, la kallistatine serait la plus apte à réguler l'activité de la kallibréine tissulaire puisque cette enzyme est présente non pas seulement dans le plasma mais dans une variété de tissus, de cellules et de fluides où la kallibréine tissulaire trouve origine (Chai, Chen et al. 1997; Chao, Miao et al. 2001).

La plasmine ainsi que le t-PA ont aussi des régulateurs faisant partie de cette superfamille d'inhibiteurs. Le premier inhibiteur de la plasmine est l' α_2 -antiplasmine mais l'antithrombine III, l' α_1 -antitrypsine et le C1INH sont aussi des molécules inhibitrices de la plasmine mais avec un effet physiologique minimal dans la circulation sanguine (Dobrovolsky and Titaeva 2002). Actuellement, 4 types distincts d'inhibiteurs du t-PA sont décrits dont le plus important au niveau du plasma est le PAI-1 (Emeis and Kooistra 1986).

3.2 Métabolisme des kinines

Les kinines sont des peptides vasoactifs ayant une demi-vie *in vivo* d'une quinzaine de secondes au niveau plasmatique ce qui explique que leur action soit essentiellement locale (Ferreira and Vane 1967). L'activité des kinines est régulée par une multitude de métallopeptidases regroupée sous le terme de kininases. L'action des kinines est

très brève, en raison de leur inactivation presque immédiate par ces enzymes et permet d'expliquer la raison pour laquelle, en absence d'un déficit enzymatique, les kinines exercent leurs activités pharmacologiques de façon autocrine ou paracrine (Decarie, Raymond et al. 1996; Blais, Drapeau et al. 1997; Dumoulin, Adam et al. 1998; Raut, Rouleau et al. 1999).

La nature et les propriétés d'une variété de peptidases qui ont la capacité de métaboliser les kinines ont fait l'objet de plusieurs études. Des évidences expérimentales observées par notre laboratoire démontrent que cinq métallopeptidases interviennent principalement dans le catabolisme des kinines : l'ECA, l'aminopeptidase P, la néprilysine et les kininases I, regroupant les carboxypeptidases M et N (Decarie, Raymond et al. 1996; Blais, Drapeau et al. 1997; Raut, Rouleau et al. 1999; Blais, Marceau et al. 2000; Cyr, Lepage et al. 2001). Ces peptidases sont des métallopeptidases dites à zinc, c'est-à-dire qu'elles requièrent un atome de zinc à leur site catalytique afin de pouvoir hydrolyser leur substrat. Cependant, l'importance relative de chacune de ces peptidases potentiellement impliquées dans le métabolisme des kinines varie en fonction de l'espèce animale, de l'approche expérimentale utilisée, du milieu biologique exploré ainsi que du contexte pathophysiologique. Ainsi différentes amino-, carboxy- et endopeptidases présentes dans le sang, les tissus et les liquides biologiques sont susceptibles de métaboliser rapidement la BK afin de produire plusieurs métabolites actifs et inactifs. La majorité de ces enzymes entraîne l'inactivation de la BK, sauf les kininases I qui transforme la BK en son métabolite actif, la des-Arg⁹-BK.

Le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK est illustré à la **Figure 5** où l'ECA relie deux systèmes physiologiques ayant des effets opposés. Soit le système kallicréine-kinine possédant des propriétés vasodilatatrices et le système rénine-angiotensine aux propriétés vasoconstrictives.

3.2.1 Enzyme de conversion de l'angiotensine I

3.2.1.1 Définition et structure

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA; peptidyldipeptide hydrolase; peptidyldipeptidase A; EC 3.4.15.1) est une ectoenzyme membranaire de type I liée à la membrane cellulaire par l'intermédiaire d'une ancre hydrophobe transmembranaire située près de son extrémité carboxy-terminale. L'enzyme de conversion de l'angiotensine I est une métallopeptidase à zinc qui possède une spécificité enzymatique particulière. Elle est en effet capable d'agir suivant le substrat considéré soit comme une dipeptidyl-carboxypeptidase ou une endopeptidase.

Chez les mammifères, l'ECA est présente sous deux isoformes : l'une somatique (150-180 kDa) composée de 1306 acides aminés y compris un peptide signal de 29 acides aminés, et retrouvée dans une variété de tissus, l'autre germinale (100-110 kDa; environ 730 acides aminés) située exclusivement dans les cellules germinales des testicules (Soubrier, Alhenc-Gelas et al. 1988; Hagaman, Moyer et al. 1998; Turner and Hooper 2002). L'enzyme de conversion de l'angiotensine somatique possède deux sites catalytiques fonctionnelles en position amino- et carboxy-terminale contenant chacun le motif His-Glu-X-X-His nécessaire à la fixation de l'ion zinc (Georgiadis, Beau et al. 2003).

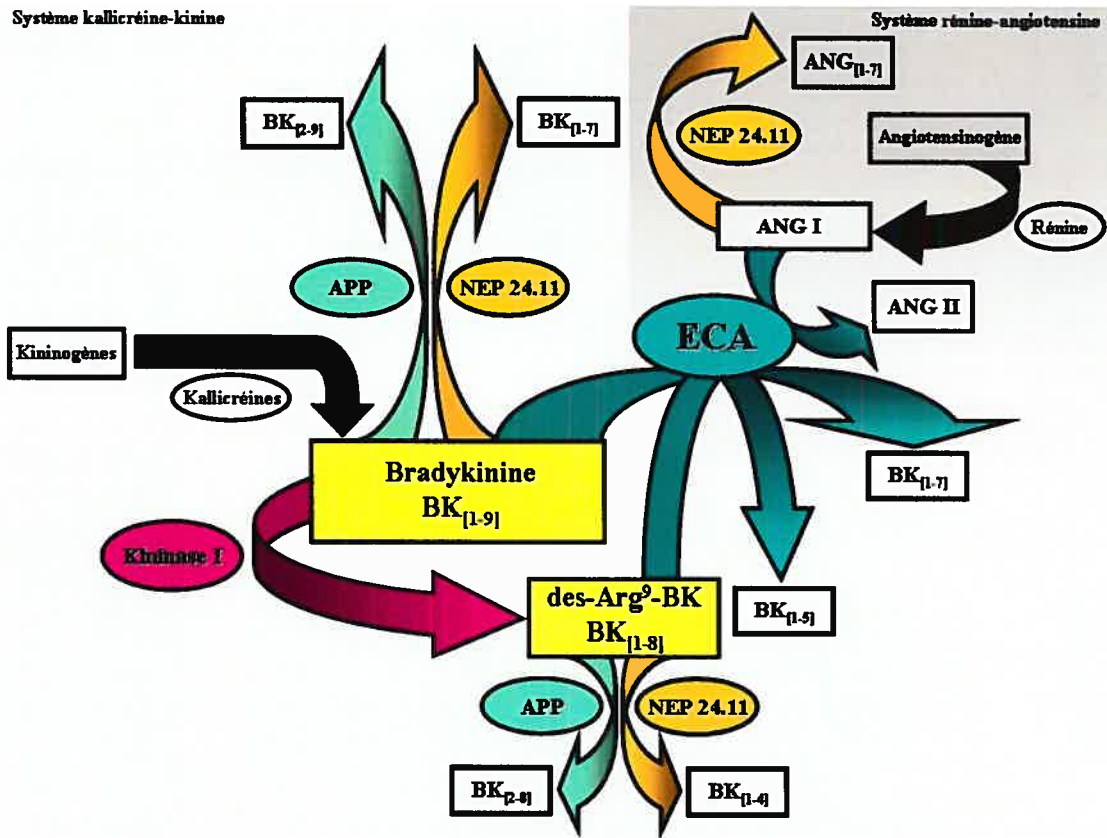


Figure 5.

Les systèmes kallibréine-kinine et rénine-angiotensine où l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) assure une interaction entre les deux systèmes. Représentation schématique de la participation des différentes voies métaboliques plasmatiques catabolisant la BK et son métabolite actif la des-Arg⁹-BK chez l'humain. APP : aminopeptidase P; NEP 24.11 : néprilysine; ANG : angiotensine.

L'enzyme de conversion de l'angiotensine germinale ne comporte qu'un site catalytique actif correspondant au domaine en position carboxy-terminale de l'ECA somatique (Hooper and Turner 2003). Les deux isoformes de l'ECA ont donc une activité dipeptidyl carboxypeptidasique dépendante du cation Zn^{2+} (Turner and Hooper 2002).

3.2.1.2 Synthèse, régulation et localisation

Les séquences génomiques et structurales des deux isoformes de l'ECA sont connues depuis 1991 (Hubert, Houot et al. 1991). L'enzyme de conversion de l'angiotensine somatique et germinale sont transcrites à partir d'un même gène localisé sur le chromosome 17q23 mais par des sites d'initiation différents et sous l'influence de promoteurs différents (Howard, Shai et al. 1990; Sen, Thekkumkara et al. 1990; Hubert, Houot et al. 1991). Mise à part leur spécificité tissulaire distincte, l'expression des deux transcrits de l'ECA est aussi régulée par différents contrôles hormonaux comme par exemple l'enzyme endothéliale est induite par les glucocorticoïdes alors que la forme germinale est stimulée par les androgènes (Hubert, Houot et al. 1991). L'enzyme de conversion de l'angiotensine somatique est une ectoenzyme des cellules endothéliales vasculaires et de plusieurs autres types cellulaires (cellules épithéliales absorbatives, neurones, cellules mononucléaires) où elle est synthétisée. Bien que l'ECA soit à prime à bord une protéine membranaire, une forme soluble de l'enzyme est présente dans plusieurs fluides corporels. La forme sécrétée de l'ECA présente dans le plasma à la concentration relativement élevée de 10^{-9} M (Alhenc-Gelas, Weare et al. 1983) résulte d'un clivage protéolytique

post-traductionnel de la partie carboxy-terminale de la molécule par une sécrétase ou « sheddase », elle aussi une métallopeptidase à zinc, libérant l'ECA de son ancrage à la membrane des cellules endothéliales (Oppong and Hooper 1993; Allinson, Parkin et al. 2004; Parkin, Turner et al. 2004). La nature exacte de l'enzyme impliquée dans ce mécanisme et sa situation intracellulaire ou membranaire est incertaine. L'enzyme plasmatique est considérée comme beaucoup moins importante que l'enzyme membranaire endothéliale qui, par son abondance, assure l'essentiel du métabolisme des peptides vasoactifs dans la circulation. Cependant, cette enzyme plasmatique est accessible à l'investigation clinique.

3.2.1.3 Propriétés

3.2.1.3.1 Angiotensinase vs kininase

C'est en 1975 que Erdös et ses collaborateurs montraient que la kininase II et l'enzyme de conversion de l'angiotensine étaient en fait une seule et même enzyme capable de catalyser à la fois la synthèse de l'angiotensine II vasoconstrictrice et l'inactivation de la BK vasodilatatrice (Yang, Erdos et al. 1970; Erdos 1975). L'enzyme de conversion de l'angiotensine I contribuerait à la régulation de la pression artérielle et/ou des flux sanguins locaux non seulement par la conversion de l'angiotensine I mais également par l'inactivation de la BK. Ce concept, quelque peu radical à l'époque, de dualité enzymatique a donc été attribué à l'ECA (Yang, Erdos et al. 1970; Yang, Erdos et al. 1971).

L'angiotensine I fut longtemps considérée comme le principal substrat physiologique de l'ECA où ce dernier transforme l'angiotensine I en angiotensine II par coupure du dipeptide His⁹-Leu¹⁰. Cependant la différence de K_m (K_m angiotensine I : 16 μ M; K_m

BK : 0.18 μ M) font que l'ECA est considéré à l'heure actuelle comme une kininase plutôt qu'une angiotensinase (Erdos 1990; Blais, Marceau et al. 2000), propriété que possèdent les deux sites actifs de la forme somatique (Jaspard, Wei et al. 1993). Les deux sites actifs de l'ECA endothéliale ont par contre des propriétés enzymatiques différentes où le site actif en position carboxy-terminale est très sensible à l'activation par le chlore qui stimule l'hydrolyse de l'angiotensine I alors que celui situé en position amino-terminale est beaucoup moins dépendant de cet ion (Wei, Clauser et al. 1992; Jaspard, Wei et al. 1993).

L'importance de l'ECA dans le métabolisme de la BK peut s'expliquer par l'affinité de cette peptidase pour cette dernière. En étant une peptidyl-dipeptidase, l'ECA inactive la BK en hydrolysant deux liens distincts à l'extrémité carboxy-terminale. L'enzyme de conversion de l'angiotensine I clive donc séquentiellement le dipeptide Phe⁸-Arg⁹ et ensuite le lien Phe⁵-Ser⁶ afin de générer le second dipeptide Ser⁶-Pro⁷, transformant la BK en un produit final inactif BK_[1-5] (Inokuchi and Nagamatsu 1981; Oshima, Hiraga et al. 1985). L'enzyme de conversion de l'angiotensine I métabolise aussi la des-Arg⁹-BK en clivant le tripeptide Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸ à l'extrémité carboxy-terminale résultant au même pentapeptide final (Oshima, Hiraga et al. 1985).

3.2.1.3.2 Polymorphisme *I/D* de l'ECA

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I est aussi caractérisée par un polymorphisme *DD*, *ID*, *II*, manifesté par une différence en activité kininasique (Brown, Blais et al. 1998). La présence (insertion, *I*) ou l'absence (délétion, *D*) de 287 bases à l'intron 16 définit le polymorphisme de l'ECA (Rigat, Hubert et al. 1990). Il

existe une relation entre le polymorphisme et l'activité de l'ECA circulante, où les homozygotes *DD* ont une activité haute, les homozygotes *II* une activité basse et les hétérozygotes présentant une activité intermédiaire. Le polymorphisme génétique de l'ECA (*I/D*), bien que lié à une prédisposition génétique vis-à-vis de l'infarctus du myocarde ou de l'hypertrophie ventriculaire du cœur, ne paraît pas corrélé directement à l'hypertension artérielle. Quoique associé à différents types de pathologies, la signification de ce polymorphisme reste mal connue d'autant plus que c'est l'ECA ancrée à la membrane endothéliale qui est la principale convertase et non l'enzyme circulante (Sayed-Tabatabaei, Oostra et al. 2006).

3.2.1.3.3 ECA2 vs ECA

Plusieurs protéines possèdent une similarité de séquence avec l'ECA mais la seule d'entre elles à être spécifiquement reliée à l'ECA est l'enzyme de conversion de l'angiotensine I-2 (ECA2). Ce premier homologue connu de l'ECA démontre plus de 60% de similarité de séquence avec l'ECA (Donoghue, Hsieh et al. 2000; Tipnis, Hooper et al. 2000). Il s'agit aussi d'une glycoprotéine membranaire de type I présente à la surface des cellules endothéliales et épithéliales ne comportant toutefois qu'un seul domaine avec un site actif qui par comparaison de séquence ressemble beaucoup plus au domaine amino-terminal que carboxy-terminal de l'ECA somatique (Donoghue, Hsieh et al. 2000; Tipnis, Hooper et al. 2000). Bien que sa distribution tissulaire soit restreinte aux testicules, au cœur, aux reins et au tractus gastro-intestinal, l'ECA2 hydrolyse efficacement la des-Arg⁹-BK ($k_{cat}/K_m = 1.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) mais est incapable d'hydrolyser la BK contrairement à l'ECA (Vickers, Hales

et al. 2002). L'enzyme de conversion de l'angiotensine I-2 diffère aussi de l'ECA par son action de carboxypeptidase éliminant qu'un seul résidu d'acide aminé de ses substrats lesquels incluent l'angiotensine I et II, et par son insensibilité aux inhibiteurs classiques de l'ECA (Donoghue, Hsieh et al. 2000).

Finalement, la découverte de l'ECA2 révèle une cascade enzymatique tout aussi complexe que l'ECA qui pourrait influencer le système rénine-angiotensine à l'intérieur du rein au niveau de l'expression de molécules fonctionnelles telles que l'angiotensine II et l'angiotensine₁₋₇ (Chappel and Ferrario 2006; Tikellis, Cooper et al. 2006).

3.2.1.3.4 **Activité GPIase**

Kondoh et ses collaborateurs ont rapporté que l'ECA posséderait une nouvelle fonction soit l'habileté de libérer les protéines ancrées aux membranes cellulaires par un pont glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Kondoh, Tojo et al. 2005). Cette activité GPIase serait indépendante du site actif dépendant du zinc impliqué dans le métabolisme de l'angiotensine I et de la BK et aucun motif consensus aux glycosidases ni aux lectines dans la séquence en acides aminés de l'ECA n'a pu être identifié. Par la suite, afin de confirmer ces résultats, Leisle et ses collaborateurs ont étudié si différentes sources d'ECA pouvaient cliver des protéines à ancre GPI dans une variété de contexte expérimental (Leisle, Parkin et al. 2005). Les résultats de cette étude démontrent qu'aucune préparation d'ECA n'a entraîné une augmentation significative du taux de protéines à ancre GPI au-dessus du niveau basal. Ils n'ont trouvé aucune évidence que l'ECA possède bel et bien une activité GPIase

considérable. Leurs résultats laissent un doute quant à la véracité de la nouvelle propriété que Kondoh et ses collaborateurs ont attribué à l'ECA.

3.2.2 Aminopeptidase P

3.2.2.1 Définition

L'aminopeptidase P (APP, X-prolyl aminopeptidase, EC 3.4.11.9) existe au moins sous deux formes : une forme cytosolique (APPc) et une forme membranaire (APPm), toutes deux douées d'une activité X-prolyl aminopeptidasique et possédant 43% d'homologie (Rawlings and Barrett 2000). L'aminopeptidase P membranaire est une métallopeptidase zinc-dépendante fortement glycosylée en position amino-terminale et comporte en position carboxy-terminale une ancre GPI qui augmente son poids moléculaire à 90kDa approximativement lui permettant d'être liée à la membrane des cellules (Venema, Ju et al. 1997). Une forme d'APPm soluble a récemment été produite et caractérisée *in vitro* par notre laboratoire dont la masse moléculaire est de 85kDa (Molinaro, Carmona et al. 2005). L'aminopeptidase P cytosolique est tant qu'à elle un homodimère de 70kDa par sous-unités (Cottrell, Hooper et al. 2000).

Les effets des ions divalents sur l'activité de l'APP semblent différer pour la forme cytosolique et membranaire de l'enzyme (Molinaro, Boileau et al. 2004). Alors que l'APPm utilise le Zn^{2+} à son site actif, l'APPc est activée *in vitro* par la présence de Mn^{2+} et non par le Zn^{2+} lequel est inhibiteur (Hooper, Hryszko et al. 1992; Cottrell, Hooper et al. 2000).

3.2.2.2 Synthèse, localisation et propriétés

L'aminopeptidase P cytosolique est codée par le gène *XPNPEPL* localisé au chromosome 10q25.3, alors que le gène *XPNPEP2* qui code pour l'APP_m est situé au locus Xq25-26.1 (Sprinkle, Stone et al. 1998; Sprinkle, Caldwell et al. 2000). Il y a certaines évidences démontrant l'existence d'une autre forme d'APP chez les mammifères. Cette troisième isoforme est hypothétique et a été identifiée selon une homologie séquence. La localisation chromosomale de cette isoforme est 22q13.31-q13.33 et semble posséder une sous-unité de 57kDa, ce qui lui donne une taille inférieure à l'APP cytosolique et membranaire (Ersahin, Szpaderska et al. 2005).

Alors que l'APP_c est soluble, l'APP_m, elle, est associée à la surface externe de la membrane des cellules endothéliales ou des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale ou des tubules rénaux par son pont GPI (Hooper and Turner 1988; Lasch, Moschner et al. 1998).

L'aminopeptidase P cytosolique présente une grande spécificité de substrat et peut cliver les dipeptides X-Pro aussi bien que les peptides de la forme de X-Pro-Y où X et Y correspondent à un acide aminé commun (Harbeck and Mentlein 1991; Rusu and Yaron 1992; Gilmartin and O'Cuinn 1999). Contrairement à l'APP_c, l'APP_m possède une spécificité de substrat plus restreinte. L'aminopeptidase P membranaire n'hydrolyse pas les dipeptides X-Pro et clive difficilement les peptides X-Pro-Y lorsque X est une proline ou une glycine, ou lorsque Y est un acide aminé avec une chaîne volumineuse (Simmons and Orawski 1992; Yoshimoto, Orawski et al. 1994; Orawski and Simmons 1995).

Les kinines sont les principaux substrats de l'APP. En effet, la deuxième enzyme en importance responsable de l'inactivation de la BK est l'APP. Par contre, en ce qui concerne l'inactivation de la des-Arg⁹-BK, on assiste à une situation inverse à celle décrite pour la BK : l'APP est la principale voie de dégradation de la des-Arg⁹-BK comptant pour près de 65% de l'activité enzymatique de dégradation (Decarie, Raymond et al. 1996; Erdös and Skidgel 1997; Blais, Marc-Aurele et al. 1999; Cyr, Lepage et al. 2001) Ainsi dans le plasma humain, l'APP transforme respectivement la BK et la des-Arg⁹-BK en deux métabolites inactifs, soit la BK_[2-9] et la BK_[2-8].

3.2.2.3 Régulation génétique

L'activité plasmatique de l'APP semble être régulée au moins à deux différents niveaux. Le premier serait lors de la synthèse cellulaire de l'enzyme et ce, par des mécanismes transcriptionnels et possiblement post-transcriptionnels responsables de la quantité d'APPm liée à la surface des cellules par son ancre GPI. Le second niveau serait lors du clivage de son ancre GPI libérant la protéine dans le plasma. La phospholipase C semble être un candidat potentiel apte à couper le pont GPI de l'enzyme afin de permettre sa libération. Plus intéressant encore, c'est la récente étude qui rapporte que l'ECA possède une activité GPIase (Kondoh, Tojo et al. 2005). Si tel est le cas, comme l'APPm et l'ECA sont souvent toutes les deux exprimées par les mêmes cellules, il serait intéressant de voir si la concentration en ECA affecte l'APPm.

L'identification des facteurs responsables de la régulation de l'activité plasmatique de l'APP n'est pas encore élucidée et tout demeure à l'état d'hypothèse.

3.2.3 Carboxypeptidase M et N

Connues comme des kininases I, l'une ou l'autre sont des peptidases zinciques présentant 41% d'homologie de structure (Tan, Chan et al. 1989). La carboxypeptidase N (kininase I, EC 3.4.17.3) est une protéine tétramérique synthétisée au niveau du foie, alors que la carboxypeptidase M est une peptidase membranaire de nature GPI ancrée à la membrane des poumons et des cellules épithéliales des reins. Ces enzymes sont responsables du métabolisme de différents peptides possédant un résidu Arg ou Lys en partie carboxy-terminale, comme les anaphylatoxines C3a et C5a (Skidgel 1988). Les kininases I ne sont pas une voie de dégradation majeure de la BK et de la KD mais le deviennent lorsque l'ECA est inhibée (Erdös and Skidgel 1997; Cyr, Lepage et al. 2001). Les peptides résultant de cette voie de dégradation, la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD, sont actifs et possèdent une affinité pour le récepteur B₁ contrairement à la BK et la KD qui ont le pouvoir de liaison au récepteur B₂ (Skidgel 1988; Erdös and Skidgel 1997; Cyr, Lepage et al. 2001).

3.2.4 Autres peptidases : Néprilysine, Aminopeptidase N, Dipeptidyl-peptidase IV et Carboxypeptidase U

La néprilysine (EC 3.4.24.11, néprilysine, NEP 24.11) est une protéine de surface présentant une courte-queue membranaire insensible à l'activité enzymatique de toute sécrétase (Hooper 1994). Le gène codant pour la néprilysine (*MME*) est localisé au locus 3q21-q27 (Barker, Shipp et al. 1989). D'abord identifiée au niveau des cellules épithéliales de la bordure en brosse du tubule contourné proximal rénal,

elle a également été mise en évidence dans d'autres tissus comme le cerveau, l'endothélium, les testicules ou encore la moelle osseuse et les glandes salivaires (Kerr and Kenny 1974). Le rôle physiologique de la néprilysine dépend de sa localisation tissulaire et de la présence de ses différents substrats. Au niveau des reins, elle constitue la principale peptidase responsable du métabolisme de la BK. Au niveau de l'endothélium, elle joue un rôle semblable à celui de l'ECA tandis que dans le plasma, son rôle est négligeable (Decarie, Raymond et al. 1996). Au niveau de l'endothélium vasculaire, l'ECA constitue l'enzyme principale responsable de la dégradation de la BK et nous avons montré qu'une inhibition de l'ECA entraîne la mise en jeu d'une autre enzyme, la néprilysine. Ce phénomène s'explique aisément par l'affinité des deux enzymes pour la BK (Dumoulin, Adam et al. 1998). Comme l'ECA, la néprilysine inactive la BK en hydrolysant de façon séquentielle le dipeptide Phe⁸-Arg⁹ et le tripeptide Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷ générant la BK_[1-4], ce même métabolite est obtenu lors du métabolisme de la des-Arg⁹-BK (Gafford, Skidgel et al. 1983). Outre les kinines, la néprilysine inactive aussi d'autres peptides comme les enképhalines ou les facteurs natriurétiques (Kanazawa, Casley et al. 1992; Iwata, Tsubuki et al. 2000).

D'autres peptidases jouent un rôle secondaire dans le catabolisme des kinines ou de leurs métabolites. L'aminopeptidase N (APN, CD13) est une ectoenzyme (EC3.4.11.2) de la famille des métallopeptidases à zinc 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 (Pfleiderer and Celliers 1963; Shipp and Look 1993; Antczak, De Meester et al. 2001; Kehlen, Lendeckel et al. 2003). Due à

son activité ectopeptidase, l'APN catalyse l'hydrolyse de résidus d'acides aminés neutres situés en position amino-terminale de peptides vasoactifs, de neuropeptides hormonaux, et de cytokines telles que l'interleukine 6 et 8 (Ward, Benter et al. 1990; Hoffmann, Faust et al. 1993). Son importance dans le domaine des kinines est reliée à son habileté à hydrolyser le lien Lys-Arg en position amino-terminale de la KD et la des-Arg¹⁰-KD. L'APN est impliquée dans la majorité des voies d'inactivation de la des-Arg¹⁰-KD dans l'artère ombilicale isolée de l'humain ainsi que l'aorte de lapin (Fortin, Gera et al. 2005; Pelorosso, Brodsky et al. 2005). Cette réaction est fonctionnellement significative pour ce dernier peptide qui est l'agoniste optimal du récepteur B₁ chez l'humain et plusieurs autres espèces, puisque le composé qui en résulte, la des-Arg⁹-BK, a une affinité moindre pour le récepteur B₁.

Les propriétés de la dipeptidyl-peptidase IV (DPP IV) ont intensément été passées en revue (Lambeir, Durinx et al. 2003). Cette enzyme (CD26; EC 3.4.14.5) est une prolyl-oligopeptidase de la famille des sérines protéases (Lambeir, Durinx et al. 2003) exprimée principalement au niveau des rein et de l'intestin grêle, mais elle est aussi présente dans les poumons, la moëlle osseuse, le foie et la rate (Vanhoof, De Meester et al. 1992; Gorrell, Gysbers et al. 2001; de Meester, Lambeir et al. 2003). Une forme soluble circulante de la DPP IV 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 DPP IV possède plusieurs fonctions physiologiques. Cette enzyme dégrade les métabolites inactifs BK_[2-8] et BK_[2-9] générés par l'APPm en lysant le lien Pro³-Gly⁴ (Lambeir, Durinx et al. 2003). Parmi les autres peptides clivés par cette enzyme, on retrouve les chimiokines, les

neuropeptides, la substance P ainsi que certaines hormones peptidiques circulant dans le sang (Mentlein 1999; Lambeir, Durinx et al. 2003). La DPP IV joue donc un rôle majeur dans la régulation de plusieurs processus physiologiques.

La carboxypeptidase U (CPU, TAFIa, EC 3.4.17.20) est une glycoprotéine monocaténaire de la famille des métallocarboxypeptidases qui utilise le Zn^{2+} à son site actif afin de cliver les résidus lysine et arginine positionnés à l'extrémité carboxy-terminale d'une variété de peptides et de protéines (Skidgel 1988). Cette carboxypeptidase semble avoir un rôle majeur dans la régulation de la balance entre coagulation et fibrinolyse où des modifications de son taux plasmatique corrélerent avec des syndromes hémorragiques ou thrombotiques. Elle agirait au niveau de la fibrine en enlevant les résidus lysines en position carboxy-terminale entraînant ainsi une diminution de la fixation du plasminogène à la fibrine, une réduction de l'activation du plasminogène par le t-PA et de la conversion du Glu-plasminogène en Lys-plasminogène où la fibrine en cours de dégradation a un rôle de cofacteur dans ces deux dernières fonctions (Wang, Boffa et al. 1998; Nesheim, Walker et al. 2001). En plus de son implication dans la fibrinolyse, cette enzyme serait responsable du métabolisme de différents peptides possédant un résidu Arg ou Lys en partie carboxy-terminale, comme les anaphylatoxines (C3a et C5a) et les kinines et jouerait ainsi un rôle dans la régulation de l'inflammation par l'inactivation de ces peptides (Sato, Miwa et al. 2000; Campbell, Lazoura et al. 2002; Myles, Nishimura et al. 2003). Il semblerait donc que la carboxypeptidase U au même titre que les kininases I agirait sur la BK la rendant inactive et modulant ainsi ses fonctions pro-inflammatoires (Willemse, Leurs et al. 2005).

II- Importances Physiopathologiques des Kinines

Une dualité existe en ce qui a trait à l'activité pharmacologique des kinines laquelle est souvent considérée soit comme proinflammatoire ou comme cardioprotective dépendamment de l'approche expérimentale ou de l'intérêt scientifique.

1. Kinines et inflammation

De nombreuses évidences pharmacologiques appuient le rôle de médiateurs endogènes de l'inflammation joué par la BK et la des-Arg⁹-BK. En fait, les kinines sont impliquées dans la mise en place et le maintien de la réaction inflammatoire locale via le récepteur B₂ pour ensuite être relayée par le récepteur B₁ où son expression est induite par les cytokines présentes. Les kinines initient cette réponse et induisent les symptômes associés aux quatre signes cardinaux de l'inflammation aussi bien que l'accumulation des leucocytes au site lésé. En effet, l'administration intra-dermique de la BK reproduit deux des signes cardinaux de l'inflammation par l'activation du récepteur B₂ (rougeur et chaleur) qui engendre une vasodilatation en raison de la stimulation de la NOS et de la phospholipase A₂, menant à la production de NO et de prostaglandine I₂ par les cellules endothéliales vasculaires (vaisseaux précapillaires) (Bhoola, Figueroa et al. 1992). De plus, sur les vaisseaux post-capillaires (veines et veinules), la BK cause une vasoconstriction par une action directe sur le muscle lisse. Ainsi, la vasodilatation des artérioles pré-capillaires et la contraction des veinules post-capillaires favorisent l'augmentation de la pression hydrostatique dans les capillaires, permettant le passage de fluides, de protéines et de médiateurs de l'inflammation vers le milieu extravasculaire (Gabbiani, Badonnel et al.

1970). L'augmentation de la perméabilité vasculaire engendrée par la BK suite à l'activation et la contraction des cellules endothéliales vasculaires conduit à une fenestration de la paroi des microvaisseaux, principalement des veinules, favorisant à nouveau l'extravasation plasmatique. Ce mécanisme vasogénique amène le troisième signe cardinal de l'inflammation soit l'œdème. Pour évaluer le rôle des kinines dans la formation de l'œdème, plusieurs modèles ont été utilisés (carragénine, lipopolysaccharide, sulfate de dextran, etc.). L'injection locale de la carragénine est connue pour sa capacité d'activation du système de contact dans les modèles d'inflammation (Decarie, Adam et al. 1996). Ainsi, l'étude effectuée par Blais et ses collaborateurs démontre clairement la présence de la BK et la des-Arg⁹-BK endogène dans le foyer inflammatoire local lors de l'induction de la réaction inflammatoire locale aiguë par la carragénine (Blais, Couture et al. 1997). De plus, ces peptides sont directement impliqués dans la réponse inflammatoire aiguë locale et systémique via la stimulation de leur récepteur.

La douleur est le quatrième signe cardinal de l'inflammation. L'implication des récepteurs des kinines et leur rôle spécifique dans la perception de la douleur inflammatoire corrélient avec l'amplitude et les cinétiques de leur expression. Constitutivement exprimé à la surface des neurones sensoriels afférents, le récepteur B₂ joue donc un rôle crucial dans la nociception d'origine inflammatoire (Dray, Patel et al. 1992; Dray 1997; Yusuf, Sleight et al. 2000). Par contre, dans des modèles de douleur inflammatoire persistante, c'est la des-Arg⁹-BK qui participe à l'induction de l'hyperalgésie mécanique et thermique persistante d'origine inflammatoire via le récepteur B₁ (Davis and Perkins 1994). De plus, des travaux effectués par Perkins et

ses collaborateurs ont montré qu'un antagoniste pharmacologique du récepteur B₁, [Leu⁸]-des-Arg⁹-BK, induit une analgésie dans les modèles animaux et agit contrairement au récepteur B₂ où l'utilisation d'HOE140 comme antagoniste produit un effet seulement dans la phase précoce de l'hyperalgésie (Perkins, Campbell et al. 1993). Le récepteur B₁ semble donc être le principal inducteur de la persistance inflammatoire associée à l'hyperalgésie.

2. Pouvoir cardioprotecteur des kinines

Les systèmes kallibréine-kinine et rénine-angiotensine aux propriétés opposées sont reliés entre eux par l'ECA et cette position stratégique explique les effets pharmacologiques des inhibiteurs de l'ECA. Les inhibiteurs de l'ECA utilisés couramment en clinique exercent une action à deux niveaux : inhibition de la synthèse d'angiotensine II mais également dégradation des kinines. Les effets bénéfiques de cette classe de médicaments observée en thérapeutique ont d'abord été attribués à la réduction de la concentration en angiotensine II mais plus récemment à l'augmentation des effets des kinines via l'inhibition de leur dégradation (Linz, Wiemer et al. 1995). Par contre aucune évidence directe n'existe pour une implication des kinines endogènes dans l'effet protecteur des inhibiteurs de l'ECA au niveau du système cardiovasculaire. Mis à part ces réserves, il existe cependant de nombreuses preuves indirectes de type pharmacologique pour un tel rôle. D'une part, l'ECA est une kininase plutôt qu'une angiotensinase; la BK constitue donc un substrat préférentiel pour l'ECA (Jaspard, Wei et al. 1993; Jaspard and Alhenc-Gelas

1995). D'autre part, différentes évidences expérimentales sur l'animal, les organes isolés, les cultures cellulaires, dans des modèles d'ischémie-reperfusion *in vitro* et d'hypertension chez l'homme plaident pour un rôle des kinines dans les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ECA via le récepteur B₂. Ces différents arguments de type indirect ont fait l'objet de plusieurs articles et revues exhaustives (Linz, Martorana et al. 1990; Baumgarten, Linz et al. 1993; Chahine, Adam et al. 1993; Unger and Gohlke 1994; Wiemer, Popp et al. 1994; Wiemer, Scholkens et al. 1994; Lamontagne, Nadeau et al. 1995; Linz, Wiemer et al. 1995; Gainer, Morrow et al. 1998; Matoba, Tatsumi et al. 1999). Finalement, selon l'étude de Skidgel et ses collaborateurs, la plupart des iECA activent directement le récepteur B₁ et donc la relâche de NO par les iECA suite à la stimulation de ce récepteur peut significativement contribuer de beaucoup aux effets thérapeutiques bénéfiques de ces agents médicinaux. Il s'ensuit que l'utilisation clinique de bloqueurs des récepteurs B₁ pourrait réduire potentiellement les effets bénéfiques de l'administration d'un iECA (Skidgel, Stanisavljevic et al. 2006).

2.1 Les inhibiteurs de l'ECA

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (iECA) constituent une classe importante de médicaments utilisés avec succès depuis plus de 20 ans dans le traitement de différentes affections cardioréovasculaires. En effet, les iECA se sont avérés des médicaments particulièrement efficaces pour traiter l'hypertension artérielle, pour diminuer la résistance à l'insuline et retarder la néphropathie et la protéinurie diabétique et non diabétique, et pour réduire l'hypertrophie ventriculaire

gauche résultant de différentes affections cardiovasculaires (infarctus du myocarde, hypertension et insuffisance cardiaque) (Nakashima, Fouad et al. 1984; Konstam 1995; Maschio, Alberti et al. 1996; GISEN 1997).

2.1.1 Définition des iECA

En 1965, Ferreira a montré que le venin de *Bothrops jararaca* pouvait contenir des substances de nature peptidique potentialisant les effets pharmacologiques de la BK et ce par inhibition de la kininase II (Ferreira 1965). Ce n'est que quelques années plus tard, suite à la découverte d'Erdős et ses collaborateurs et du concept de dualité enzymatique attribué à l'ECA que le développement des iECA vit le jour (Yang, Erdos et al. 1970; Erdos 1975). Il était dès lors logique d'imaginer l'utilisation de ces composés dans la prévention des maladies cardiovasculaires.

En se basant sur des relations structure-activité, Cushman et Ondetti synthétisèrent en 1977 le premier iECA non-peptidique, le captopril ($K_i = 1700$ pM), et subséquemment au fil des ans, la commercialisation de plus d'une douzaine d'iECA a eu lieu devenant aujourd'hui une classe de médicaments très largement utilisée (Cushman, Cheung et al. 1977; Ondetti, Rubin et al. 1977). Le captopril est le chef de file de la famille des PRIL qui peuvent être classés en 3 catégories en fonction de l'élément structural qui interagit avec l'ECA : les iECA aux fonctions sulfhydryques dont le captopril; de nature carboxylique (énalapril, bénazépril, lisinopril, quinapril et ramipril) ou aux fonctions phosphorées (fosinopril) (Verme-Gibboney 1997). Cette classification chimique de même que les autres propriétés pharmacocinétiques

attribués à ces différents composés n'ont cependant aucune application clinique réelle (Jackson 2006).

2.2 Indications cliniques des iECA

Cette classe thérapeutique a su démontrer au fil des ans, sa grande efficacité dans les maladies aussi diverses que l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque ou la néphropathie diabétique (Ball and White 2003). Les iECA vont entraîner une baisse de la pression artérielle systémique, systolique et diastolique, chez le patient hypertendu en provoquant une vasodilatation à la fois artérielle et veineuse. Au niveau rénal, les iECA augmentent le débit sanguin rénal, contribuent à une hausse de la diurèse par une diminution de la libération d'aldostérone, suppriment l'action anti-natriurétique de l'angiotensine II, et potentialisent l'effet natriurétique des kinines (Bernadet-Monrozies, Rostaing et al. 2002).

Depuis nombre d'années, différentes études ont montré non seulement l'effet anti-hypertenseur et néphroprotecteur chez les diabétiques des iECA mais surtout qu'ils réduisent la mortalité ainsi que la morbidité chez les insuffisants cardiaques ou en post-infarctus. Récemment, trois grandes études cliniques ont évalué l'impact des iECA et leurs bienfaits dans le traitement de la dysfonction ventriculaire gauche, chez les patients ayant subi un infarctus du myocarde, souffrant d'insuffisance cardiaque ou d'athérosclérose : HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) (Yusuf, Sleight et al. 2000), EUROPA (European trial on Reduction Of cardiac events with Perindopril among patients with stable coronary Artery disease) (Fox 2003), et PEACE (Prevention of Events with Angiotensin-Converting-Enzyme

inhibition trial) (Braunwald, Domanski et al. 2004). En résumé, ces essais cliniques démontrent clairement les bénéfices de l'utilisation des iECA en réduisant la survenue d'accidents cardiovasculaires chez des patients à risque élevé.

2.3 Effets pharmacologiques des iECA

L'inhibition de l'ECA permet de rétablir l'équilibre entre les systèmes antagonistes rénine-angiotensine et kallibréine-kinine. Le système rénine-angiotensine joue un rôle central dans la régulation de l'homéostasie, participe à la régulation de la vasomotricité et du remodelage dans le système cardiovasculaire. Deux enzymes constituent le cœur de ce système et agissent successivement : la rénine produit le décapeptide inactif angiotensine I à partir de l'angiotensinogène d'origine hépatique; l'ECA clive les deux résidus carboxy-terminaux de l'angiotensine I pour produire l'angiotensine II, peptide effecteur de ce système. Outre les effets physiologiques vasoconstricteurs et stimulateurs de la sécrétion de l'aldostérone par la surrénale, l'angiotensine II est en partie responsable de nombreux processus délétères, dont l'hyperplasie des cellules musculaires lisses, l'hypertrophie des myocytes cardiaques, la fibrose, l'apoptose et le stress oxydatif de nombreux types de cellules du système cardiovasculaire. Ainsi, le blocage de ces processus soulève un intérêt thérapeutique évident. Donc, les effets pharmacologiques des iECA ont d'abord été attribués à leur action sur le système rénine-angiotensine : les iECA empêchent la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II. À l'heure actuelle cependant, il existe différentes évidences pour un rôle des kinines et principalement de la BK dans les effets cardiovasculaires de ces médicaments.

2.3.1 Effets bénéfiques des iECA : rôle des kinines

Plusieurs données expérimentales suggèrent que les kinines participent aux effets protecteurs exercés au niveau du système cardiovasculaire par les iECA. Ces données, de nature pharmacologique pour la plupart, s'appuient sur le fait que la BK exogène produit les mêmes effets que ceux exercés par les iECA dans des modèles animaux, ces effets étant par ailleurs supprimés par l'administration d'icatibant (HOE140) (Perez, Molinaro et al. 2001). La BK participerait donc aux effets vasculaires des iECA en exerçant un effet vasodilatateur au niveau du réseau coronaire médié par le NO (Remme 1997). Les effets bénéfiques des iECA sont donc attribués, du moins en partie, à la prolongation de la durée de demi-vie de la BK et la potentialisation de son effet sur le récepteur B₂.

2.3.2 BK, iECA et hypertension artérielle

Expérimentalement, administrée par voie intraveineuse, la BK exerce un effet vasodilatateur et hypotenseur puissant. À l'inverse, les antagonistes du récepteur B₂ provoquent une augmentation de la pression artérielle, ce qui confirme que, chez l'animal, les kinines participent à sa régulation. Différentes évidences expérimentales plaident pour un rôle des kinines dans les effets bénéfiques des iECA. Tout d'abord, *in vivo* chez l'animal et *ex vivo* sur des organes isolés, les effets des iECA sur le système cardiovasculaire sont semblables à ceux de la BK exogène à doses pharmacologiques (Linz and Scholkens 1992; Bouaziz, Joulin et al. 1994; Barbe, Su et al. 1996). Sur plusieurs modèles animaux présentant une hypertension artérielle rénovasculaire, il a été démontré que l'HOE140 (antagoniste du récepteur B₂) réduit la

réponse hémodynamique aux iECA, ceci aussi bien en traitement aigu ou chronique (Bao, Gohlke et al. 1992). Au niveau des cellules endothéliales en culture, les iECA potentialisent la production de NO et prostaglandines I₂, deux seconds messagers de la BK au niveau endothélial (Wiemer, Popp et al. 1994). Un tel effet potentialisateur a également été montré sur la production de BK endogène mesurée dans le surnageant de culture de cellules endothéliales, qui libèrent de la BK *in vitro* à des concentrations de l'ordre de la nanomolaire tout comme les cardiomyocytes, suite à une incubation préalable des cellules avec un iECA (Wiemer, Scholkens et al. 1991; Wiemer, Scholkens et al. 1994). Dans ces modèles d'hypertension, l'effet hypotenseur des iECA est affecté de façon variable par le blocage des récepteurs B₂ chez l'animal (Unger and Gohlke 1994). Par la suite, chez l'homme, cette participation des kinines a aussi été confirmée où l'effet hypotenseur du captopril a été affecté de façon variable par l'icatibant et ce, chez un petit groupe de patients hypertendus (Brown, Ryder et al. 1996; Gainer, Morrow et al. 1998; Brown, Gainer et al. 2000; Cruden, Witherow et al. 2004).

2.3.3 Hypertrophie cardiaque, ischémie cardiaque et athérosclérose

Les effets bénéfiques des iECA sur l'hypertrophie ventriculaire gauche en période post-infarctus ont surtout été étudiés chez des rats munis d'un système kallicréine-kinine normal, un élément indispensable aux effets cardioprotecteurs des iECA. Il a été démontré que ces effets sont plutôt médiés par une potentialisation de la BK que par une inhibition de la formation de l'angiotensine II (Liu, Yang et al. 2000) puisqu'une hypertrophie cardiaque se développe chez l'animal knock-out pour le

récepteur B₂ (Emanuelli, Maestri et al. 1999). De plus, l'antagonisme du récepteur B₂ annule l'effet antihypertrophique des iECA chez l'animal (Linz and Scholkens 1992). Dans des modèles expérimentaux d'ischémie totale ou partielle, la BK et les iECA ont montré le même effet cardioprotecteur médié par le récepteur B₂ soit une diminution de la taille de l'infarctus (Scholkens, Linz et al. 1988; Linz, Wiemer et al. 1995; Wirth, Linz et al. 1997). De plus, dans différents modèles d'ischémie-reperfusion *in vitro*, la perfusion d'un iECA, de BK, mais aussi de des-Arg⁹-BK diminue le nombre d'arythmies à la reperfusion (Linz, Martorana et al. 1990; Chahine, Adam et al. 1993). De même *in vitro*, la perfusion d'un iECA potentialise la libération de BK ou de des-Arg⁹-BK endogène à partir du cœur ischémié selon le modèle expérimental utilisé (Baumgarten, Linz et al. 1993; Lamontagne, Nadeau et al. 1995). Les effets anti-ischémiques mais aussi anti-athérosclérotiques des iECA sont annulés par l'antagonisme du récepteur B₂, effets démontrés chez l'animal (Martorana, Kettenbach et al. 1990; Hartman, Hullinger et al. 1993; Hartman 1995).

2.3.4 Insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque se caractérise non seulement par une diminution de la capacité d'éjection du cœur mais également par des anomalies de la circulation périphérique, en particulier la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Les iECA ont démontré leur efficacité dans cette indication en termes de réduction de la mortalité et de la symptomatologie des patients. Cette action est classiquement rapportée à la réduction de la production d'angiotensine II mais implique également les kinines. En effet, chez des chiens insuffisants cardiaques, il a été démontré que la

réponse vasculaire aux kinines est préservée et les mêmes constatations ont été récemment rapportées chez les transplantés cardiaques (Aptecar, Teiger et al. 2000). De plus, sur des cœurs humains insuffisants explantés avant transplantation cardiaque, les kinines engendrent une production notable de NO, bien que ces niveaux de NO soit inférieure à ceux observés chez les sujets témoins (Kichuk, Zhang et al. 1997). L'ensemble de ces données suggère donc que la production et les effets des kinines au niveau vasculaire sont préservés lors d'insuffisance cardiaque démontrant ainsi la participation des kinines aux effets bénéfiques des iECA.

2.3.5 Homéostasie rénale

Un traitement aux iECA a permis d'atténuer de manière significative le développement de maladie rénale comme la glomérulosclérose progressive ou néphrosclérose et la protéinurie et ce, dans des modèles expérimentaux de masse rénale réduite et de diabète mellitus. Des études cliniques sont venues confirmer que l'usage d'iECA assurait une protection rénale dans les diabètes insulino et non-insulino dépendants ainsi que dans d'autres maladies rénales chroniques découlant d'autres causes (Maschio, Alberti et al. 1996; GISEN 1997). La production locale de kinines potentialisée par l'inhibition de l'ECA contribue au contrôle du flot sanguin rénal, à la natriurèse et à la diurèse; plus précisément, la BK, par son action sur les artérioles pré- et post-glomérulaires, se trouve à accroître le flot sanguin (Bhoola, Figueroa et al. 1992).

3. Kinines et effets indésirables associés aux iECA

Malgré leur efficacité clinique et comme toute thérapie médicamenteuse, les iECA ne sont pas dénués d'effets secondaires indésirables. Mise à part l'hyperkaliémie, la protéinurie, l'insuffisance rénale aiguë, la neutropénie et l'hépatotoxicité, la toux sèche persistante et non soulagée par les antitussifs habituels est considérée comme l'effet secondaire chronique le plus fréquemment rencontré avec cette classe de médicaments (Overlack 1996), rapporté dès 1982 avec le captopril (Havelka, Vetter et al. 1982). L'incidence varie selon les études. En effet, jusqu'à 20% des patients traités présentent cet effet indésirable associé à la prise d'un iECA, incidence significativement plus élevée chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque (26%) que chez les hypertendus (14%), et certains doivent même interrompre le traitement pour un autre antihypertenseur (Ravid, Lishner et al. 1994; Kostis, Shelton et al. 1996). Certaines évidences expérimentales plaident pour une responsabilité de la BK et/ou de la substance P dans la physiopathologie de cet effet secondaire (Israïli and Hall 1992; Overlack 1996; Takahama, Araki et al. 1996; Mukae, Aoki et al. 2000; Dykewicz 2004). Ces agents pharmacologiques puissants sont aussi à l'origine d'effets indésirables aigus, rares mais sévères : l'angioœdème, la réaction anaphylactoïde et les réactions d'hypotension sévères. Les bases physiopathologiques de ces effets secondaires associés aux iECA résultent d'une accumulation de peptides inflammatoires tels que la BK et son métabolite actif la des-Arg⁹-BK, accumulation qui s'explique surtout par une anomalie de leur catabolisme et possiblement par une surproduction lors de l'activation du système de contact du plasma ou d'une autre voie de la coagulation.

3.1 Les effets indésirables aigus des iECA

Les effets indésirables aigus associés aux iECA dont la nature varie avec le contexte clinique sont : l'angioœdème rapporté chez des patients hypertendus et insuffisants cardiaques ainsi que chez des patients souffrant d'un accident vasculaire cérébral sous traitement fibrinolytique; les réactions anaphylactoïdes en hémodialyse et les réactions d'hypotension sévères observées lors de transfusions sanguines.

3.1.1 L'angioœdème chez le patient hypertendu et le patient insuffisant cardiaque

3.1.1.1 Définition, symptomatologie et incidence

La première description de l'angioœdème (AO) est attribuée à John Laws Milton en 1876, et ce dernier utilisa le terme « urticaire géant » pour décrire l'œdème affectant le derme et l'espace sous-cutané (Greaves and Lawlor 1991). La notion d'« œdème angioneurotique » ou œdème de Quincke suggérait l'existence de médiateurs d'origine neurologique responsables de la symptomatologie pouvant affecter différentes régions du corps. Les causes peuvent être de nature allergique, médicamenteuse ou due à une anomalie de l'inhibiteur de la C1 estérase (C1INH) congénitale ou acquise (Kaplan and Greaves 2005). Il est possible de distinguer principalement deux grands types d'AO : une forme d'origine génétique et donc l'angioœdème héréditaire (AOH) et une forme acquise (AOA) (**Tableau III**).

L'angioœdème héréditaire identifié par William Osler dès 1888 est causé par un déficit quantitatif (type I) ou qualitatif (type II) en C1INH (Donaldson and Evans 1963; Davis 1988). Classiquement, il y a deux variantes dans cette maladie : l'AOH de type I qui représente 85% des individus où un seul des deux gènes est fonctionnel

résultant en une diminution de la quantité de C1INH présent dans le plasma, et l'AOH de type II qui regroupe 15% des individus où la concentration effective de la protéine C1INH est normale ou même plus élevée que la normale mais la molécule n'est pas fonctionnelle (Greaves and Lawlor 1991). Les études *in vitro* montrent que la production de C1INH dans l'AOH de type II est normale, contrairement à ce qui s'observe dans la maladie de type I (Prada, Zahedi et al. 1998).

Par contre, un troisième type d'AO héréditaire (AOH de type III) a été décrit par Bork et ses collaborateurs (Bork and Dewald 2004). Récemment, une étude a montré que cette forme d'AO serait probablement due à une augmentation de l'activité enzymatique plasmatique du facteur de Hageman engendrée par la présence d'une mutation dans le gène *F12*, gène codant le facteur XII, et chez les femmes portant cette mutation, une production accrue de kinines résultant en AO est engendrée (Cichon, Martin et al. 2006). De plus, la transcription du gène *F12* est régulée positivement par les œstrogènes, expliquant ainsi la prédominance de ce type d'AO chez les femmes. La forme acquise de l'AO résulte en un déficit acquis en C1INH c'est-à-dire à une hyperconsommation du C1INH. Cette consommation est de nature idiopathique, associée à des phénomènes de nature lymphoproliférative ou, moins souvent, à des désordres auto-immuns (Melamed, Alper et al. 1986; Greaves and Lawlor 1991; Agostoni and Cicardi 1992; Nzeako, Frigas et al. 2001; Cicardi, Zingale et al. 2003).

Tableau III. Classification des différentes formes d'angioœdème. (Tableau adapté de (Bonillet, Ponard et al. 2000; Bonillet, Ponard et al. 2004)).

Formes	Types	Caractéristiques
Œdème angioneurotique héréditaire (AOH)	Type I	<ul style="list-style-type: none"> - déficit pondéral en C1INH - dû au catabolisme <i>in vivo</i> du C1INH - hétérozygote exclusif
	Type II	<ul style="list-style-type: none"> - déficit fonctionnel en C1INH - anomalie provenant d'une mutation par substitution d'acides aminés au niveau du centre réactif de la molécule ou de la partie amino-terminale - hétérozygote exclusif
	Type IIa	<ul style="list-style-type: none"> - C1INH muté donne naissance à des molécules dysfonctionnelles ne réagissant pas avec les protéases cibles - aucune formation de complexes, C1INH demeure sous sa forme native
	Type IIb	<ul style="list-style-type: none"> - C1INH muté peut réagir et former des complexes avec les protéases cibles - complexes peu stables, facilement hydrolysés en protéases libres et en C1INH clivé
	Type III	<ul style="list-style-type: none"> - taux pondéral du C1INH normal - C1INH fonctionnel - niveaux élevés d'œstrogènes - prédominance chez les femmes
Œdème angioneurotique acquis (AOA)	Type I	<ul style="list-style-type: none"> - déficit en C1INH par hyperconsommation - hyperactivation de la voie classique du complément - associé à des lymphoproliférations B bénignes ou malignes
	Type II	<ul style="list-style-type: none"> - présence d'autoanticorps anti-C1INH - associé à des dysglouloninémies et à des pathologies lymphoprolifératives
	Type médicamenteux	<ul style="list-style-type: none"> - associé aux iECA et aux antagonistes du récepteur de l'angiotensine II (AT₁) - taux pondéral du C1INH bas à normal

L'angioœdème peut être déclenché par certains médicaments comme les iECA.

L'angioœdème associé aux iECA est jusqu'à présent considéré comme acquis et le

premier épisode mettant en danger la vie d'un patient atteint d'un œdème des voies

respiratoires est rapporté avec le captopril en 1986 (Suarez, Ho et al. 1986). L'œdème peut survenir dès la première prise, lors des premiers jours de traitement, ou tardivement soit plusieurs mois après le début du traitement (Shionoiri, Takasaki et al. 1996; Sabroe and Black 1997; Agostoni, Cicardi et al. 1999). Jusqu'à tout récemment, l'incidence d'un épisode d'AO chez les patients lors d'un traitement aux iECA était considérée de 0.1 à 0.2% (Vleeming, van Amsterdam et al. 1998; Cicardi, Zingale et al. 2004).

Ces différentes formes d'AO se caractérisent par la survenue d'œdèmes sous-cutanés ou sous-muqueux à n'importe quel endroit de la peau et des voies respiratoires et digestives. Les sites de prédilection peuvent se situer au niveau viscéral et génital mais l'atteinte des muqueuses des voies aériennes supérieures notamment la zone oto-rhinolaryngée soit la langue, le pharynx et le larynx en fait toute la gravité due à une possible suffocation et peut se révéler fatale (25% de mortalité en l'absence de traitement adapté) (Moore, Hurley et al. 1988; Dean, Schultz et al. 2001). La symptomatologie comprend la survenue d'œdèmes récidivants, circonscrits, non prurigineux, sans infiltration de cellules sanguines, non érythémateux et responsables d'une sensation de tension cutanée (Israili and Hall 1992; Kaplan and Greaves 2005). Dans la majorité des cas, l'AO est une maladie non inflammatoire caractérisée par une augmentation de la perméabilité des capillaires avec une extravasation des fluides intravasculaires et s'en suit un œdème localisé des tissus sous-cutanés ou sous-muqueux d'apparition brutale. Il résulte donc de la synthèse d'un taux accru de médiateurs augmentant la perméabilité vasculaire.

3.1.1.2 Mécanismes physiopathologiques possibles

Plusieurs arguments appuient l'hypothèse voulant que la vasodilatation associée à la BK soit à l'origine de l'œdème observé avec les iECA mais même si la BK est l'acteur principal, elle ne serait pas la seule responsable des symptômes. L'activation du système de contact au cours de crises et la génération de plusieurs protéases pourraient prendre part au mécanisme de l'œdème.

Tout a débuté par l'observation de taux sanguin élevé de kinines sur des échantillons de sang prélevés dans les minutes ayant suivi l'épisode d'AO et ce, sans qu'une augmentation de fragments de kininogènes n'ait été constatée (Nussberger, Cugno et al. 1998; Agostoni, Cicardi et al. 1999; Nussberger, Cugno et al. 2002). La probabilité que ce soit une anomalie du catabolisme des kinines et non une augmentation de l'hydrolyse du précurseur de la BK qui soit à l'origine de cette concentration élevée de kinines semble la voie la plus plausible (Agostoni, Cicardi et al. 1999).

Dans la même suite d'idées, notre laboratoire a mis en évidence une activité APP plasmatique significativement plus faible chez un groupe de patients ayant présenté des antécédents d'AO lors d'un traitement par un iECA lorsque comparée à un groupe témoin ou à une population de référence (Blais, Rouleau et al. 1999; Adam, Cugno et al. 2002; Molinaro, Cugno et al. 2002). Cette anomalie avait pour conséquence d'entraîner une diminution significative de la dégradation *in vitro* de la des-Arg⁹-BK plasmatique et du fait même d'augmenter le temps de demi-vie de ce métabolite actif de la BK. Suivant l'évidence que les patients présentant un AO relié aux iECA ont une activité plasmatique faible en APP, il a été récemment démontré que les valeurs d'activité sont partiellement régulées par des facteurs d'origine

génétique. Par une analyse d'un locus du gène *XPNPEP2* codant pour l'APP membranaire, Duan et ses collaborateurs ont fourni l'évidence soutenant le fait que le variant C-2399A, polymorphisme portant sur une paire de base dans la région promotrice du gène *XPNPEP2*, est en association avec une activité d'APP réduite ou haute et conséquemment avec l'incidence élevée d'un AO induite par un iECA (Duan, Nikpoor et al. 2005).

D'autres arguments de nature biochimique cette fois, plaident aussi pour une participation des kinines. En effet, des études ont montré que l'administration d'iECA potentialise l'œdème suite à l'injection intradermique de la BK, que les effets hémodynamiques des iECA sont annulés par la co-administration d'icatibant (antagoniste B₂) et que l'œdème dermique obtenu expérimentalement chez l'homme lors d'une inhibition parallèle de l'ECA par un iECA et de l'APP par l'apstatin, inhibiteur spécifique de l'APP, est plus important dans ce cas (Anderson and deShazo 1990; Gainer, Morrow et al. 1998; Kim, Kumar et al. 2000). Ainsi, en présence d'un iECA, l'inhibition *in vivo* de l'APP chez l'homme potentialise les effets pro-inflammatoires de la BK.

Il a été suggéré que la cascade de la coagulation peut être impliquée dans des épisodes précipités d'AOH. En effet, en plus d'être le principal régulateur des premières étapes d'activation de la voie classique du complément, le C1INH régule également l'activation de la kallicréine, la plasmine dans la chaîne de la fibrinolyse, du facteur XI dans la cascade de la coagulation et le facteur XIIa. Le déficit en C1INH entraîne une élévation de la kallicréine mais aussi l'activation de tous les autres facteurs décrits (Levy and O'Donnell 2006). Ces formes d'AO résulteraient alors

d'une activation anarchique du système de contact du plasma dû au déficit en C1INH, conduisant à la libération de BK. Le résultat final est donc une augmentation de la perméabilité vasculaire et un œdème local massif et incontrôlé.

Finalement, l'AO a été signalé dans l'insuffisance cardiaque et chez le patient hypertendu atteint d'un accident vasculaire cérébral traité par fibrinolyse au moyen d'un activateur tissulaire du plasminogène recombinant ou altéplase (Hill, Barber et al. 2000). Aucune publication jusqu'à ce jour ne propose d'explication mécanistique précise à ce phénomène seulement des hypothèses comme celle voulant que l'AO induit par un traitement à l'altéplase fasse intervenir un mécanisme semblable aux iECA (Molinaro, Gervais et al. 2002). De plus, certains patients ayant présentés un AO consécutif à l'administration d'altéplase étaient sous traitement d'un iECA. L'altéplase en affectant les voies du complément et des kinines par la formation de plasmine pourrait donc précipité l'AO par cette kininogénèse combinée à l'accumulation des kinines déjà observée lors d'un traitement par des iECA. Tous ces arguments ne font qu'appuyer l'hypothèse voulant que l'inhibition de la dégradation des kinines soit à l'origine des AO.

Contrairement aux réactions anaphylactoïdes et d'hypotension sévères, la mécanistique entourant le déclenchement d'un épisode d'AO reste à ce jour inconnu et malgré les débats qui persistent quant au composé exact qui est responsable de l'AO, des données s'accumulent toujours en faveur du rôle des kinines.

3.1.2 Les réactions d'hypersensibilité

3.1.2.1 Anaphylaxie vs anaphylactoïde

L'anaphylaxie, premier terme utilisé par Richet et Portier en 1902 dérivé des mots grecs « a » (inverse) et « phylaxis » (protection), est une réaction allergique sévère souvent imprévisible et potentiellement létale affectant organes et/ou systèmes (Cohen 2002; Cohen and Zelaya-Quesada 2002). Le terme « anaphylaxie » est classiquement réservé à la réaction immunologique aiguë représentant la manifestation la plus grave d'hypersensibilité immédiate dont le mécanisme implique la participation des immunoglobulines E (IgE). Cette réaction nécessite une sensibilisation préalable à l'organisme pathogène et met en jeu les mastocytes tissulaires et les polynucléaires basophiles porteurs, au niveau de leur surface, d'IgE spécifiques témoignant d'un contact antigénique antérieur. La réintroduction de l'antigène dans l'organisme provoque une cascade de réaction avec libération massive, par les cellules précitées, de puissants médiateurs tels que l'histamine, la tryptase et les dérivés de l'acide arachidonique (prostaglandines et leucotriènes) (Kemp and Lockey 2002). Le choc anaphylactique se traduit par des signes cliniques de gravité variable : collapsus tensionnel vasoplégique avec tachycardie, hypotension, bronchospasme, éruption urticarienne généralisée, œdème laryngé et douleurs abdominales (Kemp and Lockey 2002).

À côté de ce mécanisme IgE-dépendant, il existe d'autres voies d'activation des mastocytes/basophiles qui déterminent une entité clinique proche du choc anaphylactique, appelée réaction anaphylactoïde. Il s'agit de phénomènes d'histamino-libération directe ou due à l'activation massive du complément, avec intervention d'enzymes comme la plasmine ou la kallikréine. Contrairement aux réactions d'anaphylaxie, la physiopathologie de la réaction anaphylactoïde ne

nécessite pas de sensibilisation antigénique préalable ni une dégranulation des mastocytes par les IgE. Les agents étiologiques potentiels à l'origine de ces réactions sont résumés dans le **Tableau IV**. Les causes du choc anaphylactique sont largement dominées par les aliments (40 à 60 % des cas) alors que les médicaments représentent 15 à 20% des chocs anaphylactiques ou anaphylactoïdes.

Tableau IV. *Agents étiologiques potentiels à l'origine du choc anaphylactique et du choc anaphylactoïde introduits par voie systémique, locale ou digestive. (Tableau adapté de (Kemp and Lockey 2002)).*

Mécanisme		Agents causals
Choc anaphylactique	IgE-dépendant	<ul style="list-style-type: none"> - Aliments (arachides, noix, crustacés, etc.) - Médicaments (antibiotiques, vaccins, etc.) - Venins (hyménoptères, serpents) - Latex et autres allergènes - Enzymes (streptokinase, papaïne, etc.)
Choc anaphylactoïde	IgE-indépendant	<ul style="list-style-type: none"> - Activation de la coagulation (endotoxine) - Histamino-libération directe (mannitol, autres anesthésiques) - Modification du métabolisme de l'acide arachidonique (aspirine, benzoate, etc.) - Origine indéterminée (sulfite, récurrent idiopathique) - Mécanismes multiples (produits de contraste iodés)

3.1.2.2 La réaction anaphylactoïde en hémodialyse

Certaines réactions d'hypersensibilité en hémodialyse sont aussi appelées réactions anaphylactoïdes (RA) et ce par opposition aux réactions anaphylactiques. Rare au début des années 1980, l'incidence des RA en hémodialyse a augmenté de façon

significative au cours des années 1990 avec l'introduction de membranes synthétiques de polyacrylonitrile, électronégatives et fortement perméables (PAN, AN69TM) et l'utilisation des iECA (Verresen, Waer et al. 1990; Schaefer, Schaefer et al. 1994). L'association causale avec les iECA a rapidement été démontrée en premier lieu dans une étude effectuée par le groupe de Verresen portant sur 500 patients (Verresen, Waer et al. 1991) et par la suite au cours de différentes études multicentrées (Lacour and Maheut 1992; Simon, Potier et al. 1996).

Les RA surviennent de façon précoce généralement dans les premières minutes d'une séance de dialyse et l'intensité de ces réactions sont habituellement légères à modérées mais peuvent être mortelles. La genèse d'une RA implique soit la bioincompatibilité ou l'électronégativité de la membrane utilisée entraînant l'activation du système du complément ou de la phase de contact, respectivement (Verresen, Waer et al. 1990). La RA se caractérise par des manifestations cliniques associant au moins deux des symptômes suivants : un érythème facial, de la bradycardie, une oppression thoracique, des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales, une dyspnée ou une hypotension sévère (Daugirdas and Ing 1988; Bright, Torrence et al. 1999).

3.1.2.3 La réaction d'hypotension sévère en transfusion

Un autre type de réaction d'anaphylaxie a été décrit parallèlement aux RA mais cette réaction se manifestait surtout par des crises hypotensives sévères d'où le nom réaction d'hypotension sévère (RHS). Les RHS ont d'abord été associées à des transfusions d'albumine humaine contaminée avec des facteurs de la coagulation

comme le facteur XII et la kallicréine. L'association avec les iECA n'a été faite que plus tard.

Depuis 1990, de nombreux cas de RHS isolées, non associées à d'autres effets secondaires (réactions hémolytiques ou allergiques, par exemple) ont été rapportés lors de transfusion de produits sanguins : fractions cellulaires et en particulier les plaquettes, le plasma, les concentrés de globules rouges et au cours de transfusions autologues (Cyr, Eastlund et al. 2001; Lavee and Paz 2001; Heddle, Blajchman et al. 2002; Molinaro, Adam et al. 2002; Molinaro, Duan et al. 2006). La majorité de ces réactions survient au début de la transfusion d'un produit filtré au lit du malade à travers un filtre leucoréducteur chargé négativement chez un patient traité au moyen d'un iECA. De telles réactions, plus sévères cependant ont été rapportées chez les patients souffrant d'hypercholestérolémie et traités par LDL aphasère par chromatographie sur sulfate de dextran lié de façon covalente sur une matrice de cellulose. Des cas semblables ont aussi été rapportés chez les patients subissant une aphasère pour la protéine A du staphylocoque et une aphasère par cryofiltration (Molinaro, Adam et al. 2002). Ces réactions se caractérisent par une chute de pression systolique et/ou diastolique de 30 mm de Hg et davantage, un érythème facial, de la bradycardie, des nausées, parfois une dyspnée, une transpiration accompagnée ou non de céphalées et de douleurs abdominales.

3.1.2.4 Mécanismes physiopathologiques des RA et RHS

De nombreux facteurs ont fait l'objet d'hypothèses pouvant causer les RA et les RHS (Revillard 1990; Horl 2002). Toutefois, contrairement à l'AO associé aux iECA,

l'activation du système de contact déclenchée par un facteur physicochimique entraînant la libération de la BK dans le plasma de patients traités par un iECA est le mécanisme responsable de la genèse de ces réactions adverses (Schaefer, Schaefer et al. 1994; Verresen, Fink et al. 1994; Blais, Marc-Aurele et al. 1999; Cyr, Hume et al. 1999; Cyr, Eastlund et al. 2001). En effet, vérifié *in vitro*, des taux de BK jusqu'à 100 fois plus élevés que les témoins ont été mesurés dans l'effluent de dialyseurs et cette mécanistique BK-dépendante a été expliquée et confirmé *in vivo* chez le mouton, d'autant plus que chez cet animal, la symptomatologie était renversée par l'utilisation d'antagonistes du récepteur B₂ (Schaefer, Fink et al. 1993; Schulman, Hakim et al. 1993; Akizawa, Kinugasa et al. 1994; Fink, Lemke et al. 1994; Van der Niepen and Verbeelen 1995; Krieter, Grude et al. 1998). De plus, notre laboratoire a précédemment décrit une anomalie du métabolisme des kinines endogènes et aussi de la des-Arg⁹-BK exogène ajoutée au sérum de patients ayant présenté une RA ou RHS, anomalie associée à une faible activité plasmatique de l'APP chez ces patients (Cyr, Hume et al. 1999). Cette observation amène l'hypothèse que ce métabolite actif joue aussi un rôle dans ces effets indésirables aigus associés aux iECA. Ainsi, ces réactions semblent être de nature multifactorielle et résultent de la rencontre d'au moins trois différents facteurs : un facteur physicochimique, une membrane chargée négativement, déclenchant le système de contact du plasma et la libération des kinines; un agent pharmacologique inhibant l'activité de l'ECA mais qui pourrait aussi inhiber non spécifiquement une autre métallopeptidase comme l'APP impliquée dans le métabolisme des kinines; enfin un aspect métabolique en partie génétiquement régulé qui caractérise la capacité du patient à métaboliser les kinines

(Molinaro, Duan et al. 2006). Imprévisible et n'apparaissant que chez une minorité comme pour l'AO, il n'en demeure pas moins que la mécanistique de ces réactions peut impliquer d'autres facteurs de risques, ou d'autres médiateurs.

4. Les inhibiteurs des vasopeptidases

4.1 Définition et incidence

L'enzyme de conversin de l'angiotensine I n'est pas l'unique enzyme impliquée dans le métabolisme de la BK et l'importance de sa participation dépend de l'espèce animale, de la nature du tissu ou du type de cellules utilisées, du milieu biologique et des conditions physiopathologiques (Decarie, Raymond et al. 1996). Chez l'homme, la néprilysine joue un rôle équivalent à celui de l'ECA au niveau de l'endothélium vasculaire et est la métallopeptidase principale responsable du métabolisme de la BK au niveau du tubule contourné distal dans le tissu rénal (Blais, Fortin et al. 2000a). Ainsi, l'implication de la néprilysine dans le métabolisme de la BK au niveau du système cardiovasculaire a conduit au développement d'une nouvelle classe de médicaments. C'est donc dans les années 1990, que le développement de molécules capables d'inhiber simultanément l'ECA et la néprilysine avec une affinité semblable a été décrit et l'apport thérapeutique potentiel de ces agents, baptisés inhibiteurs des vasopeptidases (iVP), a intensément été discuté (Trippodo, Fox et al. 1993; Molinaro, Rouleau et al. 2002). En principe, les effets bénéfiques connus des iECA auraient été combinés aux bienfaits théoriques additionnels de l'inhibition de la néprilysine, qui se traduisaient par l'accumulation des peptides natriurétiques ANP, BNP et CNP, en

plus de la BK (Burnett 1999; Asher and Naftilan 2000; Burnett 2000; Dendorfer and Dominiak 2000; Bralet and Schwartz 2001; Molinaro, Rouleau et al. 2002). Cependant, le prototype de cette nouvelle classe d'inhibiteurs, l'omapatrilat, n'a pas su être supérieur à un iECA générique dans le traitement de l'insuffisance cardiaque et comme antihypertenseur, il provoquait deux fois plus de cas d'AO qu'un iECA classique comme l'énalapril.

C'est donc suite aux études OCTAVE (The Omapatrilat Cardiovascular Treatment *vs* Enalapril) (Kostis, Packer et al. 2004) et OVERTURE (Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events) (Packer, Califf et al. 2002) que la mise en marché de ces nouvelles molécules a été freinée. Dans l'étude OVERTURE, la survenue d'AO était plus élevée dans le groupe insuffisant cardiaque sous omapatrilat (0.8%) que celui traité par énalapril (0,5%). Dans l'étude OCTAVE, l'incidence d'AO chez les hypertendus varie et les résultats de cette étude clinique ont une signification physiopathologique (**Tableau V**). Ils montrent en effet l'importance de 3 facteurs : la présence d'une inflammation (les fumeurs), l'aspect génétique (les patients d'origine afro-américaine) et la nature de l'inhibiteur qui peut inhiber une ou plusieurs métallopeptidases, de façon spécifique ou non. Malgré ces résultats, la progression lente mais certaine du développement d'autres de ces agents pharmacologiques vers une utilisation thérapeutique humaine semble imminente (Daull, Blouin et al. 2004; Daull, Benrezzak et al. 2005).

Tableau V. *Caractéristiques des patients hypertendus ou insuffisants cardiaques ayant présenté un AO lors d'un traitement par énalapril ou par omapatrilat (études OCTAVE et OVERTURE) (Packer, Califf et al. 2002; Kostis, Packer et al. 2004; Kostis, Kim et al. 2005).*

Caractéristiques des patients	Énalapril Incidence % AO	Omapatrilat Incidence % AO	Études
<u>Race</u>			
Caucasienne	0,5	0,8	OVERTURE
	0,68	2,17	OCTAVE
Afro-américaine	1,62	5,54	OCTAVE
<u>Statut</u>			
Non-fumeur	0,61	nd	OCTAVE
Fumeur	0,81	3,93	OCTAVE

* nd : non disponible

III- Le Système Kallicréine-Kinine comme Cible Thérapeutique

1. Le système kinino-formateur plasmatique

1.1 Contrôle de la voie kinino-formatrice

L'inhibition des composantes de la voie kallicréine-kinine semble être un secteur primaire de recherche dans le développement de médicaments pour contrecarrer l'AO héréditaire (**Figure 6**). Il est possible d'émettre l'hypothèse qu'une inhibition d'une composante située en amont de la cascade d'activation de la voie kallicréine-kinine pourrait être l'approche thérapeutique la plus prometteuse puisqu'ainsi un blocage efficace de la production du médiateur approprié (BK) est effectué et conséquemment, une inhibition de l'activation inflammatoire. Les expérimentations cliniques devraient fournir d'ici quelques années un aperçu de l'efficacité d'une inhibition spécifique des principaux effecteurs dans la libération de la BK comme la kallicréine plasmatique et la plasmine, mais aussi de l'utilisation d'antagonistes du récepteur de la BK (Han, MacFarlane et al. 2002; Bas, Bier et al. 2006; Lock and Gompels 2007). En effet, il y a trois nouvelles options de pharmacothérapies en étude actuellement dans des essais cliniques : le C1INH recombinant, l'inhibiteur de la kallicréine soit le DX88 et l'antagoniste du récepteur B₂ soit le HOE140.

1.1.1 Inhibiteurs des protéases à sérine

L'administration du C1INH ou de l'aprotinine, deux enzymes impliquées dans le contrôle de l'activation du système de contact, est parmi les traitements utilisés pour apaiser les crises d'AO.

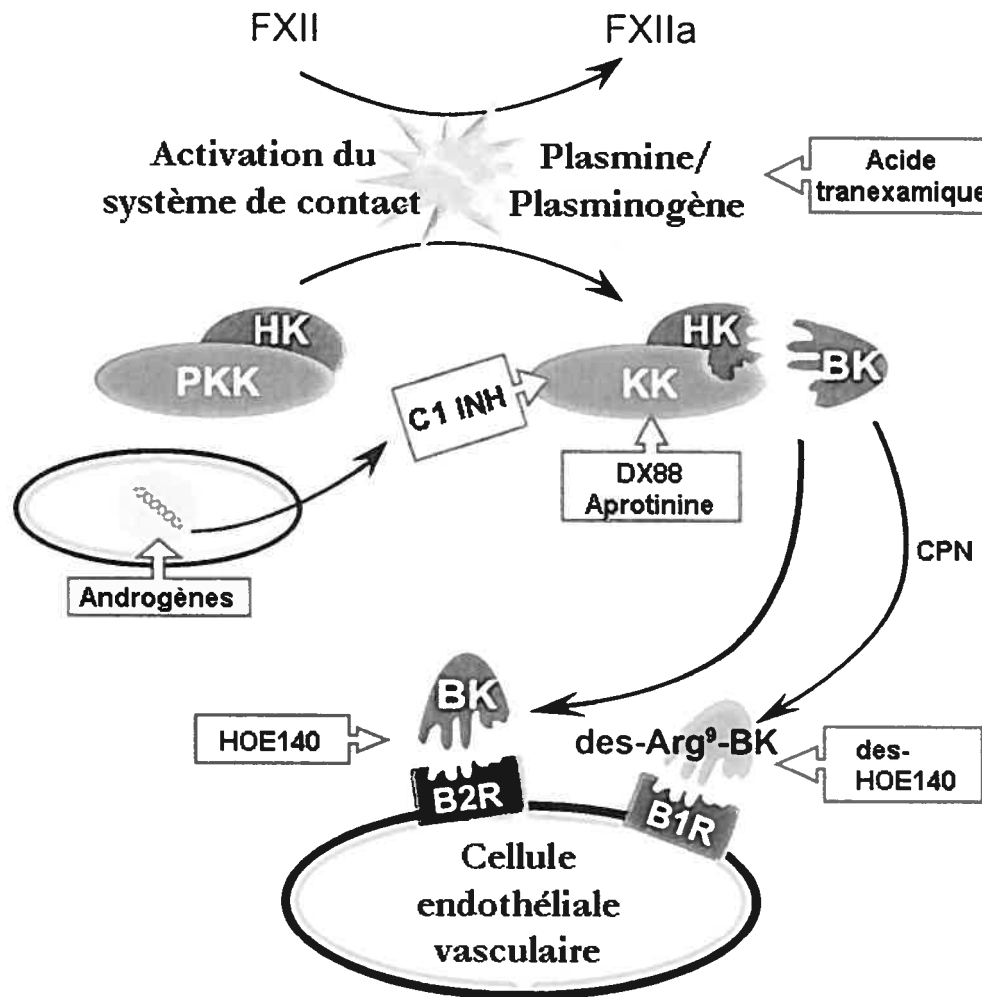


Figure 6.

Cibles pharmacologiques qui modulent l'activité du système kallibréine-kinine. L'acide tranexamique inhibe les composantes de la fibrinolyse alors que le DX88, l'aprotinine et le C1INH vont inhiber l'activité de la kallibréine plasmatique. Les androgènes vont stimuler la synthèse du C1INH et les antagonistes des récepteurs B₁ et B₂ vont bloquer l'activation de ces récepteurs. FXII : facteur de Hageman; FXIIa : facteur de Hageman activé; PKK : pré-kallibréine; KK : kallibréine; HK : KHPM, kininogène de haut poids moléculaire; CPN : carboxypeptidase N. (Figure adaptée de (Moreau, Garbacki et al. 2005)).

L'aprotinine ($C_{284}H_{432}N_{84}O_{79}S_7$), protéine de 58 acides aminés isolée du tissu pulmonaire bovin, fait partie de la superfamille d'inhibiteurs de protéase à sérine intervenant dans la coagulation et la fibrinolyse et possède une haute affinité particulièrement pour la trypsine, la plasmine et la kallikréine plasmatique (Alston 2004). Ainsi, en inhibant la kallikréine, l'aprotinine diminue la libération de la BK par le système de contact lors d'un épisode d'AO et prévient de ce fait l'amplification de la réponse inflammatoire systémique, améliorant de manière significative certaines conséquences indésirables de l'inflammation tel que l'œdème (Bojanov and Belani 2005).

L'angioœdème héréditaire est actuellement traité par l'injection intraveineuse de C1INH et ce traitement semble efficace par son intervention d'inactivation du système de contact typiquement observé pendant les attaques d'AO (De Serres, Groner et al. 2003). En effet, depuis le début des années 1980 que l'efficacité du concentré de C1INH a été démontrée et ce dans des séries de cas et d'essais contrôlés (Agostoni, Bergamaschini et al. 1980; Gadek, Hosea et al. 1980; Waytes, Rosen et al. 1996; Bork and Barnstedt 2001). De plus, un composé humain de C1INH recombinant a été développé et est actuellement en évaluation dans des expertises cliniques de phase III (Wolff, Zhang et al. 2001; Bas, Adams et al. 2007). Le recombinant humain C1INH est extrait du lait cru de lapins transgéniques. En effet, le gène humain codant pour le C1INH est fonctionnellement lié à une séquence promotrice spécifique bovine et inséré dans l'ADN du lapin menant à la sécrétion de la protéine dans le lait. Il est attendu que ce recombinant agira sur l'AOH au même titre que la forme native du C1INH (van Doorn, Burggraaf et al.

2005; Bas, Adams et al. 2007). Contrairement au concentré de C1INH, l'utilisation de ce recombinant réduira le risque minime mais significatif de transmission de maladies due à la contamination du plasma humain par des pathogènes inconnus comme les virus et le prions.

1.1.2 DX88

Le DX88 (ecallantide) est une protéine recombinante de 60 acides aminés synthétisée par analogie avec le premier domaine de type Kunitz de l'inhibiteur de la voie extrinsèque de la coagulation, le TFPI (« tissue factor pathway inhibitor ») (Williams and Baird 2003; Tanaka, Szlam et al. 2004). Ce composé est un inhibiteur synthétique de la kallibréine plasmatique produit par la technologie du « phage display » et démontre une efficacité d'inhibition approximative de 1000 fois plus que l'aprotinine (Levy and O'Donnell 2006). *In vivo*, il a été démontré que ce médicament a le pouvoir de diminuer la perméabilité vasculaire observée chez des souris déficientes en C1INH (Han, MacFarlane et al. 2002; Davis 2003; Han Lee, Pappalardo et al. 2003). À la différence du C1INH, le DX88 est spécifique à la kallibréine et démontre qu'une très faible activité inhibitrice pour le C1r, le C1s, la plasmine, le facteur XIIa et le facteur XIa (Levy and O'Donnell 2006). De plus, comme il n'emprunte pas la même voie que le C1INH, le DX88 présente possiblement un intérêt potentiel dans le traitement non pas seulement de l'AOH, mais aussi d'autres formes moins communes d'AO non-allergiques et acquis (Williams and Baird 2003; Zuraw 2005).

1.1.3 Androgènes atténués

Les androgènes à activité modérée augmentent la biosynthèse de beaucoup de protéines. Le danazol, le stanozolol et l'oxandrolone sont les androgènes, alkylés en C17 et dérivés de la testostérone, les plus utilisés (Gompels, Lock et al. 2005). La réponse biologique résulte en une réduction considérable du nombre d'attaques d'AOH lorsqu'ils sont utilisés en prophylaxie à long terme. En effet, des doses élevées d'androgènes atténués (400-600 mg/jour) vont corriger le défaut biochimique observé chez les patients atteints d'AOH soit en normalisant le taux de C1INH, de C2 et de C4 menant ainsi à la disparition complète de l'œdème suite à plusieurs mois de traitement (Cicardi and Zingale 2003). Le mécanisme d'action des androgènes atténués est probablement relié à une augmentation de la synthèse hépatique de C1INH puisqu'une augmentation des niveaux de cette protéine dans le plasma est observée (Pappalardo, Zingale et al. 2003). Par contre, la mécanistique entourant ce traitement n'a pas encore été élucidée ni les effets de ces composés sur les métallopeptidases responsables de l'inactivation des kinines.

1.1.4 Agents antifibrinolytiques

Les antifibrinolytiques inhibent l'activation du plasminogène réduisant ainsi la consommation du C1INH. L'aprotinine, aussi considérée comme inhibiteur de protéases, et l'acide tranexamique sont les principaux médicaments utilisés qui vont perturber l'activité protéolytique de la plasmine et subséquentement inhiber la fibrinolyse (Agostoni, Aygoren-Pursun et al. 2004; Gompels, Lock et al. 2005).

Seulement l'acide tranexamique sera défini ici puisque l'aprotinine a été abordée précédemment.

L'acide tranexamique, (acide 4-(aminométhyl) cyclohexanecarboxylique), se fixe réversiblement à un résidu lysine du plasminogène formant un complexe auquel il reste fixé même après la transformation du plasminogène en plasmine. Cette dernière ayant fixé l'acide tranexamique est inactive. L'action normale de la plasmine, à savoir dissoudre le caillot est ainsi bloquée puisqu'elle ne peut plus se lier à la fibrine (Bas, Adams et al. 2007). La fibrinolyse est donc inhibée. Une efficacité contre l'AOH a été remarquée lorsque le traitement est donné en prophylaxie à long terme (Frank, Sergent et al. 1972; Karlis, Glickman et al. 1997; Dunn and Goa 1999; Cicardi and Zingale 2003). Ce traitement réduirait le nombre et la fréquence des épisodes d'AO mais n'est pas aussi efficace que les androgènes à activité modérée.

1.1.5 Antagoniste du récepteur B₂: Icatibant[®], HOE140

L'antagoniste du récepteur B₂, HOE140 (icatibant), est actuellement en étude clinique pour le traitement d'attaque aiguë d'AOH (Rosenkrans, Russmann et al. 2004; Bas, Bier et al. 2006; Bas, Adams et al. 2007; Bork, Frank et al. 2007). Le HOE140 est un décapeptide synthétique (1304.6 Da) dont la structure est similaire à la BK mais avec cinq acides aminés non protéinogéniques en plus (2005). La phase II de l'étude fut concluante avec des résultats positifs en ce qui a trait à l'AOH. Une biodisponibilité élevée (environ 90%), combinée avec une faible variabilité et une concentration maximale atteinte après 30 minutes environ, ont été démontrés avec une formulation sous-cutanée, qui peut être administrée soi-même suite aux premiers

signes d'apparition d'une attaque d'AO (Bas, Bier et al. 2006; Bas, Adams et al. 2007). Dans l'étude en double-aveugle randomisée de phase III, les patients présentant un AO sont traités à l'icatibant. Dans cette étude, l'icatibant est administré par voie sous-cutanée et est évalué en comparaison à l'acide tranexamique administré oralement et ce, jusqu'au soulagement des symptômes. Dans la partie préliminaire de l'étude, les patients éprouvant des épisodes d'AO reçoivent l'antagoniste du récepteur B₂ comme requis (Bas, Bier et al. 2006; Bas, Adams et al. 2007). Les résultats de ces études récemment accomplies n'ont pas encore été publiés et donc le profil de sécurité de l'icatibant ne peut être établi. En plus d'être efficace dans le traitement de l'AOH, l'icatibant semble aussi être une alternative prometteuse dans le traitement de patients atteints d'AO induit par un iECA (Bas, Bier et al. 2006).

1.2 Traitement antithrombotique et les kinines

Le mécanisme kinino-formateur reste à ce jour inconnu dans l'AO. Cependant les épisodes d'AO associés à une fibrinolyse au moyen du t-PA recombinant permettent d'entrevoir un rôle kinino-formateur du système fibrinolytique, soit du t-PA ou de la plasmine. La plasmine, appelée aussi fibrinolysine, est une protéase qui hydrolyse la fibrine en fragments mais également le fibrinogène et d'autres facteurs de la coagulation. La plasmine provient de l'hydrolyse du plasminogène au niveau d'un résidu arginine. Le plasminogène est une glycoprotéine d'origine hépatique présent dans le plasma, inactif par lui-même, bien que se fixant sur la fibrine. Le t-PA tant qu'à lui est libéré par les cellules endothéliales et active la transformation du plasminogène en plasmine. La libération de ces activateurs est stimulée par les dépôts

de fibrine et par la thrombine. *In vitro*, la plasmine est capable de libérer la BK à partir du KHPM et du KFPM, tout comme la kallibréine plasmatique. Ce pouvoir kinino-formateur de la plasmine a pu être confirmé pour le plasma humain (Molinaro, Gervais et al. 2002). En effet, ces travaux effectués au laboratoire ont montré que l'incubation du plasma en présence du t-PA recombinant à une concentration pharmacologique active la libération des kinines à partir des kininogènes indépendamment du facteur XII et de la kallibréine, avec une cinétique cependant différente de celle observée lors de l'activation de la phase contact.

La large utilisation du t-PA recombinant (rt-PA) pour le traitement de la thrombolyse chez des sujets atteints d'un infarctus du myocarde a entraîné le développement de formes mutantes du t-PA avec des propriétés pharmacocinétiques améliorées, c'est-à-dire avec une durée de vie prolongée au niveau de la circulation et une augmentation de sa résistance face aux inhibiteurs et au clivage par la plasmine (Dobrovolsky and Titaeva 2002). Cependant, en stimulant la formation de la plasmine, les médicaments thrombolytiques ou fibrinolytiques accélèrent non seulement la dissolution des caillots intravasculaires, mais activent aussi le facteur XII, la cascade du complément ainsi que le système kallibréine-kinine (Cugno, Cicardi et al. 1994; Merlini, Cugno et al. 2004). De plus, il a été démontré que la BK stimule l'exocytose du t-PA à partir de l'endothélium vasculaire. Ainsi, des études utilisant l'antagoniste HOE140 ont indiqué qu'un traitement par un iECA augmente le relâchement du t-PA endogène par une voie dépendante du récepteur B₂ (Pretorius, Rosenbaum et al. 2003). Cet effet potentialisant de l'iECA sur la fibrinolyse constitue un nouvel aspect au rôle cardioprotection de l'iECA.

La BK_[1-5], produit de deux clivages séquentielles de la BK par l'ECA aux liaisons Pro⁷-Phe⁸ et Phe⁵-Ser⁶, a été identifié comme le métabolite stable de la BK *in vivo* chez les sujets humains avec un temps de demi-vie supérieur à la BK (Murphey, Hachey et al. 2000). Des études effectuées chez des modèles animaux suggèrent que la BK_[1-5] possède des activités biologiques au même titre que la BK en ce qui a trait par exemple à l'inhibition de l'agrégation plaquettaire (Hasan, Amenta et al. 1996; Hasan, Rebello et al. 1999). Des études chez l'humain démontre que la relâche de t-PA corrèle avec les concentrations totales de kinines et de BK_[1-5] lors de l'infusion de la BK (Murphey, Gainer et al. 2000); toutefois il n'est pas connu si cette libération est due à la concentration stable de la BK_[1-5] qui reflète la dose de la BK ou parce que la BK_[1-5] à elle seule stimule la libération du t-PA. Finalement, l'étude de Murphey et ses collaborateurs démontre que la BK_[1-5] inhibe l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine chez l'humain au même titre que la BK mais par un nouveau mécanisme en absence de vasodilatation et peut ainsi servir de modèle pour des nouvelles stratégies pharmacologiques antiplaquettaires (Murphey, Malave et al. 2006).

2. Métabolisme des kinines

Jusqu'à présent, parmi les enzymes métabolisant les kinines, seulement l'ECA constitue une cible pharmacologique cliniquement exploitée. Cependant, l'efficacité de cette classe d'inhibiteurs engendre des recherches plus intensives dans le développement de molécules plus puissantes et capables d'inhiber deux

métallopeptidases à la fois, à savoir l'ECA et la néprilysine. Malgré leur efficacité clinique, cette nouvelle classe de médicaments n'est pas dépourvue d'effets secondaires dont l'incidence d'AO est plus élevée lors d'un traitement par un inhibiteur des vasopeptidases. Des études se poursuivent afin de comprendre la mécanistique derrière l'AO et ainsi améliorer ces molécules en conséquence.

3. Les récepteurs des kinines comme cible thérapeutique

La connaissance approfondie des voies de signalisation et la disponibilité de modèles transgéniques impliquent le rôle croissant des récepteurs des kinines en particulier en physiopathologie cardiovasculaire. Le développement d'agonistes et d'antagonistes stables doit permettre de valider ou d'infirmer les potentialités thérapeutiques de ces récepteurs dans leurs nombreuses fonctions centrales et périphériques. Cependant, un nombre limité d'études cliniques humaines publiées a été effectué dans le secteur de la douleur, de l'asthme/rhinite, et du choc septique montrant un potentiel thérapeutique possible de l'utilisation d'antagonistes des récepteurs de la BK (Whalley, Clegg et al. 1987; Proud, Bathon et al. 1995; Akbary, Wirth et al. 1996; Fein, Bernard et al. 1997; Turner, Dear et al. 2001). Plusieurs études pharmaceutiques sont actuellement en cours afin de découvrir les mécanismes antagonismes du récepteur B₂ et d'optimiser les structures chimiques des antagonistes agissant sur le récepteur B₁. Le besoin médical conduit les secteurs thérapeutiques à centrer leur intérêt dans les domaines touchant le diabète, la fonction cardiovasculaire, la douleur et l'AO.

3.1 Les récepteurs des kinines : B₁ et B₂

3.1.1 Diabète

Certains résultats expérimentaux suggèrent que le diabète insulino-dépendant, diabète de type I, est une condition pathologique induisant l'expression du récepteur B₁. Ce diabète est dû à une réponse auto-immune impliquant une surproduction de cytokines, dont l'IL-1 β et le TNF- α . De plus, l'hyperglycémie ainsi que le stress oxydatif peuvent aussi activer le NF- κ B (Gabra and Sirois 2003; Gabra and Sirois 2003) que l'on sait capable d'induire le récepteur B₁. Ainsi, la surproduction de cytokines et l'hyperglycémie pourraient déclencher, au cours du diabète, l'expression du récepteur B₁ par l'intermédiaire du NF- κ B. L'utilisation d'un antagoniste B₁ prévient la progression du diabète démontré dans le modèle où celui-ci est induit par la streptozotocine chez le rongeur mais un traitement avec l'icatibant n'a aucun effet suggérant que le récepteur B₁ a un rôle sélectif dans l'insulinite, réaction inflammatoire lente relayée par l'activation des récepteurs B₁, qui précède le diabète dans ce modèle (Zuccollo, Navarro et al. 1999). Les antagonistes B₁ normalisent l'hyperglycémie et les anomalies rénales, dont l'augmentation du volume d'urine et d'excrétion de protéines, de nitrite et de kallicréine chez la souris traitée à la streptozotocine.

3.1.2 Maladies cardiovasculaires

La BK est connue pour ses multiples effets sur le système cardiovasculaire et particulièrement pour ses propriétés de vasodilatation et d'extravasation (Heitsch 2003), menant à une réponse inflammatoire. La vasodilatation est normalement

médiée par le récepteur B₂ (Groves, Kurz et al. 1995), mais sous des conditions inflammatoires, la régulation à la hausse de l'expression du récepteur B₁ entraîne une vasodilatation et une hypotension induites par les kinines (Regoli, Marceau et al. 1981; deBlois and Horlick 2001). La génération locale des kinines ou l'inhibition de leur dégradation ainsi que la stimulation du récepteur B₂ qui en résulte peuvent être un intérêt pour réduire la pression sanguine ou pour promouvoir les effets cardioprotecteurs de certains composés médicinaux (Gainer, Morrow et al. 1998; Zhu, Zaugg et al. 1999; Witherow, Helmy et al. 2001).

3.1.3 Inflammation, douleur et applications neurologiques

Une des applications les plus prometteuses des antagonistes des récepteurs des kinines est l'analgésie. Un nombre important de modèles d'animaux de douleur inflammatoire ont été exploités pour démontrer que les antagonistes B₁ ou B₂ exercent une analgésie (Couture, Harrisson et al. 2001). Les antagonistes du récepteur B₂ ont un effet antinociceptif dans des modèles d'hyperalgésie aiguë d'origine inflammatoire. La stimulation centrale des récepteurs B₂ peut être un événement important dans la douleur lors de migraine et dans d'autres désordres cérébrovasculaires, ainsi que dans l'inflammation neurogénique observée dans diverses formes de traumatismes cérébraux où l'utilisation d'antagonistes est considéré (Marmarou, Nichols et al. 1999; Schulz, Plesnila et al. 2000; Marmarou, Guy et al. 2005). Comme les effets biologiques des kinines sont relayés par la stimulation de leur récepteur et qu'une surproduction de la BK est observée au cours des états inflammatoires, le blocage des récepteurs des kinines demeure la cible de

choix qui permettrait de réduire l'intensité de la réaction inflammatoire et de la douleur.

3.1.4 Angioœdème

Un polymorphisme génétique du récepteur B₂ chez l'homme qui semble conférer un niveau plus élevé d'expression du récepteur a été observé dans les cas les plus symptomatiques d'AOH dans une petite cohorte de patients (Marceau, Hess et al. 1998). Cependant, ce polymorphisme ne peut aucunement prédire l'incidence de l'effet indésirable le plus commun associé aux iECA, la toux non productive.

Chez les hypertendus, des épisodes d'AO associés à la prise d'un iECA ont corrélé avec une faible activité de dégradation de la des-Arg⁹-BK appuyant ainsi l'hypothèse que la BK n'est pas le seul effecteur de ces affections (Molinaro, Cugno et al. 2002).

La présence de ce marqueur biologique a été plus tard attribué à une grande variabilité d'expression membranaire de l'APP (Duan, Nikpoor et al. 2005). Il est évident que seule une minorité de patients traités par un iECA présenteront éventuellement un AO. Cette susceptibilité individuelle s'explique par d'autres facteurs de risque à définir : activité enzymatique, expression et voies de signalisation du récepteur B₁, autres mécanismes kinino-formateurs, etc.

Les résultats encourageant l'expérimentation clinique des antagonistes du récepteur B₂ supportent l'idée que l'inhibition de ces récepteurs est un intérêt thérapeutique dans le traitement de l'AOH (Rosenkrans, Russmann et al. 2004; Bas, Bier et al. 2006; Bas, Adams et al. 2007; Bork, Frank et al. 2007). Mais il reste à savoir si le

développement d'antagonistes du récepteur B_1 n'est pas l'intervention thérapeutique légitime à adopter dans ces cas d'AO ou même dans les autres formes d'œdème.

IV- Objectifs de l'Étude

Une compréhension des aspects multifactoriels des différents constituants impliqués dans le système kallibréine-kinine est nécessaire afin d'élucider les mécanismes physiopathologiques des effets secondaires aigus engendrés par les inhibiteurs de l'ECA dont la nature varie avec le contexte clinique. L'ensemble des démarches expérimentales antérieurement entreprises dans notre laboratoire a montré la complexité de la physiopathologie de l'angioœdème, des réactions anaphylactoïdes et d'hypotension sévères associés aux iECA. Les études menées dans notre laboratoire ont mis en évidence le rôle essentiel de certaines métallopeptidases dans le métabolisme des kinines en plus d'émettre l'hypothèse que l'accumulation de peptides inflammatoires, notamment la BK et la des-Arg⁹-BK, accumulation qui s'explique surtout par une inhibition de leur dégradation, est l'une des résultantes de ces effets indésirables. De plus, nous avons mis en évidence une anomalie métabolique de la des-Arg⁹-BK chez certains patients ayant présenté un AO en présence d'un iECA. Cette anomalie caractérisée par une diminution du catabolisme de l'agoniste B₁ est liée à une activité diminuée ou nulle de l'APP, seule voie métabolique plasmatique en présence d'un iECA. Nous avons aussi montré que cette diminution d'activité de l'APP est partiellement régulée par des facteurs de nature génétique. Les complications aiguës associées aux iECA résultent donc de la conjonction de différents facteurs pharmacologiques, physicochimiques, métaboliques et génétiques.

Ce travail de doctorat vise donc à poursuivre les travaux du laboratoire portant sur la physiopathologie des effets secondaires associés aux iECA. Dans cette optique, mon

projet de recherche repose sur les deux parties suivantes : (1) une partie expérimentale avec un modèle animal (porc) et cellulaire (cellules de muscle lisse de l'artère ombilicale humaine) où il sera possible de mieux comprendre les phénomènes physiopathologiques et les médiateurs responsables des effets indésirables associés aux iECA, et (2) une partie clinique où le facteur « patient » dans l'accumulation des kinines lors de l'activation du système de contact sera mis en évidence et où le pouvoir kinino-formateur des différents facteurs de la coagulation et de la fibrinolyse sera défini.

(1) Partie expérimentale

L'anomalie du métabolisme des kinines portant de façon préférentielle sur la des-Arg⁹-BK ne peut avoir de signification physiopathologique que dans la mesure où le récepteur B₁ inductible au cours de l'inflammation est présent. Par conséquent, dans un premier temps, afin de mieux comprendre le rôle des kinines dans l'AO au niveau tissulaire, nous étudierons l'effet d'un traitement chronique et aigu au moyen d'un iECA comparé à celui du lipopolysaccharide bactérien sur l'expression du récepteur B₁ au niveau de la zone oropharyngée chez le porc. Comme différents facteurs sont susceptibles d'induire la synthèse du récepteur B₁, nous procéderons dans un deuxième temps à la caractérisation du niveau d'expression du récepteur B₁ dans un modèle de cellules de muscle lisse de l'artère ombilicale humaine en culture suite à leur exposition à divers agents pharmacologiques. Ainsi, il sera possible de déterminer les mécanismes impliqués dans le processus fonctionnel de régulation de l'expression du récepteur B₁ et par quels systèmes de seconds messagers ils sont relayés.

(2) Partie clinique

L'activation du système de contact est considérée comme la voie kinino-formatrice principale du plasma mais le mécanisme kinino-formateur associé aux RHS est cependant plus complexe, il dépend également du produit transfusé et donc du receveur. De plus, dans le cadre d'une fibrinolyse induite *in vivo*, la fréquence relativement élevée d'AO rapportée dans la littérature laisse penser à un pouvoir kinino-formateur de celle-ci. Ce qui nous a amené à explorer d'autres voies métaboliques potentiellement responsables de la libération des kinines au niveau plasmatique. Ainsi, d'une part, nous allons documenter la concentration de kinines immunoréactives et pharmacologiquement actives dans des concentrés plaquettaires prélevés dans les conditions préconisées par les agences officielles, confirmer si le processus de leucoréduction est responsable d'une kinino-formation et identifier si d'autres mécanismes sont impliqués dans cette kininogénèse. D'autre part, nous allons comparer le pouvoir kinino-formateur de voies alternes, notamment par le biais d'autres protéases à sérine ainsi que par l'activation des voies de la coagulation et de la fibrinolyse. Pour ce faire, nous caractériserons quantitativement et qualitativement l'activité kinino-formatrice de la thrombine (facteur IIa), du facteur Xa et de la plasmine. À cette fin, nous mesurerons les kinines immunoréactives libérées par le clivage des deux précurseurs, KHPM et KFPM, et nous calculerons les constantes de cinétique enzymatique. Finalement, en plus de cette approche expérimentale combinée à un système de thromboélastogramme, nous étudierons de façon cinétique la quantité et la nature des kinines libérées dans le sang total lorsque

la voie extrinsèque ou intrinsèque de la coagulation est activée seule ou simultanément avec la fibrinolyse.

PARTIE I :
CHAPITRE II
EXPRESSION OF METALLOPEPTIDASES AND KININ
RECEPTORS IN SWINE OROPHARYNGEAL TISSUES:
EFFECTS OF ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME
INHIBITION AND INFLAMMATION

**Expression of Metallopeptidases and Kinin Receptors in Swine Oropharyngeal
Tissues: Effects of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibition and
Inflammation**

Moreau ME, Dubreuil P, Molinaro G, Chagnon M, Müller-Esterl W, Lepage Y,
Marceau F, Adam A

J Pharmacol Exp Ther 2005, 315: 1065-1074

Maladie orpheline, l'AO reste à ce jour l'effet indésirable aigu associé à la prise d'un iECA le moins bien élucidé. Les investigations biochimiques et pharmacologiques s'effectuent essentiellement sur des milieux biologiques dus à l'inflammation locale rendant les médiateurs potentiels responsables de cette réaction inaccessibles. Ainsi, ces investigations demeurent seulement un reflet indirect de la réaction angioœdémateuse. Bien que notre laboratoire ait démontré plusieurs évidences possibles concernant la physiopathologie de l'AO, ces observations effectuées dans le plasma peuvent être difficilement extrapolées à une réaction inflammatoire locale qui caractérise l'AO. Dans ce premier article de doctorat, nous avons voulu mettre en évidence les métallopeptidases et les récepteurs des kinines au niveau de la zone oropharyngée chez un modèle porcin dans le but de comprendre les phénomènes tissulaires locaux impliqués dans la genèse de l'AO.

En tant que premier auteur, ma collaboration repose sur mon implication active dans la planification de l'étude et sur ma participation à la réalisation technique du projet, à l'analyse et l'interprétation des résultats ainsi qu'à la rédaction de l'article.

** Reprinted with permission of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. All rights reserved.*

Expression of Metallopeptidases and Kinin Receptors in Swine Oropharyngeal Tissues: Effects of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibition and Inflammation

Marie Eve Moreau, Pascal Dubreuil, Giuseppe Molinaro, Miguel Chagnon, Werner Müller-Esterl, Yves Lepage, François Marceau, and Albert Adam

Faculté de Pharmacie (M.E.M., G.M., A.A.), Faculté des Arts et des Sciences, Département de Mathématiques et de Statistique (M.C., Y.L.) and Faculté de Médecine Vétérinaire (P.D.), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Centre de Recherche, Québec, Canada (F.M.); and Institute of Biochemistry II, Johann Wolfgang Goethe University School of Medicine, Frankfurt, Germany (W.M.-E.)

Received April 14, 2005; accepted September 13, 2005

ABSTRACT

Angiotensin I-converting enzyme inhibitors (ACEi) cause both chronic and acute side effects, including rare but potentially life-threatening angioedema (AE). The main hypothesis to be tested in this study was that metallopeptidases and kinin receptors are present in oropharyngeal tissues and that their expression is modulated by ACEi and inflammation. Novel real-time polymerase chain reaction analysis was developed and allowed the relative quantification of tissue's gene expression for neprilysin, membrane-bound aminopeptidase P (mAPP), and both B₁ and B₂ kinin receptor subtypes in tongue, parotid gland, and laryngeal tissue (areas especially involved in the gravest clinical forms of AE) and in kidney in a porcine model (single injection or 7-day ACEi oral treatments applied or lipopolysaccharide injected as a positive inflammatory control). The

results provide evidence of the expression and activities of kininases in oropharyngeal tissues in the swine. ACEi treatment modulated the expression of neutral endopeptidase and mAPP mRNA, but the corresponding enzyme activities and that of angiotensin I-converting enzyme (ACE) were generally stable in tissues. The 7-day ACEi treatment up-regulated both kinin receptor mRNAs in the oropharynx and the B₁ receptor mRNA in the lingual vascular endothelium (immunohistochemistry). The inhibition of ACE in plasma is responsible for an accumulation of bradykinin and des-arginine⁹-bradykinin generated during activation of the contact system with glass beads. The expression of critical components of the kallikrein-kinin system in the oropharyngeal tissues supports the role of kinins in ACEi-induced AE.

Despite their clinical effectiveness in various cardiovascular and metabolic diseases, angiotensin I-converting enzyme inhibitors (ACEi) cause chronic and acute side effects (Blais et al., 2000), notably potentially life-threatening angioedema (AE). Although the incidence of AE is considered low (0.1–0.5% of patients under ACEi therapy), the fact that 35 to 40 million patients worldwide receive this medication means that these drugs could account for several hundred deaths per year due to laryngeal edema (Cugno et al., 2003). More-

over, two recent studies have shown AE incidence higher than previously appreciated, up to 0.68% of enalapril-treated hypertensive patients (Packer et al., 2002; Kostis et al., 2004). Also, a 3-fold incidence increase was reported in African-American patients, and it was nominally higher in smokers (Coats, 2002).

AE affects notably the extremities, abdominal cavity, face, larynx, and tongue. However, a laryngeal localization is at high risk. Although the clinical symptoms of AE have been attributed to the vasoactive peptide bradykinin, no definitive experimental evidence supports an obligatory role for this agent.

The nonapeptide bradykinin is the prototype of kinins, a family of powerful bioactive autacoids, involved in a series of

This study was supported in part by the Canadian Institute of Health Research (CIHR) (Grant MOP-14077) and a CIHR Fellowship Award (to G.M.).
Article, publication date, and citation information can be found at <http://jpet.aspetjournals.org>.
doi:10.1124/jpet.105.088005.

ABBREVIATIONS: ACEi, angiotensin I-converting enzyme inhibitor; AE, angioedema; ACE, angiotensin I-converting enzyme; NEP, neprilysin; AUC, area under curve; des-Arg⁹-BK, des-arginine⁹-bradykinin; mAPP, membrane-bound aminopeptidase P; PCR, polymerase chain reaction; LPS, lipopolysaccharide; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; vWF, von Willebrand factor; (Abz)RGL(EDDnp), (o-aminobenzoic acid)-Arg-Gly-Leu-(ethylenediamine 2,4-dinitrophenyl); K(Dnp)PPGK(Abz), Lys-(2,4-dinitrophenyl)-Pro-Pro-Gly-Lys-(o-aminobenzoic acid); (Abz)YRK(Dnp)P, (o-aminobenzoic acid)-Tyr-Arg-Lys-(2,4-dinitrophenyl)-Pro; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid.

physiological and pathological cardiovascular responses, mainly vasodilatation, increased capillary permeability, and pain processes (Leeb-Lundberg et al., 2005). Bradykinin and kallidin (Lys-bradykinin) exert their pharmacological activities by binding to their constitutively expressed kinin B₂ receptor before being metabolized by multiple peptidases (Leeb-Lundberg et al., 2005). The identity of the metallopeptidases involved in bradykinin metabolism *in vitro* and their relative importance vary according to the biological medium considered. In various cell types and tissues, such as kidney, endothelial cells, and cardiomyocytes, neutral endopeptidase 24.11 (NEP, neprilysin) plays an important role in the degradation of bradykinin (Raut et al., 1999). In human plasma, bradykinin is metabolized mostly by three metallopeptidases (Decarie et al., 1996; Cyr et al., 2001). Angiotensin I-converting enzyme (ACE) constitutes the main degradation pathway. Carboxypeptidase N transforms bradykinin and kallidin into their active metabolites, des-arginine⁹-bradykinin (des-Arg⁹-BK) and Lys-des-Arg⁹-BK (des-Arg¹⁰-kallidin), respectively (a minor metabolic pathway in plasma unless ACE is inhibited). We have also shown that aminopeptidase P (X-prolyl aminopeptidase, APP) plays an important role in the metabolism of kinins in plasma, mostly for des-Arg⁹-BK (Cyr et al., 2001). Although the carboxytruncated metabolites of bradykinin and kallidin are largely inactive under normal conditions, they are the agonists of the strongly regulated B₁ receptors, of which receptor synthesis is increased in experimental models of inflammation under the control of cytokines, MAP kinases, and specific transcription factors (Leeb-Lundberg et al., 2005).

We have previously reported a decreased degradation of endogenous des-Arg⁹-BK in the plasma of hypertensive patients who, while treated with an ACEi, experienced an AE (Molinaro et al., 2002). This anomalous breakdown was linked to a decreased aminopeptidase P plasma activity, supporting a pathogenic mechanism relying on kinin catabolism (Adam et al., 2002; Molinaro et al., 2002). Human aminopeptidase P exists in both cytosolic and membrane-bound forms, the latter being most likely responsible for plasma activity (Molinaro et al., 2005). Moreover, a recent report describes a single nucleotide polymorphism within the membrane-bound aminopeptidase P (mAPP) gene *XPNPEP2* linked to low plasma aminopeptidase P activity (Duan et al., 2005). Although plasma aminopeptidase P deficiency states could predispose to AE in some ACEi-treated patients, little is known about the physiological roles of this metallopeptidase in tissues. These observations based on plasma can hardly be extrapolated to a localized AE affecting the oropharyngeal tissues.

The first aim of this paper was to quantify metallopeptidases and kinin receptor mRNAs in oropharyngeal tissues in swine using novel real-time PCR analysis. As a second step, we have defined the effect of inflammation and of acute and chronic ACE inhibition on the expression of these biochemical entities that limit and mediate, respectively, the pharmacological activity of kinins during an episode of AE. As a sequel to our preceding *in vitro* investigations, we have defined the effect of these *in vivo* treatments on the metabolism of endogenous kinins in plasma.

Materials and Methods

Reagents. The ACEi enalaprilat (Vasotec I.V., 1.25 mg/ml) and enalapril (Vasotec) were from Merck Frosst Canada (Kirkland, QC, Canada); *RNAlater* was from Ambion (Austin, TX); bradykinin and des-Arg⁹-BK were acquired from Peninsula Laboratories (Belmont, CA); LPS extracted from *Escherichia coli* serotype O111:B4, L-arginine, and *o*-phthalaldehyde were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada); and TRIzol reagent was purchased from Invitrogen (Burlington, ON, Canada). The internally quenched fluorescent substrates (Abz)RGL(EDDnp) for NEP (Medeiros et al., 1997), K(Dnp)P-PGK(Abz) for mAPP (Molinaro et al., 2005), and (Abz)YRK(Dnp)P for ACE (Araujo et al., 2000) were gifts from Prof. A. Carmona (Department of Biophysics, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil). PCR primers were synthesized by Biocorp Inc. (Montreal, QC, Canada).

Animals. Twenty-four healthy male cross-bred barrows (Yorkshire × Landrace) approximately 2 months old and weighing 16.1 ± 1.6 kg were purchased from a specific pathogen-free farm (Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Montréal, Canada) and were kept in an isolated room. Within the room, the animals were housed in separate pens. Food and water were provided *ad libitum* throughout the experiment.

Experimental Protocol. The experimental protocol was approved by the Faculty of Veterinary Medicine ethics committee (Université de Montréal) in accordance to the Canadian Council on Animal Care Guidelines. The 24 animals were randomly allocated in four different treatment groups: 1) the one-time ACEi treatment group (enalaprilat 100 µg/kg *i.v.* injection once), 2) the 7-day ACEi treatment group (enalapril maleate tablet 20 mg *p.o.*) 12 h apart for 7 consecutive days, 3) the LPS group [5 µg/kg dissolved in 1 ml of NaCl (0.9%) *i.v.* once], and 4) untreated animals (control group). At the end of the experiments, all of the animals were euthanized with an *i.v.* lethal dose of sodium pentobarbital (540 mg/ml). The one-time ACEi group was euthanized 4 h postenalaprilat *i.v.* injection, the 7-day ACEi group was euthanized on the morning of the eighth day, and the LPS animals were sacrificed 6 h post-LPS *i.v.* injection. Sacrifice immediately followed the last blood samplings. Two control pigs were sacrificed with each group of treated animals.

Venous blood samples were collected in 1) the one-time ACEi group before injection, 45 min post-ACEi injection, and 4 h post-ACEi injection; 2) the 7-day ACEi group on the first (before the first oral dose of ACEi), third, and eighth days of treatment; and 3) the LPS group before and 6 h after LPS injection. Control group samples were taken at all time points on six animals. Blood samples were collected into sodium citrate and EDTA-treated tubes (Vacutainer; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). The citrated blood samples were immediately centrifuged (2400g for 10 min), and the plasma from each animal was aliquoted in polypropylene tube and immediately stored at -80°C until further analysis. Tissues from the oropharyngeal zone (parotid gland, tongue, and laryngeal tissue) and a piece of kidney were quickly excised upon euthanasia, washed in ice-cold saline solution, and flash-frozen in liquid nitrogen and/or conserved in *RNAlater* for protein and RNA extraction.

Assessment of the Systemic Inflammatory Response. C-reactive protein, an indicator of a systemic inflammatory response, was quantified in plasma with a commercial solid-phase sandwich immunoassay kit (PHASE RANGE porcine C-reactive protein assay kit; Tri-Delta Diagnostics, Inc., Morris Plains, NJ) according to the manufacturer's instructions. Total and differential leukocytes counts were routinely obtained with a Coulter counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA), and these systemic parameters were complemented by rectal temperature assessment in LPS-treated and control animals.

Biochemical Investigations in Plasma. The activity of ACE, aminopeptidase P, and carboxypeptidase N was measured using the methods described previously. ACE activity was determined by Bühlmann ACE radioenzymatic assay (ALPCO: American Labora-

tory Products Company, Windham, NH) according to the manufacturer's instructions. The activity of aminopeptidase P and carboxypeptidase N was assessed by fluorimetric assay as described previously (Cyr et al., 2001). The metabolism of the endogenous kinins, bradykinin and its active metabolite des-Arg⁹-BK, was studied through in vitro plasma contact system activation as described extensively elsewhere (Cyr et al., 2001; Molinaro et al., 2002), using two specific competitive chemiluminescent enzyme immunoassays, as previously described (Decarie et al., 1994; Raymond et al., 1995).

Total RNA Isolation from Tissues. Total RNA was isolated using the TRIzol reagent and RNAqueous-4PCR kit (Ambion) according to the manufacturer's instructions with modification. In brief, ~50 mg of each tissue was first homogenized in the TRIzol reagent, and chloroform was added. After centrifugation, the aqueous phase was mixed with the lysis/binding solution and the RNAqueous-4PCR protocol was followed subsequently. All RNA samples were finally DNase-treated to remove traces of genomic DNA, quantified using RiboGreen fluorescent nucleic acid stain (RNA quantification kit; Invitrogen, Carlsbad, CA), and stored at -80°C until use.

Reverse Transcription and Real-Time Polymerase Chain Reaction. The 0.5- μ g amount of total RNA was transcribed into cDNA using 50 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 5 μ M oligo(dT)₁₆ primer. Quantification of the RNAs was performed by real-time PCR using the LightCycler 2.0 apparatus (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Two microliters of cDNA were brought to a final volume of 20 μ l containing 2 mM MgCl₂, 2 μ l of LightCycler-FastStart DNA SYBRGreen I Mix (Roche Diagnostics), and 0.5 or 0.7 μ M primers (Table 1) in water. After initial activation of the DNA polymerase at 95°C for 10 min, the amplification conditions were as follows: 47 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 s, annealing for 12 s at 62°C [glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), B₁ receptor, B₂ receptor, and neprilysin] or 15 s at 60°C (mAPP), and extension at 72°C. The extension times were calculated from the amplicon size (base pairs/25). Fluorescence data were acquired at the end of each extension phase. After amplification, a melting curve analysis from 65 to 98°C with a heating rate of 0.1°C/s with a continuous fluorescence acquisition was made. Standard curves were created from specific PCR products. The corresponding real-time PCR efficiency (*E*) of one cycle in the exponential phase was calculated from the slopes calculated by the LightCycler software according to eq. 1 (Pfaffl, 2001).

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} \quad (1)$$

Quantification was done by using a mathematical model in eq. 2 to determine the relative quantification of a target gene compared with a reference gene. The relative quantification of a target transcript is based on the PCR efficiency of the individual transcripts and cross-

ing point (Cp) deviation (calculated by the second derivative maximum method) of a control and an unknown sample normalized by a reference transcript. This relative expression ratio can be calculated as shown in eq. 2,

$$\text{Normalized Ratio} = \frac{E_T^{\text{CpT(C)}}}{E_R^{\text{CpR(C)}}} \times \frac{E_R^{\text{CpR(S)}}}{E_T^{\text{CpT(S)}}} \quad (2)$$

where *E_R* is the real-time PCR efficiency of a reference gene transcript, *E_T* is the real-time PCR efficiency of target gene transcript, CpR is the deviation of reference gene transcript, CpT = Cp deviation of the target gene transcript, S is the unknown sample, and C is the calibrator. The expression was normalized against the expression of GAPDH and calculated for each animal for a given tissue and target gene.

Measurement of ACE, mAPP, and Neprilysin Enzymatic Activities in Tissues. Tissues from the oropharyngeal zone, namely from the parotid gland, tongue, and laryngeal tissue, and a piece of kidney weighing ~500 mg were homogenized in Tris buffer [50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.4, and 1× Complete protease inhibitor solution (protease inhibitor cocktail tablets; Roche Diagnostics)] with a Polytron homogenizer (Brinkmann Instruments, Rexdale, ON, Canada) and sonicated for 10 min. A solution of CHAPS (Sigma-Aldrich) was added to each homogenate to final concentration of 8 mM, incubated on ice for 2 h, and centrifuged (1750g, 4°C), and the supernatant containing total membrane proteins was collected (Raut et al., 1999). Final protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid method (Pierce Chemical, Rockford, IL).

Metalloproteinase (ACE, mAPP, and neprilysin) activities were measured in tissue extracts using quenched fluorescent substrates. Reactions were run in duplicate in 96-well flat bottom plates (Costar UV plate 3635; Corning Life Sciences, Acton, MA) in a final volume of 150 μ l. Ten milligrams of membrane protein extracts in a 50 mM Tris-Cl buffer, pH 7.4, 100 mM NaCl, and 10 μ M ZnCl₂ for ACE and neprilysin or 100 mM Hepes buffer, pH 7.4, for mAPP were incubated with a 10 μ M final concentration of (Abz)YRK(Dnp)P for ACE, (Abz)RGL(EDDnp) for neprilysin, or K(Dnp)PPGK(Abz) for mAPP. Plates were preincubated at 37°C for 15 min before substrate addition. Fluorescence (excitation wavelength of 340 nm, emission wavelength of 420 nm) was assessed kinetically in a FL600 microplate fluorescence plate reader (BioTek, Winooski, VT). Fluorescent units were converted into picomoles of hydrolyzed substrate based on a standard fluorescence curve.

Immunohistochemistry. Lingual tissue samples from all pigs were obtained at necropsy and fixed using 10% buffered formalin phosphate for histological examination. Paraffin-embedded tissue sections (5- μ m thick) were prepared, submitted to an antigen-retrieving procedure (Marceau et al., 1999), and immunostained at

TABLE 1

Oligonucleotides for real-time PCR

Sequences are derived from GenBank accession numbers AF017079 (GAPDH), AF540788 [B₁ receptor (B₁R)], AB051422 [B₂ receptor (B₂R)], U55039 (mAPP), and NM_000902 (NEP).

mRNA Targets	Nucleotide Sequences (5' → 3')	Product Size	Final Concentration ^b
		bp	μ M
GAPDH-GAPDH gene	F834: ACT TCG GCA TCG TGG AAG GAC T[R] R1334: GGT CCA GGG GCT CTT ACT CCT T[R]	500	0.7
B ₁ R-BDKRB1 gene	F5: CTC CCA GAC CCT CGT GGT GT[R] R355: CCA GGA AGA TGC TGA TGA ACA GGT[R]	350	0.7
B ₂ R-BDKRB2 gene	F110: TGA ACA CGG CAC AGC AGA GAC CTC AGT TCC[R] R610: CTT CAC CAG GGC CAG GTA GCG GTC GAT G[R]	500	0.7
mAPP-XPNPEP2 gene	F1716: AAC AAC AGA CAT CAC CCG AA[R] R1936: CAC ACA GGA AGT TGC CG[R]	220	0.5
NEP-MME gene	F1246: CAG CCG AAC CTA CAA GGA GTC CAG AAA TGC[R] R1845: TGT CAT CGA AGC CAT GGG TGA TTT CGT GTC[R]	599	0.7

^a F and R indicate forward and reverse primers, respectively; numbers indicate the sequence position.^b Final concentration of forward and reverse primers.

37°C for 1.5 h with one of the following antibodies: monoclonal anti- α -actin (clone 1A4, dilution 1:100; Sigma-Aldrich), monoclonal anti-human-B₂ receptor (Blaukat et al., 2003), polyclonal anti-von Willebrand factor (vWF, dilution 1:100; DakoCytomation California Inc., Carpinteria, CA), or a mixture of polyclonal antibodies raised against six distinct peptides from the B₁ receptor human sequence (Mazenot et al., 2001). The antibody staining was revealed using horseradish peroxidase-coupled goat anti-mouse IgG (dilution 1:100; Sigma-Aldrich) for primary monoclonal antibodies or monoclonal anti-rabbit IgG (dilution 1:200; Sigma-Aldrich) for polyclonal antibodies (30-min reactions, 37°C). The secondary antibodies were allowed to react for 5 to 15 min at 25°C with the Immunopure metal-enhanced diaminobenzidine substrate (Pierce Chemical). Endogenous peroxidase was initially inhibited in tissue sections using 3% H₂O₂ (5 min).

Statistical Analysis. The systemic inflammatory response and the enzymatic activities in plasma are analyzed using a two-way analysis of variance with repeated measures on one of the factors. The factors are the groups with four levels (one-time ACEi treatment, 7-day ACEi treatment, LPS, and control) and the time with two levels [before experimental protocol (T_0) and at sacrifice (T_S)], the latter being the repeated factor. In case of interaction, separate analyses of variance with the factor group are performed at each time. Significant differences with the control groups were further assessed using Dunnett's test ($p < 0.05$).

For the normalized ratio of the examined target gene/GAPDH generated by the real-time PCR analysis, a logarithmic transformation was used to bring the data closer to normality. The statistical significance was established using the mean values of the log normalized ratio calculated for each animal for a given tissue. The biochemical investigations in tissues are analyzed separately for each tissue. For the log normalized ratio and the biochemical parameters, a one-way analysis of variance with a factor group with four levels (one-time ACEi treatment, 7-day ACEi treatment, LPS, and control) was used followed by Dunnett's test when a significant difference was observed ($p < 0.05$).

Results

Assessment of the Systemic Inflammatory Response.

Fig. 1A represents the systemic inflammatory status of each group of animals assessed by plasma C-reactive protein concentrations immediately before experimental protocol and prior to sacrifice. There is a significant interaction between the factors time and group for C-reactive protein analysis [$F(3,20) = 11.19, p < 0.001$]. No difference was observed between the groups at T_0 [$F(3,21) = 1.37, p = 0.279$]; however, at T_S , a significant difference was shown [$F(3,21) = 9.147, p < 0.001$]. The concentration of this acute-phase protein was significantly higher for the LPS group when compared with the control group ($p = 0.001$). The one-time or 7-day treatment with ACEi does not significantly modify the plasma concentrations of this acute-phase protein marker.

Figure 1B shows the number of circulating leukocytes for the four groups before treatment and prior to sacrifice. As for C-reactive protein, a significant interaction was observed between the factors time and group [$F(3,19) = 8.545, p = 0.001$]. No significant difference was noted at T_0 [$F(3,21) = 1.764, p = 0.185$] between treatments; however, at T_S , a significant difference was obtained between the groups [$F(3,23) = 19.402, p < 0.001$]. The LPS injection produced a significantly decreased total leukocyte count at T_S compared with the control animals ($p < 0.001$). Finally, the rectal temperatures measured in the LPS and control groups

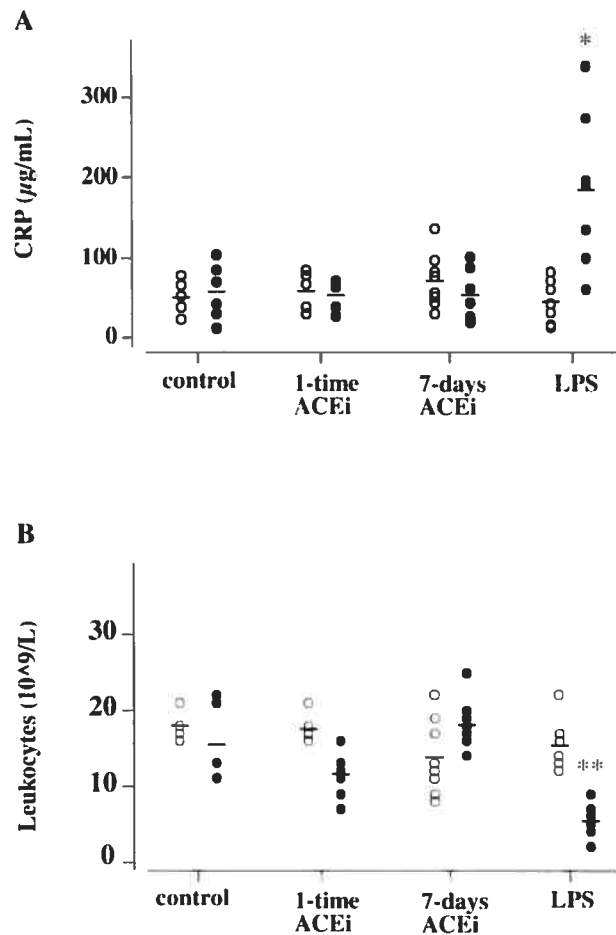


Fig. 1. Systemic inflammatory response. Systemic inflammatory response represented by dot-plots. A, C-reactive protein concentrations in pigs for each group before treatment of ACEi and endotoxin infusions in pigs (T_0 , open circles) and before sacrifice (T_S , closed circles). *, $p = 0.001$. B, leukocytes counts before treatment of ACEi and LPS (T_0 , open circles) and before sacrifice (T_S , closed circles). **, $p < 0.001$. The line represents the median.

showed that the temperature peaked at 4 h and returned to baseline by the T_S (6 h) (data not shown).

Biochemical Analysis in Plasma. Enzymatic activities measured in blood plasma for ACE, aminopeptidase P, and carboxypeptidase N are presented in Table 2. For ACE, the four groups progressed differently and a significant interaction was observed between the factors time and group [$F(3,20) = 43.417, p < 0.001$]. At T_0 , a difference was obtained between the groups [$F(3,20) = 4.77, p = 0.011$]; the one-time ACEi treatment group was significantly different from the control group ($p = 0.025$; an unexplained variation

TABLE 2

Enzymatic activity of ACE, APP, and carboxypeptidase N (CPN) ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$) in plasma before treatment (T_0) and prior to sacrifice (T_S)

Values are means \pm S.D. ($n = 6$).

Enzymes	Control	One-Time ACEi	7-day ACEi	LPS
ACE T_0	214 \pm 29	151 \pm 57*	221 \pm 32	221 \pm 27
ACE T_S	222 \pm 38	47 \pm 7†	33 \pm 14†	223 \pm 29
APP T_0	56 \pm 5	52 \pm 16	48 \pm 6	46 \pm 8
CPN T_0	90 \pm 22	76 \pm 29	71 \pm 10	67 \pm 10

* $P = 0.025$ vs. control at T_0 ; † $P < 0.001$ vs. control at T_S .

observed before drug dosing). At T_S , a significant difference was observed [$F(3,20) = 105.81, p < 0.001$]; as expected, the one-time and 7-day ACEi treatments lead to a significantly lower ACE activity ($p < 0.001$) when compared with LPS and control groups. Both ACEi and LPS treatments do not affect significantly plasma activities of aminopeptidase P at T_S . Indeed, no interaction between the factors time and group and no time effect were noted [$F(3,20) = 0.452, p = 0.719$; and $F(1,20) = 0.286, p = 0.599$, respectively] (data not shown). For carboxypeptidase N, there is a significant interaction between the factors time and group [$F(3,20) = 5.088, p = 0.009$]. No group effect at each time was observed, but a time effect was significant only for LPS group where carboxypeptidase N activity was $67 \pm 10 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ at T_0 and increased to $86 \pm 6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$ at euthanasia ($p < 0.001$).

Endogenous Bradykinin and Des-Arg⁹-BK Metabolism. Fig. 2 illustrates the calculated area under the curve (AUC), representing the accumulation and subsequent catabolism of immunoreactive bradykinin and des-Arg⁹-BK measured during the in vitro activation of the contact system using glass beads in 1 ml of plasma sampled from each animal at T_S . For bradykinin, a significant interaction was observed between the factors time and group [$F(3,20) = 8.440, p = 0.001$]. No significant difference was noted for data at T_0 [$F(3,20) = 1.205, p = 0.333$], but at T_S , the difference was significant [$F(3,20) = 60.94, p < 0.001$] and obtained for the one-time and 7-day ACEi treatment groups when compared with the control group ($p < 0.001$, respectively). For des-Arg⁹-BK, the same outcome was observed [$F(3,20) = 7.069, p = 0.002$]. No difference was noted at T_0 [$F(3,20) = 1.745, p = 0.190$], but one occurred at euthanasia [$F(3,20) = 11.475, p < 0.001$]; in fact, the one-time ACEi ($p = 0.006$) and 7-day ACEi ($p < 0.001$) treatment groups were statistically higher from the control group. For the LPS group, the AUC was not statistically different from the control group, neither for bradykinin nor for des-Arg⁹-BK. There were no differences among groups from samples collected at every other time (data not shown).

Real-Time Polymerase Chain Reaction Applied to Tissues. Specificity of PCR products was confirmed on the agarose gel illustrated in Fig. 3A and resulted in single bands, each one with the predicted length. The melting curves analyses are an exact and fast method to check PCR specificity and are displayed as first-negative derivative of the fluorescence versus the temperature. Typical LightCycler melting curve analysis from the amplification of the targets and reference transcripts resulted in product-specific melting temperatures, as illustrated in Fig. 3B.

Table 3 shows the log of normalized ratios for metalloproteinases in oropharyngeal tissues and kidney. In Fig. 4 and Table 4, the same information is given for the kinin receptors. For mAPP, the 7-day ACEi treatment significantly increased the expression of the mRNA corresponding to this enzyme in the tongue ($p < 0.001$) and laryngeal tissue ($p = 0.027$). The expression of neprilysin mRNA was significantly increased in kidney, tongue, and parotid for the 7-day ACEi treatment group ($p = 0.038, p = 0.007, \text{ and } p = 0.026$, respectively), but a significant decrease in its expression was observed for the one-time ACEi and LPS treatments in kidney ($p < 0.001$). The expression of the B₁ receptor mRNA was significantly higher in kidney and oropharyngeal tissues only

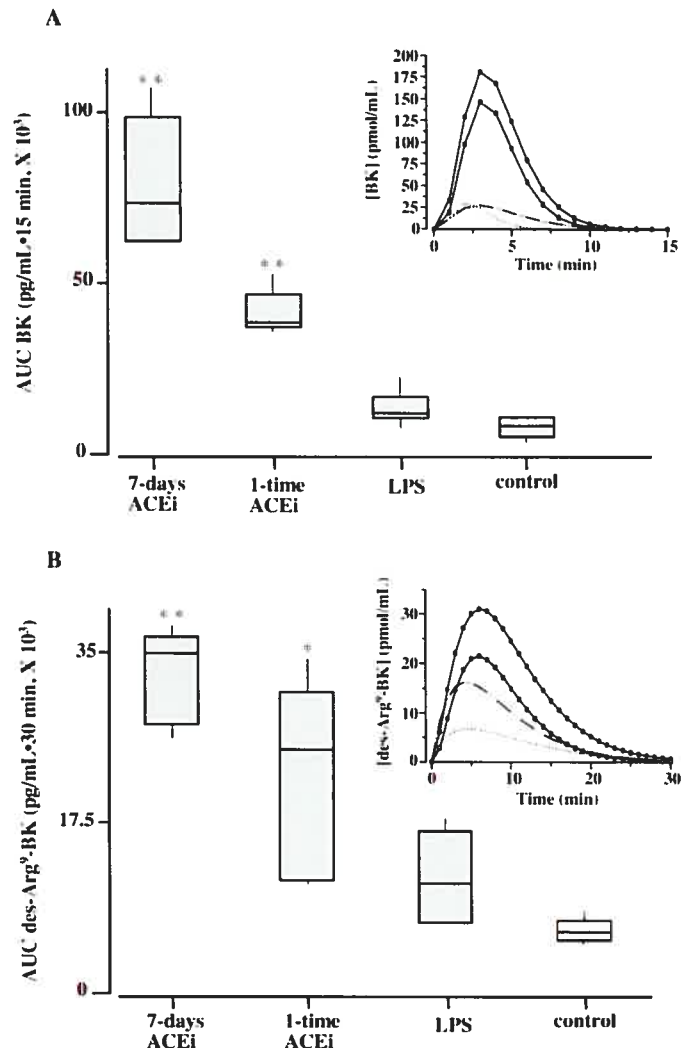


Fig. 2. AUC of immunoreactive bradykinin and des-Arg⁹-BK. AUC of immunoreactive bradykinin and des-Arg⁹-BK as a function of time are illustrated in graph for each experimental group (7-day ACEi, one-time ACEi, LPS, and control), and values measured in each treatment group were compared with the control group values. Box plots display summary statistics for the distribution. The line in the box represents the median. *, $p = 0.006$; **, $p < 0.001$. Insets represent the kinetic profiles of the formation and degradation of bradykinin (BK) (A) and des-Arg⁹-BK (B) for mean 7-day (closed circles) and one-time (open circles) treatment with ACEi and LPS (dashed line) group before sacrifice (T_S) after activation of the contact system with glass beads in plasma. Dotted lines are values for control group.

for the 7-day treatment with ACEi (kidney, tongue, and parotid, $p < 0.001$; laryngeal tissue, $p = 0.002$; Fig. 4). Neither acute ACEi treatment nor single LPS injection significantly affected the expression of the mRNA coding for this receptor in the kidney, tongue, parotid gland, or laryngeal tissue at the tested time points. The one-time ACEi treatment and LPS treatment led to a significantly lower expression of the B₂ receptor mRNA in the kidney ($p = 0.002$ and $p = 0.008$, respectively; Table 4). In contrast, in the tongue ($p = 0.002$) and laryngeal tissue ($p = 0.007$), B₂ receptor mRNA expression was significantly increased by a 7-day treatment with ACEi.

Metalloproteinase Activities in Tissues. Metalloproteinase activities measured in tissue extracts from control animals using quenched fluorescent substrates are given in Ta-

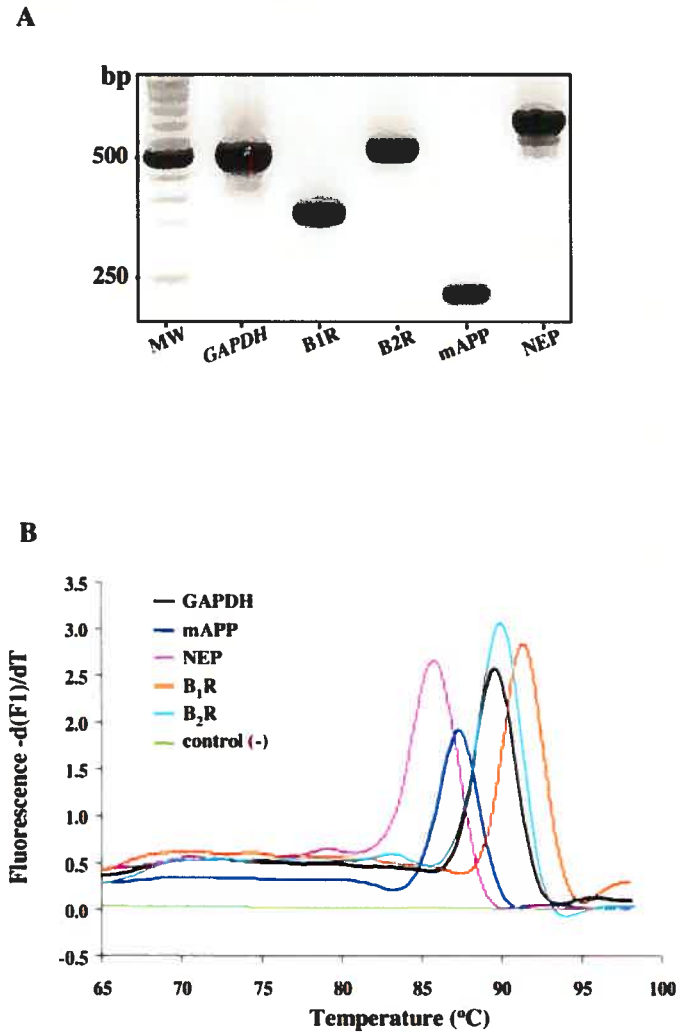


Fig. 3. Amplification specificity by real-time PCR. Specificity of PCR products for each primer was visualized in 2% agarose gel and resulted in a single band with the predicted length (A). In addition, a PCR product dissociation curve (melting temperature analysis) was performed, which resulted in single product-specific melting temperature (B).

ble 5. Neither acute nor 7-day ACEi treatments, nor the single LPS injection, significantly affected ACE activities in the kidney, tongue, parotid gland, or laryngeal tissue when compared with the control group (data not shown). However, a significant treatment effect was noted for the neprilysin activity in the kidney and for the mAPP activity in parotid gland [$F(3,20) = 19.567$, $p < 0.001$; and $F(3,20) = 3.440$, $p = 0.036$, respectively] when compared with the control group. Indeed, the one-time and 7-day ACEi treatment significantly increased neprilysin activity in the kidney, 20461 ± 841 ($p < 0.001$), and mAPP activity in the parotid gland, 294 ± 151 ($p = 0.027$), respectively.

Immunohistochemistry Applied to Lingual Tissue.

The tongue, examined below the epithelial surface, contains connective tissue and striated muscle along with blood vessels of various sizes (Fig. 5, hematoxylin and eosin stain). The blood vessels are further identified by immunoreactivity for the endothelial cell marker vWF (one-cell thick lines) and by the smooth muscle cell marker α -actin (thicker labeling in arteriole and venule walls). Unexpectedly, tissues from all animals treated for 7 days with the ACEi exhibit only faint

vWF vascular staining (Fig. 5). The staining for the B_2 receptor is present in endothelial cells of identifiable blood vessels in all groups, but the comparatively weaker B_1 receptor signal is only found after treatment with LPS or 7-day ACEi.

Discussion

AE is a local inflammatory reaction, yet most if not all previous biochemical investigations on AE are based on plasma analysis (Nussberger et al., 1998). Here we have set out to analyze in more detail the pathogenesis of ACEi-induced AE. To this end, we used an animal model (i.e., the pig) that is large enough to allow repeated blood sampling and harvesting of oropharyngeal tissues to support multiple analyses.

Clinical and experimental lines of evidence plead for a multifactorial mechanism of ACEi-associated AE. Angioedema could be the result of a coincidence of distinct pharmacological, metabolic, and pathophysiological factors. Previously, we have shown that AE patients have an anomaly of the metabolism of des-Arg⁹-BK because of a defect of plasma aminopeptidase P activity, evidenced only in the presence of ACEi (Adam et al., 2002; Molinaro et al., 2002). We have shown recently that this low aminopeptidase P depends largely on genetic factors (Duan et al., 2005). Because the incidence of AE is higher in hypertensive smokers treated with an ACEi (Coats, 2002), we analyzed the effect of inflammation (a pathophysiological factor) on the tissue expression of metallopeptidases and on the plasma metabolism of kinins. Inflammation was mimicked by a sublethal dose of LPS. We chose a dose substantially less than that typically used in rats and mice, because, like human and nonhuman primates, pigs are extremely sensitive to LPS (Warren et al., 1997). Since AE episodes have been reported as early as on the first day (Wood et al., 1987) or later during ACEi treatment (pharmacological factor) (Hedner et al., 1992; Shionoiri et al., 1996), two groups of pigs were treated, acutely or chronically. The dosages of a single injection of 100 μ g/kg enalaprilat i.v. and the per oral application of 20 mg of enalapril twice daily were chosen in preliminary studies, because they both allowed consistent inhibition of plasma ACE activity, as extensive as in our *in vitro* studies (Cyr et al., 1999; Molinaro et al., 2002).

Methods previously developed in our laboratory to define the metabolism of endogenous kinins (Decarie et al., 1994; Raymond et al., 1995; Cyr et al., 2001) were applied to the plasma of the experimental animals. A significant *in vitro* accumulation of kinins (as assessed by the AUC; Fig. 2) has been monitored in the one-time and 7-day ACEi treatment groups when compared with controls. Because aminopeptidase P activities in plasma were similar in both ACEi-treated groups, the observed increased bradykinin and des-Arg⁹-BK concentrations are exclusively a consequence of ACE blockade and not of a nonspecific inhibition of the activity of aminopeptidase P by ACEi. These observations are important as Hooper et al. (1992) reported a nonspecific inhibition of purified pig aminopeptidase P by some ACEi.

We provide evidence for the expression of kininases and kinin receptors in the oropharyngeal tissues of swine. For this purpose, we developed the relative quantification of

TABLE 3

Log of normalized ratios for metalloproteinases in oropharyngeal and kidney tissues

The relative gene expressions vs. controls of mAPP and NEP are normalized to GAPDH. Average ratios ($n = 6$) are expressed as mean \pm S.D. Values are log means \pm S.D. Only tissues with significant differences are shown ($p < 0.05$).

mAPP-Normalized Ratio (log)			
	Groups	Average	p Value vs. Control
Tongue	LPS	-3.89 ± 0.14	0.567
	7-day ACEi	-1.37 ± 0.62	<0.001
	One-time ACEi	-3.25 ± 0.41	0.883
	Control	-3.48 ± 0.85	
Laryngeal tissue	LPS	-1.28 ± 0.20	0.998
	7-day ACEi	0.06 ± 0.19	0.027
	One-time ACEi	-1.19 ± 0.51	1.000
	Control	-1.22 ± 1.09	
NEP-Normalized Ratio (log)			
	Groups	Average	p Value vs. Control
Kidney	LPS	1.4 ± 0.15	<0.001
	7-day ACEi	2.3 ± 0.25	0.038
	One-time ACEi	1.4 ± 0.05	<0.001
	Control	2.0 ± 0.28	
Tongue	LPS	0.71 ± 0.18	0.295
	7-day ACEi	1.81 ± 0.51	0.007
	One-time ACEi	0.96 ± 0.19	0.955
	Control	1.04 ± 0.25	
Parotid	LPS	1.48 ± 0.64	0.780
	7-day ACEi	3.47 ± 0.37	0.026
	One-time ACEi	1.88 ± 1.16	1.000
	Control	1.87 ± 0.64	

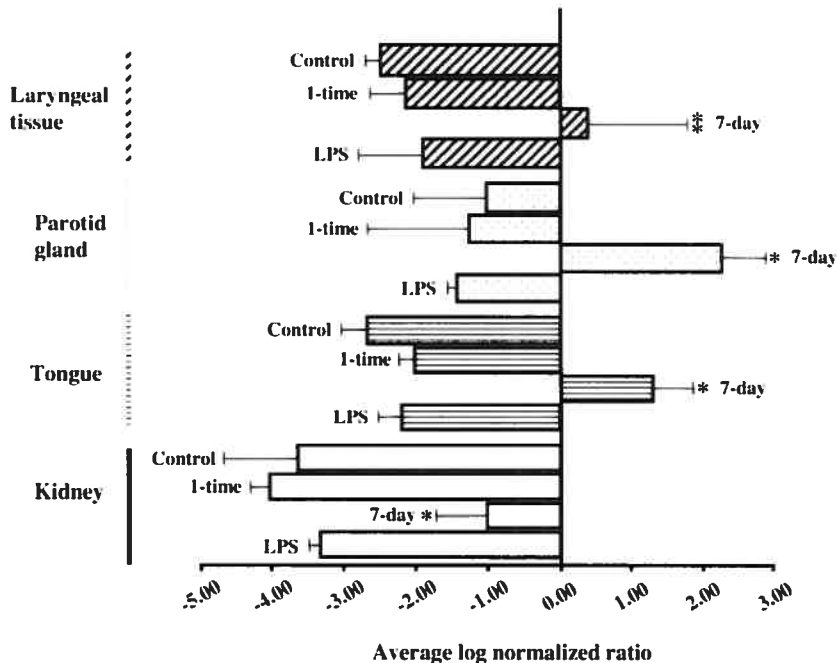


Fig. 4. Log of the normalized ratio B_1 receptor mRNA/GAPDH mRNA in oropharyngeal tissues and kidneys. Values are averaged ratios \pm S.D. ($n = 6$). *, $p < 0.002$; **, $p < 0.001$ versus controls.

our target gene transcripts *XPNPEP2* (membrane aminopeptidase P), *MME* (neprilysin), *BDKRB1* (B_1 receptor), and *BDKRB2* (B_2 receptor) in comparison with the reference *GAPDH* gene transcript. After an analytical validation, a mathematical approach for data analysis was presented to calculate the relative expression of normalized logarithmic ratios.

We show that gene expression of the metalloproteinases neprilysin and mAPP in the oropharyngeal tissues is lower than that measured in the kidney when expressed as a ratio to GAPDH (Table 3 and data not shown), and the enzyme activity measurements fully support this observa-

tion. The kidney is a valuable positive expression control that contains all components of the kallikrein-kinin system. A 7-day treatment with an ACEi increased mAPP mRNA expression in the tongue and laryngeal tissue and also increased neprilysin mRNA expression in kidney, tongue, and parotid gland tissues; paradoxically, neprilysin expression was decreased after a single administration of enalaprilat, as well as in LPS-treated animals, and this only in the kidney. As in the control animals, the corresponding enzyme activities were rather stable, with occasional changes that did not match the mRNA variation. Although these observations suggest that other factors

TABLE 4

Log of normalized ratios for kinin B₂ receptor in oropharyngeal and kidney tissues

The relative gene expressions vs. controls of the kinin B₂ receptor (B₂R) are normalized to GAPDH. Average ratios (*n* = 6) are expressed as mean ± S.D. Values are log means ± S.D. Only tissues with significant differences are shown (*p* < 0.05).

B ₂ R-Normalized Ratio (log)			
	Groups	Average	<i>p</i> Value vs. Control
Kidney	LPS	-3.72 ± 0.22	0.008
	7-day ACEi	-1.28 ± 0.91	1.000
	1-time ACEi	-4.10 ± 0.42	0.002
	Control	-1.23 ± 2.14	
Tongue	LPS	-3.84 ± 0.28	0.607
	7-day ACEi	1.10 ± 0.69	0.002
	1-time ACEi	-3.00 ± 0.92	0.991
	Control	-2.76 ± 2.20	
Laryngeal tissue	LPS	-1.68 ± 0.72	0.942
	7-day ACEi	0.64 ± 1.58	0.007
	1-time ACEi	-2.28 ± 0.38	0.965
	Control	-2.01 ± 1.15	

TABLE 5

Metallopeptidases activities in tissues from control animals

Values are means ± S.D. (*n* = 5–6).

	ACE	mAPP	NEP
Kidney	8162 ± 2139	2780 ± 399	14740 ± 3242
Tongue	1058 ± 331	224 ± 55	501 ± 118
Parotid	768 ± 255	136 ± 59	123 ± 54
Laryngeal tissue	1412 ± 258	225 ± 42	198 ± 59

regulate the activity of the peptidases, a high variation of the low activities did not reach statistical significance, even when the activities were higher or lower than those measured in the control animals (Table 5 and data not shown). The mechanisms by which ACEi leads to changes in metallopeptidase mRNA expression in the present experimental model remain to be elucidated, although other laboratories have reported that ACEi increase ACE mRNA and activity in cell systems and in some tissues (Chai et al., 1992; King and Oparil, 1992). We were unable to assess the effect of ACEi on ACE expression itself, because obtaining valid and specific primers for the porcine gene was not possible and attempts to synthesize primers based on homologous mammalian sequences remained unsuccessful. To circumvent these problems, the quantification of enzyme activities in tissue homogenates using highly sensitive and specific internally quenched fluorescent substrates for ACE was done, as well as for neprilysin and mAPP (Molinario et al., 2005). In fact, the enzyme activities in oropharyngeal tissues could not be measured using traditional endpoint methods (Blais et al., 1999). The effects of ACEi treatments on tissue ACE activities contrast with those observed in plasma; no significant difference was seen in ACE catalytic activity in any tissue for any treatment. These results parallel others in this laboratory for rat and human heart, and they could be explained by a washout of the ACEi during the tissue homogenization for membrane preparation (Kinoshita et al., 1993; Blais et al., 1997, 2000a).

Local tissue inflammation in ACEi-treated pigs took the form of a strong up-regulation of the mRNA levels for the kinin B₁ receptor in all oropharyngeal and renal tissues after the 7-day drug treatment only. This contrasts with B₂ receptor regulation modulated in a tissue-specific manner by 7-day ACEi treatment (mRNA up-regulated in the

tongue and laryngeal tissue) and in an apparently inconsistent manner with other tissues or treatments. B₁ and B₂ receptor genes are well documented to be differently regulated *in vivo* (Leeb-Lundberg et al., 2005). B₁ receptor mRNA was expected to be low in healthy tissues but up-regulated during inflammatory conditions. In our hands, LPS administration at a mid-range level that does not overtly stress the animals (Warren et al., 1997) did not substantially alter kinin receptor mRNA expression in any of the tested tissues despite a marked systemic inflammatory reaction (Naess et al., 1989). The observed increased plasma carboxypeptidase N in the LPS group supports the idea that the synthesis of this protein is increased by inflammation and can be considered to be an acute-phase reactant protein, as previously observed in patients with inflammatory arthritis (Cherchuitte et al., 1987). The lack of B₁ receptor mRNA up-regulation in this experimental group could be explained by the low dose used and short duration of the endogenous cytokine action (as monitored by the febrile reaction). However, the lingual immunohistochemistry study suggests that some endothelial B₁ receptor protein was still present 6 h post-LPS after a hypothetical rise and fall of the corresponding mRNA; this induction reproduces published functional results for this species (Siebeck et al., 1996). ACEi-induced B₁ receptor expression has been observed in chronically treated rats (Marin-Castano et al., 2002), although 48-h treatment with enalaprilat did not induce B₁ receptor expression in the healthy rabbit despite an effective ACE blockade that should theoretically potentiate endogenous kinins (Marceau et al., 1999). A species- and physiological state-dependent toxic reaction to ACEi could explain the up-regulation of B₁ receptor without overt systemic inflammatory reaction (as C-reactive protein remained low and leukocyte counts were normal in ACEi-treated pigs). Vasopressin or epinephrine administration to human subjects depletes endothelial vWF in biopsies from the oral mucosa (Takeuchi et al., 1988). Such depletion was observed in the lingual vasculature in the 7-day ACEi group and may result from a slow onset hemodynamic adaptation that includes the secretion of these hormones and a form of endothelial stimulation that favors B₁ receptor expression.

In conclusion, here we provide a sensitive real-time PCR analyses that permit gene expression of metallopeptidases and kinin receptors in the oropharyngeal tissues in the pig. We have detected subtle changes after ACEi treatment. The low activity of kininases, the presence of specific receptors, mainly B₁ receptor, and the modulatory effect of inflammation and ACEi support a plausible mechanism whereby kinins could initiate a vasogenic inflammatory process (AE) via the sustained stimulation of either or both kinin receptor subtypes. These results obtained using ACEi could be the basis of future investigations on the pathophysiology of AE associated with more "modern" cardiovascular drugs; e.g., AT1 receptor antagonists and vasopectidase inhibitors. Moreover, encouraging results in the clinical trial of the B₂ receptor antagonist Icatibant support that kinin receptor blockade is of therapeutic interest in hereditary AE (Rosenkranz et al., 2004). It remains to be seen whether B₁ receptor blockade could be more effective in this and other forms of AE.

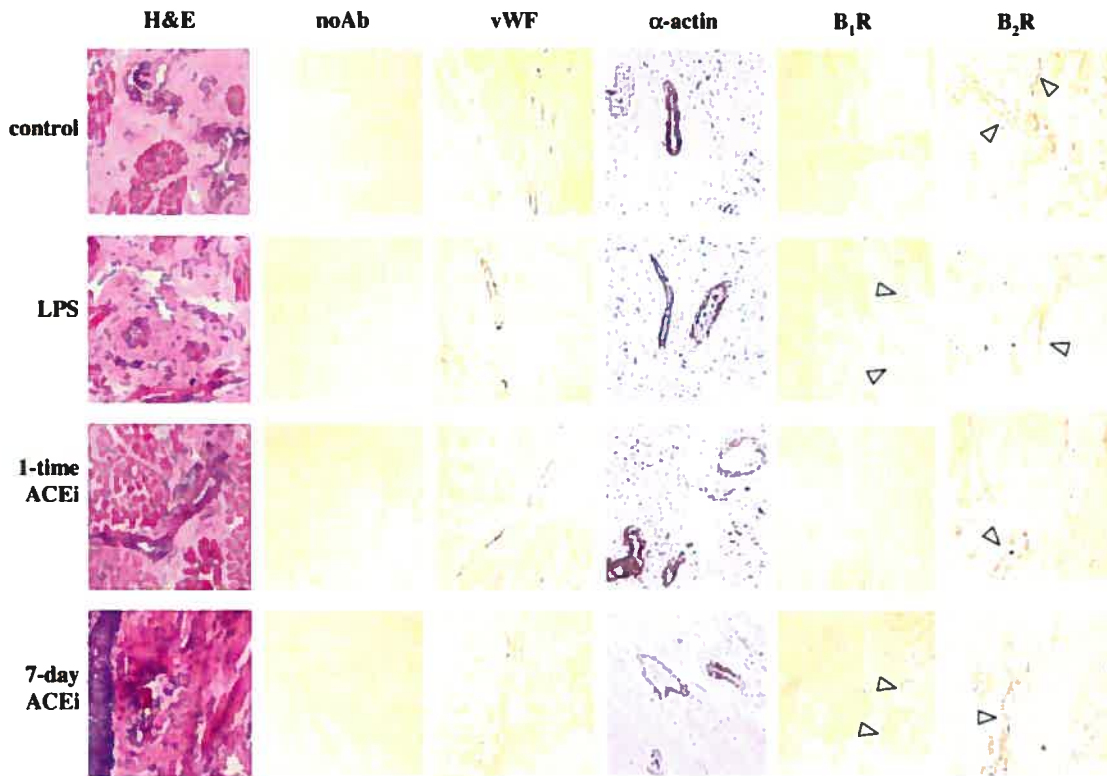


Fig. 5. Immunohistochemistry in porcine lingual tissue. Representative sections from each experimental group are shown (original magnification 100 \times). The presence of blood vessels is shown in hematoxylin and eosin (H&E)-stained sections. No Ab (noAb) refers to background staining of secondary peroxidase-labeled anti-rabbit IgG antibodies in the absence of primary antibodies (other sections treated with the anti-mouse IgG antibodies exhibited a similar background). Arrowheads point at endothelium-like structures labeled with the antikinin receptor antibodies in relatively large blood vessels.

Acknowledgments

We thank Aurore LeBourgeois, Justin Rousselle, Nancy Rodrigue, Nicole Gervais, and Johanne Bouthillier for technical assistance.

References

- Adam A, Cugno M, Molinaro G, Perez M, Lepage Y, and Agostoni A (2002) Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors. *Lancet* **359**:2088–2089.
- Araujo MC, Melo RL, Cesari MH, Juliano MA, Juliano L, and Carmona AK (2000) Peptidase specificity characterization of C- and N-terminal catalytic sites of angiotensin I-converting enzyme. *Biochemistry* **39**:8519–8525.
- Blais C Jr, Drapeau G, Raymond P, Lamontagne D, Gervais N, Venneman I, and Adam A (1997) Contribution of angiotensin-converting enzyme to the cardiac metabolism of bradykinin: an interspecies study. *Am J Physiol* **273**:H2263–H2271.
- Blais C Jr, Fortin D, Rouleau JL, Molinaro G, and Adam A (2000a) Protective effect of omapatrilat, a vasopeptidase inhibitor, on the metabolism of bradykinin in normal and failing human hearts. *J Pharmacol Exp Ther* **295**:621–626.
- Blais C Jr, Marc-Aurele J, Simmons WH, Loute G, Thibault P, Skidgel RA, and Adam A (1999) Des-Arg9-bradykinin metabolism in patients who presented hypersensitivity reactions during hemodialysis: role of serum ACE and aminopeptidase P. *Peptides* **20**:421–430.
- Blais C Jr, Marceau F, Rouleau JL, and Adam A (2000b) The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides* **21**:1903–1940.
- Blaukat A, Mücke P, Kalatskaya I, Faussner A, and Muller-Esterl W (2003) Down-regulation of bradykinin B2 receptor in human fibroblasts during prolonged agonist exposure. *Am J Physiol* **284**:H1909–H1916.
- Chai SY, Perich R, Jackson B, Mendelsohn FA, and Johnston CI (1992) Acute and chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors on tissue angiotensin-converting enzyme. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **19** (Suppl):7–12.
- Cherchuitte F, Beaulieu AD, Poubelle P, and Marceau F (1987) Carboxypeptidase N (kininase I) activity in blood and synovial fluid from patients with arthritis. *Life Sci* **41**:1225–1232.
- Coats AJ (2002) Omapatrilat—the story of overture and octave. *Int J Cardiol* **86**:1–4.
- Cugno M, Nussberger J, Cicardi M, and Agostoni A (2003) Bradykinin and the pathophysiology of angioedema. *Int Immunopharmacol* **3**:311–317.
- Cyr M, Hume HA, Champagne M, Sweeney JD, Blais C Jr, Gervais N, and Adam A (1999) Anomaly of the des-Arg9-bradykinin metabolism associated with severe hypotensive reactions during blood transfusions: a preliminary study. *Transfusion* **39**:1084–1088.
- Cyr M, Lepage Y, Blais C Jr, Gervais N, Cugno M, Rouleau JL, and Adam A (2001) Bradykinin and des-Arg9-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am J Physiol* **281**:H275–H283.
- Decarie A, Drapeau G, Closset J, Couture R, and Adam A (1994) Development of digoxigenin-labeled peptide: application to chemiluminescence immunoassay of bradykinin in inflamed tissues. *Peptides* **15**:511–518.
- Decarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, and Adam A (1996) Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* **271**:H1340–H1347.
- Duan QL, Nikpoor B, Dube MP, Molinaro G, Meijer IA, Dion P, Rochefort D, Saint-Onge J, Flury L, Brown NJ, et al. (2005) A variant in XPNPEP2 is associated with angioedema induced by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. *Am J Hum Genet* **77**:617–626.
- Hedner T, Samuelsson O, Lunde H, Lindholm L, Andren L, and Wiholm BE (1992) Angio-oedema in relation to treatment with angiotensin converting enzyme inhibitors. *BMJ* **304**:941–946.
- Hooper NM, Hryszko J, Oppong SY, and Turner AJ (1992) Inhibition by converting enzyme inhibitors of pig kidney aminopeptidase P. *Hypertension* **19**:281–285.
- King SJ and Oparil S (1992) Converting-enzyme inhibitors increase converting-enzyme mRNA and activity in endothelial cells. *Am J Physiol* **263**:C743–C749.
- Kinoshita A, Urata H, Bumpus FM, and Husain A (1993) Measurement of angiotensin I converting enzyme inhibition in the heart. *Circ Res* **73**:51–60.
- Kostis JB, Packer M, Black HR, Schmieder R, Henry D, and Levy E (2004) Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the omapatrilat cardiovascular treatment vs. enalapril (OCTAVE) trial. *Am J Hypertens* **17**:103–111.
- Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, and Zuraw BL (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* **57**:27–77.
- Marceau F, Larrivee JF, Bouthillier J, Bachvarova M, Houle S, and Bachvarov DR (1999) Effect of endogenous kinins, prostanoids and NO on kinin B1 and B2 receptor expression in the rabbit. *Am J Physiol* **277**:R1568–R1578.
- Marin-Castano ME, Schanstra JP, Neau E, Pradaude F, Pecher C, Ader JL, Girolami JP, and Bascands JL (2002) Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation* **105**:627–632.
- Mazenot C, Loufrani L, Henrion D, Ribout C, Muller-Esterl W, and Godin-Ribuot D (2001) Endothelial kinin B(1)-receptors are induced by myocardial ischaemia-reperfusion in the rabbit. *J Physiol (Lond)* **530**:69–78.
- Medeiros MA, Franca MS, Boileau G, Juliano L, and Carvalho KM (1997) Specific fluorogenic substrates for neprilysin (neutral endopeptidase, EC 3.4.24.11) which are highly resistant to serine- and metalloproteases. *Braz J Med Biol Res* **30**:1157–1162.
- Molinaro G, Carmona AK, Juliano MA, Juliano L, Malitskaya E, Yessine MA,

- Chagnon M, Lepage Y, Simmons WH, Boileau G, et al. (2005) Human recombinant membrane-bound aminopeptidase P: production of a soluble form and characterization using novel, internally quenched fluorescent substrates. *Biochem J* **385**: 389–397.
- Molinaro G, Cugno M, Perez M, Lepage Y, Gervais N, Agostoni A, and Adam A (2002) Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema is characterized by a slower degradation of des-arginine9-bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther* **303**:232–237.
- Naess F, Roese O, Pillgram-Larsen J, Ruud TE, Stadaas JO, and Aasen AO (1989) Plasma proteolysis and circulating cells in relation to varying endotoxin concentrations in porcine endotoxemia. *Circ Shock* **28**:89–100.
- Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, and Agostoni A (1998) Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* **351**:1693–1697.
- Packer M, Califf RM, Konstam MA, Krum H, McMurray JJ, Rouleau JL, and Swedberg K (2002) Comparison of omapatrilat and enalapril in patients with chronic heart failure: the omapatrilat versus enalapril randomized trial of utility in reducing events (overture). *Circulation* **106**:920–926.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**:e45.
- Raut R, Rouleau JL, Blais C Jr, Gosselin H, Molinaro G, Sirois MG, Lepage Y, Crine P, and Adam A (1999) Bradykinin metabolism in the postinfarcted rat heart: role of ACE and neutral endopeptidase 24.11. *Am J Physiol* **276**:H1769–H1779.
- Raymond P, Drapeau G, Raut R, Audet R, Marceau F, Ong H, and Adam A (1995) Quantification of des-Arg9-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. *J Immunol Methods* **180**:247–257.
- Rosenkranz B, Russmann S, Reichen J, Brunner-Ferber F, Bork K, and Knolle J (2004) Clinical proof-of-concept for the bradykinin B₂ antagonist: icatibant in liver cirrhosis and hereditary angioedema, in *Peptide Receptors Montreal 2004 Symposium*; 2004 Jul 31–Aug 4; abstract p 55; Montreal, Canada.
- Shionoiri H, Takasaki I, Hirawa N, Kihara M, Gotoh E, Sasaki T, Nakajima H, and Ishii M (1996) A case report of angioedema during long-term (66 months) angiotensin converting enzyme inhibition therapy with enalapril. *Jpn Circ J* **60**:166–170.
- Siebeck M, Spannagl E, Schorr M, Stumpf B, Fritz H, Whalley ET, and Cheronis JC (1996) Effect of combined B1 and B2 kinin receptor blockade in porcine endotoxin shock. *Immunopharmacology* **33**:81–84.
- Takeuchi M, Nagura H, and Kaneda T (1988) DDAVP and epinephrine-induced changes in the localization of von Willebrand factor antigen in endothelial cells of human oral mucosa. *Blood* **72**:850–854.
- Warren EJ, Finck BN, Arkins S, Kelley KW, Seamura RW, Murtaugh MP, and Johnson RW (1997) Coincidental changes in behavior and plasma cortisol in unrestrained pigs after intracerebroventricular injection of tumor necrosis factor- α . *Endocrinology* **138**:2365–2371.
- Wood SM, Mann RD, and Rawlins MD (1987) Angio-oedema and urticaria associated with angiotensin converting enzyme inhibitors. *BMJ* **294**:91–92.

Address correspondence to: Dr. Albert Adam, Université de Montréal, Faculté de Pharmacie, Room 3190, 2900 Blvd. Édouard-Montpetit, C.P. 6128, succ Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada. [REDACTED]

CHAPITRE III

ROLE OF NUCLEAR FACTOR- κ B AND PROTEIN KINASE C

SIGNALING IN THE EXPRESSION OF THE KININ B1

RECEPTOR IN HUMAN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS

Role of Nuclear Factor-kB and Protein Kinase C Signaling in the Expression of the Kinin B1 Receptor in Human Vascular Smooth Muscle Cells

Moreau ME, Bawolak M-T, Morissette G, Adam A, Marceau F

Mol Pharmacol 2007, 71: 949-956

La des-Arg⁹-BK est inactive dans des conditions normales mais provoque une réponse inflammatoire typique lorsque ce métabolite de la BK se lie à son récepteur B₁, récepteur dont la synthèse est induite seulement lors d'une réponse inflammatoire systémique ou locale. Différents facteurs sont susceptibles d'induire la synthèse du récepteur B₁ et faisant suite à l'article précédent où nous avons montré qu'un traitement par un iECA provoque une augmentation de l'expression génique du récepteur B₁ chez l'animal, nous avons procédé à la caractérisation de l'expression du récepteur B₁ au niveau des cellules du muscle lisse de l'artère ombilicale humaine afin d'étudier l'importance et la spécificité des voies de signalisation proposées qui régulent ce récepteur inductible couplé à la protéine G. Cet article, en co-auteur principal avec Marie-Thérèse Bawolak, explore donc les mécanismes précis impliqués dans le processus fonctionnel de régulation positive de l'expression du récepteur B₁.

En tant que premier auteur, mon apport à l'article comprend la participation à la réalisation des travaux de recherche, l'analyse des résultats et la rédaction, en partie, de l'article.

** Reprinted with permission of the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. All rights reserved.*

Role of Nuclear Factor- κ B and Protein Kinase C Signaling in the Expression of the Kinin B₁ Receptor in Human Vascular Smooth Muscle Cells

Marie Eve Moreau, Marie-Thérèse Bawolak, Guillaume Morissette, Albert Adam, and François Marceau

Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada (M.E.M., A.A.); and Centre de Recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Ville de Québec, Québec, Canada (M.-T.B., G.M., F.M.).

Received September 7, 2006; accepted December 18, 2006

ABSTRACT

Kinin B₁ receptor expression was characterized in human umbilical artery smooth muscle cells to further elucidate the function and specificity of three previously proposed pathways [nuclear factor- κ B (NF- κ B), protein kinase C, and agonist autoregulation] that regulate this inducible G protein-coupled receptor. Radioligand binding assays, real-time reverse transcription/polymerase chain reaction with an optional actinomycin D treatment period, and NF- κ B immunofluorescence were primarily employed in these primary cell cultures. Various stimulatory compounds that increase receptor mRNA stability only (human and bovine sera, cycloheximide) or that stimulate NF- κ B nuclear translocation and both mRNA concentration and stability [interleukin (IL)-1 β , phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)] all increased the density of binding sites for the tritiated B₁ receptor agonist [³H]Lys-des-Arg⁹-bradykinin

(without change in receptor affinity) in cell-based assays. Small interfering RNA assays indicated that NF- κ B p65 is necessary for the effective expression of the cell surface B₁ receptor under basal or IL-1 β , fetal bovine serum (FBS), or PMA stimulation conditions. Dexamethasone cotreatment reproduced these effects. IL-1 β -, FBS-, or PMA-induced stabilization of B₁ receptor mRNA was inhibited by the addition of the protein kinase C inhibitor 3-[1-[3-(dimethylamino)propyl]-1*H*-indol-3-yl]-4-(1*H*-indol-3-yl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione monohydrochloride (GF-109203x), which also diminished the B_{max} under FBS or PMA treatment. Lys-des-Arg⁹-bradykinin had little effect on NF- κ B activation, the B_{max}, or receptor mRNA abundance or stability. Both NF- κ B and protein kinase C signaling are required for the effective expression of the kinin B₁ receptor in human umbilical artery smooth muscle cells.

Kinins (bradykinin-related peptides) are regulatory plasma-derived peptides that affect smooth muscle tone, microvascular permeability, and pain responses. Kinins bind to the G protein-coupled receptors B₁ and B₂. The B₂ receptor is preformed in endothelial and other cell types, and the B₁ type has been shown to be inducible in some tissue injury models (Leeb-Lundberg et al., 2005; Moreau et al., 2005b). The human B₁ receptor exhibits a particular pharmacological profile, with preference for both kallidin (Lys-bradykinin)-de-

rived ligands and kinin metabolites without the C-terminal Arg residue; thus, lysyl-des-arginine⁹-bradykinin (Lys-des-Arg⁹-BK) is the optimal natural agonist of this receptor (Leeb-Lundberg et al., 2005).

Interleukin (IL)-1 and other cytokines and transcription factors, such as nuclear factor (NF)- κ B are involved in the transcriptional regulation of the B₁ receptor (Schanstra et al., 1998; Medeiros et al., 2004; Leeb-Lundberg et al., 2005), and a role for tyrosine and MAP kinases in B₁ receptor expression has been proposed (Larrivée et al., 1998; Phagoo et al., 2001). Stabilization of B₁ receptor mRNA is involved with its up-regulation in IMR-90 cells, notably after IL-1 treatment or protein synthesis inhibition (Zhou et al., 1998).

Autoregulation of B₁ receptor expression is defined as kinin-induced B₁ receptor up-regulation (Phagoo et al., 1999). Although B₁ receptor autoregulation in human embryonic

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research operating grant MOP-14077 (to F.M. and A.A.) and a Canada Graduate Scholarships Doctoral Award (to G.M.).

M.E.M. and M.-T.B. contributed equally to this work.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://molpharm.aspetjournals.org>.

doi:10.1124/mol.106.030684.

ABBREVIATIONS: BK, bradykinin; siRNA, small interfering RNA; IL, interleukin; NF- κ B, nuclear factor- κ B; HUA, human umbilical artery; SMC, smooth muscle cell; FBS, fetal bovine serum; PCR, polymerase chain reaction; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; DMSO, dimethyl sulfoxide; GF109203x, 3-[1-[3-(dimethylamino)propyl]-1*H*-indol-3-yl]-4-(1*H*-indol-3-yl)-1*H*-pyrrole-2,5-dione monohydrochloride; CHX, cycloheximide.

fibroblasts IMR-90 has been reported (Schanstra et al., 1998; Phagoo et al., 1999, 2001), this may not be the typical scenario, given that receptor expression in this cell line is dependent on G protein-coupled receptor-mediated secretion of IL-1 β [including CXCR2 (Bastian et al., 1998)]. Autoregulation was not seen in rabbit smooth muscle cells (SMCs) stimulated with either B₁ or B₂ receptor agonists or live rabbits treated with dextran sulfate to activate the contact system [with ensuing massive production of kinins and depletion of kininogen (Sabourin et al., 2001)].

De novo synthesis of B₁ receptors causes isolated blood vessels, such as rabbit aorta, human umbilical vein, and rat portal vein, to contract in presence of kinins (Bouthillier et al., 1987; Gobeil et al., 1996; Sabourin et al., 2002b; Medeiros et al., 2004). In freshly isolated human umbilical arteries (HUA), stimulation of vascular smooth muscle B₁ receptors mediates contraction (Pelorosso et al., 2005). In cultured SMCs, B₁ receptor inhibits mitosis and migration (Agata et al., 2000; Dixon et al., 2002). HUA SMC responses to B₁ receptor agonist stimulation include phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Fortin et al., 2003b) and inhibition of cell migration in a wound closure assay (Morissette et al., 2006). The extent of migration inhibition mediated by the B₁ receptors in human SMCs correlated with the B_{max} of the receptor population (the B_{max} was varied by introducing or omitting IL-1 β in the FBS-containing medium; Morissette et al., 2006). Accordingly, a reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) technique used previously suggested that the baseline B₁ receptor mRNA expression was up-regulated by IL-1 treatment in the HUA SMCs (Angers et al., 2000).

The present work aimed to verify and characterize several putative pathways implicated in the regulation of B₁ receptor levels in human SMCs. We compared the effects of IL-1, human and bovine serum, and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) on NF- κ B stimulation, B₁ receptor mRNA concentration and stability and the abundance and affinity of cell surface receptor expression. The results functionally illustrate the diversity of the B₁ receptor regulation mechanisms in a valuable primary culture system of human origin.

Materials and Methods

Cells. The institutional research ethics board approved the anonymous use of human umbilical cord segments obtained after normal deliveries. All culture surfaces were coated with gelatin. Primary cultures of SMCs were obtained from explants (1–2-mm cubes) of de-endothelialized HUAs maintained in medium 199 supplemented with antibiotics and 20% FBS [cell culture media and reagents from Invitrogen (Burlington, ON, Canada) and FBS from BioMedia Canada (Drummondville, QC, Canada)]. Cells sprouting from the explants invaded the culture surface in approximately 3 weeks and were passaged at confluence with a brief trypsin-EDTA treatment and used between passages 3 and 6. SMCs were identified by their narrow, pointed morphology as seen in phase-contrast microscopy and α -actin expression as seen in immunofluorescence (1A4 monoclonal antibody; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Drugs. Lys-des-Arg⁹-BK (des-Arg¹⁰-kallidin) was purchased from Bachem Bioscience Inc. (King of Prussia, PA), IL-1 β from R&D Systems (Minneapolis, MN), and the remaining drugs from Sigma-Aldrich. DMSO was used as the primary solvent for dexamethasone, GF109203x, and PMA, and the final solvent concentration never exceeded 0.1%. In experiments using these drugs, the control cells were treated with DMSO vehicle in parallel.

B₁ Receptor Expression in Human Umbilical Artery SMCs.

To evaluate the effect of several cell treatments on B₁ receptor expression, intact HUA SMCs were incubated with [³H]Lys-des-Arg⁹-BK ([³H]des-Arg¹⁰-kallidin; 64 Ci/mmol; PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA) in 12-well plates according to published methods (Sabourin et al., 2002b). Each well (3.8 cm²) contained an average of $224 \pm 16 \times 10^3$ SMCs ($n = 20$, estimated from four primary cell lines) or $11.5 \pm 0.8 \mu\text{g}$ ($n = 6$) of membrane proteins, prepared as described previously (Houle et al., 2000). At near confluence, the FBS-containing medium was replaced by serum-free medium 199 for 48 h to reduce the basal B₁ receptor expression level, after which various stimulant or inhibitory drugs were added for 4 h (this included the restoration of the serum for some experimental groups). Finally, the wells were washed twice with the binding medium [medium 199 supplemented with 0.1% bovine serum albumin, 3 μM amastatin, 1 μM captopril, 1 μM phosphoramidon, and 0.02% (w/v) sodium azide] and filled with 1.0 ml of prewarmed (37°C) binding medium. The B₁ receptor ligand (0.125–4 nM) and unlabeled competing peptide (1 μM Lys-des-Arg⁹-BK for the determination of nonspecific binding) were added to the wells. After 60 min of incubation at 37°C, each well was washed three times with 2 ml of ice-cold phosphate-buffered saline, pH 7.4, then 1 ml of 0.1 N NaOH was added to dissolve the cells. Radioactivity in the resulting suspension was determined by liquid scintillation counting (5–10 min per vial). Ancillary binding experiments aimed at studying the effect of temperature on both the association and dissociation reactions for the agonist radioligand in relation to the wild-type human B₁ receptors; very slow association and dissociation have been shown at 0°C with rabbit wild-type or recombinant receptors in intact cells (Levesque et al., 1995; Sabourin et al., 2002a).

Assays for the Nuclear Quantification of NF- κ B. The translocation of NF- κ B p65 subunit from the cytosol to the nucleus was studied in serum-starved (48 h) HUA SMCs using immunofluorescence as described previously (Sabourin et al., 2002b), except that incubation times with stimulants or drug combinations were limited to 1 h. The p65 staining intensity for each manually outlined nucleus in the photographic record was quantified as the median pixel intensity (0–255 scale; Photoshop v. 6; Adobe Systems, Mountain View, CA). These numerical values were averaged in each microscopic field, and results from several fields were compared using nonparametric statistical tests.

RT and Real-Time PCR. Total RNA was extracted from treated cells according to the method of Chomczynski and Sacchi (1987), then 1 μg of total RNA was transcribed into cDNA using 10 U of Transcriptase reverse transcriptase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and 5 μM oligo(dT)₁₆ primer. The RNA was quantified by real-time PCR using the LightCycler 2.0 apparatus (Roche Diagnostics). Two microliters of cDNA were brought to a final volume of 20 μl containing 2 mM MgCl₂, 2 μl of LightCycler-FastStart DNA SYBRgreen I Mix (Roche Diagnostics), and 0.7 μM primers (Table 1) in water. DNA polymerase was activated at 95°C for 10 min. The amplification conditions were as follows: 47 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 s, annealing for 5 s at 60°C (62°C for GAPDH and B₁ receptor), respectively, and extension at 72°C. The extension times were calculated from the amplicon size (base pairs/25). Fluorescence was measured at the end of each extension phase. After amplification, a melting curve analysis from 65 to 98°C with a heating rate of 0.1°C/s with a continuous fluorescence acquisition was made. A mathematical model was used to calculate level of the target gene relative to the reference gene.

Silencing of p65 (Rel A). Lipofectamine-facilitated transfection of siRNAs has previously been applied to cultured human SMCs (Gravel and Servant, 2005). siRNA reagents were purchased from Upstate/Dharmacon RNA Technologies (Lake Placid, NY/Lafayette, CO) and used as directed. In brief, the "Smart Pool" mixture of four siRNA duplexes with selectivity for human NF- κ B p65 (Rel A) was used, as well as a nonspecific control pool (nontargeting negative

control). Immunoblotting to control protein expression was done using 6-cm SMC Petri dishes and radioligand binding experiments in 12-well plates; 400 pmol of siRNA pools were added to Petri dishes, and the adherent SMCs were grown to 70% confluence [siRNA pre-mixed with 10 or 15 μ l of Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in 1 ml of Opti-MEM, incubated 20 min at room temperature and added to 4 ml of serum- and antibiotic-free medium 199 in each dish]. After 24-h incubation at 37°C in humid air containing 5% CO₂, the medium was removed from the dish and replaced with regular culture medium (medium 199 with 20% FBS and antibiotics). The cells were extracted at 96 h for immunoblots of p65 [based on the same monoclonal antibody as immunofluorescence; dilution 1:250 (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY); general procedures as in Houle et al. (2000)]. Cells used for binding experiments were transfected in a similar manner (reagent quantities used proportionally to the cell culture surface in 12-well plates), but starved in FBS in the 48- to 96-h interval after transfection. At that time point, 4-h treatments with stimuli were performed before the binding assay was applied, as described above.

Statistical Analysis. The Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney test were done using the InStat 3.05 computer program (GraphPad Software, San Diego, CA). The parameters of Scat-

chard plots (binding data treatment) were obtained using a computer program (Tallarida and Murray, 1987).

Results

Effects of Stimulants on Surface B₁ Receptor Expression. HUA SMCs maintained for 48 h in the absence of FBS showed low levels of saturable binding sites for the B₁ receptor ligand [³H]Lys-des-Arg⁹-BK (0.125–4 nM; Fig. 1A). The Scatchard regression analysis of the binding data (Fig. 1B) was compatible with a single class of sites with a K_D of 0.15 nM [95% confidence limits (CL), 0.09 to 0.40 nM] and a B_{max} of 1.69 ± 0.11 fmol/well. As in the rabbit SMCs (Galizzi et al., 1994; Sabourin et al., 2002b), IL-1 β treatment (4 h) considerably increased the B_{max} (4.4-fold; 7.46 ± 0.36 fmol/well) in human SMCs without significant affinity change (K_D, 0.27 nM; 95% CL, 0.20 to 0.42). Separate tests showed that the IL-1 β concentration in the range 2 to 10 ng/ml produced a similar effect, and that 5 ng/ml is maximal (data not shown). Serum restoration (to 20%, either human or FBS) or temporary protein synthesis blockade with cyclohex-

TABLE 1

Oligonucleotides for real-time PCR

Sequences derived from GenBank accession numbers NM_002046 (GAPDH) and NM_000710 (B₁ receptor). F and R indicate forward and reverse primers, respectively; numbers indicate the sequence position. Final concentration refers to forward and reverse primers.

mRNA Targets	Nucleotide Sequences (5' → 3')	Product Size	
		bp	μ M
GAPDH-GAPDH gene			
F479	TGAACCATGAGAAGTATGACAACA	156	0.7
R634	TCTTCTGGGTGGCAGTG		
B ₁ receptor-BDKRB1 gene			
F731	CTGCGATCCATCCAAGC	158	0.7
R888	GCCAGGATGTGGTAGTTGA		

bp, base pair(s).

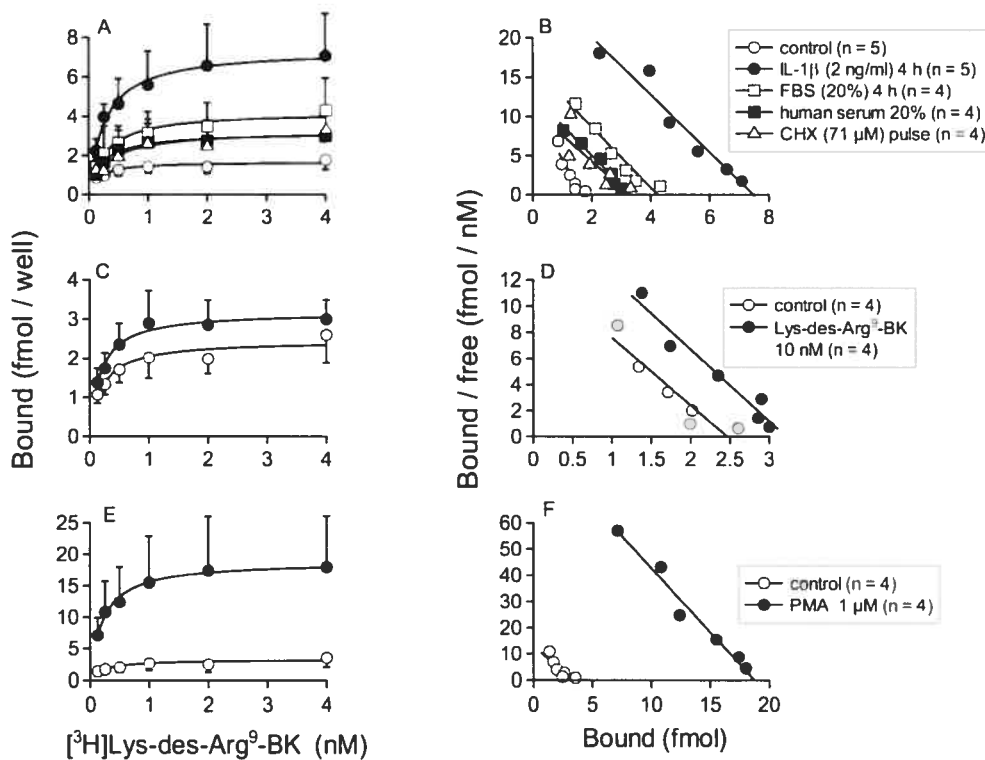


Fig. 1. Specific binding of [³H]Lys-des-Arg⁹-BK to serum-starved human umbilical artery SMCs further treated for 4 h with the indicated stimuli before the binding assays. Curves were fitted to the equation $B_{max} \times X/(X + K_D)$ using a least-squares method (software KyPlot 2.15 for Windows; Yoshioka, 2002). Values are means \pm S.E.M. of the indicated number of determinations (*n*), each composed of duplicate observations. Scatchard plots (graphs on right) were derived from averaged values of the saturation curves (left). See text for further description.

imide also stimulated B_1 receptor expression in human SMCs [B_{max} of 3.28 ± 0.12 , 4.20 ± 0.21 , and 3.28 ± 0.48 fmol/well; K_D values of 0.25 (CL, 0.20–0.35), 0.26 (CL, 0.19–0.40), and 0.28 (CL, 0.14–25.8) nM, respectively; Fig. 1]. In subsequent experiments based on many different primary cell lines, the relative increase of B_{max} varied from one stimulus to the other, but the stimulants had consistent effects.

Serum-starved cells were incubated for 4 h in the presence of the agonist Lys-des-Arg⁹-BK (10 nM, a saturating concentration) to determine whether presence of the agonist would determine an increased B_1 receptor level, thus testing for autoregulation of the receptor. It was assumed that the added agonist used during preincubation would be progressively degraded by the cells and thus would not interfere with the binding assay (based on the tritiated form of the agonist). This assumption was based on reports of the high level of activity of at least one inactivating kininase, aminopeptidase N, seen in these cells (Pelorosso et al., 2005; Gera et al., 2006). A 1.3-fold stimulation of the baseline levels of binding sites was observed in agonist-pretreated cells (Fig. 1, C and D). Measured K_D values indeed showed no unlabeled agonist leftover from the stimulation period (0.19 nM in controls, 0.18 nM in agonist-pretreated cells).

The phorbol ester PMA increased the B_{max} of the B_1 receptor in the human cell line IMR-90 (Zhou et al., 1998), although the mechanism of this effect remains unknown. In primary SMC cultures, this effect was remarkable for 1 μ M

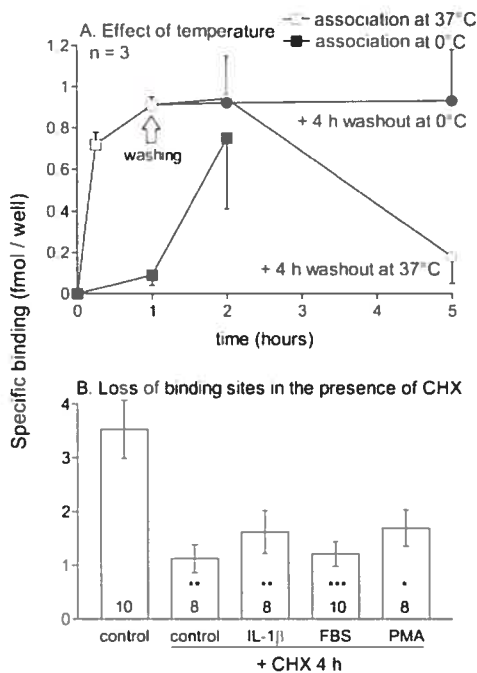


Fig. 2. Ancillary radioligand binding experiments involving serum-starved smooth muscle cells. **A**, association kinetics of 1 nM [³H]Lys-des-Arg⁹-BK to cells at 0 or 37°C. The association reaction at 37°C was followed by washing at time 60 min and further incubation for 4 h at either 0 or 37°C. Values are means \pm S.E.M. of three separate experiments composed of duplicate determinations. **B**, before the regular binding assay (1 nM agonist radioligand, 37°C), other cells were incubated with CHX (71 μ M) with or without a B_{max} stimulant [IL-1 β , 5 ng/ml; FBS 20% (v/v); PMA, 1 μ M]. Values are means \pm S.E.M. of the indicated number of determinations drawn from four separate experiments. The nonparametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test) indicated that values were statistically heterogeneous ($P < 0.01$). The Mann-Whitney test was applied to assess the effect of treatments relative to the controls (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

PMA (4 h), with a 5.7-fold increase in B_{max} relative to that of serum-starved cells (Fig. 1, E and F). Again, the apparent affinities of the sites remained constant and compatible with those from previous experiments (0.23 and 0.21 nM in control and PMA-treated cells, respectively).

The results of ancillary radioligand binding experiments are presented in Fig. 2. The kinetics of [³H]Lys-des-Arg⁹-BK (1 nM) association at 0 or 37°C to serum-starved wells containing SMCs expressing the baseline B_1 receptor population is presented in Fig. 2A. The radioligand binding was rapid (complete after 60 min) at 37°C, but was slow at 0°C (incomplete after 2 h), which was similar to binding to rabbit wild-type or recombinant B_1 receptors expressed by adherent and intact cells (Levesque et al., 1995; Sabourin et al., 2002a). After ligand association at 37°C, some wells were washed three times with phosphate-buffered saline at 60 min and further incubated in the azide-free binding medium for 4 h at 37 or 0°C. Most of the specifically bound radioligand was released at 37°C during the washout period, but the cells retained practically all the radioligand if the cells were incubated at 0°C (Fig. 2A). Other serum-starved SMCs were incubated at 37°C for 4 h with cycloheximide (71 μ M), optionally combined with IL-1 β , FBS, or PMA before the binding assay (1 nM radioligand; Fig. 2B). Blocking protein synthesis was associated with a 67% loss of surface binding that was not recovered by adding stimulants. These observations support the concept that the agonist-independent rapid clearance of surface B_1 receptors previously proposed for rabbit natural or recombinant B_1 receptors (Fortin et al., 2003a) applies to the human system and that B_{max} stimulation by IL-1 β , FBS, or PMA acts on receptor synthesis but does not affect the receptor half-life.

NF- κ B Translocation in Response to Stimulation. HUA SMCs were distinguished by their morphology and presence of α -actin (Fig. 3, top). In most serum-starved SMCs, p65 resided in the cytosol and not the nucleus (Fig. 3). IL-1 β treatment (1 h) resulted in p65 translocation to the nuclei in most cells (Fig. 3, numerical analysis of digitized images in Fig. 4A). Neither serum restoration (to 20% with

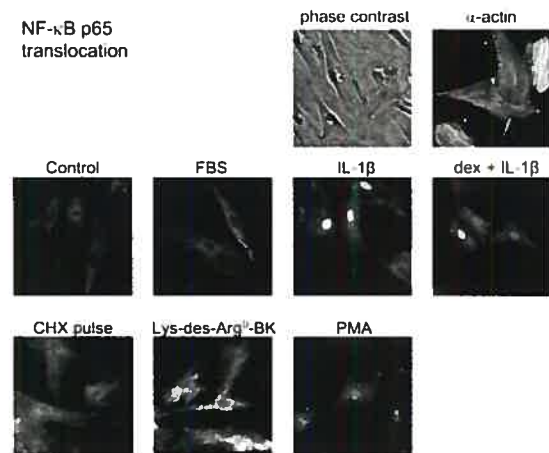


Fig. 3. Effect of drugs or drug combinations (1 h) on the subcellular localization of NF- κ B subunits in serum-starved SMCs: sample photographic record of the immunofluorescence of p65 (original magnification, 400 \times). The morphology of the cells and their expression of α -actin are also shown (top). Agent concentrations: IL-1 β , 5 ng/ml; FBS, 20% (v/v); Lys-des-Arg⁹-BK, 100 nM; CHX, 71 μ M; PMA, 1 μ M; dexamethasone (dex), 100 nM.

human serum or FBS for 1 h) nor presence of Lys-des-Arg⁹-BK (100 nM) or cycloheximide (71 μM) significantly induced p65 nuclear translocation (Figs. 3 and 4A). Dexamethasone cotreatment significantly but only partially re-

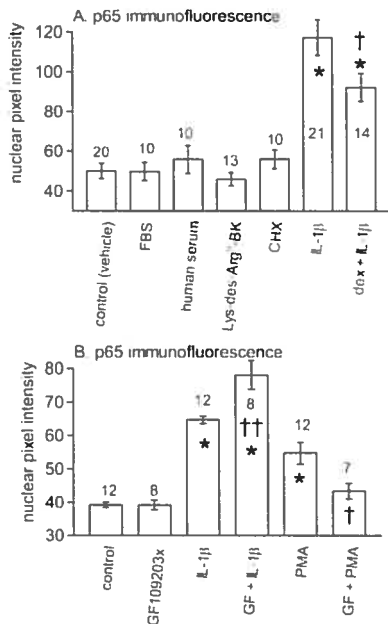


Fig. 4. NF-κB regulation of B₁ receptor expression in human SMCs. A, image analysis (see *Materials and Methods*) was used to assess the relative abundance of p65 in the nucleus of SMCs. Photographic record from 4 different days of experiments based on four different cell lines were exploited. Values are mean ± S.E.M. of the averaged median pixel intensity for nuclei from the indicated number of microscopic fields. The nonparametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test) indicated that values were statistically heterogeneous ($P < 0.001$). The Mann-Whitney test was applied to assess the effect of treatments relatively to the controls (**, $P < 0.001$) or the effect of the concomitant treatment added to IL-1β relative to IL-1β alone (†, $P < 0.05$; ††, $P < 0.01$). B, relative abundance of p65 in the nucleus of SMCs based on the photographic techniques (as in A) for treatments related to protein kinase C (PMA, 1 μM; GF109203x, 5 μM; IL-1β, 5 ng/ml). Statistics as in A (*, $P < 0.001$ relative to control; †, $P < 0.05$; ††, $P < 0.01$ relative to same stimulus).

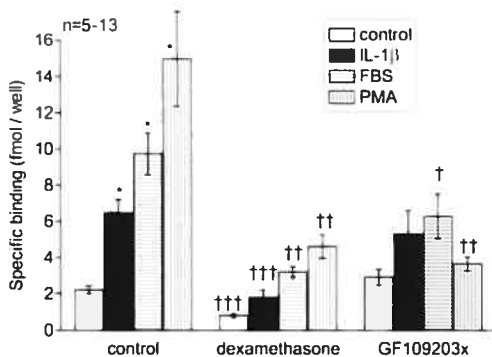


Fig. 5. Effect of inhibitory drugs on the stimulated cell surface B₁ receptor density in SMCs estimated using the specific binding of [³H]Lys-des-Arg⁹-BK (1 nM). HUA SMC lines were initially serum-starved then treated for a further 4-h period with the indicated drugs and stimuli before the binding assays (concentrations as in Fig. 4; control wells contained the DMSO vehicle of dexamethasone or GF 109230x). Values are the means ± S.E.M. of 5 to 13 determinations, each composed of duplicate observations in different cell lines. The Mann-Whitney test was applied to assess the effect of stimuli relatively to the control group in cells exposed to the drug vehicle (*, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$) or the effect of the inhibitory drug relative to the control group subjected to the same stimulation (†, $P < 0.05$; ††, $P < 0.01$; †††, $P < 0.001$).

duced the effect of IL-1β on p65 translocation (Figs. 3 and 4A). The DMSO vehicle of dexamethasone had no effect (data not shown). An enzyme-linked immunosorbent assay to detect the p50 subunit of NF-κB in nuclear extracts confirmed that IL-1β was the only significant activator and that FBS, human serum, cycloheximide (CHX), or the B₁ receptor agonist were not active in this assay (data not shown; Mercury Transfactor NF-κB p50 kit; Clontech, Mountain View, CA). Figure 4B presents the effects of treatments related to protein kinase C (PKC) in the photographic p65 translocation assay. PMA (1 μM, 1 h) was a significant stimulant of this translocation, but was less active than IL-1β. The effect of PMA on p65 nuclear translocation was significantly inhibited by GF109203x, a broad PKC inhibitor that also significantly potentiated the effect of IL-1β (Fig. 4B).

Effect of Drugs and p65 Silencing on the Cell Surface Density of B₁ Receptors. A saturating concentration of the agonist radioligand (1 nM) has been used to assess the effect of dexamethasone and of GF109203x on the cell surface B₁ receptor density; some of the cells were cotreated with IL-1β, FBS, or PMA (Fig. 5). Dexamethasone significantly diminished the baseline receptor expression in 4 h, under both basal and stimulated conditions. The inhibitory effect of GF109203x reached significance only in cells costimulated with FBS or PMA.

Four days of transfection with relevant siRNAs silenced p65 expression [immunoblot in total SMC extract (Fig. 6, top); two siRNA-lipofectamine ratios were tested and the second applied in the following experiments], but the nontargeting siRNA had no effect on p65 levels. NF-κB silencing reduced the abundance of cell surface binding sites for [³H]Lys-des-Arg⁹-BK under basal conditions and inhibited the stimulatory effect of IL-1β, FBS, and PMA (stimulation

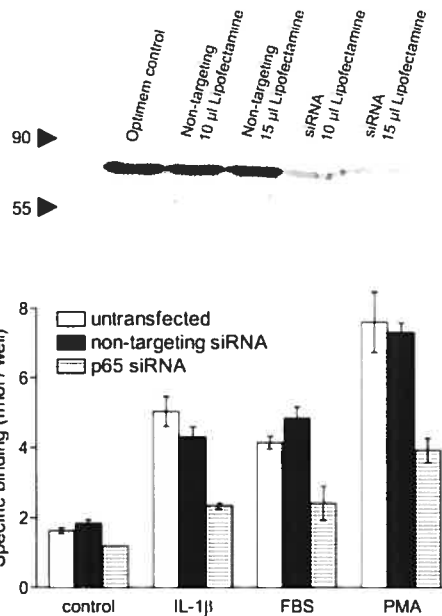


Fig. 6. Silencing of NF-κB p65 in human SMCs. Top, immunoblot of p65 in the total cell extract performed 4 days after siRNA transfection. Two siRNA/lipofectamine ratios were tested, and the second one was applied in the subsequent experiments. Bottom, effect of p65 silencing (4 days after transfection) on the cell surface expression of B₁ receptors (radioligand binding assay as in Fig. 5) as modified by stimulants (applied for the last 4 h of culture, concentration as in Fig. 4). Values are the means ± S.E.M. of two experiments composed of duplicate determinations.

during the last 4 h in serum-starved cells; Fig. 6, bottom). Pretreatment with the nontargeting siRNA did not affect B_1 receptor expression.

RT-PCR Analysis of Kinin B_1 Receptor mRNA in Cultured Human SMCs. Control B_1 receptor mRNA concentration in SMCs was measured in confluent, FBS-starved cells (48 h) and expressed in a ratio with the concentration of GAPDH mRNA (a stable molecule, Fig. 7). Of the stimulants tested, only IL-1 β and PMA increased the cellular concentration of B_1 receptor mRNA. An additional 3-h incubation with the transcription inhibitor actinomycin D sharply reduced the B_1 receptor/GAPDH mRNA ratio in control cells, which indicated that the B_1 receptor mRNA was short-lived. CHX, FBS, or human serum mainly affected mRNA inactivation, in that actinomycin D treatment did not reduce the mRNA concentration in these cells (Fig. 7). This effect was also seen with IL-1 β and PMA, with a nonsignificant concentration decrease with actinomycin D treatment. The B_1 receptor agonist Lys-des-Arg⁹-BK had no significant effect on B_1 receptor mRNA concentration (with or without actinomycin D); compound 11 (100 nM, data not shown), a high affinity non-peptide antagonist of the B_1 receptor (Morissette et al., 2004), had no effect as well.

Inhibitory drugs were combined with stimulants of B_1 receptor expression in SMCs to isolate effects on the acute rise of mRNA concentration or on the stability of the RNA (Fig. 8). Treatments with IL-1 β or PMA acutely increased the B_1 receptor mRNA in control cells; the effect of FBS did not reach significance, but, as observed previously, all 3 stimulants prevented the drop of mRNA concentration caused by actinomycin D treatment. Dexamethasone did not significantly influence the acute effect of any of the three stimulants but did significantly reduce the effect of IL-1 β and PMA

seen after actinomycin D treatment (Fig. 8); the combined inhibition did not reach statistical significance for FBS. GF109203x cotreatment inhibited the acute stimulatory effect of IL-1 β and PMA and all three conditions of stimulation in the presence of actinomycin D. These results indicated the possibility of a special role for PKC in B_1 receptor mRNA stabilization.

Discussion

Despite inherent genetic and environmental variability, we elected to use primary cultures of human SMCs to characterize the kinin B_1 receptor expression and identify physiological mechanisms that may not be intact in transformed or permanent cell lines. The culture procedures themselves, particularly the serum supplements (which are often not controlled), have important effects on the results. The regulation of B_1 receptor expression in the present cellular system has several distinct features relative to other documented systems. The B_1 receptor population in the present cellular model and the rabbit aortic SMCs was up-regulated in response to cycloheximide pulse or FBS treatment but in an NF- κ B-dependent manner only in rabbit cells (Sabourin et al., 2002b). Kinin-induced B_1 receptor up-regulation was observed mainly in IMR-90 cells (see Introduction), and Lys-des-Arg⁹-BK had a synergistic effect with IL-1 β in that system (Phagoo et al., 2001); however, this regulatory pathway was not detected in primary cultures of human or rabbit SMCs (Sabourin et al., 2001; Marceau et al., 2002; present results). PKC regulation of B_1 receptor expression was first identified in IMR-90 cells (Zhou et al., 1998), and IL-1-induced enrichment of B_1 receptor mRNA underlies the ratio-

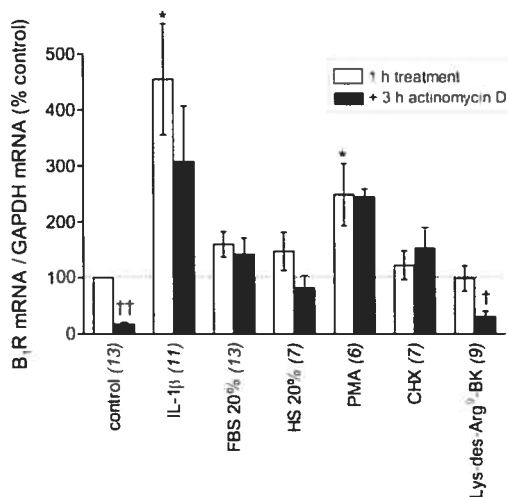


Fig. 7. Effect of actinomycin D (2 μ M, 3 h) on the B_1 receptor mRNA/GAPDH mRNA ratio determined by real-time RT-PCR in HUA SMCs prestimulated with IL-1 β (5 ng/ml, 1 h), FBS or human serum (HS) (20%, 1 h), PMA (1 μ M, 1 h), CHX (71 μ M, 1 h), or Lys-des-Arg⁹-BK (100 nM, 1 h). Results are the means of the number of determinations indicated between parentheses and derived from different cell lines. Kruskal-Wallis test showed that the groups were not statistically homogeneous ($P < 0.001$). The effect of each 1-h treatment was further compared with the control group using Mann-Whitney test (*, $P < 0.001$). The 1-h treatments were also compared with the effect of the same treatment with the addition of actinomycin D (solid bar next to each open bar; Mann-Whitney; †, $P < 0.01$; ††, $P < 0.001$). Results are normalized within each cell line and day of experiment (100% = control mRNA ratio at 1 h).

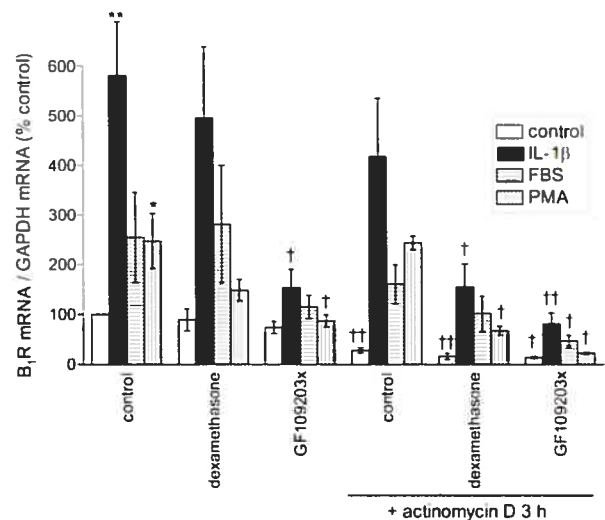


Fig. 8. Effect of inhibitory drugs on B_1 receptor mRNA regulated by IL-1 β (5 ng/ml), FBS (20%), or PMA (1 μ M) in SMCs. B_1 receptor mRNA was measured after 1 h of treatment and an optional 3-h period of treatment with actinomycin. Presentation as in Fig. 7 ($n = 6-11$). Kruskal-Wallis test showed that the groups were not statistically homogeneous ($P < 0.001$). In control cells treated with vehicle of inhibitory drugs, the effect of the stimulants was compared with the control group using the Mann-Whitney test (*, $P < 0.001$; **, $P < 0.0001$). The effect of inhibitory drugs added to stimulants (dexamethasone, 100 nM; GF109203, 5 μ M; actinomycin D, 2 μ M alone or combined) was also compared with the effect of the same stimulant without drug (leftmost set of histograms; Mann-Whitney; †, $P < 0.01$; ††, $P < 0.001$). Results are normalized within each cell line and day of experiment (100% = control mRNA ratio at 1 h).

nale of expression cloning of this gene in these cells (Menke et al., 1994).

The radioligand binding experiments reveal that the B₁ receptor population is tightly regulated in HUA SMCs; only the cell surface abundance (B_{max}) is variable, not affinity (K_D) (Fig. 1), an observation that has been reported in other cell-based systems (Galizzi et al., 1994; Bastian et al., 1998; Sabourin et al., 2002b). However, the baseline population of B₁ receptors in the human SMCs was functional and supported the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (data not shown) and specific effects on cell motility (Morissette et al., 2006). Evidence based on the wild-type rabbit B₁ receptors or its recombinant conjugate suggested that, like other inflammatory signaling molecules, the cell surface protein is short-lived (Fortin et al., 2003a); the same is true for the natural human receptor given that cycloheximide treatment diminished the radioligand B_{max} (Fig. 2B). IL-1, human serum, FBS, cycloheximide pulse, and PMA all altered the receptor B_{max} by increasing synthesis of the B₁ receptor during the standardized 4-h incubation period, based on specific effects on the corresponding mRNA and the absence of stimulation in the presence of cycloheximide.

The present siRNA results support for the first time the oft-proposed role of NF- κ B signaling in B₁ receptor expression (see Introduction and Fig. 6). The p65 subunit, a component of the classic NF- κ B heterodimer, is necessary for full stimulation of B₁ receptor B_{max} by IL-1, FBS, and PMA, and it is noteworthy that treatment with the siRNA somewhat decreased the baseline expression in control cells. The results of this approach support the idea that B₁ receptor expression is dependent on NF- κ B, although the effects of the individual stimulants on NF- κ B activation varied widely under the tested conditions. Whereas human serum, FBS, and cycloheximide did not activate NF- κ B nuclear translocation (Figs. 3 and 4), IL-1 β and PMA showed strong and intermediate tendencies, respectively, to induce p65 nuclear translocation. As expected, the effect of PMA on NF- κ B nuclear translocation was mediated by a protein kinase C (shown by inhibition by GF109203x), although unexplained interference of this drug with IL-1 β signaling increased the p65 translocation (Fig. 4). Therefore, certain stimulants could rely on the basal level of NF- κ B activation in the cell-based model (SMCs subjected to 48-h FBS starvation) to increase the effective expression of a basal B₁ receptor gene transcription rate.

The real-time PCR measurement of the B₁ receptor-coding mRNA provided insight into possible NF- κ B-independent stimulatory mechanisms. Although the capacity to stimulate NF- κ B predicted the acute (1 h) effect of the stimuli of the mRNA cellular concentration (significant only for IL-1 β and PMA; Fig. 7), an additional actinomycin D treatment period identified a second class of stimulants selectively stabilizing the mRNA concentration (the human and bovine sera and cycloheximide). However, PMA and IL-1 β also completely stabilized the mRNA, as previously noted for the cytokine in another system (Zhou et al., 1998). PMA activates protein kinase C; thus, its effect on receptor mRNA stabilization was completely inhibited by the kinase inhibitor GF109203x (Fig. 8). This mediation has been generalized to the more physiological stimuli of stabilization (IL-1 β , FBS) using the same drug, which reduced the total cell B₁ receptor mRNA after 1-h treatment with IL-1 and after the additional RNA synthesis blockade period for FBS (Fig. 8) and the binding B_{max}

in FBS-treated cells (Fig. 5). These results warrant further investigation to identify relevant protein kinase C isoform(s) and signaling pathways. Whether protein kinase C-mediated stabilizing influence works in concert with a proposed destabilizing RNA sequence (AUUAAA) that overlaps the stop codon (Zhou et al., 1999) remains to be studied. The possibility that additional mechanisms of regulation are recruited by specific stimulants, such as FBS, which often had a large effect on receptor B_{max} , cannot be excluded. A role for activator protein 1 has been proposed in B₁ receptor expression (Yang et al., 2001). Such regulatory diversity has a possible interest to explain situations in which the B₁ receptor up-regulation occurs without frank systemic inflammation. We have recently observed that pigs undergoing long-term treatment with the angiotensin I-converting enzyme inhibitor enalapril exhibit a generalized B₁ receptor up-regulation (mRNA in several organs and endothelial immunoreactivity in tissue sections). This protracted response occurred without changes in the white blood cell counts or increases in the phase reactant C-reactive protein (Moreau et al., 2005a). On the other hand, pharmacological inhibition did not support important roles for tyrosine or MAP kinases in the basal or stimulated expression of B₁ receptors in the present cellular model (data not shown), in contrast to other in vitro systems (Larrivée et al., 1998; Phagoo et al., 2001).

The antiinflammatory glucocorticoid dexamethasone has been known for a long time as a negative regulator of B₁ receptor up-regulation (deBlois et al., 1988; Leeb-Lundberg et al., 2005). As discussed elsewhere, dexamethasone is an indirect inhibitor of NF- κ B-induced gene transcription (Sabourin et al., 2002b); it only slightly diminished the IL-1 β -induced nuclear translocation of NF- κ B p65 (Figs. 3 and 4). The activated glucocorticoid receptor may inhibit NF- κ B translocation through the stimulation of the de novo synthesis of I κ B (an endogenous inhibitor of translocation) but is mainly inhibitory through a protein-protein interaction with activated NF- κ B in the nucleus (Rhen and Cidlowski, 2005). Thus, the functional inhibition of NF- κ B by dexamethasone may be more profound than that expected from a translocation assay, and this has been observed under all tested stimulation conditions using the B₁ receptor binding assay (Fig. 5), reproducing the effect of the siRNA. It is noteworthy that

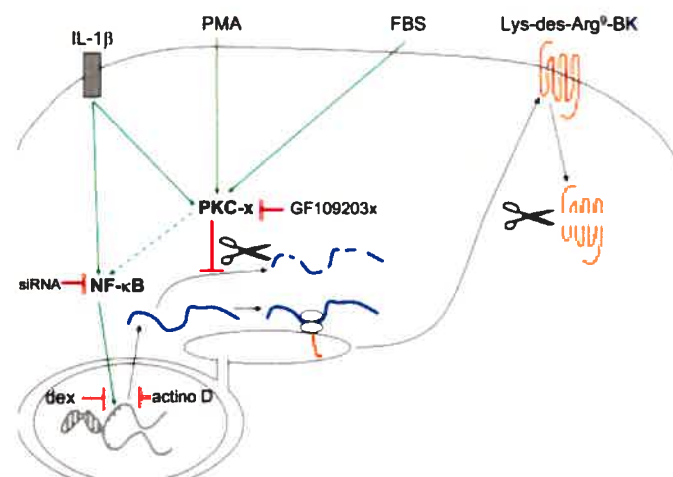


Fig. 9. Schematic representation of the regulation of B₁ receptor expression in SMCs. Green, stimulatory effects; red, inhibitory effects; blue, mRNA; orange, protein; dex: dexamethasone; actino D, actinomycin D.

the effect of dexamethasone on the mRNA concentration was nonsignificant after 1 h of stimulation but clearer in the control cells and in those treated with the NF- κ B stimulants IL-1 and PMA after RNA synthesis inhibition (Fig. 8). The measurements of receptor mRNA in the total cell extract as applied in the present experiments seem to be more sensitive to stabilizing influences than to the transcriptional rate.

Lys-des-Arg⁹-BK stimulated neither NF- κ B translocation nor stabilization of B₁ receptor mRNA. The Lys-des-Arg⁹-BK-induced effect on B₁ receptor B_{max} was comparatively small (1.3-fold) and does not support the idea that autoregulation (kinin-induced up-regulation of kinin B₁ receptors, see Introduction) is generally applicable.

In conclusion, two types of stimuli were identified for kinin B₁ receptor up-regulation in HUA SMCs (Fig. 9): those that increased mRNA stability only (sera, cycloheximide) and others that also stimulated NF- κ B (IL-1 β , PMA). Protein kinase C is a likely mediator of the mRNA stabilization by physiological stimuli. The siRNA approach indicated that NF- κ B is indispensable for the effective expression of this important signaling molecule (control of vascular tone, cell migration etc.) at the SMC cell surface.

Acknowledgments

We thank Johanne Bouthillier for expert technical assistance.

References

- Agata J, Miao RQ, Yayama K, Chao L, and Chao J (2000) Bradykinin B₁ receptor mediates inhibition of neointima formation in rat artery after balloon angioplasty. *Hypertension* **36**:364–370.
- Angers M, Drouin R, Bachvarova M, Paradis I, Marceau F, and Bachvarov DR (2000) In vivo protein-DNA interactions at the kinin B₁ receptor promoter: no modification upon interleukin-1 β or lipopolysaccharide induction. *J Cell Biochem* **78**:278–296.
- Bastian S, Paquet JL, Robert C, Cremers B, Loeffler B, Larrivée JF, Bachvarov DR, Marceau F, and Pruneau D (1998) Interleukin 8 (IL-8) induces the expression of kinin B₁ receptor in human lung fibroblasts. *Biochim Biophys Res Commun* **253**:750–755.
- Bouthillier J, Deblois D, and Marceau F (1987) Studies on the induction of pharmacological responses to des-Arg⁹-bradykinin in vivo and in vitro. *Br J Pharmacol* **92**:257–264.
- Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156–159.
- deBlois D, Bouthillier J, and Marceau F (1988) Effect of glucocorticoids, monokines and growth factors on the spontaneously developing responses of the rabbit aorta to des-Arg⁹-bradykinin. *Br J Pharmacol* **93**:969–977.
- Dixon BS, Evanoff D, Fang WB, and Dennis MJ (2002) Bradykinin B₁ receptor blocks PDGF-induced mitogenesis by prolonging ERK activation and increasing p27Kip1. *Am J Physiol* **283**:C193–C203.
- Fortin JP, Bouthillier J, and Marceau F (2003a) High agonist-independent clearance of rabbit kinin B₁ receptors in cultured cells. *Am J Physiol* **284**:H1647–H1654.
- Fortin JP, Gobeil F, Adam A, Regoli D, and Marceau F (2003b) Do angiotensin-converting enzyme inhibitors directly stimulate the kinin B₁ receptor. *Am J Physiol* **285**:H277–H282.
- Galizzi JP, Bodinier MC, Chapelain B, Ly SM, Coussy L, Gireaud S, Neliat G, and Jean T (1994) Up-regulation of [³H]des-Arg¹⁰-kallidin binding to the bradykinin B₁ receptor by interleukin-1 β in isolated smooth muscle cells: Correlation with B₁ agonist-induced PGI₂ production. *Br J Pharmacol* **113**:389–394.
- Gera L, Fortin JP, Adam A, Stewart JM, and Marceau F (2006) Discovery of a dual-function peptide that combines aminopeptidase N inhibition and kinin B₁ receptor antagonism. *J Pharmacol Exp Ther* **317**:300–308.
- Gobeil F, Pheng LH, Badini I, Nguyen-Le XK, Pizard A, Rizzi A, Blouin D, and Regoli D (1996) Receptors for kinins in the human isolated umbilical vein. *Br J Pharmacol* **118**:289–294.
- Gravel SR and Servant MJ (2005) Roles of an I κ B kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells. A molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions. *J Biol Chem* **280**:7477–7486.
- Houle S, Larrivée JF, Bachvarova M, Bouthillier J, Bachvarov DR, and Marceau F (2000) Antagonist-induced intracellular sequestration of the rabbit bradykinin B₂ receptor. *Hypertension* **35**:1319–1325.
- Larrivée JF, Bachvarov DR, Houle S, Landry J, Huot J, and Marceau F (1998) Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B₁ receptors induced by tissue injury. *J Immunol* **160**:1419–1426.
- Leeb-Lundberg LMF, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, and Zuraw BL (2005) International Union of Pharmacology. XLV. Classification of kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* **57**:27–77.
- Levesque L, Harvey N, Rioux F, Drapeau G, and Marceau F (1995) Development of a binding assay for the B₁ receptors for kinins. *Immunopharmacology* **29**:141–147.
- Marceau F, Sabourin T, Houle S, Fortin JP, Petitclerc E, Molinaro G, and Adam A (2002) Kinin receptors: functional aspects. *Int Immunopharmacol* **2**:1729–1739.
- Medeiros R, Cabrini DA, Ferreira J, Fernandes ES, Mori MA, Pesquero JB, Bader M, Avellar MC, Campos MM, and Calixto JB (2004) Bradykinin B₁ receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein: a critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B signaling pathways. *Circ Res* **94**:1375–1382.
- Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, and Hess FJ (1994) Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J Biol Chem* **269**:21583–21586.
- Moreau ME, Dubreuil P, Molinaro G, Chagnon M, Müller-Esterl W, Lepage Y, Marceau F, and Adam A (2005a) Expression of metalloproteinases and kinin receptors in swine oropharyngeal tissue: effect of ACE inhibition and inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* **315**:1065–1074.
- Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, and Adam A (2005b) The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* **99**:6–38.
- Morissette G, Fortin JP, Otis S, Bouthillier J, and Marceau F (2004) A novel nonpeptide antagonist of the kinin B₁ receptor: effects at the rabbit receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **311**:1121–1130.
- Morissette G, Sabourin T, Adam A, and Marceau F (2006) Inhibition of human and rabbit arterial smooth muscle cell migration mediated by the kinin B₁ receptor: role of receptor density and released mediators. *Can J Physiol Pharmacol* **84**:1107–1119.
- Pelorusso FG, Brodsky PT, Zold CL, and Rothlin RP (2005) Potentiation of des-Arg⁹-kallidin induced vasoconstrictor responses by metalloproteinase inhibition in isolated human umbilical artery. *J Pharmacol Exp Ther* **313**:1355–1360.
- Phagoo SB, Poole S, and Leeb-Lundberg LMF (1999) Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1 β shift the repertoire of receptor subtypes from B₂ to B₁ in human lung fibroblasts. *Mol Pharmacol* **56**:325–333.
- Phagoo SB, Reddi K, Anderson KD, Leeb-Lundberg LM, and Warburton D (2001) Bradykinin B₁ receptor up-regulation by interleukin-1 β and B₁ agonist occurs through independent and synergistic intracellular signaling mechanisms in human lung fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther* **298**:77–85.
- Rhen T and Cidlowski JA (2005) Mechanisms of disease: antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* **353**:1711–1723.
- Sabourin T, Guay K, Houle S, Bouthillier J, Bachvarov DR, Adam A, and Marceau F (2001) Absence of ligand-induced regulation of kinin receptor expression in the rabbit. *Br J Pharmacol* **133**:1154–1162.
- Sabourin T, Bastien L, Bachvarov DR, and Marceau F (2002a) Agonist-induced translocation of the kinin B₁ receptor to caveolae-related rafts. *Mol Pharmacol* **61**:546–553.
- Sabourin T, Morissette G, Bouthillier J, Levesque L, and Marceau F (2002b) Expression of kinin B₁ receptor in fresh or cultured rabbit aortic smooth muscle cells: role of NF- κ B. *Am J Physiol* **283**:H227–H237.
- Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pêcher C, Gauthier F, Girolami JP, and Bascands JL (1998) The B₁-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF- κ B and induces homologous up-regulation of the bradykinin B₁-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest* **101**:2080–2091.
- Tallarida RJ and Murray RB (1987) *Manual of Pharmacologic Calculations with Computer Programs*, Springer-Verlag, New York.
- Yang Z, Taylor L, Fenton MJ, and Polgar P (2001) Mediator caused induction of a human bradykinin B₁ receptor minigene: participation of c-Jun in the process. *J Cell Biochem* **82**:163–170.
- Yoshioka K (2002) KyPlot—a user-oriented tool for statistical data analysis and visualisation. *Comp Stat* **17**:425–437.
- Zhou X, Polgar P, and Taylor L (1998) Roles for interleukin-1 β , phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B₁ receptor gene expression. *Biochem J* **330**:361–366.
- Zhou X, Prado GN, Chai M, Yang X, Taylor L, and Polgar P (1999) Posttranscriptional destabilization of the bradykinin B₁ receptor messenger RNA: cloning and functional characterization of the 3'-untranslated region. *Mol Cell Biol Res Commun* **1**:29–35.

Address correspondence to: Dr. François Marceau, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Centre de recherche en rhumatologie et immunologie, 2705 Laurier Blvd, Ville de Québec (Québec), Canada G1V 4G2.

PARTIE II :
CHAPITRE IV
GENERATION OF KININS DURING PREPARATION AND
STORAGE OF WHOLE BLOOD-DERIVED PLATELET
CONCENTRATES

**Generation of Kinins during Preparation and Storage of Whole Blood-Derived
Platelet Concentrates**

Moreau ME, Thibault L, Désormeaux A, Chagnon M, Lemieux R, Robillard P,
Marceau F, Colman RW, Lepage Y, Rivard G-É, Adam A

Transfusion 2007, 47: 410-420

Les réactions d'hypotension sévères ont été observées lors de transfusion de dérivés sanguins tels que plaquettes, plasma frais congelé et concentrés de globules rouges. La majorité de ces effets secondaires se produit au début de la transfusion et a été attribuée aux kinines. Le mécanisme kinino-formateur associé aux RHS est complexe, il dépend également du produit transfusé et donc du receveur. À notre connaissance, aucune étude n'a exploré la génération des kinines dans les concentrés plaquettaires autre que lors de la leucoréduction au lit du receveur occasionnant une RHS en particulier chez les patients traités avec un iECA. Le but de ce travail était donc de définir l'influence des conditions de préparation et de conservation des dérivés sanguins sur la génération des kinines, BK et des-Arg⁹-BK, dans les concentrés de plaquettes et dans le plasma pauvre en plaquettes correspondant à ces concentrés de plaquettes.

En tant que premier auteur, ma participation à l'article consiste à avoir collaboré aux travaux de recherche, à l'analyse et l'interprétation des résultats obtenus et à la rédaction de l'article, des figures et des tableaux.

Generation of kinins during preparation and storage of whole blood-derived platelet concentrates

Marie Eve Moreau, Louis Thibault, Anik Désormeaux, Miguel Chagnon, Réal Lemieux, Pierre Robillard, François Marceau, Robert W. Colman, Yves Lepage, Georges-Étienne Rivard, and Albert Adam

BACKGROUND: Leukoreduction of platelet (PLT) concentrates (PCs) may be associated with hypotension in recipients, and a role for bradykinin (BK)-related peptides has been proposed for this side effect.

STUDY DESIGN AND METHODS: The concentration of BK and one of its vasoactive metabolites, des-arginine⁹-BK (des-Arg⁹-BK), was measured in a large number of PCs as a function of leukoreduction and storage duration with specific enzyme immunoassays and complementary techniques.

RESULTS: On Day 0 of storage, kinins were detected in leukoreduced and unfiltered PCs at a concentration lower than 100 pg per mL. During storage, both kinin levels peaked on Day 5 of storage, with a concentration higher than 1 ng per mL in 22 percent of PCs whether filtered on Day 0 or not. Physicochemical and pharmacologic characterizations of immunoreactive kinins confirm their nature. In vitro activation of the contact system of the corresponding PLT-poor plasma showed that a high kinin concentration on Day 5 of the storage corresponded with a low kinin-forming capacity of plasma. On Day 7, BK was no longer elevated presumably due to its degradation and the depletion of kinin-forming capacity of the plasma in stored PCs. The activities of metalloproteinases that metabolize BK-related peptides in plasma from PCs were at levels similar to those recorded in the plasma of a normal reference population and were unaffected by storage.

CONCLUSION: Storage of PCs contributes to the hydrolysis of high-molecular-weight kininogen and generation of pharmacologically relevant BK levels that might pose a hazard in susceptible patients.

Before the introduction of prestorage leukoreduction, febrile reactions have been the most common immediate side effect associated with platelet (PLT) transfusion.¹ These adverse reactions were often observed after transfusion of PLT concentrates (PCs) stored between 2 and 5 days at room temperature.² Cytokine production has been reported previously in PCs during the storage period and their levels have been related to the number of white blood cells (WBCs) present in the component.³ Introduction of

ABBREVIATIONS: ACE = angiotensin I-converting enzyme; ACEi = ACE inhibitor; APP = aminopeptidase P; AUC = area under the curve; BK = bradykinin; CPN = carboxypeptidase N; des-Arg⁹-BK = des-arginine⁹-bradykinin; PC(s) = platelet concentrate(s); PRP = platelet-rich plasma; YFP = yellow fluorescent protein.

From the Faculty of Pharmacy, Faculty of Arts and Sciences, Department of Mathematics and Statistics, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada; Héma-Québec, Quebec, Canada; National Institute of Public Health of Quebec, Montreal, Quebec, Canada; the Rheumatology and Immunology Research Center, University Hospital Center of Quebec, Quebec, Canada; the Sol Sherry Thrombosis Research Center, Hematology Division of the Departments of Medicine and Physiology, Temple University, Philadelphia, Pennsylvania; and the Department of Hematology, Sainte-Justine Hospital, Montreal, Quebec, Canada.

Address reprint requests: Albert Adam, PhD, Faculté de Pharmacie, Room 3190, Université de Montréal, 2900 Boulevard Édouard-Montpetit, C.P. 6128, succ Center-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7; [REDACTED]

Supported by grant from the Bayer-CBS-HQ Partnership Fund and the work of the corresponding author (AA) is funded by the Canadian Institutes for Health Research (Grant MOP-14077) and the NIH (Grant 1-R01-HL079184).

Received for publication March 27, 2006; revision received July 26, 2006, and accepted July 28, 2006.

doi: 10.1111/j.1537-2995.2007.01097.x

TRANSFUSION 2007;47:410-420.

prestorage leukoreduction filtration of PCs has significantly decreased the production of these cytokines with a parallel reduction in the incidence of febrile reactions associated with transfusion of PCs.⁴⁻⁶ Furthermore, the transfusion of PCs, leukoreduced with filters having negatively charged surfaces, has also reduced exposure to HLA WBCs in frequently transfused patients.⁷ Bedside leukoreduction by filtration has been associated with development of hypotension in recipients. Consequently, the US FDA issued a warning about this practice and recommended leukoreduction before or during the storage period.⁸ Previous publications have presented direct or circumstantial evidences that generation of bradykinin (BK) and/or des-arginine⁹-BK (des-Arg⁹-BK) in PCs could play a role in the hypotensive adverse reactions associated with the bedside leukoreduction of PCs.⁹⁻¹²

BK is a nonapeptide (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) released from high-molecular-weight kininogen (HK) by plasma kallikrein during activation of the kallikrein-kinin system of plasma. It is subsequently metabolized mainly by three metallopeptidases.^{13,14} Angiotensin I-converting enzyme (ACE) and aminopeptidase P (APP) are, respectively, the first and second major metallopeptidases in importance for inactivating BK. Carboxypeptidase N (CPN) transforms BK into its carboxytruncated active metabolite des-Arg⁹-BK. This constitutes a minor metabolic pathway for BK unless ACE is inhibited. Des-Arg⁹-BK is also degraded by ACE and APP. In the case of des-Arg⁹-BK, APP represents the main peptidase activity, whereas ACE plays a secondary role.¹⁵

Kinins mediate several physiologic activities including the ability to dilate the peripheral vasculature, both directly and indirectly, resulting in hypotension. BK exerts its pharmacologic activities through binding to its constitutively expressed kinin B₂ receptor. Des-Arg⁹-BK does not bind to this receptor type, but is a selective ligand of the B₁ receptor, which corresponds to a highly regulated gene product whose synthesis is increased in experimental models of inflammation by different cytokines.¹⁶ Several reports have demonstrated the transient generation of BK in PCs during the hour after various filtration procedures.¹⁷⁻²²

Although the generation of BK by bedside filtration of PC has been associated with hypotensive reactions, Arnold and coworkers¹² reported hypotensive reactions in patients receiving PCs that were leukoreduced after donation and before storage, not at the bedside immediately before transfusion. To our knowledge, no study has monitored the generation of kinins during storage of PCs to investigate the conditions, other than bedside filtration, that have occasionally been associated with severe hypotensive reactions.^{10,12,23}

We hypothesize that storage conditions could generate kinins in quantity enough to contribute to hypotensive reactions, particularly in patients treated with an ACE

inhibitor (ACEi). To test this hypothesis, we measured BK and des-Arg⁹-BK level in PCs, with and without prestorage leukoreduction by filtration during 7 days of storage at room temperature. We quantified both BK and des-Arg⁹-BK with specific immunoassays developed and validated in our laboratory.^{24,25} These methods were supplemented by physicochemical and pharmacological characterization of both peptides. Mechanisms potentially responsible for elevated levels of kinins during PCs storage were also investigated.

MATERIALS AND METHODS

Blood donors

Whole-blood donations were collected after informed consent from healthy volunteer donors (7 women and 28 men; ages, 58 ± 11 years) who met Héma-Québec guidelines for PLT donation. The study was approved by Héma-Québec and the University of Montreal ethics committees. None of these donors was treated with an ACEi.

Preparation of PCs

Collection and processing of whole blood. The collection protocol is summarized in Fig. 1. Approximately 450 mL of blood was drawn in whole blood collection, filtration and storage systems (Leukotrap RC-PL, Pall Medical Corp., East Hills, NY) which contained 63 mL of citrate-monobasic sodium phosphate-dextrose anticoagulant solution (CP2D). Samples of whole blood were collected aseptically from each blood unit immediately after drawing (Day 0). Blood units were kept at 20 to 24°C and processed within 8 hours. Before processing, the in-line leukoreduction PLT negatively charged filter (ATSLPL, Pall Medical Corporation) and the two CLX PVC satellite bags were removed with a dielectric thermal sealer and replaced by a single empty CLX PVC bag made with a

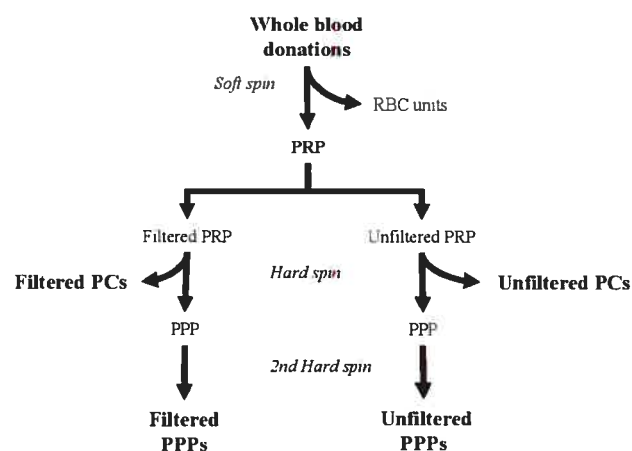


Fig. 1. Preparation of PCs and PPPs from whole blood by centrifugation.

TABLE 1. PLT content, WBC count, and volume of unfiltered and filtered PCs and PPPs before storage*

Component	Volume (mL)	PLT count (x10 ⁹ /unit)	WBC count (x10 ⁹ /mL)
Whole blood source	476 ± 8	NT	NT†
PCs			
Filtered unit	58 ± 2	25.3 ± 6.4‡	34 ± 23‡
Unfiltered unit	57 ± 3	31.0 ± 6.9‡	375 ± 244‡
PPP			
Filtered	25 ± 5	NT	NT
Unfiltered	24 ± 6	NT	NT

* Components were stored at 20 to 24°C with continuous agitation.

† NT = not tested.

‡ Indicates a significant difference between mean ± SD of filtered and unfiltered PCs (p < 0.05).

sterile docking device (SCD 312, Terumo Medical Corp., Somerset, NJ). PLT-rich plasma (PRP) was obtained after a low-spin centrifugation (2005 × g for 3 min 50 sec; Sorvall RC3-BP, Kendro Laboratory Products, Newton, CT) and transferred into the CLX PVC bag. After detachment of the red cell unit, the PRP bag was aseptically connected to a Y connector. A processing pack, made of four CLX PVC bags attached in succession with the sterile docking device, was connected to each side of the Y connector. An ATS-LPL filter was inserted on the tubing of one series of bags downstream of one branch of the Y connector. An equal volume of the content of the PRP bags was transferred into the first CLX PVC bag of each series to obtain filtered and unfiltered PRP. PLT filters and tubing were next detached and the PCs were centrifuged at high speed (4395 × g for 5 min at room temperature). After centrifugation, the plasma was transferred into the second satellite bag, except for 60 mL which was left in the PCs. After 120 minutes, the filtered and unfiltered PLTs were stored under continuous horizontal agitation in a PLT incubator at room temperature (Helmer Laboratories, Fort Wayne, IN). Five milliliters of the filtered and unfiltered PCs were aseptically sampled during storage on Days 0, 2, 5, and 7 and immediately added with 35 mL of cold anhydrous ethanol. The mixture was kept at 4°C for 1 hour before centrifugation (4395 × g, 5 min). Thirty-five milliliters of the ethanolic extract were decanted and evaporated to dryness in a concentrator (Speed Vac, Savant, Farmingdale, NY). Residual PLTs were removed from plasma bags by another high-speed centrifugation (4395 × g for 5 min at room temperature). The PLT-poor plasma (PPP) was divided into two remaining CLX PVC bags. For each series of paired donations, a bag of filtered and unfiltered PPP was incubated with agitation together with PCs. Five milliliters from each PPP was sampled aseptically on Days 0 and 5 and processed as described above for PCs for the quantification of kinins.

Laboratory tests. Cell counts were determined on Day 5 on each PC with an automated hematology analyzer (Cell-Dyn 3200, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). The number of PLTs in filtered and unfiltered PCs

is summarized in Table 1. Samples from all PCs were tested for bacterial contamination after 7 days of storage with an automated microbial detection system (BacT/ALERT 3D bacterial detection system, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). All testing results were negative.

Quantification of immunoreactive kinins

Samples preparation for the quantification of immunoreactive kinins.

Dry extracts of PCs and PPPs were dissolved in 1 mL of 0.1 percent trifluoroacetic acid (TFA) and loaded on a SepPack C₈-silica column equilibrated successively with 3 × 1 mL of CH₃CN and with 5 × 1 mL of 0.1 percent TFA. The column was sequentially washed with 2 × 1 mL of 0.1 percent TFA and 2 × 1 mL of a mixture of 10 percent acetonitrile (CH₃CN) in 0.1 percent TFA. Kinins were eluted with a mixture of 40 percent CH₃CN in 0.1 percent TFA.²⁶ Eluted fractions were evaporated to dryness. In these optimal conditions, the yield (over 95%) of the extraction method is reproducible with a coefficient of variation (CV) of less than 10 percent.²⁷

Measurement of immunoreactive BK and des-Arg⁹-BK. The residues of evaporated extracts were dissolved in 50 mmol per L Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 100 mmol per L NaCl and 0.05 percent Tween 20. After dissolution, BK and des-Arg⁹-BK were quantified by two specific competitive enzyme immunoassays (EIAs), as described previously.^{24,25} These methods have been validated and their analytical performances reported. Briefly, both immunoassays use purified polyclonal IgG raised against the C-terminal portion of the peptides, responsible for the B₁ or the B₂ pharmacologic activities. Antibodies were raised in rabbits against the C-terminal part of BK covalently linked to bovine serum albumin with glutaraldehyde. The tracer used was BK labeled with digoxigenin-3-O-methylcarboxyl-ε-aminocaproic acid—succinimide ester (DIG-O-Su, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) and characterized by mass spectrometry and radioimmunoassay. Kallidin (Lys-BK or KD) and BK are 100 percent cross-reactive with these antibodies. Except for BK_[2-9], none of the BK metabolites (des-Arg⁹-BK or Lys-des-Arg⁹-BK) present a significant cross-reactivity with the BK antibodies. The calibration curve was characterized by an ED₅₀ of 7.37 pg per well (50 μL). The CV for each value of the calibration curve was less than 5 percent. Intra- and interassay CV of BK measurements were lower than 4.0 and 7.4 percent. For the quantification of des-Arg⁹-BK, polyclonal antibodies were generated in rabbit against Cys-Lys-Aca-Lys-des-Arg⁹-BK coupled with maleimide-activated

keyhole limpet hemocyanin²⁸ and purified by gel filtration (PD-10). The tracer was obtained by coupling des-Arg⁹-BK to DIG-O-Su. After purification by hydrophobic chromatography, the tracer was also characterized by mass spectrometry and radioimmunoassay. Lys-des-Arg⁹-BK and des-Arg⁹-BK exhibit identical 100 percent immunoreactivity for the C-terminal peptide-specific antibodies. Neither BK nor Lys-BK cross-react in the assay and different metabolites of kinins present less than 0.1 percent cross-reactivity. The calibration curve is characterized by an ED₅₀ of 6.96 pg per well (50 μ L). The CV for each value of the calibration curve is less than 6 percent. The intra-assay CV calculated at three concentration levels varies between 5 and 8 percent and the interassay CV is lower than 10 percent. The bound DIG-BK/DIG-des-Arg⁹-BK is reacted with anti-DIG Fab labeled with horseradish peroxidase. The reaction was revealed by adding o-phenylenediamine and read by absorbance at 530 nm.

Kinin-forming capacity of plasma. PPPs were activated as described earlier.^{9,14,29-32} Briefly, 1 mL of PPPs was preincubated with enalaprilat for 20 minutes at 37°C in polypropylene tubes at a concentration (130 nmol/L), which totally inhibits ACE activity. The contact system was then activated by incubation of PPPs with glass beads (37°C, with agitation). The reaction was stopped after various incubation periods (0-60 min) by adding cold anhydrous ethanol at a final concentration of 80 percent (v/v). Samples were then incubated at 4°C for 1 hour and centrifuged (4°C, 15 min, 3000 \times g) for complete protein precipitation. The supernatant was decanted and evaporated to dryness before determining the levels of the immunoreactive peptides BK and des-Arg⁹-BK as described above.

Characterization of immunoreactive kinins

HPLC separation of immunoreactive kinins (BK, Lys-BK, des-Arg⁹-BK, and Lys-des-Arg⁹-BK). Ethanolic extracts from PCs and PPPs containing immunoreactive kinins were evaporated to dryness and the residue of evaporation was dissolved in 200 μ L of 5 mmol per L KH₂PO₄, pH 3.0, 25 percent acetonitrile with 1.0 percent H₃PO₄. HPLC separation was performed with a liquid chromatography system (Agilent 1100 Series system, Agilent Technologies, Mississauga, Ontario, Canada) with a 2-sulfoethyl aspartamide column (PolySULFOETHYL A, The Nest Group Inc., Southboro, MA) with a linear gradient of KCl (0-300 mmol/L) in 5 mmol per L KH₂PO₄, 25 percent acetonitrile (v/v), pH 3.0, during 30 minutes. Samples were collected at a flow rate of 1 mL per minute. The different eluted fractions were evaporated before dosage of immunoreactive BK and des-Arg⁹-BK as described above.

Pharmacologic characterization of BK and des-Arg⁹-BK. To verify the receptor-binding specificities

of kininogen-derived peptides, radioreceptor assays were designed and based on fluorescent rabbit B₁ and B₂ receptors stably expressed in HEK 293 cells (B₁R-yellow fluorescent protein [YFP], B₂R-green fluorescent protein [GFP]).^{33,34} Lyophilized samples from PCs with high kinin levels, extracted as indicated above, were dissolved and further diluted in the buffer specific for each assay and used as competitors of the binding of fixed radioligand and concentrations (0.5 nmol/L [³H]Lys-des-Arg⁹-BK and 3 nmol/L [³H]BK for B₁R-YFP and B₂R-GFP, respectively). The concentrations of the samples were expressed as Lys-des-Arg⁹-BK or BK, respectively, and determined with control competition curves obtained with unlabeled authentic peptides. These assays are based on the knowledge of the structure-activity relationships for each receptor subtype: at the B₁R-YFP, Lys-des-Arg⁹-BK exhibits at least a 100-fold higher affinity relative to Lys-BK or des-Arg⁹-BK and BK has no affinity;³³ at the recombinant rabbit B₂ receptor, Lys-BK has an approximate equal affinity to that of BK, but Lys-des-Arg⁹-BK or any BK fragment has negligible affinities.³⁵

Quantification of metallopeptidase activities

Metallopeptidase activities were quantified in each PPP sample on Day 0 and in six PPPs on Day 0 and 5. ACE activity was determined by Bühlmann ACE radioenzymatic assay (ALPCO, American Laboratory Products Company, Windham, NH) according to the manufacturer's instructions. APP activity was kinetically assessed with the K(Dnp)PPGK(Abz)-quenched fluorescent substrate. This method was developed and validated recently in our laboratory.³⁶ One unit of APP activity corresponds to 1 pmol of K(Dnp)PPGK(Abz) hydrolyzed per minute per milliliter of plasma. CPN activity was measured with the dansyl-Ala-Arg substrate by a modification of the method described by Skidgel.^{14,37} One unit of CPN activity equals 1 nmol of dansyl-Ala released per minute per milliliter of plasma.

Statistical analysis

Descriptive statistics and box-plots were used to describe the original data. In view of the heterogeneity of the variances between the days and the unfiltered or filtered PCs, the data were transformed by a logarithmic function to stabilize this variability.^{38,39} The transformed data were also illustrated with descriptive statistics and box-plots. For the concentration of BK and des-Arg⁹-BK, the effects of storage time and unfiltered or filtered PCs on each of the two transformed concentration variables were studied with a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures on each factor. In presence of an interaction, a one-way ANOVA was used to compare the days for each unfiltered or filtered PCs, whereas for the com-

parison between unfiltered or filtered PCs for each day, a paired t test was used. When needed, the pairwise comparisons were performed with the Bonferroni adjustment. The association between the order of concentrations of kinins measured in unfiltered and filtered PCs was assessed with a Pearson correlation coefficient between the ranks of the concentrations. The kinin-forming capacity of plasma was measured by the area under the curve (AUC) of BK concentrations measured in the interval 0 to 12 minutes. A two-way ANOVA with repeated measurements on the factor days was used to study the effect of the days on the quantity of BK released between the levels of BK. In presence of an interaction, paired t tests were used to compare the AUC between Days 0 and 5 for each pool of BK and two-samples t tests were used to compare the AUC between the two pools of BK for each day. Finally, t tests with Satterthwaite-Welch correction for heterogeneity of variances were used to compare the mean of ACE, APP, and CPN between our samples and the reference population.¹⁴

RESULTS

Immunoreactive kinin concentrations measured in unfiltered and filtered PCs

Table 2 shows the distribution of BK concentrations in unfiltered and filtered PCs. In both groups, the number of PCs with concentrations of BK higher than 100 pg per mL increased during storage from Day 0 to Day 5. On Day 5, 6 of 31 PCs had a BK concentration between 1 and 10 ng per mL and one had a concentration higher than 10 ng per mL. On Day 7, the levels of BK in the PCs returned to levels comparable to those observed on Days 0 and 2 with 27 of 35 filtered and 27 of 35 unfiltered PCs having concentrations of BK lower than 100 pg per mL. The distribution of

des-Arg⁹-BK concentrations paralleled that of BK, for all 7 days of storage (data not shown).

The descriptive statistics that characterize the concentrations of BK and des-Arg⁹-BK in both unfiltered and filtered PCs are summarized in Table 3. The wide range of concentrations measured for both immunoreactive kinins reflects the distribution reported in Table 2. The highest concentrations with the largest range of BK and des-Arg⁹-BK concentrations were found on Day 5. Owing to this high variability, a logarithmic transformation was used for further analysis. The box-plots corresponding to these log-transformed concentrations (Fig. 2) show a similar dispersion of the concentrations between the unfiltered and filtered PCs.

A two-way ANOVA with repeated measurements on the logarithm of BK concentrations in unfiltered and filtered PCs over the storage time (Days 0, 2, 5, and 7) indicated an interaction between storage duration and the filtration procedure (p = 0.006). A pairwise comparison between the number of days of storage, with a Bonferroni adjustment, demonstrated a significant increase of

TABLE 2. Distribution of BK levels in unfiltered and filtered PCs during storage at 20 to 24°C

BK concentration (pg/mL)	Day			
	0	2	5	7
Unfiltered PCs				
<100	28	28	12	27
100-1000	6	7	13	7
1-10			6	1
>10			1	
Filtered PCs				
<100	24	26	11	27
100-1000	11	8	14	8
1-10		1	6	
>10			1	

TABLE 3. The variability of BK and des-Arg⁹-BK levels in unfiltered and filtered PCs during storage at 20 to 24°C

BK/des-Arg ⁹ -BK samples	Days	Valid number	Mean (pg/mL)	SD	Minimum	Maximum
BK						
Unfiltered PCs	0	34	70.85	120.56	3.00	513.00
	2	35	83.97	138.23	3.00	648.00
	5	32	895.63	2016.69	15.00	10,900.00
	7	35	114.09	235.56	7.00	1,198.00
Filtered PCs	0	35	100.86	156.76	4.00	863.00
	2	35	107.40	190.14	3.00	1,013.00
	5	32	1419.31	4425.89	7.00	24,750.00
	7	35	108.29	193.99	5.00	853.00
Des-Arg⁹-BK						
Unfiltered PCs	0	34	98.26	113.70	10.00	530.00
	2	35	64.37	105.76	1.00	533.00
	5	32	337.78	487.24	12.00	2,060.00
	7	35	186.80	302.38	11.00	1,688.00
Filtered PCs	0	35	194.49	190.70	18.00	880.00
	2	35	105.51	125.41	3.00	558.00
	5	32	850.16	2317.67	22.00	12,575.00
	7	35	230.89	251.85	10.00	945.00

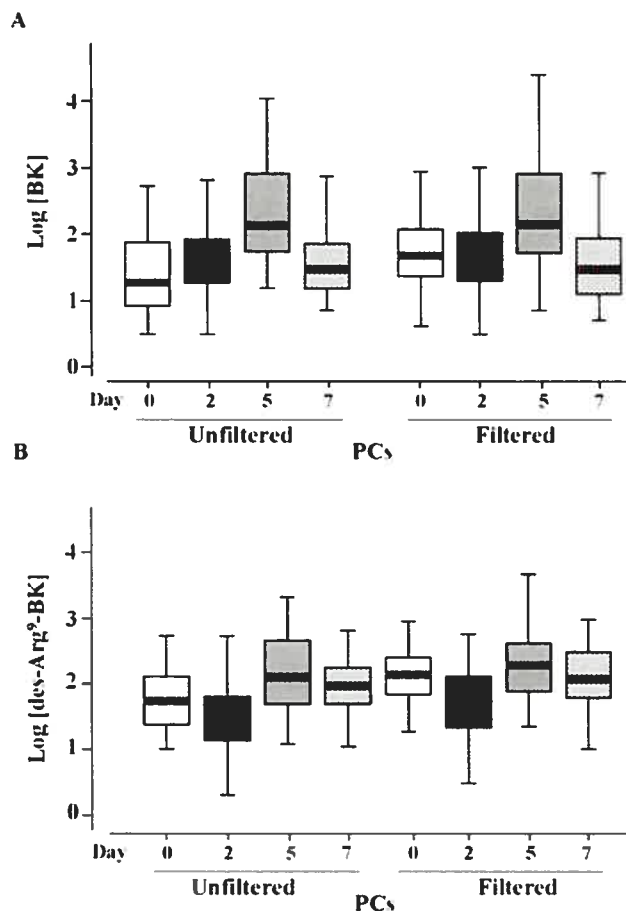


Fig. 2. Log data for BK and des-Arg⁹-BK in unfiltered and filtered PCs during 7 days storage. Box-plots represent the distribution of the logarithmic concentration of BK (A) and des-Arg⁹-BK (B) in PCs. The line in the box represents the median level on Day 0 (open box), Day 2 (closed box), Day 5 (gray box), and Day 7 (hatched box).

BK concentrations in unfiltered PCs measured on Day 5 when compared to Days 0 ($p < 0.001$), 2 ($p < 0.001$), and 7 ($p < 0.001$). Similarly, a significant increase in BK levels in filtered PCs was observed after 5 days of storage when compared to Day 0 ($p < 0.001$), 2 ($p < 0.001$), and 7 ($p < 0.001$). In contrast, the log BK concentration measured on Day 0 showed a significantly higher concentration of immunoreactive BK ($p < 0.001$) in filtered PC than unfiltered PC. This effect of filtration could not be observed on the other days of the storage period.

The two-way ANOVA for logarithm of des-Arg⁹-BK concentrations did not show interaction between days of storage and PCs with and without filtration ($p = 0.303$). A significantly lower level of des-Arg⁹-BK was observed on Day 2 when compared to Days 0 ($p = 0.011$), 5 ($p < 0.001$), and 7 ($p < 0.001$). Moreover, the filtration procedure had a significant effect on the log concentration of des-Arg⁹-BK,

which remained significantly higher in the filtered PCs during all 7 days of the study ($p < 0.001$).

Finally, the order of BK concentrations is strongly related between the unfiltered and filtered PCs for Day 0 ($r = 0.856$; $p < 0.001$), Day 2 ($r = 0.802$; $p < 0.001$), Day 5 ($r = 0.761$; $p < 0.001$), and Day 7 ($r = 0.882$; $p < 0.001$), which means that changes in concentrations of BK in filtered PCs corresponded to concentrations of BK in the unfiltered PCs for each day.

Characterization of the mechanisms leading to kinins accumulation in PCs

Elevated levels of kinins in PCs can result either from a decreased degradation or/an increased synthesis or from both, and these metabolic pathways were explored in PPP obtained from corresponding PCs.

Measurement of the kininase activities in plasma

On Day 0, the activities of ACE (49 ± 14 units), APP (325 ± 182 units), and CPN (65 ± 10 units), the metalloproteinases mainly responsible for the metabolism of BK and des-Arg⁹-BK in human plasma, were not significantly different from levels (ACE, 43 ± 12 units, $p = 0.061$; APP, 316 ± 248 units, $p = 0.072$; CPN, 68 ± 11 units, $p = 0.096$) previously reported in a healthy reference blood donor population.¹⁴ Storage of plasma did not affect significantly the activity of these metalloproteinases. Indeed, activities of ACE and APP measured in a limited number of plasma samples ($n = 3$ with low concentration of BK; $n = 3$ with high concentration of BK on Day 5) on Day 0 (ACE, 47 ± 17 ; APP, 366 ± 228) were not different from those measured on Day 5 (ACE, 41 ± 19 ; APP, 362 ± 215).

Kinin-forming capacity of plasma

Because no relation could be associated between the concentration of kinins on Day 5 and the PLT count, immunoreactive BK and des-Arg⁹-BK were measured in six filtered PPPs on Days 0 and 5 of room-temperature storage (Table 4). Three of these filtered PPPs (Donations 15, 28, and 33) stored for 5 days contained high BK concentrations ($50,238$ pg/mL) and they corresponded to three PCs with high BK concentrations ($11,433$ pg/mL). A separate group of three PPPs (Donations 1, 22, and 24) contained low concentrations of BK (68 pg/mL) on the fifth day of the storage and they corresponded to three PCs with low concentration of BK (86 pg/mL). In vitro contact activation of Days 0 and 5 samples from these plasma pools showed that the BK-generating capacity of plasma was depleted after 5 days of storage in plasma containing large amounts of BK but not in plasma containing lesser amounts of BK (Fig. 3).

TABLE 4. BK levels (pg/mL) in unfiltered and filtered PCs and PPPs during 5 days of storage at 20 to 24°C with continuous agitation

Donation number	PCs				PPPs			
	Unfiltered		Filtered		Unfiltered		Filtered	
	Day 0	Day 5	Day 0	Day 5	Day 0	Day 5	Day 0	Day 5
1	16	128	44	164	27	10	27	68
22	3	38	4	59	18	26	18	36
24	8	46	23	35	13	18	13	101
Mean	9	71	24	86	19	18	19	68
15	233	1,998	263	5,175	100	33,750	100	140,000
28	73	10,900	253	24,750	32	45,000	32	9,125
33	433	2,525	300	4,375	18	22,250	18	1,590
Mean	246	5,141	272	11,433	50	33,667	50	50,238

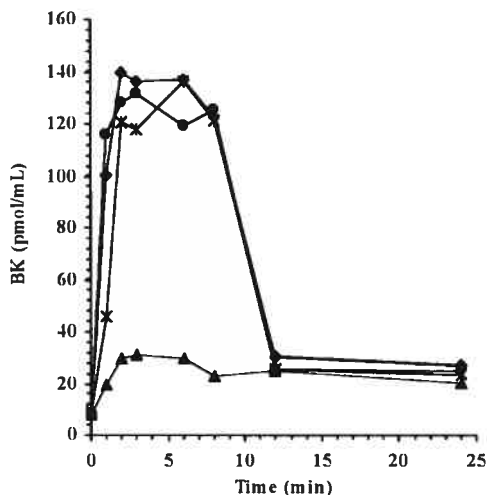


Fig. 3. Generation of BK during in vitro contact activation of plasma from two pools of three PPPs each. A pool of three PPPs exhibiting a low concentration of BK, 19 pg per mL on Day 0 (■), and 68 pg per mL on Day 5 (*), was activated by glass beads in presence of an ACEi. Plasma from a pool of three PPPs exhibiting a high BK concentration, 50 pg per mL at Day 0 (●) and 50,238 pg per mL at Day 5 (▲). Each of the plasma samples, except that with elevated BK after storage for 5 days, generated large amounts of BK after contact activation.

In PPP without high amounts of BK on Day 0 or after storage for 5 days, high levels of BK developed within 2 minutes after exposure to glass beads and the levels decreased toward baseline within 12 minutes. In the one pool that developed high levels of BK during 5 days of storage, there was a very low level of BK developing after exposure to glass beads. The effect of plasma storage and whether BK was generated during storage was correlated with the amount of BK generated after contact activation as calculated as the AUC (Fig. 3). The area under the curve, reflecting the kinin-forming capacity of HK when activated by glass beads, was not different ($p = 0.414$) for both pools of PPPs on Day 0. On Day 5, there was a significantly greater area under the curve ($p < 0.001$) for plasma that

had high levels of BK. In fact, at Day 0, for the pool of PPPs with a low concentration of BK (mean concentration, 19 pg/mL), the AUC (1,365 ng) is not significantly higher than PPPs (AUC, 1,268 ng) exhibiting a high BK concentration (mean concentration, 50 pg/mL). By Day 5, the AUC (1,233 ng) of PPPs with a low concentration of BK (mean concentration, 68 pg/mL) is greater than the AUC (335 ng) of PPPs exhibiting a higher BK concentration (mean concentration, 50,238 pg/mL). For the pool of PPPs containing low concentrations of BK (19 and 68 pg/mL for Days 0 and 5, respectively), no difference ($p = 0.316$) in generation of BK was observed between Day 0 (AUC, 1,365 ng) and Day 5 (AUC, 1,233 ng) samples. For the pool of PPPs exhibiting a high BK concentration (50 pg/mL on Day 0 and 50,238 pg/mL on Day 5), the AUC on Day 5 was significantly lower (AUC, 335 ng) than that measured on Day 0 (AUC, 1,268 ng; $p = 0.010$). Because 1 mol of BK is released from 1 mol of HK, the difference between both AUC (low concentration of BK, AUC 132 ng or 0.125 nmol; high concentration of BK, AUC 933 ng or 0.880 nmol) corresponds to the amount of HK activated during the storage.

Identification and pharmacologic characterization of immunoreactive kinins measured in PCs and in PPPs

Figure 4 illustrates the immunoreactivity profile of kinins generated in PCs and PPPs after separation by HPLC. The retention time of immunoreactive BK and des-Arg⁹-BK corresponded, respectively, to the retention time of reference BK (retention time, 24.1 min) and des-Arg⁹-BK (retention time, 18.6 min). No immunoreactivity could be measured at the retention time corresponding to reference Lys-BK (retention time, 29.8 min) and Lys-des-Arg⁹-BK (retention time, 24.7 min).

The radioreceptor assays based on cells expressing recombinant B₁ and B₂ receptors showed a pharmacologic BK-like activity of plasma from selected PCs stored for 5 days (range, 46-86 nmol/L; $n = 6$) based on the competition of ³H-BK to rabbit B₂ receptors. The same extracts barely displaced [³H]Lys-des-Arg⁹-BK binding from

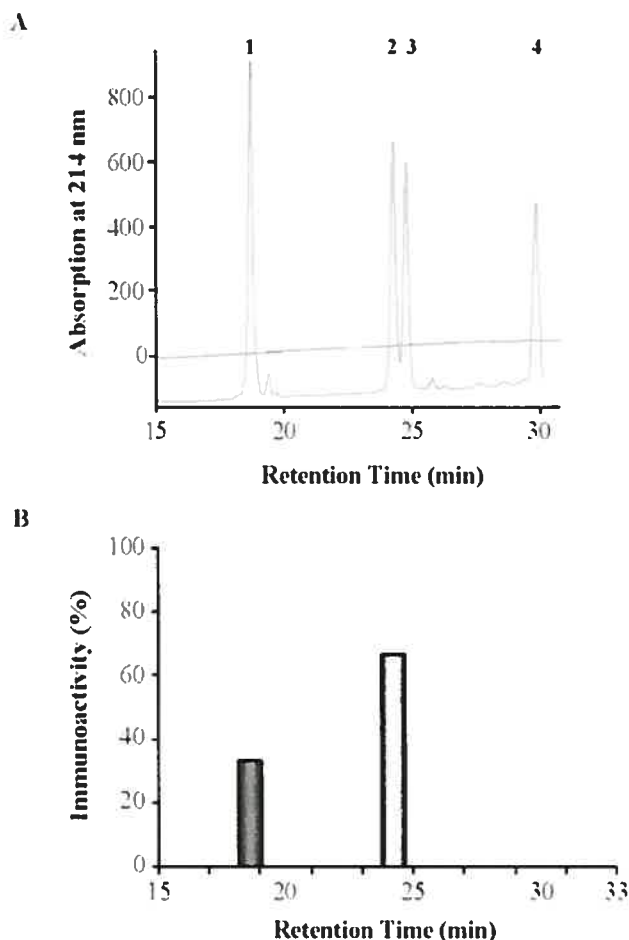


Fig. 4. Typical elution profile of immunoreactive kinins after HPLC. (A) UV absorbance (wavelength 314 nm) of reference peptides: 1, des-Arg⁹-BK (retention time, 18.6 min); 2, BK (retention time, 24.1 min); 3, Lys-des-Arg⁹-BK (retention time, 24.7 min); and 4, Lys-BK (retention time, 29.8 min). (B) Immunogram of immunoreactive kinins present in representative plasma samples (PPPs) and PCs on Day 5 of the storage: des-Arg⁹-BK (closed column); BK (open column).

recombinant rabbit B₁ receptors (0.01-0.3 nmol/L of Lys-des-Arg⁹-BK-like activity), consistent with the absence of this peptide in the extracts, since des-Arg⁹-BK, previously identified in PCs with the immunoassay coupled to the HPLC separation, has only a low affinity for rabbit or human B₁ receptors and accounts for the low occupancy of B₁ receptors in the radioreceptor assay. This information was structurally complementary to that obtained from the EIAs because the latter does not discriminate the structure of the N-terminal part of the kinins.

DISCUSSION

Hypotensive transfusion reactions have previously been described after PLT and plasma transfusion through negatively charged leukoreduction filters in patients taking

ACEi medications.^{10,12,23,40} We hypothesized that transfusion of kinins generated in PCs during storage, regardless whether the PCs were filtered before storage, may also contribute to hypotensive transfusion reactions. We measured kinin generation in PCs and their corresponding plasma samples over a storage period of 7 days. We showed elevated levels of BK and des-Arg⁹-BK in PCs, prepared and stored under standard conditions for therapeutic use. The concentrations of BK and des-Arg⁹-BK peaked on Day 5 and returned to basal levels on Day 7 of storage. Our data showing depletion of kinin-generating capacity of plasma on Day 5 of room-temperature storage, presumably by depleting high-molecular-weight kininogen, suggest that the low BK levels on Day 7 resulted from its expected degradation without any further generation.

The development of high BK levels during storage occurred in approximately 20 percent of the PCs we studied. Previous studies reporting BK generation by exposure to negatively charged leukoreduction filters also showed variability.^{17,22} BK levels declined within 1 hour of filtration unless ACEi were present to delay this degradation. Other investigators reported complete cleavage of HK and an activation of prekallikrein in some, but not in all pools of PCs filtered through negatively charged filters.²² Although an anomaly in BK degradation in some patients taking ACEi has been associated with a prolonged t_{1/2} of BK in several cases of hypotensive transfusion reactions, the concentrations of des-Arg⁹-BK were not examined and the mechanism responsible for the accumulation of BK was not fully explained.^{9,23,31}

In this study, we used an analytical approach that we have previously developed in order to define the metabolism of kinins in reference plasma from healthy subjects¹⁴ and in patients who had experienced side effects of ACEi treatment including hypotensive transfusion reactions.^{9,23,29,31,32,41} For the quantification of BK and des-Arg⁹-BK, we used nonisotopic immunologic methods developed and validated in our laboratory.^{24,25} The nature of the N-terminal part of BK and des-Arg⁹-BK was further elucidated by physicochemical and pharmacologic approaches. These immunoreactive kinins generated in PCs during storage were shown to be BK, a peptide widely considered to be released from HK by plasma kallikrein during the activation of the contact system⁴² and its active metabolite, des-Arg⁹-BK, a marginally vasoactive agonist of the B₁ receptor in humans.

We observed that the concentration of both BK and des-Arg⁹-BK increase in some but not all PCs filtered within 8 hours from collection. The concentration of des-Arg⁹-BK remained higher than BK during storage. These differences may be partly explained by differences in their degradation rates. Indeed, we have shown that the t_{1/2} of des-Arg⁹-BK (236-1901 sec) is significantly longer than the one of BK (15-53 sec).¹⁴ We also observed wide variability in BK and des-Arg⁹-BK levels in PCs on Day 5 of storage.

BK levels greater than 100 pg per mL were observed in 20 of 32 PCs and one had a level greater than 1 ng per mL. A similar variability of BK levels was observed during storage of PPP.

The accumulation of kinins in PCs and in PPPs during storage could result from an increased formation, a decreased degradation or a combination of both. In the PPP samples, we observed that the activity of peptidases responsible for degradation of BK and des-Arg⁹-BK is similar to the levels found in healthy reference subjects.¹⁴ Moreover, in a limited number of PPP samples exhibiting high and low kinin concentrations, we could not detect a decline in metalloproteinase activity during storage. The kinetic profile of kinins generation suggests the possibility of two different mechanisms. One involves the activation of the contact system during filtration and storage and a second one could be the activation of fibrinolysis as we and others have previously reported.⁴³⁻⁴⁵ The high variability of kinin levels suggests differences among the different donors. Because the variability of BK levels cannot be explained by differences in the levels of metalloproteinases responsible for BK degradation, in donor use of ACE inhibitors or in PLT concentrations of the PC, there may be genetic differences in the kinin-forming capacity of plasma of donors. Interestingly, missense mutation of Hageman factor associated with an increase protease activity of Hageman factor has been recently described.^{46,47}

The characterization of immunoreactive HK by immunoblotting with an antibody directed against its light chain provided evidence of reduced native HK in PPPs with high levels of BK (data not shown).⁴⁸ When the contact system in PPP samples stored for 5 days was activated by glass beads *in vitro*, the generation of BK was significantly lower in the PPP containing high BK concentrations. These observations indicate a depletion of the kinin-forming capacity of these samples and activation of the contact system during PC storage between Days 0 to 5. These observations are in agreement with the identity of the released kinins, which corresponded to native BK released by plasma kallikrein from HK and its des-Arg⁹ metabolite.

Our results in PPPs have some limitation, however. Our findings do not elucidate the kinin-forming capacity of PLTs in PCs and the mechanism of contact system activation in PC and PPP remains unproven. The composition, the stability, and the physicochemical properties, including the zeta potential of the leukoreduction filter and other possible contributory factors (such as exposure to blood bag plastic material, temperature, and agitation), have not been well described in the scientific literature. Further work in collaboration with the manufacturers of collection bags is needed to evaluate the effects of the above on the contact activation system. Moreover, the observation that the high concentration of BK was only observed in some PCs emphasizes the possibility that

donor-specific factors could play a role in the triggering BK-mediated hypotensive transfusion reaction.⁴⁹

Although increased plasma concentrations of kinins have been documented in patients experiencing ACEi-related acute side effects, the exact amount of kinins needed to be generated to cause hypotensive reactions is not known. The finding that more than 20 percent of whole blood-derived PCs prepared and stored for 5 days under standard blood bank conditions contain high concentrations of BK suggests that hypotensive transfusion reactions could occur after massive transfusion of stored PCs, particularly in patients being treated with an ACEi. The identification of the susceptible patients taking ACE inhibitors and the use of freshly prepared PCs could limit the occurrence of these adverse events.

Further studies of the kinin levels in PCs on Day 7 needs to be investigated because the maximum duration of storage of PCs is expected to extend from 5 to 7 days soon. In addition, it is unknown whether apheresis PLTs generate the same amount of BK during storage. In the future, the results of this study will be used as a reference to define kinin generation during and after plateletpheresis. The continued studies of kinin generation in relation to collection, processing, and storage in collaboration with container, filter, and blood collection equipment manufacturers might result in better approaches to prevent this acute side effect.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Eric Wagner for very constructive comments during the preparation of the manuscript. We thank Nicole Gervais, Marie Joëlle de Grandmont, Annie Beauséjour, and Gérard Boucher for technical assistance and Claudine Côté for the collection of blood donations. The authors also thank Héma-Québec and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec for financial assistance.

REFERENCES

1. Snyder EL. Transfusion reactions. In: Hoffman R, editor. *Hematology: basic principles and practice*. Churchill Livingstone Inc.; 1995. p. 2045-53.
2. Chu RW. Leukocytes in blood transfusion: adverse effects and their prevention. *Hong Kong Med J* 1999;5:280-4.
3. Stack G, Snyder EL. Cytokine generation in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1994;34:20-5.
4. Aye MT, Palmer DS, Giulivi A, Hashemi S. Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage. *Transfusion* 1995;35:117-24.
5. Wadhwa M, Seghatchian MJ, Lubenko A, et al. Cytokine levels in platelet concentrates: quantitation by bioassays and immunoassays. *Br J Haematol* 1996;93:225-34.

6. Federowicz I, Barrett BB, Andersen JW, et al. Characterization of reactions after transfusion of cellular blood components that are white cell reduced before storage. *Transfusion* 1996;36:21-8.
7. Petranyi GG, Reti M, Harsanyi V, Szabo J. Immunologic consequences of blood transfusion and their clinical manifestations. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;114:303-15.
8. Zoon KC, Jacobson ED, Woodcock J. Hypotension and bedside leukocyte reduction filters. *Int J Trauma Nurs* 1999;5:121-2.
9. Cyr M, Hume HA, Champagne M, et al. Anomaly of the des-Arg9-bradykinin metabolism associated with severe hypotensive reactions during blood transfusions: a preliminary study. *Transfusion* 1999;39:1084-8.
10. Cyr M, Eastlund T, Blais C Jr, et al. Bradykinin metabolism and hypotensive transfusion reactions. *Transfusion* 2001;41:136-50.
11. Hume HA, Adam A. Hypotensive transfusion reactions. In: Popovsky MA, editor. *Transfusion reactions*. Bethesda: American; 2001. p. 213-33.
12. Arnold DM, Molinaro G, Warkentin TE, et al. Hypotensive transfusion reactions can occur with blood products that are leukoreduced before storage. *Transfusion* 2004;44:1361-6.
13. Decarie A, Raymond P, Gervais N, et al. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* 1996;271(4 Pt 2):H1340-7.
14. Cyr M, Lepage Y, Blais C Jr, et al. Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H275-83.
15. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, et al. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 2005;99:6-38.
16. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, et al. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 2005;57:27-77.
17. Hild M, Soderstrom T, Egberg N, Lundahl J. Kinetics of bradykinin levels during and after leucocyte filtration of platelet concentrates. *Vox Sang* 1998;75:18-25.
18. Takahashi TA, Abe H, Hosoda M, et al. Bradykinin generation during filtration of platelet concentrates with a white cell-reduction filter. *Transfusion* 1995;35:967.
19. Takahashi TA, Abe H, Fujihara M, et al. Quality of platelet components: the role of suspension medium and leukocyte depletion. *Transfus Clin Biol* 1994;1:481-7.
20. Shiba M, Tadokoro K, Sawanobori M, et al. Activation of the contact system by filtration of platelet concentrates with a negatively charged white cell-removal filter and measurement of venous blood bradykinin level in patients who received filtered platelets. *Transfusion* 1997;37:457-62.
21. Takahashi TA, Hosoda M, Abe H, Sekiguchi S. Bradykinin formation in a platelet concentrate filtered with a leukocyte-removal filter made of nonwoven polyester fibers with a negatively charged surface. *Transfusion* 1994;34(Suppl):S22.
22. Davenport RD, Penezina OP. Cleavage of high molecular weight kininogen induced by filtration of platelet concentrates. *Transfusion* 1997;37(Suppl):104S.
23. Molinaro G, Adam A, Lepage Y, et al. Hypotensive reaction during staphylococcal protein A column therapy in a patient with anomalous degradation of bradykinin and Des-Arg9-bradykinin after contact activation. *Transfusion* 2002;42:1458-65.
24. Decarie A, Drapeau G, Closset J, et al. Development of digoxigenin-labeled peptide: application to chemiluminoenzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues. *Peptides* 1994;15:511-8.
25. Raymond P, Drapeau G, Raut R, et al. Quantification of des-Arg9-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. *J Immunol Methods* 1995;180:247-57.
26. Blais C Jr, Lapointe N, Rouleau JL, et al. Effects of the vasoepitidase inhibitor omapatrilat on cardiac endogenous kinins in rats with acute myocardial infarction. *Peptides* 2001;22:953-62.
27. Blais C Jr, Marceau F, Rouleau JL, Adam A. The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides* 2000;21:1903-40.
28. Guimaraes JA, Pierce JV, Hial V, Pisano JJ. Methionyl-lysyl-bradykinin: the kinin released by pepsin from human kininogens. *Adv Exp Med Biol* 1976;70:265-9.
29. Molinaro G, Cugno M, Perez M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema is characterized by a slower degradation of des-arginine9-bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:232-7.
30. Adam A, Perez M, Molinaro G, et al. Angiotensin I converting enzyme inhibitor (ACEi) associated angioedema (AE) is characterized by an anomaly of the metabolism of endogenous plasma des-Arg9-bradykinin [abstract]. *Circulation* 2001;104(Suppl II):II-450.
31. Blais C Jr, Marc-Aurele J, Simmons WH, et al. Des-Arg9-bradykinin metabolism in patients who presented hypersensitivity reactions during hemodialysis: role of serum ACE and aminopeptidase P. *Peptides* 1999;20:421-30.
32. Blais C Jr, Rouleau JL, Brown NJ, et al. Serum metabolism of bradykinin and des-Arg9-bradykinin in patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Immunopharmacology* 1999;43:293-302.
33. Sabourin T, Bastien L, Bachvarov DR, Marceau F. Agonist-induced translocation of the kinin B(1) receptor to caveolae-related rafts. *Mol Pharmacol* 2002;61:546-53.
34. Houle S, Larrivee JF, Bachvarova M, et al. Antagonist-induced intracellular sequestration of rabbit bradykinin B(2) receptor. *Hypertension* 2000;35:1319-25.
35. Bachvarov DR, Saint-Jacques E, Larrivee JF, et al. Cloning and pharmacological characterization of the rabbit brady-

- kinin B2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:1623-30.
36. Molinaro G, Carmona AK, Juliano MA, et al. Human recombinant membrane-bound aminopeptidase P. production of a soluble form and characterization using novel, internally quenched fluorescent substrates. *Biochem J* 2005;385 (2):389-97.
 37. Skidgel RA. Human carboxypeptidase N: lysine carboxypeptidase. *Methods Enzymol* 1995;248:653-63.
 38. Miller RG Jr. *Beyond ANOVA: basics of applied statistics*. New York: Wiley; 1986.
 39. Neter J, Wasserman W, Kutner MH. *Applied linear statistical models*. 4th ed. Chicago: Irwin; 1996.
 40. Fried MR, Eastlund T, Christie B, et al. Hypotensive reactions to white cell-reduced plasma in a patient undergoing angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. *Transfusion* 1996;36:900-3.
 41. Adam A, Cugno M, Molinaro G, et al. Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors. *Lancet* 2002;359:2088-9.
 42. Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 1997;90:3819-43.
 43. Molinaro G, Gervais N, Adam A. Biochemical basis of angioedema associated with recombinant tissue plasminogen activator treatment: an in vitro experimental approach. *Stroke* 2002;33:1712-6.
 44. Ewald GA, Eisenberg PR. Plasmin-mediated activation of contact system in response to pharmacological thrombolysis. *Circulation* 1995;91:28-36.
 45. Kleniewski J, Blankenship DT, Cardin AD, Donaldson V. Mechanism of enhanced kinin release from high molecular weight kininogen by plasma kallikrein after its exposure to plasmin. *J Lab Clin Med* 1992;120:129-39.
 46. Dewald G, Bork K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:1286-9.
 47. Wiggins RC. Kinin release from high molecular weight kininogen by the action of Hageman factor in the absence of kallikrein. *J Biol Chem* 1983;258:8963-70.
 48. Schmaier AH, Schutsky D, Farber A, et al. Determination of the bifunctional properties of high molecular weight kininogen by studies with monoclonal antibodies directed to each of its chains. *J Biol Chem* 1987;262:1405-11.
 49. Colman RW, Scott CF. Hypotensive reactions during transfusion: is bradykinin the culprit? *Transfusion* 1999;39:107-9. ■

CHAPITRE V

CONTRIBUTION OF COAGULATION AND FIBRINOLYSIS IN

THE GENERATION OF KININS

Contribution of Coagulation and Fibrinolysis in the Generation of Kinins

Moreau ME, Désormeaux A, Fortin J-P, Rivard G-É, Tucci M, Lepage Y, Brown NJ,
Gauthier F, Marceau F, Adam A

En préparation

La nature des effets secondaires aigus varie avec le contexte clinique et leur mécanisme exact n'a pas encore été élucidé. Outre la présence de l'agent pharmacologique et d'un facteur déclenchant conduisant à la libération de kinines, leur aspect multifactoriel a mis en évidence leur nature écogénétique résultant de la conjonction simultanée de différents facteurs tant métaboliques que génétiques, pathologiques et pharmacologiques. Bien que l'activation du système de contact du plasma soit considérée comme la voie kinino-formatrice principale, le mécanisme kinino-formateur demeure toutefois inconnu dans l'AO. Afin de tenter d'élucider le mécanisme physiopathologique responsable de l'AO, cet article explore le pouvoir kinino-formateur de la plasmine, de la thrombine et du facteur Xa consécutif à l'activation de la fibrinolyse et de la voie intrinsèque de la coagulation.

En tant que premier auteur, ma participation à l'article repose sur ma collaboration aux travaux de recherche, à l'interprétation, en partie, des résultats et à la rédaction de l'article. D'autres expériences associées à cet article sont en cours au laboratoire et donc une révision de l'article devra être effectuée afin d'intégrer ces nouveaux résultats.

Abstract

Classically, there are two main pathways by which kinins are generated: the plasma and the tissue kallikrein-kinin systems. In addition to these kallikreins, other serine proteases have been reported to have a kinin-forming capacity. The main objective of this study was to characterize the kininogenase activity of plasma kallikrein (KK), plasmin, factor Xa, and thrombin, in a purified system. Moreover, we evaluated the kinetic profile of kinin generation in a whole blood system. Bradykinin (BK) released from both low- and high-molecular-weight kininogens was measured with a specific competitive enzyme immunoassay and used to calculate the kinetic parameters for the different kininogenase activities. The kinetic profile of kinin released in whole blood during coagulation and fibrinolysis was evaluated in parallel with the kinetic profile of the tensile strength of clot during its formation and dissolution as monitored by thromboelastography. In the purified system, BK was released not only by plasma KK but also by plasmin and, to a lesser extent, by factor Xa. In the case of thrombin, release of both BK and kallidin was detected. In the whole blood system, the kinins generation was higher when coagulation was initiated by the contact pathway than when it was triggered by the tissue factor pathway. The triggering of fibrinolysis dramatically potentiated the release of des-Arg⁹-BK. Although plasma KK is considered as the main kinin-forming enzyme, other serine proteases involved in coagulation and in fibrinolysis are able to release kinins and could potentially contribute to certain pathologies where kinins play an active role.

Keywords. Bradykinin, des-Arg⁹-BK, fibrinolysis, plasmin, thromboelastography, kininogens

5.1 Introduction

In human and in most mammals, the term «kinin» usually refers to the nonapeptide, bradykinin (BK: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), the decapeptide, kallidin (KD: Lys-BK) and their carboxy-terminal des-Arg metabolites. BK and KD exert their pharmacological activities by binding to specific B₂ receptors while des-Arg⁹-BK and des-Arg¹⁰-KD bind to B₁ receptors. The nature, the properties and the pharmacological consequences of their activation have been extensively and recently reviewed (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). By virtue of their ability to activate endothelial cells, leading to vasodilatation, increased vascular permeability, tissue-type plasminogen activator (tPA) release, production of nitric oxide (NO), and mobilization of arachidonic acid, they participate in physiological (regulation of blood pressure, renal and cardiac functions) and pathological processes like inflammation (Moreau, Garbacki et al. 2005).

Classically, the tissue and plasma kallikreins are considered the two main kinin-forming enzymes (Moreau, Garbacki et al. 2005). Low-molecular-weight kininogen (LK) has been reported to be the preferred substrate of tissue kallikrein from which it releases KD (Mahabeer and Bhoola 2000). In plasma, prekallikrein is transformed to the active serine protease, kallikrein (KK), during the activation of the contact system of coagulation (Kaplan, Joseph et al. 1997). Plasma kallikrein releases BK from high-molecular-weight kininogen (HK). In addition to tissue and plasma KK, other proteases involved in coagulation (factors Xa and IIa) and in fibrinolysis (plasmin) have been shown to have a kinin-forming capacity (Dobrovolsky and

Titaeva 2002). However most of the available results regarding these different kininogenase activities have been obtained either with biological methods that measure the pharmacological activity of BK *ex vivo* on isolated organs or by physicochemical methods that detect kininogen cleavage products. These analytical approaches did not allow the quantitative assessment of kinetic parameters of the different kininogenases, nor for comparison of the kinin-forming capacity of the different coagulation and fibrinolysis pathways in human whole blood.

The primary aim of this study was to characterize quantitatively and qualitatively the kininogenase activity of plasma KK, plasmin, factor Xa, and thrombin (factor IIa), incubated with human HK and LK. For this purpose, we measured immunoreactive BK release from both precursors using a specific competitive enzyme immunoassay and we calculated the kinetic parameters that characterize these kinin-forming activities. As kinins were quantified with antibodies specifically raised against the COOH-part of the B₂ agonist, we confirmed the nature of the NH₂-part of the immunoreactive BK using an immunoreactive profile coupled with an HPLC separation. Moreover, its pharmacological activity was assessed using a receptor assay. The second aim of this study was to evaluate and characterize the kinetic profiles of immunoreactive BK and des-Arg⁹-BK released when the tissue factor and the contact pathways of coagulation as well as the fibrinolytic system were triggered in whole blood and monitored by thromboelastography.

5.2 Materials and Methods

5.2.1 Reagents

BK, des-Arg⁹-BK, KD and des-Arg¹⁰-KD were purchased from Peninsula Laboratories (Belmont, CA). Human plasma kallikrein, high- and low-molecular-weight kininogen were purchased from Calbiochem (a brand of EMD Biosciences, Inc. San Diego, CA), plasmin and factor Xa from Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN), and factor IIa from Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN) and from Haematologic Technologies Inc. (Essex Junction, VT, USA). The purity of enzymes was $\geq 95\%$. Recombinant hirudin was acquired from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), Innovin from Dade Behring Inc. (Marburg, Germany), recombinant tissue plasminogen activator from Genentec (Genentech Inc, San Francisco, CA, USA), STA-PTT A from Diagnostica STAGO (Asnières, France), and potato carboxypeptidase U (TAFI) inhibitor from Sigma-Aldrich. The TEG[®] Hemostasis Analyzers equipped with research software for the determination of the first derivative were obtained from Haemoscope Corporation (Niles, IL, USA).

5.2.2 Kinin releasing capacity of different coagulation factors and plasmin

5.2.2.1 Kinetic parameters of the different kininogenase activities

Incubation conditions. The incubation conditions are summarized in Table 1. HK or LK was incubated at 37°C for 1 hour in the presence of the following proteases: plasma KK, plasmin, factor IIa and Xa in a total volume of 50 μ l (0.1 M HEPES

buffer, pH 7.4). These conditions (duration of incubation, enzyme and substrate concentrations) were selected in a pilot study to obtain a proportion of substrate hydrolysis of $\leq 10\%$ calculated as the number of moles of immunoreactive BK released per mole of kininogen.

The hydrolysis reaction was stopped by adding 450 μl of cold absolute ethanol. After a 4-hour incubation period at 4°C , proteins were eliminated by centrifugation (30 min, 10 000g) and, 400 μl aliquots of the ethanol-based supernatant were decanted and evaporated to dryness in a SpeedVac system.

Preincubation of four NIH units of purified human factor IIa with 4, 8, 20 and 40 anti-thrombin units of recombinant hirudin for 1 hour at 37°C was used to confirm the specificity of the kinin-forming capacity of this protease.

Measurement of immunoreactive kinins. Immunoreactive BK was measured in the residues of evaporated ethanolic extracts redissolved in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 100 mM NaCl and 0.05% Tween-20. BK was quantified by a specific competitive enzyme immunoassay (EIA), as described previously (Decarie, Drapeau et al. 1994; Raymond, Drapeau et al. 1995). This method uses purified polyclonal IgG raised against the COOH-terminal portion of the peptide responsible for the B_2 receptor pharmacological activities. KD and BK are 100% cross-reactive with the antibodies raised against the COOH-part of BK. Neither des-Arg⁹-BK, nor des-Arg¹⁰-KD cross react in this system.

Kinetic parameters. K_m and k_{cat} were calculated by the non-linear regression data analysis using GraphPad Prism version 4 for Windows (GraphPad Software, San

Diego, CA, USA). The k_{cat}/K_m values were calculated as the ratio of these two determined parameters.

5.2.2.2 Identification of the NH₂-part of immunoreactive BK

HPLC separation. HK and LK were incubated with various proteases under the conditions described above. Evaporation residues of the ethanolic extracts were dissolved in 200 µl of 5 mM KH₂PO₄, pH 3.0, 25% acetonitrile with 1.0% H₃PO₄. HPLC separation was achieved with a Agilent 1100 Series system (Agilent Technologies Canada, Mississauga, CA) equipped with a 2-sulfoethyl aspartamin column (PolySULFOETHYL A TM, The Nest Group inc, Southboro, MA), and using a linear gradient of KCl (0-300 mM) in 5 mM KH₂PO₄, 25% acetonitrile (v/v), pH 3.0, during 30 min. Samples were collected at a flow rate of 1 ml/min. The eluted fractions were evaporated before quantification of immunoreactive BK as described above.

5.2.2.3 Pharmacological characterization of immunoreactive BK

Radioreceptor assay. To verify the receptor binding capabilities of kininogen-derived peptides, a radioreceptor assay was designed that is based on fluorescent rabbit B₂ receptors stably expressed in HEK 293 cells (B₂R-GFP) (Houle, Larrivee et al. 2000; Sabourin, Bastien et al. 2002). Lyophilized samples of kininogen digested by an excess of protease were dissolved and further diluted in the buffer specific for the assay and used as competitors of the binding of a fixed radioligand concentration (3 nM [³H]BK for B₂R-GFP). The sample concentrations were expressed as BK and

determined using control competition curves obtained with unlabeled authentic peptide. This assay is based on the knowledge of the structure-activity relationships: KD has an approximate equal affinity to that of BK for the recombinant rabbit B₂ receptor, whereas des-Arg¹⁰-KD or any BK fragment have negligible affinities (Bachvarov, Saint-Jacques et al. 1995). Thus, the information is structurally complementary to that obtained from the EIAs.

5.2.3 Kinin-forming capacity associated with the contact and the tissue factor coagulation pathways and with fibrinolysis in whole blood

5.2.3.1 Blood samples

Whole blood was obtained by a two-syringe technique from 7 healthy volunteers. Blood was anticoagulated with 3.2% buffered citrate in a 9:1 proportion. The tubes were capped and kept undisturbed for 30 min at 37°C. None of these volunteers was being treated with an angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitor. Moreover, values of aminopeptidase P, ACE and carboxypeptidase N measured in citrated plasma were higher or equal to the mean of the reference activities previously published (Cyr, Lepage et al. 2001).

5.2.3.2 Activation of the tissue factor and of the contact coagulation pathways and fibrinolysis

Thrombelastography studies were performed as described by Sorensen *et al* (Sorensen, Johansen et al. 2003) with modifications to allow the measurement of thrombin generation at different time points during the clot formation monitored by TEG[®] (Rivard, Brummel-Ziedins et al. 2005). With this technology, several

parameters corresponding to the rate of development of the tensile strength of the forming clot are produced from the first derivative of the waveform generated by TEG[®]. The TEG[®] reaction cups were preloaded with 20 µl of CaCl₂ (200 mM) and 10 µl of Innovin diluted 1/1000 in PBS/albumin 4%, pH 7.4, or 10 µl of undiluted STA-PTT A; in some experiments, as indicated, 10µl of recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA, 3 µg/ml) was used. At the time of starting the reaction, 320 µl of citrated whole blood was added to the cup, and the recording was initiated. Four TEG[®] units (eight reaction cups) were used simultaneously. At given time points (5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 and 180 min), the recording was stopped and the whole reaction cup was quickly dropped into 3.6 ml of ice-cold pure ethanol. After vortexing for 10 s, the mixture was kept on melting ice until the end of the experiment (about 40 min). Specimens were centrifuged at 3 000g for 10 min, and the supernatants were evaporated to dryness for quantification of immunoreactive kinins.

5.2.3.2 Measurement of immunoreactive kinins

The concentrations of both immunoreactive kinins (BK, des-Arg⁹-BK) were used to assess the kinin-forming capacity of the tissue factor and the contact coagulation pathways without and with the presence of rt-PA. Immunoreactive BK was measured as described above. Immunoreactive des-Arg⁹-BK was quantified using a similar analytical approach (Raymond, Drapeau et al. 1995). Des-Arg⁹-BK and des-Arg¹⁰-KD exhibit identical 100% immunoreactivity for the C-terminal peptide-specific antibodies. Neither BK nor KD cross-react in the assay and various kinin

metabolites present less than 0.1% cross reactivity. The nature of the immunoreactive peptides was confirmed using HPLC separation as described above.

5.3.4 Statistical analysis

The area under the curve (AUC) for immunoreactive BK and des-Arg⁹-BK was calculated by summing the areas of the adjacent quadrilaterals obtained by joining the kinin concentrations measured at consecutive times. The means of the AUC for the tissue factor and the contact coagulation pathways, without and with rt-PA, were compared using a two-way analysis of variance with repeated measurements of the two factors.

5.3 Results

5.3.1 Kinin releasing capacity of different coagulation factors and plasmin

5.3.1.1 Kinetic parameters of the different kininogenase activities

Values of K_m and of k_{cat}/K_m calculated for immunoreactive BK when HK and LK are hydrolyzed by plasma KK, plasmin, factors Xa and IIa are summarized in Table 1. K_m values for each protease and both substrates were calculated from Lineweaver-Burk plots. All K_m values were similar and most of them were in the micromolar range. k_{cat} values were also deduced from the $1/V_m$ intercepts on the y axis of linear plots, using the following equation: $V_m = k_{cat} \cdot Et$, with Et = the protease concentration used in the assay. The specificity constants (k_{cat}/K_m) were calculated from experimental values (Table 1) and showed that plasmin was almost as efficient as plasma KK to release immunoreactive kinins from LK and HK. Although factor IIa and factor Xa bind to LK and HK, they are by far less efficient than KK and plasmin to cause release of immunoreactive kinins.

5.3.1.2 Characterization of immunoreactive BK by HPLC coupled with immunograms

Figure 1 presents the immunoreactivity profiles after HPLC separation of kinins released when LK was incubated with the different serine proteases for 1 hour. Immunoreactivity at the retention time of BK (24.0 min) could be detected when LK was incubated with plasma KK, plasmin and factor Xa (data not shown for FXa). Under the same chromatography conditions, a second peak of immunoreactivity was

measured at the retention time of KD (30 min) when LK was incubated in presence of factor IIa.

Similar immunoreactivity profiles were detected when HK was incubated with KK, plasmin, factor Xa and thrombin. Des-Arg⁹-BK and des-Arg¹⁰-KD were not detected as direct reaction products of pure enzymes and kininogens.

5.3.1.3 Specificity of thrombin

The specificity of thrombin was determined by measuring the influence of recombinant hirudin, a highly selective inhibitor, on the release of BK and KD from HK and LK. As shown in Figure 2, both peaks of immunoreactive kinins decreased progressively with increasing concentrations of hirudin.

5.3.1.4 Radioreceptor assay of immunoreactive BK generated by the action of purified serine proteases on pure kininogens

The assay based on the competition of [³H]BK binding to recombinant rabbit B₂ receptors allowed monitoring biologically relevant kinins formed from pure kininogens by excess serine proteases during a standard 60 min reaction period. As expected, plasma KK produced abundant quantities of BK-like activity (which includes KD, as the latter is approximately equipotent at the rabbit B₂ receptor) from LK (50 µg substrate per tube with 1 µg KK generated 70 pmol/tube of BK-like activity) and from HK (10 µg substrate with 10 µg enzyme generated 250 pmol/tube of BK). Plasmin (1 or 2 µg/tube) produced large amounts of BK-like activity (65 and 500 pg/tube, respectively) from either LK or HK (50 or 60 µg/tube of substrate,

respectively), but more efficiently from HK. Factor Xa and IIa produced small amounts of BK-related peptides (<15 pg/tube over 4 h, data not shown).

5.3.2 Kinin-forming capacity associated with the tissue factor and contact coagulation pathways and with the fibrinolysis pathway in whole blood

5.3.2.1 Activation of the tissue factor and contact pathways and of fibrinolysis

Figures 3 and 4 show the mean kinetic profile ($n=7$) of immunoreactive BK and des-Arg⁹-BK measured in whole blood and presented in parallel with thromboelastography recording when either the tissue factor or the contact coagulation pathway was triggered without or with the activation of fibrinolysis. In either case, triggering both coagulation pathways in the absence of rt-PA leads to release of immunoreactive BK peaking early (5 min) at the time of the clot formation. The presence of des-Arg⁹-BK is also detected but delayed in time (90 min), with higher concentrations measured between 10-20 minutes. The simultaneous activation of coagulation and fibrinolysis does not modify the kinetic profile of BK but has an important effect on that of des-Arg⁹-BK. A second wave of des-Arg⁹-BK occurs that is delayed in time and whose kinetic profile corresponds to the clot lysis detected by thromboelastography.

Calculation of the area under the curve (AUC) permitted comparison of the total quantity of BK or des-Arg⁹-BK released under different conditions (Figure 5). A two-way variance analysis of the AUC showed that there is no interaction between the tissue factor and the contact coagulation pathways, in the absence or presence of fibrinolysis activation, with regard to BK release ($p=0.594$). Moreover, addition of rt-

PA does not affect BK release in whole blood whether or not activation of the tissue factor or the contact coagulation pathway is induced ($p=0.798$). However, when compared with the tissue factor pathway, activation of the contact pathway leads to a significantly greater level of BK generation ($p=0.018$). For des-Arg⁹-BK, no interaction was noted between the coagulation pathways regardless of whether fibrinolysis was induced ($p=0.065$). In this case as well, accumulation of des-Arg⁹-BK is significantly higher for the contact coagulation pathway compared to the tissue factor pathway ($p=0.007$). Moreover, the presence of rt-PA significantly increased ($p=0.037$) the AUC in both cases.

5.3.2.2 Characterization of immunoreactive kinins by HPLC

B₂ and B₁ receptor agonists are present in the early phase of activation. B₂ receptor agonists (BK and KD) were detected after 5 minutes of activation, for the different incubation procedures (data not shown). The proportion of KD and its active metabolite des-Arg¹⁰-KD associated with activation of the tissue factor pathway was notably higher, accounting for more than 50% of the immunoreactivity detected. For the late phase of activation (90-120 min), only des-Arg⁹-BK could be detected as the final metabolite of all forms.

5.4 Discussion

In this paper, we show that several serine proteases which play a pivotal role in the tissue factor (factors IIa and Xa) and in the contact (KK) activation pathways of coagulation and clot lysis (plasmin) are able to release immunoreactive kinins from high- and low-molecular-weight kininogen. The values of the kinetic parameters measured *in vitro* and the metabolic profiles obtained for activated whole blood *ex vivo* argue for a physiological relevance of these observations. These results obtained by measurement and characterization of immunoreactive kinins not only complete but also extend our understanding of kinins. In prior publications, kininogenase activity of different serine (Rocha e Silva, Beraldo et al. 1949; Habal, Burrowes et al. 1976; Donaldson and Kleniewski 1977; Donaldson and Kleniewski 1979; Kleniewski, Donaldson et al. 1982) but also thiol proteases (Scott, Whitaker et al. 1993; Imamura, Pike et al. 1994; Herwald, Collin et al. 1996; Desmazes, Gauthier et al. 2001) has been reported using mainly two analytical approaches: the measurement of BK pharmacological activity released from HK in isolated animal organs and the detection of immunoreactive fragments of HK and LK (Kerbiriou and Griffin 1979; Mori, Sakamoto et al. 1981; Muller-Esterl, Vohle-Timmermann et al. 1982; Wiggins 1983; Kleniewski and Donaldson 1987; Kleniewski, Blankenship et al. 1992). The analytical performances did not allow calculation of kinetic parameters. To the best of our knowledge, these different kininogenase activities have not been quantitatively compared, the NH₂-terminal part of the B₂ receptor agonist released from both LK and HK has not been documented, and the kinin-forming capacity of the tissue

factor and contact coagulation pathways and fibrinolysis has not been characterized, nor paralleled with the kinetics of clot formation and lysis.

In the present study, the use of purified kininogen and proteases coupled with specific and sensitive immunoassays allowed for the first time the calculation of K_m values for the four enzymes under study. Interestingly, all K_m values were similar in the micromolar range. Indeed, we have previously reported that the mean plasma concentrations of HK and LK are respectively 0.750 μM and 2.73 μM (Adam, Albert et al. 1985). At these physiological concentrations, either LK or HK could be used as a substrate by these different serine proteases. Although there is affinity for both kininogens, the turnover of hydrolysis of both substrates is higher for plasma KK. The best substrate for these serine proteases seems to be HK due to its high affinity for the four proteases, particularly for plasmin ($k_{cat}/K_m=175.93 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). On the other hand, LK was hydrolyzed by this enzyme with a high k_{cat} value, but with a >2-fold decrease in catalytic efficiency due to its low affinity for the enzyme suggesting that, under optimal conditions, HK appears to be the preferred natural substrate for plasmin. The k_{cat}/K_m ratios, which relate the rate of HK and LK cleavage to the concentration of free enzyme, were lower for the enzyme factors Xa and IIa. However, HK and LK with plasma KK, and HK with plasmin showed the best k_{cat}/K_m values, which was due mainly to their high affinity for the enzyme. These results, however, must be interpreted with caution because no active site titration of the proteases was done before measuring kinetic parameters.

Although the kinetic data obtained reflect the overall reaction leading to the release of biologically active kinin, the linear plots observed suggest that one cleavage reaction is rate limiting. Because kininogen is cleaved in a two-step process (Tayeh, Olson et al. 1994), it is likely that the rate limiting cleavage occurs at the NH₂-terminal side of the kinin moiety and determines if KD or BK is to be released. The plasma concentrations of HK and LK previously mentioned are in the same order of magnitude as the K_m values for the protease interactions with these substrates (Table 1), indicating that substrate limitation may also play a role *in vivo* in determining the rate at which kinins are liberated both in the circulation and extravascularly.

Given that the nature of the immunoquantification requires the use of antibodies specific for the COOH-part of B₂ and B₁ receptor agonists, we have characterized the NH₂-terminal part of both peptides released by a physicochemical method. Using both these approaches, we could confirm that BK is released by plasma KK either from LK and HK, and that this peptide is also the hydrolysis product of plasmin and factor Xa acting on both kinin precursors. However in the case of factor IIa, we were able to measure the simultaneous and specific release of KD and BK from HK and LK.

The data described in this study provide new insight into the mechanisms of kinin-forming systems and demonstrate that enzymes other than KK also have kininogenase activity pointing to the possible existence of alternative pathways for kinin production. Thus, although KK presents a much faster mechanism for kinin generation in solution, it is not the only pathway for kinin generation. Other

pathways, which are slower but capable of substantial kinin release, exist via the direct action of plasmin, factors Xa and IIa on both kininogens.

When applied to whole blood, these analytical approaches show that the kinin-forming capacity of the contact coagulation pathway was higher than that of the tissue factor pathway. These results not only confirm the kinetic parameters obtained in a purified system but also show that the anti-proteases present in whole blood are not able to completely inhibit the generation of kinins. The thromboelastographic profile suggests that the kinetics of BK release correspond to the point where maximum generation of thrombin takes place, as previously reported (Rivard, Brummel-Ziedins et al. 2005). The peak generation of des-Arg⁹-BK appears later presumably due to the fact that this kinin is a product of BK metabolism (Cyr, Lepage et al. 2001). The presence of leukocytes and platelets in whole blood does not modify the metabolic profile of both BK and des-Arg⁹-BK already observed in the plasma contact activation system; these results do not suggest a direct and important kinin-forming capacity of enzymes released from these cells, at least in our experimental approach. The addition of rt-PA simultaneously with the triggering of the coagulation pathways does not significantly modify the metabolic profiles of BK but has a dramatic effect on that of des-Arg⁹-BK. Given that purified plasmin does not generate des-Arg⁹-BK directly when incubated with LK and HK, these results suggest that another pathway is responsible for the direct release of this kinin from its precursors. Two carboxypeptidases could be responsible for this formation of des-Arg⁹-BK: carboxypeptidase U (CPU) and carboxypeptidase N (CPN). As the preincubation of whole blood with a specific CPU (TAFI) inhibitor does not modify

the kinetic profile of des-Arg⁹-BK (data not shown), this carboxypeptidase is most probably not responsible for the synthesis of the B₁ receptor agonist. CPN which is initially activated by plasmin before being inactivated by it could potentially be responsible for the generation of des-Arg⁹-BK when rt-PA is added to whole blood in our experimental conditions (Quagraine, Tan et al. 2005). A direct or indirect effect of rt-PA and/or plasmin to reduce the activity of the enzyme(s) responsible for degradation of des-Arg⁹-BK cannot be excluded. These observations also suggest a major role for plasmin in kinin generation in whole blood, mainly with regard to des-Arg⁹-BK and des-Arg¹⁰-KD and corroborate observations of Cugno *et al* who have reported a significant activation of fibrinolysis during an angioedema episode (Cugno, Hack et al. 1993). Both these observations imply that this pathway plays a major role in the pathophysiology of these localized inflammatory reactions.

Finally, our results point to an important role of B₁ receptor agonists, des-Arg⁹-BK and des-Arg¹⁰-KD, which are present in all experiment conditions and particularly in the late phase of clot lysis. Native KD, effectively formed by thrombin in the present experiments, is itself a nanomolar potency agonist of the human recombinant B₁ receptor (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). The kinetic profiles of immunoreactive BK and des-Arg⁹-BK must be compared by taking into consideration an important difference of their respective receptors: B₂ receptors are rapidly desensitized after interaction with their agonist, whereas B₁ receptors do not exhibit this distinctive feature (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005).

Addendum

ME Moreau and A Désormeaux participated in the biochemical investigations, the interpretation of the results and the writing of the paper. F Marceau and J-P Fortin were in charge of the pharmacological investigations and the interpretation of the results. F Gauthier was involved in the analysis and interpretation of the kinetic data. NJ Brown participated in the clinical interpretation of the results and the writing of the paper. Y Lepage was in charge of the statistical analysis. G-E Rivard was in charge of the TEG study and participated in the interpretation of the results and the writing of the paper. M Tucci participated in the writing of the paper. A Adam supervised the different aspect of this manuscript and was the principal investigator.

Acknowledgments

We would like to thank Drs Guy Boileau and Adriana Carmona for very constructive comments during the preparation of this manuscript. We thank Josée Robillard and Nicole Gervais for technical assistance.

Dedication

This paper is dedicated to Dr Robert W. Colman on the occasion of his retirement. Dr Colman, a worldwide recognized leader in the kallikrein-kininogen-kinin domain was a precious help for my integration (AA) in North America.

References

1. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, et al. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 2005;57(1):27-77.
2. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, et al. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 2005;99(1):6-38.
3. Mahabeer R, Bhoola KD. Kallikrein and kinin receptor genes. *Pharmacol Ther* 2000;88(1):77-89.
4. Kaplan AP, Joseph K, Shibayama Y, et al. The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation. *Adv Immunol* 1997;66:225-72.
5. Dobrovolsky AB, Titaeva EV. The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochemistry (Mosc)* 2002;67(1):99-108.
6. Decarie A, Drapeau G, Closset J, et al. Development of digoxigenin-labeled peptide: application to chemiluminescence enzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues. *Peptides* 1994;15(3):511-8.
7. Raymond P, Drapeau G, Raut R, et al. Quantification of des-Arg⁹-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. *J Immunol Methods* 1995;180(2):247-57.
8. Sabourin T, Bastien L, Bachvarov DR, et al. Agonist-induced translocation of the kinin B(1) receptor to caveolae-related rafts. *Mol Pharmacol* 2002;61(3):546-53.
9. Houle S, Larrivee JF, Bachvarova M, et al. Antagonist-induced intracellular sequestration of rabbit bradykinin B(2) receptor. *Hypertension* 2000;35(6):1319-25.
10. Bachvarov DR, Saint-Jacques E, Larrivee JF, et al. Cloning and pharmacological characterization of the rabbit bradykinin B2 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275(3):1623-30.
11. Cyr M, Lepage Y, Blais C, Jr., et al. Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281(1):H275-83.

12. Sorensen B, Johansen P, Christiansen K, et al. Whole blood coagulation thrombelastographic profiles employing minimal tissue factor activation. *J Thromb Haemost* 2003;1(3):551-8.
13. Rivard GE, Brummel-Ziedins KE, Mann KG, et al. Evaluation of the profile of thrombin generation during the process of whole blood clotting as assessed by thrombelastography. *J Thromb Haemost* 2005;3(9):2039-43.
14. Rocha e Silva M, Beraldo W, Rosenfeld G. Bradykinin, hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol* 1949;156:261-273.
15. Habal FM, Burrowes CE, Movat HZ. Generation of kinin by plasma kallikrein and plasmin and the effect of alpha1-antitrypsin and antithrombin III on the kinongenases. *Adv Exp Med Biol* 1976;70(00):23-36.
16. Donaldson VH, Kleniewski J. Kinin release from high molecular weight kininogen by thrombin. *Fed. Proc.* 1977;26:329.
17. Donaldson VH, Kleniewski J. The role of plasmin in kinin-release by preparations of human thrombin. *Thromb Res* 1979;16(3-4):401-6.
18. Kleniewski J, Donaldson VH, Wagner CJ. Some molecular and functional changes in high molecular weight kininogen induced by plasmin and trypsin. *Thromb Res* 1982;25(5):387-99.
19. Scott CF, Whitaker EJ, Hammond BF, et al. Purification and characterization of a potent 70-kDa thiol lysyl- proteinase (Lys-gingivain) from *Porphyromonas gingivalis* that cleaves kininogens and fibrinogen. *J Biol Chem* 1993;268(11):7935-42.
20. Imamura T, Pike RN, Potempa J, et al. Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. *J Clin Invest* 1994;94(1):361-7.
21. Herwald H, Collin M, Muller-Esterl W, et al. Streptococcal cysteine proteinase releases kinins: a virulence mechanism. *J Exp Med* 1996;184(2):665-73.
22. Desmazes C, Gauthier F, Lalmanach G. Cathepsin L, but not cathepsin B, is a potential kininogenase. *Biol Chem* 2001;382(5):811-5.
23. Mori K, Sakamoto W, 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)* 1981;90(2):503-9.

24. Kerbiriou DM, Griffin JH. Human high molecular weight kininogen. Studies of structure-function relationships and of proteolysis of the molecule occurring during contact activation of plasma. *J Biol Chem* 1979;254(23):12020-7.
25. Kleniewski J, Blankenship DT, Cardin AD, et al. Mechanism of enhanced kinin release from high molecular weight kininogen by plasma kallikrein after its exposure to plasmin. *J Lab Clin Med* 1992;120(1):129-39.
26. Kleniewski J, Donaldson VH. Comparison of human high molecular weight kininogen digestion by plasma kallikrein and by plasmin. A revised method of purification of high molecular weight kininogen. *J Lab Clin Med* 1987;109(4):469-79.
27. Muller-Esterl W, Vohle-Timmermann M, Boos B, et al. Purification and properties of human low molecular weight kininogen. *Biochim Biophys Acta* 1982;706(2):145-52.
28. Wiggins RC. Kinin release from high molecular weight kininogen by the action of Hageman factor in the absence of kallikrein. *J Biol Chem* 1983;258(14):8963-70.
29. Adam A, Albert A, Calay G, et al. Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values. *Clin Chem* 1985;31(3):423-6.
30. Tayeh MA, Olson ST, Shore JD. Surface-induced alterations in the kinetic pathway for cleavage of human high molecular weight kininogen by plasma kallikrein. *J Biol Chem* 1994;269(23):16318-25.
31. Quagraine MO, Tan F, Tamei H, et al. Plasmin alters the activity and quaternary structure of human plasma carboxypeptidase N. *Biochem J* 2005;388(Pt 1):81-91.
32. Cugno M, Hack CE, de Boer JP, et al. Generation of plasmin during acute attacks of hereditary angioedema. *J Lab Clin Med* 1993;121(1):38-43.

Figure Legends

Figure 1. Typical elution profile of immunoreactive kinins after HPLC chromatography. (A) UV absorbance profile (wavelength 214 nm) of reference peptides: #1 des-Arg⁹-BK (retention time: 18.6 min); #2 BK (retention time: 24.1 min); #3 Lys-des-Arg⁹-BK (retention time: 24.7 min); and #4 KD (retention time: 29.8 min). Immunoreactive kinins released by incubation of low-molecular-weight kininogen with plasma kallikrein (B), plasmin (C), and thrombin (D) for 1 hour.

(■BK, ■KD)

Figure 2. Specificity of the kininogenase activity of thrombin. Preincubation for 1 hour of thrombin with increasing concentrations of recombinant hirudin decreases progressively and in a similar manner the quantities of immunoreactive BK and KD released from HK (A) and LK (B), after HPLC chromatography.

Figure 3. Kinetic profiles of BK and des-Arg⁹-BK comparatively with thrombus formation. The tissue factor and contact coagulation pathways are activated in whole blood. Bottom panel represent the thromboelastogram.

Figure 4. Kinetic profiles of BK and des-Arg⁹-BK presented in parallel with thrombus formation and lysis. The tissue factor and contact coagulation pathways are activated in whole blood in the presence of rt-PA. Bottom panel represent the thromboelastogram.

Figure 5. Area under the curves (AUC) of immunoreactive BK and des-Arg⁹-BK. AUC of immunoreactive BK (A) and des-Arg⁹-BK (B) released in whole blood when the tissue factor and contact coagulation pathways are activated alone or in presence of rt-PA.

Table 1. Incubation conditions and kinetic constants for the hydrolysis of HK and LK by kallikrein, plasmin, factors IIa and Xa for immunoreactive BK

	Incubation Conditions		Kinetic Parameters for Immunoreactive BK	
	[Enz] μM	[HK] μM	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
Kallikrein	0.003	0.130-8.333	1.46 ± 0.09	126.36
Plasmin	0.036	0.104-6.666	0.44 ± 0.05	175.93
Factor IIa	0.546	0.104-6.666	1.20 ± 0.23	1.46
Factor Xa	0.696	0.104-6.666	0.35 ± 0.05	0.18
	[Enz] μM	[LK] μM	K_m (μM)	k_{cat}/K_m ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)
Kallikrein	0.047	0.195-3.125	1.76 ± 1.14	318.70
Plasmin	0.024	0.195-7.813	3.78 ± 0.58	80.67
Factor IIa	1.366	0.195-7.813	3.08 ± 0.19	0.62
Factor Xa	0.696	0.195-12.500	3.32 ± 0.37	0.27

Figure 1.

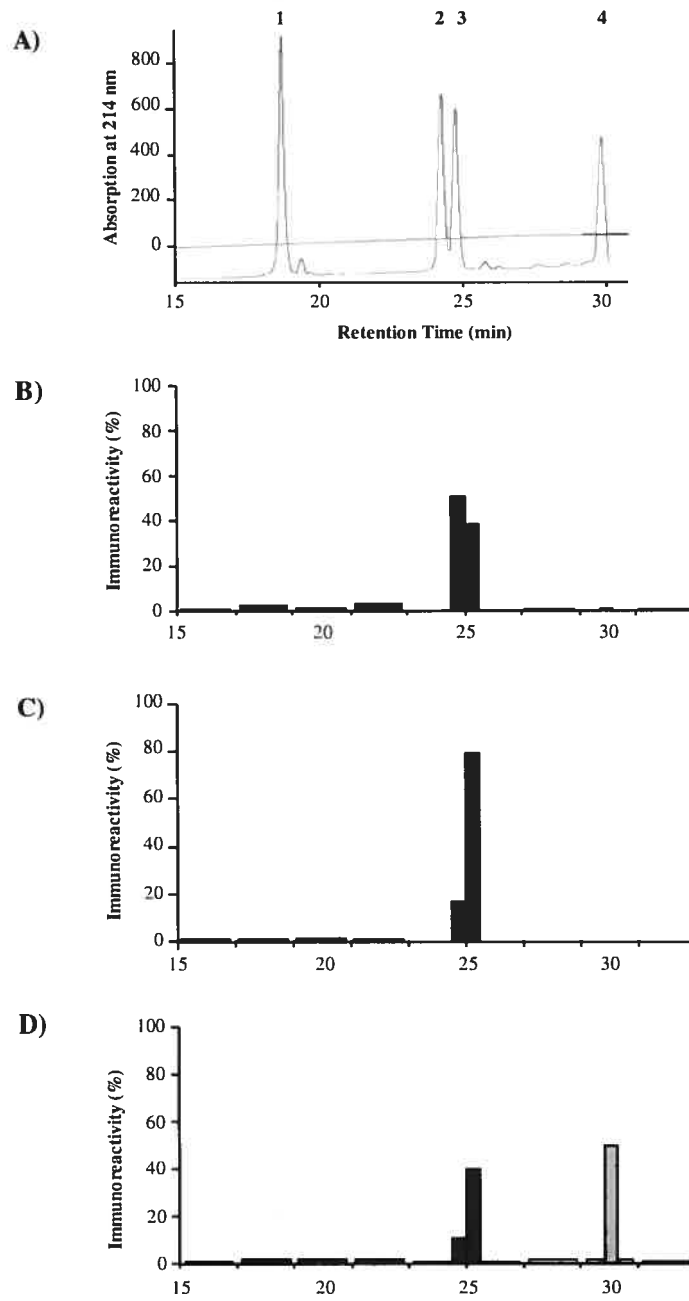


Figure 2.

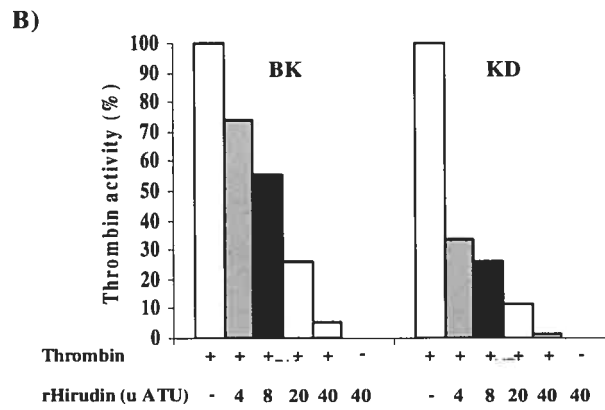
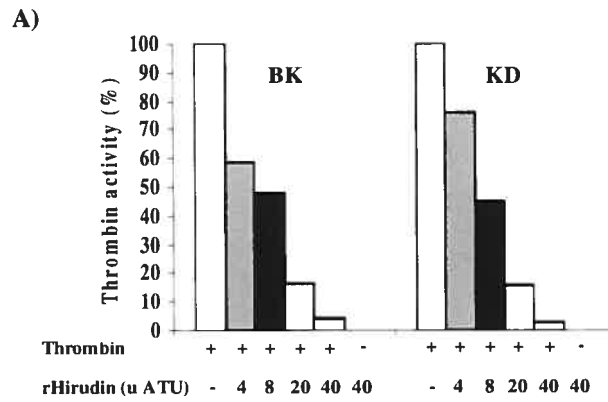


Figure 3.

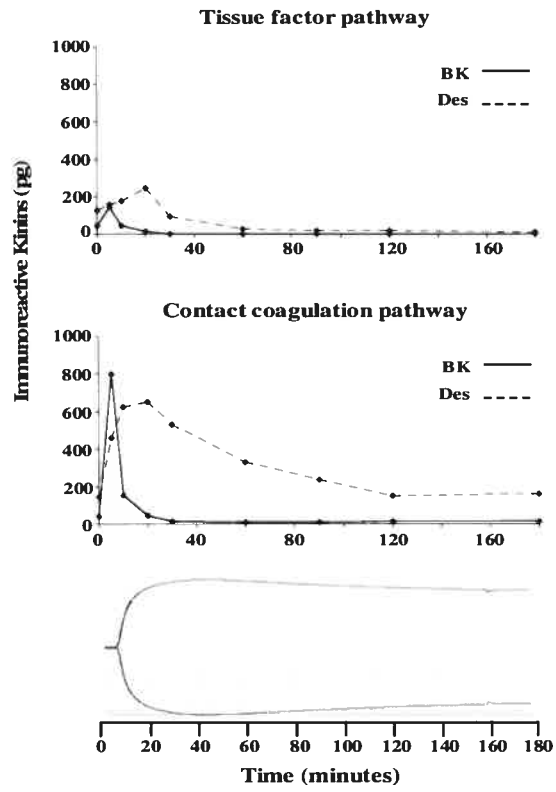


Figure 4.

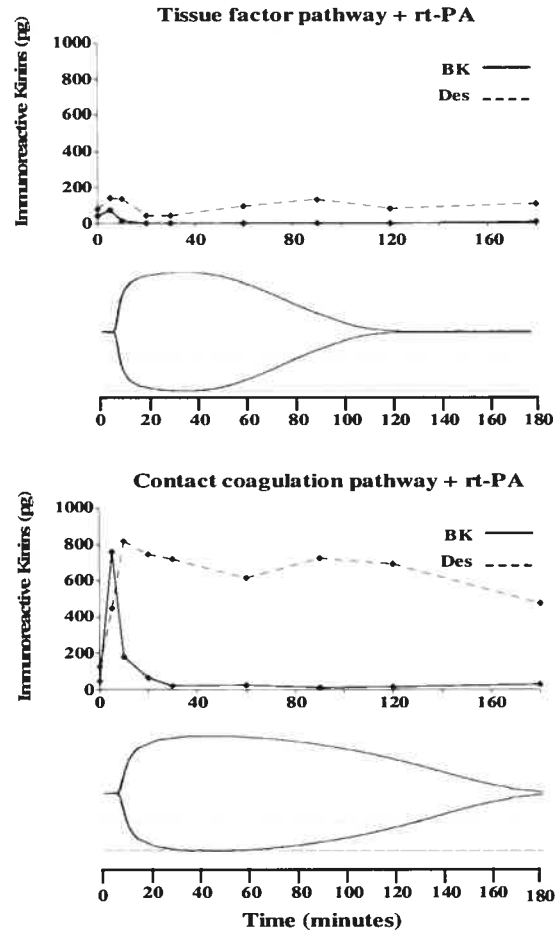
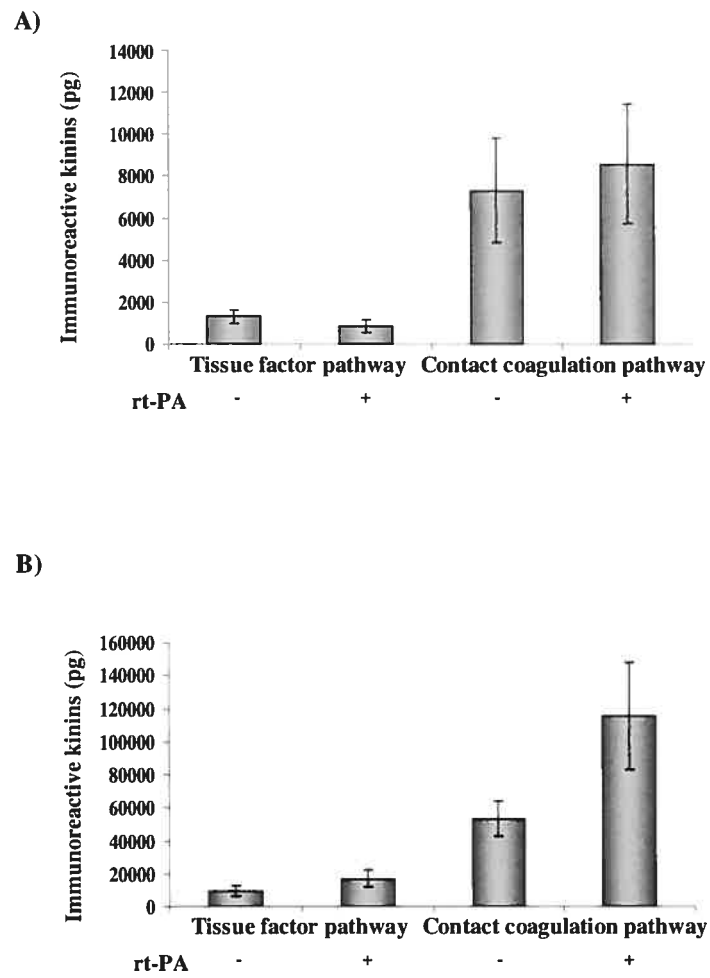


Figure 5.



CHAPITRE VI
DISCUSSION & CONCLUSION

Les bases physiopathologiques des effets secondaires associés aux inhibiteurs de l'ECA résultent traditionnellement d'une accumulation de peptides inflammatoires tels que la BK et son métabolite actif, la des-Arg⁹-BK, laissant présager une anomalie du catabolisme de ces kinines. Bien que la dégradation des kinines soit théoriquement moindre chez tous les utilisateurs d'iECA, ces réactions adverses ne surviennent que de façon inégale, imprévisible et chez une minorité de patients. L'ensemble des démarches expérimentales antérieurement entreprises dans notre laboratoire a montré la complexité de la physiopathologie de l'angioœdème, des réactions anaphylactoïdes et d'hypotension sévères associés aux iECA.

Selon diverses observations cliniques et expérimentales, l'hypothèse suivante a été émise : différents dans leur présentation clinique, les effets secondaires aigus associés aux traitements au moyen d'un iECA partagent une physiopathologie semblable. Cet aspect physiopathologique est de nature multifactorielle et résulte de la conjonction d'au moins trois facteurs qui sont de nature pharmacologique, physicochimique et métabolique. De nombreux travaux menés précédemment dans notre laboratoire sont venus étayer cette hypothèse.

L'activation du système de contact du plasma est classiquement considérée comme la voie responsable de la libération de la BK, associée à la symptomatologie de la réaction anaphylactoïde en hémodialyse et de la réaction d'hypotension sévère lors de transfusions sanguines. Ainsi, l'activation *in vitro* du système de contact au moyen de billes de verre a permis de définir les profils métaboliques de la BK et de la des-Arg⁹-

BK endogène chez une population saine dite de référence (Cyr, Lepage et al. 2001). L'incubation du plasma humain en présence d'un iECA augmente le temps de demi-vie de la BK et de la des-Arg⁹-BK. De même, l'injection du sulfate de dextran chez le lapin anesthésié et traité au moyen d'un iECA entraîne une hypotension sévère qui s'accompagne d'une diminution significative du pouvoir kinino-formateur du plasma (Sabourin, Guay et al. 2001). La définition du métabolisme plasmatique des kinines a permis de définir la nature et la contribution relative des différentes kininases. En présence d'un iECA, l'aminopeptidase P devient la voie métabolique principale de la BK et la seule voie de dégradation de la des-Arg⁹-BK (Blais, Marc-Aurele et al. 1999; Blais, Rouleau et al. 1999). C'est précisément un déficit de la forme membranaire de l'aminopeptidase P qui est responsable de l'accumulation de la des-Arg⁹-BK lors de l'activation du système de contact dans les plasmas de patients ayant présenté un angioœdème (Molinaro, Cugno et al. 2002), une réaction anaphylactoïde (Blais, Marc-Aurele et al. 1999) ou une réaction d'hypotension sévère (Arnold, Molinaro et al. 2004) associés à la prise d'un iECA. L'activité diminuée de l'isoforme membranaire de l'aminopeptidase P humaine au niveau du plasma dépend entre autres de déterminants géniques qui ont été identifiés (Duan, Nikpoor et al. 2005). Plus récemment, une inhibition non spécifique de cette enzyme par le captopril a également été mise en évidence (Molinaro, Duan et al. 2006). Le mécanisme déclenchant de l'angioœdème reste tout de même à ce jour inconnu. Cependant, par analogie avec d'autres types d'œdèmes, il pourrait résulter d'une modification locale du pH bien connue pour son pouvoir activateur de différentes kininogénases (Kaplan and Greaves 2005).

Le but de ce travail de doctorat consiste à préciser la nature multifactorielle des complications aiguës associées aux iECA et ce, en étudiant de façon plus approfondie leurs aspects pharmacologiques en premier lieu et en explorant de nouvelles voies kinino-formatrices en deuxième lieu. Les études menées dans notre laboratoire a montré une anomalie du métabolisme des kinines portant de façon préférentielle sur la des-Arg⁹-BK due à une activité diminuée ou nulle de l'aminopeptidase P et ne peut avoir de signification physiopathologique que dans la mesure où le récepteur B₁ inductible au cours de l'inflammation est présent. Deux évidences cliniques plaident pour une participation de ce récepteur B₁ dans la symptomatologie de tels effets indésirables. D'une part, l'étude OCTAVE a montré une incidence d'angioedème supérieure chez les patients hypertendus fumeurs présentant des signes d'inflammation oropharyngée (Kostis, Packer et al. 2004; Kostis, Kim et al. 2005). D'autre part, les patients dialysés ayant présenté une réaction anaphylactoïde ont des marqueurs d'inflammation systémique élevés au niveau plasmatique (Molinaro, Duan et al. 2006). Afin d'approcher la signification physiopathologique d'une accumulation de l'agoniste B₁ lors de l'activation du système de contact du plasma, nous avons précisé la régulation de l'expression de son récepteur. Dans une première partie du projet (**Chapitre II : Expression of metallopeptidases and kinin receptors in swine oropharyngeal tissues : effects of ACE inhibition and inflammation**), nous avons comparé l'effet d'un traitement chronique et aigu au moyen d'un iECA à celui du lipopolysaccharide sur l'expression de ce récepteur chez le porc. Nous avons montré qu'à une concentration inhibitrice de l'ECA, un traitement chronique mais non aigu associé à une hausse théorique des taux de BK induit

l'expression du récepteur B₁ au niveau de différents tissus dont la zone oropharyngée, site de prédilection de la réaction angioœdémateuse. Cette synthèse du récepteur B₁ nous amène à nous interroger sur le mécanisme particulier sous-tendant celle-ci. En effet, cette néosynthèse ne semble pas dépendre de l'inflammation puisque les leucocytes et la protéine C-réactive plasmatique, protéine de la phase aiguë de l'inflammation, ont chez les porcs traités au moyen d'un iECA des concentrations similaires à celles mesurées dans le groupe témoin et ce, contrairement aux animaux traités au LPS.

Ces résultats nous amènent à nous interroger sur une fonction nouvelle des iECA dont l'utilisation semble conduire à l'activation de voies de signalisation intracellulaires dans des cellules endothéliales en culture pouvant jouer un rôle dans l'induction du récepteur B₁ (Ignjatovic, Tan et al. 2002; Ignjatovic, Stanisavljevic et al. 2004). Comme différents facteurs sont susceptibles d'induire la synthèse du récepteur B₁, les iECA pourraient aussi être impliqués. Afin d'aborder ce problème de régulation de l'expression du récepteur B₁, nous avons étudié l'effet de différents agents pharmacologiques sur le niveau d'expression du récepteur B₁ dans un modèle de cellules de muscle lisse de l'artère ombilicale humaine en culture (**Chapitre III : *Role of NF-κB and protein kinase C signaling in the expression of the kinin B₁ receptor in human vascular smooth muscle cells***). Les résultats obtenus nous ont permis de montrer que deux types de stimuli peuvent réguler l'expression du récepteur B₁ : ceux augmentant la stabilité de l'ARNm seulement (ex. sérum, cycloheximide) et d'autres qui, en plus vont activer la translocation du facteur de transcription nucléaire NF-κB (ex. IL-1β,

phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)). De plus, la sous-unité p65, une composante de l'hétérodimère NF- κ B, est nécessaire pour une stimulation efficace de l'expression du récepteur B₁ par IL-1 β , le sérum et le PMA. Alors, le NF- κ B semble être indispensable à une expression efficace du récepteur B₁ à la surface des cellules de muscle lisse de l'artère ombilicale humaine et l'effet du PMA sur la translocation nucléaire de ce facteur est dépendant de la protéine kinase C, médiateur responsable de la stabilisation de l'ARNm par des stimuli physiologiques. Les mécanismes précis impliqués dans le processus fonctionnel de régulation de l'expression du récepteur B₁ sont donc relayés par des systèmes de seconds messagers impliquant l'activation de la protéine kinase C ainsi que le NF- κ B. Les résultats obtenus illustrent bien la diversité des mécanismes de régulation de l'expression du récepteur B₁ dans un système de cellules primaires d'origine humaine. Cette diversité est possiblement l'explication des situations où l'expression du récepteur B₁ a lieu sans l'apparition d'une inflammation systémique ou d'une liaison possible avec les iECA.

L'activation du système de contact est considérée comme la voie kinino-formatrice principale du plasma. Le mécanisme kinino-formateur associé aux réactions d'hypotension sévères est cependant plus complexe, il dépend également du produit transfusé et donc du receveur. Deux aspects principaux des réactions d'hypotension sévères en transfusion ont été documentés jusqu'à présent : le pouvoir kinino-formateur du processus de leucoréduction d'une part et le facteur métabolique caractérisant la capacité du receveur traité par un iECA à métaboliser la des-Arg⁹-BK d'autre part (Shiba, Tadokoro et al. 1997; Abe, Ikebuchi et al. 1998; Cyr, Hume et al.

1999; Molinaro, Adam et al. 2002). Dans la deuxième partie de nos travaux, nous nous sommes donc posé la question à savoir si le donneur pouvait contribuer à la physiopathologie de la réaction d'hypotension sévère chez un receveur traité au moyen d'un iECA et transfusé dans les conditions recommandées par les agences officielles. Pour ce faire, nous avons documenté la concentration de BK et de des-Arg⁹-BK immunoréactives et pharmacologiquement actives dans 35 concentrés plaquettaires, prélevés dans les conditions standards, leucoréduits ou non et conservés à température ambiante. Ainsi, nous avons montré que la conservation des concentrés plaquettaires dans les conditions préconisées par les agences officielles conduit à la formation de kinines (**Chapitre IV : *Generation of kinins during preparation and storage of whole blood-derived platelet concentrates***). En effet, il a été possible de confirmer que le processus de leucoréduction est responsable d'une kininogène formation, modeste cependant, avec épuisement du kininogène de haut poids moléculaire et impliquant des médiateurs plasmatiques. À notre grande surprise, nous avons montré que la préparation et les conditions de conservation peuvent induire l'accumulation graduelle de kinines, BK et des-Arg⁹-BK, à des concentrations culminant au jour 5, dernier jour de conservation recommandé actuellement. Ces résultats sont étonnants à trois points de vue. D'un aspect quantitatif tout d'abord, les concentrations maximales mesurées au jour 5 pour les préparations filtrées sont supérieures à 100 pg/mL dans 22% des concentrés plaquettaires correspondant à une quantité totale d'environ 24750 pg/mL pour la BK et 12575 pg/mL pour la des-Arg⁹-BK. Ces quantités sont nettement supérieures à celles mesurées dans un foyer inflammatoire chez l'animal de laboratoire (Barlas, Sugio et al. 1985; Tissot, Regoli et

al. 1985; Germain, Barabe et al. 1986) et constituent donc un danger potentiel pour le receveur surtout s'il est traité au moyen d'un iECA et/ou déficient en aminopeptidase P. Bien qu'il ait été démontré que la concentration de kinines au niveau du plasma de patients ayant présenté un effet secondaire aigu associé à la prise d'un iECA était augmentée (Agostoni, Cicardi et al. 1999), la quantité exacte de kinines susceptible de générer une réaction d'hypotension n'est pas connue. Ces résultats sont aussi surprenants par leur distribution qualitative, toujours au jour 5, où la nature de la partie amino-terminale des kinines générées dans les concentrés plaquettaires lors de la conservation élucidée par des approches physicochimiques et pharmacologiques confirme la génération de la BK, relâchée par l'action de la kallibréine sur les kininogènes lors de l'activation du système de contact et de son métabolite actif, la des-Arg⁹-BK. La concentration de la des-Arg⁹-BK demeure plus élevée que la BK et ce tout au long de la période de conservation des concentrés plaquettaires expliquée en partie par une demi-vie de dégradation significativement plus courte pour la BK. De plus, une variabilité des concentrations des kinines est observée parmi les donneurs. Cette non uniformité des résultats nous amène à nous poser la question suivante : l'accumulation de kinines est-elle plus importante dans les concentrés plaquettaires de certains donneurs et ce, sans qu'il y ait affaïssement d'activité des métallopeptidases responsables du métabolisme de ces peptides? Ces résultats suggèrent plutôt une kinino-formation accrue chez certains donneurs. Bien que nous n'ayons pas de réponses à cette observation originale, nous ne pouvons exclure une susceptibilité de nature génétique de certaines protéases (facteur XII, prékallibréine) ou de leurs substrats (kininogène de haut poids moléculaire). En effet,

un polymorphisme a réellement été montré au niveau du gène codant pour le facteur de Hageman (Wiggins 1983; Dewald and Bork 2006; Duponchel, Djenouhat et al. 2006). À ce polymorphisme est associée une différence d'activabilité. Le troisième fait insigne que met en évidence cette étude est le mécanisme qui conduit à la libération des kinines tant dans le concentré de plaquettes que dans son plasma correspondant. Cette kinino-formation ne semble pas dépendre de l'activation du système de contact par une surface chargée négativement, plus lent que ce dernier il serait indépendant de la présence de charges négatives puisque le potentiel Zeta des contenants en polychlorure de vinyle dans lesquels le sang est conservé est près de zéro. Les profils cinétiques de génération des kinines suite à l'activation du système de contact des plasmas correspondants aux concentrés plaquettaires suggèrent la possibilité de deux différents mécanismes. Le premier impliquerait l'activation du système de contact lors de la filtration et de la conservation, et le second pourrait être l'activation de la fibrinolyse comme nous et d'autres l'ont reporté précédemment (Kleniewski, Blankenship et al. 1992; Ewald and Eisenberg 1995; Molinaro, Gervais et al. 2002).

Ces résultats nous ont amené à explorer et comparer le pouvoir kinino-formateur des voies intrinsèque et extrinsèque de la coagulation ainsi que de la fibrinolyse. En plus de la kallikréine plasmatique et tissulaire, d'autres protéases à sérine des voies de la coagulation et de la fibrinolyse possèdent une activité kininogénase potentielle et pourraient jouer un rôle dans des pathologies différentes où les kinines semblent être impliquées comme dans les réactions d'hypotension sévères. Nous avons donc

étudié le potentiel kinino-formateur de différentes protéases à sérine (**Chapitre V : *Contribution of coagulation and fibrinolysis in the generation of kinins***). Pour ce faire, nous avons dans un premier temps caractérisé quantitativement et qualitativement l'activité kininogénase de la kallicréine plasmatique, de la thrombine (facteur IIa), du facteur Xa et de la plasmine. À cette fin, nous avons mesuré les kinines immunoréactives libérées par le clivage des deux précurseurs, kininogènes de haut et de faible poids moléculaire, et nous avons calculé les constantes de cinétique enzymatique. Bien que la kallicréine plasmatique soit considérée comme la principale enzyme impliquée dans la génération des kinines, la plasmine possède un effet comparable. Ainsi dans un système purifié, la BK est libérée non seulement par la kallicréine plasmatique mais aussi par la plasmine et plus faiblement par le facteur Xa. Dans le cas de la thrombine, nous montrons une libération de la BK mais aussi de la kallidine à partir des deux kininogènes. Dans un deuxième temps, nous avons étudié de façon cinétique la quantité et la nature des kinines libérées dans le sang total lorsque la voie extrinsèque ou intrinsèque de la coagulation est activée seule ou simultanément avec la fibrinolyse dans un système de thromboélastogramme. Dans l'étude du tracé thromboélastographique du sang total, nous montrons que comme dans le plasma l'activation du système de contact est la voie principale qui conduit à la libération de la BK. Le pouvoir kinino-formateur résultant de l'activation de la voie du facteur tissulaire est mineur lorsque comparé à la précédente. Cette observation plaide contre une participation de cette voie kinino-formatrice en tant que pourvoyeuse de kinines dans certaines pathologies dont le choc septique tel qu'il a été suggéré (Camerer, Kolsto et al. 1996; Hotchkiss and Karl 2003). L'activation de

la fibrinolyse par l'addition de rt-PA simultanément avec l'activation des voies de la coagulation quant à elle ne modifie pas de façon significative le profil métabolique de la BK mais s'accompagne d'une vague tardive et importante de la des-Arg⁹-BK qui semble être indépendante de la BK et qui pourrait être due à l'activation d'une protéase d'origine cellulaire puisque ce phénomène n'est pas observé dans le plasma. Un effet direct et indirect du rt-PA et/ou de la plasmine sur l'enzyme responsable de la dégradation de la des-Arg⁹-BK ne peut être exclu. Si l'activation de la voie extrinsèque de la coagulation est quantitativement peu importante, elle conduit cependant à la formation de la kallidine et de son métabolite actif la des-Arg¹⁰-kallidine, agoniste le plus puissant du récepteur B₁. Ce travail proposait donc un mécanisme physiologique possible de kinino-formation, qui ne passe pas par l'activation du système de contact du plasma, et qui pourrait être à l'origine de la génération des peptides responsables de la réaction d'hypotension sévère lors d'un traitement par un iECA. De plus, les résultats obtenus dans cette étude démontrent que des enzymes autres que la kallibréine ont aussi une activité kininogénase prouvant l'existence possible de voies alternatives pour la génération des kinines. Bien que la voie impliquant la kallibréine soit le mécanisme le plus rapide pour la génération de kinines en solution, elle n'est pas la seule voie kinino-formatrice. D'autres voies, plus lentes mais capables de libérer une quantité substantielle de kinines, existent via l'action directe de la plasmine et des facteurs IIa et Xa sur les kininogènes de haut ou de faible poids moléculaire. Cependant, même si la thrombine et le facteur Xa peuvent libérer *in vitro* la BK à partir des kininogènes de haut et de faible poids moléculaire, les constantes de cinétique enzymatique calculées

ne permettent pas de leur assurer un rôle physiologique important. Finalement, nos résultats démontrent que les agonistes du récepteur B₁, des-Arg⁹-BK et des-Arg¹⁰-kallidine, présents dans toutes les conditions expérimentales et particulièrement dans la phase tardive de la lyse du caillot, sont possiblement les médiateurs d'importance dans ces réactions indésirables associés aux iECA.

En conclusion, bien qu'ils soient efficaces dans le traitement de diverses maladies cardiovasculaires, les inhibiteurs de l'ECA se caractérisent par des effets secondaires aigus dont la nature varie avec le contexte clinique. Ces réactions indésirables rares, mais potentiellement mortelles, possèdent des mécanismes physiopathologiques que partiellement définis. Ce travail de doctorat principalement consacré aux voies kinino-formatrices et à la régulation de l'expression du récepteur B₁ a contribué de façon significative à la connaissance de la physiopathologie multifactorielle des complications aiguës associées aux iECA. Nous avons mis en évidence qu'à une concentration inhibitrice de l'ECA, un traitement chronique induit l'expression du récepteur B₁ au niveau de la zone oropharyngée, site de prédilection de la réaction angioœdémateuse, que cette néosynthèse semble indépendante de l'inflammation et que les mécanismes de régulation de l'expression du récepteur B₁ sont relayés par des systèmes de seconds messagers impliquant l'activation de la protéine kinase C ainsi que le NF-κB. Nous avons montré que la préparation et les conditions de conservation préconisées par les agences officielles peuvent induire l'accumulation graduelle de kinines et confirmé que le processus de leucoréduction est responsable d'une kinino-formation. Finalement, nous avons exploré des voies alternes de la kininogénèse, notamment par le biais de d'autres protéases à sérine ainsi que par l'activation des voies de la coagulation et de la fibrinolyse.

Nos travaux ouvrent des perspectives nouvelles de recherches dans différents domaines. Tout d'abord, il sera nécessaire de déterminer le mécanisme kinino-formateur local responsable du déclenchement de la réaction inflammatoire associée à l'AO et d'identifier la part respective des kinines et des neurokinines dans la

réaction angioœdémateuse. Deuxièmement, il sera intéressant d'identifier le mécanisme par lequel un traitement chronique au moyen d'un iECA conduit à l'induction du récepteur B₁. Il serait aussi nécessaire de déterminer l'origine de la des-Arg⁹-BK lors de l'activation de la fibrinolyse. Enfin, il faudra élucider le rôle des kinines dans les réactions inflammatoires associées à différents biomatériaux.

CHAPITRE VII
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (2005). "Icatibant: HOE 140, JE 049, JE049." Drugs R D **6**(4): 239-44.
- AbdAlla, S., J. Godovac-Zimmermann, et al. (1996). "Structure of the bradykinin B2 receptors' amino terminus." Biochemistry **35**(23): 7514-9.
- Abe, H., K. Ikebuchi, et al. (1998). "Hypotensive reactions with a white cell-reduction filter: activation of kallikrein-kinin cascade in a patient [letter; comment] [see comments]." Transfusion **38**(4): 411-2; discussion 413-5.
- Adam, A., A. Albert, et al. (1985). "Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values." Clin Chem **31**(3): 423-6.
- Adam, A., M. Cugno, et al. (2002). "Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors." Lancet **359**(9323): 2088-9.
- Adomeit, A., A. Graness, et al. (1999). "Bradykinin B(2) receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in COS-7 cells requires dual signaling via both protein kinase C pathway and epidermal growth factor receptor transactivation." Mol Cell Biol **19**(8): 5289-97.
- Agostoni, A., E. Aygoren-Pursun, et al. (2004). "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.
- Agostoni, A., L. Bergamaschini, et al. (1980). "Treatment of acute attacks of hereditary angioedema with C1-inhibitor concentrate." Ann Allergy **44**(5): 299-301.
- Agostoni, A. and M. Cicardi (1992). "Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients." Medicine (Baltimore) **71**(4): 206-15.
- Agostoni, A., M. Cicardi, et al. (1999). "Angioedema due to angiotensin-converting enzyme inhibitors." Immunopharmacology **44**(1-2): 21-5.
- Akbary, A. M., K. J. Wirth, et al. (1996). "Efficacy and tolerability of Icatibant (Hoe 140) in patients with moderately severe chronic bronchial asthma." Immunopharmacology **33**(1-3): 238-42.
- Akizawa, T., E. Kinugasa, et al. (1994). "Effect of dialysis membranes and ACE inhibitor on bradykinin levels during hemodialysis." Clin Nephrol **41**(4): 241-4.
- Alhenc-Gelas, F., J. A. Weare, et al. (1983). "Measurement of human converting enzyme level by direct radioimmunoassay." J Lab Clin Med **101**(1): 83-96.
- Allinson, T. M., E. T. Parkin, et al. (2004). "The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein." Eur J Biochem **271**(12): 2539-47.
- Alston, T. A. (2004). "Aprotinin." Int Anesthesiol Clin **42**(4): 81-91.
- Anderson, M. W. and R. D. deShazo (1990). "Studies of the mechanism of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor-associated angioedema: the effect of an ACE inhibitor on cutaneous responses to bradykinin, codeine, and histamine." J Allergy Clin Immunol **85**(5): 856-8.
- Antczak, C., I. De Meester, et al. (2001). "Ectopeptidases in pathophysiology." Bioessays **23**(3): 251-60.

- Aptecar, E., E. Teiger, et al. (2000). "Effects of bradykinin on coronary blood flow and vasomotion in transplant patients." *J Am Coll Cardiol* **35**(6): 1607-15.
- Arnold, D. M., G. Molinaro, et al. (2004). "Hypotensive transfusion reactions can occur with blood products that are leukoreduced before storage." *Transfusion* **44**(9): 1361-6.
- Asher, J. R. and A. J. Naftilan (2000). "Vasopeptidase inhibition: a new direction in cardiovascular treatment." *Curr Hypertens Rep* **2**(4): 384-91.
- Austin, C. E., A. Faussner, et al. (1997). "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.
- Babiuk, C., F. Marceau, et al. (1982). "Kininases and vascular responses to kinins." *Eur J Pharmacol* **78**(2): 167-74.
- Bachvarov, D. R., J. F. Hess, et al. (1996). "Structure and genomic organization of the human B1 receptor gene for kinins (BDKRB1)." *Genomics* **33**(3): 374-81.
- Bachvarov, D. R., E. Saint-Jacques, et al. (1995). "Cloning and pharmacological characterization of the rabbit bradykinin B2 receptor." *J Pharmacol Exp Ther* **275**(3): 1623-30.
- Ball, S. G. and W. B. White (2003). "Debate: angiotensin-converting enzyme inhibitors versus angiotensin II receptor blockers--a gap in evidence-based medicine." *Am J Cardiol* **91**(10A): 15G-21G.
- Bao, G., P. Gohlke, et al. (1992). "Chronic kinin receptor blockade attenuates the antihypertensive effect of ramipril." *Hypertension* **20**(1): 74-9.
- Barbe, F., J. B. Su, et al. (1996). "Bradykinin pathway is involved in acute hemodynamic effects of enalaprilat in dogs with heart failure." *Am J Physiol* **270**(6 Pt 2): H1985-92.
- Barker, P. E., M. A. Shipp, et al. (1989). "The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-q27)." *J Immunol* **142**(1): 283-7.
- Barlas, A., K. Sugio, et al. (1985). "Release of T-kinin and bradykinin in carrageenin induced inflammation in the rat." *FEBS Lett* **190**(2): 268-70.
- Barnes, P. J. and M. Karin (1997). "Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases." *N Engl J Med* **336**(15): 1066-71.
- Bas, M., V. Adams, et al. (2007). "Nonallergic angioedema: role of bradykinin." *Allergy* **62**(8): 842-56.
- Bas, M., H. Bier, et al. (2006). "Novel pharmacotherapy of acute hereditary angioedema with bradykinin B2-receptor antagonist icatibant." *Allergy* **61**(12): 1490-2.
- Bascands, J.-L. and J.-P. Girolami (1996). "La bradykinine." *Médecine sciences* **12**(5): 582-592.
- Bascands, J. L., J. P. Schanstra, et al. (2003). "[Bradykinin receptors: towards new pathophysiological roles]." *Med Sci (Paris)* **19**(11): 1093-100.
- Baumgarten, C. R., W. Linz, et al. (1993). "Ramiprilat increases bradykinin outflow from isolated hearts of rat." *Br J Pharmacol* **108**(2): 293-5.
- Beaubien, G., I. Rosinski-Chupin, et al. (1991). "Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein." *Biochemistry* **30**(6): 1628-35.

- Bergaya, S., P. Meneton, et al. (2001). "Decreased flow-dependent dilation in carotid arteries of tissue kallikrein-knockout mice." *Circ Res* **88**(6): 593-9.
- Bernadet-Monrozies, P., L. Rostaing, et al. (2002). "[The effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on the progression of chronic renal failure]." *Presse Med* **31**(36): 1714-20.
- Bhoola, K., R. Ramsaroop, et al. (2001). "Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer." *Biol Chem* **382**(1): 77-89.
- Bhoola, K. D., C. D. Figueroa, et al. (1992). "Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases." *Pharmacol Rev* **44**(1): 1-80.
- Blais, C., Jr., R. Couture, et al. (1997). "Involvement of endogenous kinins in the pathogenesis of peptidoglycan- induced arthritis in the Lewis rat." *Arthritis Rheum* **40**(7): 1327-33.
- Blais, C., Jr., G. Drapeau, et al. (1997). "Contribution of angiotensin-converting enzyme to the cardiac metabolism of bradykinin: an interspecies study." *Am J Physiol* **273**(5 Pt 2): H2263-71.
- Blais, C., Jr., D. Fortin, et al. (2000a). "Protective effect of omapatrilat, a vasopeptidase inhibitor, on the metabolism of bradykinin in normal and failing human hearts." *J Pharmacol Exp Ther* **295**(2): 621-6.
- Blais, C., Jr., J. Marc-Aurele, et al. (1999). "Des-Arg9-bradykinin metabolism in patients who presented hypersensitivity reactions during hemodialysis: role of serum ACE and aminopeptidase P." *Peptides* **20**(4): 421-30.
- Blais, C., Jr., F. Marceau, et al. (2000). "The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins." *Peptides* **21**(12): 1903-40.
- Blais, C., Jr., J. L. Rouleau, et al. (1999). "Serum metabolism of bradykinin and des-Arg9-bradykinin in patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema." *Immunopharmacology* **43**(2-3): 293-302.
- Blukat, A., S. A. Alla, et al. (1996). "Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts." *J Biol Chem* **271**(50): 32366-74.
- Bojanov, G. and K. G. Belani (2005). "APROTININ - An update for the perioperative physician." *Annals of Cardiac Anaesthesia* **8**(1): 75-80.
- Bork, K. and S. E. Barnstedt (2001). "Treatment of 193 episodes of laryngeal edema with C1 inhibitor concentrate in patients with hereditary angioedema." *Arch Intern Med* **161**(5): 714-8.
- Bork, K. and G. Dewald (2004). "Hereditary angioedema type III, angioedema associated with angiotensin II receptor antagonists, and female sex." *Am J Med* **116**(9): 644-5.
- Bork, K., J. Frank, et al. (2007). "Treatment of acute edema attacks in hereditary angioedema with a bradykinin receptor-2 antagonist (Icatibant)." *J Allergy Clin Immunol* **119**(6): 1497-503.
- Bouaziz, H., Y. Joulin, et al. (1994). "Effects of bradykinin B2 receptor antagonism on the hypotensive effects of ACE inhibition." *Br J Pharmacol* **113**(3): 717-22.

- Bouillet, L., D. Ponard, et al. (2000). "[Acquired angioneurotic edema. Clinical and biological characteristics in 9 patients]." Presse Med **29**(12): 640-4.
- Bouillet, L., D. Ponard, et al. (2004). "[Non-histaminic angiodema management: diagnostic and therapeutic interest of tranexamic acid]." Rev Med Interne **25**(12): 924-6.
- Bralet, J. and J. C. Schwartz (2001). "Vasopeptidase inhibitors: an emerging class of cardiovascular drugs." Trends Pharmacol Sci **22**(3): 106-9.
- Braunwald, E., M. J. Domanski, et al. (2004). "Angiotensin-converting-enzyme inhibition in stable coronary artery disease." N Engl J Med **351**(20): 2058-68.
- Bright, R. A., M. E. Torrence, et al. (1999). "Preliminary survey of the occurrence of anaphylactoid reactions during haemodialysis." Nephrol Dial Transplant **14**(3): 799-800.
- Brown, N. J., C. Blais, Jr., et al. (1998). "ACE insertion/deletion genotype affects bradykinin metabolism." J Cardiovasc Pharmacol **32**(3): 373-7.
- Brown, N. J., J. V. Gainer, et al. (2000). "Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release from human forearm vasculature through B(2) receptor-dependent, NO synthase-independent, and cyclooxygenase-independent pathway." Circulation **102**(18): 2190-6.
- Brown, N. J., D. Ryder, et al. (1996). "Differential effects of angiotensin converting enzyme inhibitors on the vasodepressor and prostacyclin responses to bradykinin." J Pharmacol Exp Ther **279**(2): 703-12.
- Burnett, J. C. (2000). "Vasopeptidase inhibition." Curr Opin Nephrol Hypertens **9**(5): 465-8.
- Burnett, J. C., Jr. (1999). "Vasopeptidase inhibition: a new concept in blood pressure management." J Hypertens Suppl **17**(1): S37-43.
- Calixto, J. B., D. A. Cabrini, et al. (2000). "Kinins in pain and inflammation." Pain **87**(1): 1-5.
- Camerer, E., A. B. Kolsto, et al. (1996). "Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation." Thromb Res **81**(1): 1-41.
- Campbell, D. J. (2001). "The kallikrein-kinin system in humans." Clin Exp Pharmacol Physiol **28**(12): 1060-5.
- Campbell, W. B., D. Gebremedhin, et al. (1996). "Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors." Circ Res **78**(3): 415-23.
- Campbell, W. D., E. Lazoura, et al. (2002). "Inactivation of C3a and C5a octapeptides by carboxypeptidase R and carboxypeptidase N." Microbiol Immunol **46**(2): 131-4.
- Campos, M. M., L. V. Mata, et al. (1995). "Expression of B1 kinin receptors mediating paw edema and formalin-induced nociception. Modulation by glucocorticoids." Can J Physiol Pharmacol **73**(7): 812-9.
- Campos, M. M., G. E. Souza, et al. (1998). "Modulation of kinin B1 but not B2 receptors-mediated rat paw edema by IL-1beta and TNFalpha." Peptides **19**(7): 1269-76.

- Campos, M. M., G. E. Souza, et al. (1999). "In vivo B1 kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways." *Br J Pharmacol* **127**(8): 1851-9.
- Cardoso, C. C., T. Garrett, et al. (2004). "Structure and expression of two kininogen genes in mice." *Biol Chem* **385**(3-4): 295-301.
- Cardoso, R. C., B. Lobao-Soares, et al. (2004). "Enhancement of blood-tumor barrier permeability by Sar-[D-Phe8]des-Arg9BK, a metabolically resistant bradykinin B1 agonist, in a rat C6 glioma model." *BMC Neurosci* **5**(1): 38.
- Chahine, R., A. Adam, et al. (1993). "Protective effects of bradykinin on the ischaemic heart: implication of the B1 receptor." *Br J Pharmacol* **108**(2): 318-22.
- Chai, K. X., V. C. Chen, et al. (1997). "Molecular cloning and expression of rat kallistatin gene." *Biochim Biophys Acta* **1353**(3): 277-86.
- Chao, J., R. Q. Miao, et al. (2001). "Novel roles of kallistatin, a specific tissue kallikrein inhibitor, in vascular remodeling." *Biol Chem* **382**(1): 15-21.
- Chappel, M. C. and C. M. Ferrario (2006). "ACE and ACE2: their role to balance the expression of angiotensin II and angiotensin-(1-7)." *Kidney Int* **70**(1): 8-10.
- Chen, L. W., L. Egan, et al. (2003). "The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion." *Nat Med* **9**(5): 575-81.
- Cicardi, M. and L. Zingale (2003). "How do we treat patients with hereditary angioedema." *Transfus Apheresis Sci* **29**(3): 221-7.
- Cicardi, M., L. C. Zingale, et al. (2004). "Angioedema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor use: outcome after switching to a different treatment." *Arch Intern Med* **164**(8): 910-3.
- Cicardi, M., L. C. Zingale, et al. (2003). "Autoantibodies and lymphoproliferative diseases in acquired C1-inhibitor deficiencies." *Medicine (Baltimore)* **82**(4): 274-81.
- Cichon, S., L. Martin, et al. (2006). "Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III." *Am J Hum Genet* **79**(6): 1098-104.
- Clements, J., J. Hooper, et al. (2001). "The expanded human kallikrein (KLK) gene family: genomic organisation, tissue-specific expression and potential functions." *Biol Chem* **382**(1): 5-14.
- Cohen, S. G. (2002). "Pioneers and milestones. Clemens von Pirquet, MD (1874-1929)." *J Allergy Clin Immunol* **109**(4): 722-4.
- Cohen, S. G. and M. Zelaya-Quesada (2002). "Portier, Richet, and the discovery of anaphylaxis: a centennial." *J Allergy Clin Immunol* **110**(2): 331-6.
- Colman, R. W., B. A. Jameson, et al. (2000). "Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostat) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis." *Blood* **95**(2): 543-50.
- Colman, R. W., R. A. Pixley, et al. (1997). "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.

- Cottrell, G. S., N. M. Hooper, et al. (2000). "Cloning, expression, and characterization of human cytosolic aminopeptidase P: a single manganese(II)-dependent enzyme." Biochemistry **39**(49): 15121-8.
- Couture, R., M. Harrisson, et al. (2001). "Kinin receptors in pain and inflammation." Eur J Pharmacol **429**(1-3): 161-76.
- Cruden, N. L., F. N. Witherow, et al. (2004). "Bradykinin contributes to the systemic hemodynamic effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with heart failure." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(6): 1043-8.
- Cugno, M., M. Cicardi, et al. (1994). "Activation of the contact system and fibrinolysis in autoimmune acquired angioedema: a rationale for prophylactic use of tranexamic acid." J Allergy Clin Immunol **93**(5): 870-6.
- Cugno, M., M. Cicardi, et al. (1997). "Activation of the coagulation cascade in C1-inhibitor deficiencies." Blood **89**(9): 3213-8.
- Cugno, M., C. E. Hack, et al. (1993). "Generation of plasmin during acute attacks of hereditary angioedema." J Lab Clin Med **121**(1): 38-43.
- Cushman, D. W., H. S. Cheung, et al. (1977). "Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids." Biochemistry **16**(25): 5484-91.
- Cyr, M., T. Eastlund, et al. (2001). "Bradykinin metabolism and hypotensive transfusion reactions." Transfusion **41**(1): 136-50.
- Cyr, M., H. A. Hume, et al. (1999). "Anomaly of the des-Arg9-bradykinin metabolism associated with severe hypotensive reactions during blood transfusions: a preliminary study." Transfusion **39**(10): 1084-8.
- Cyr, M., Y. Lepage, et al. (2001). "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.
- Damas, J. and G. Remacle-Volon (1982). "[Kinins and oedema induced by different carrageenans (author's transl)]." J Pharmacol **13**(2): 225-39.
- Daugirdas, J. T. and T. S. Ing (1988). "First-use reactions during hemodialysis: a definition of subtypes." Kidney Int Suppl **24**: S37-43.
- Dauil, P., O. Benrezzak, et al. (2005). "Triple vasopeptidase inhibition normalizes blood pressure in conscious, unrestrained, and spontaneously hypertensive rats." Am J Hypertens **18**(12 Pt 1): 1606-13.
- Dauil, P., A. Blouin, et al. (2004). "Triple Vasoepitidase Inhibition of Angiotensinconverting Enzyme/Neutral Endopeptidase/Endothelinconverting Enzyme Activities on the Hemodynamic Profile of Chronically Instrumented Unrestrained Conscious Spontaneously Hypertensive Rats." J Cardiovasc Pharmacol **44**: S398-S401.
- Davis, A. E. (2003). "The pathogenesis of hereditary angioedema." Transfus Apheresis Sci **29**(3): 195-203.
- Davis, A. E., 3rd (1988). "C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema." Annu Rev Immunol **6**: 595-628.
- Davis, A. J. and M. N. Perkins (1994). "Induction of B1 receptors in vivo in a model of persistent inflammatory mechanical hyperalgesia in the rat." Neuropharmacology **33**(1): 127-33.

- de Meester, I., A. M. Lambeir, et al. (2003). "Dipeptidyl peptidase IV substrates. An update on in vitro peptide hydrolysis by human DPPIV." Adv Exp Med Biol **524**: 3-17.
- De Serres, J., A. Groner, et al. (2003). "Safety and efficacy of pasteurized C1 inhibitor concentrate (Berinert((R)) P) in hereditary angioedema: a review." Transfus Apheresis Sci **29**(3): 247-54.
- de Weerd, W. F. and L. M. Leeb-Lundberg (1997). "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.
- de Weerd, W. F. and L. M. Leeb-Lundberg (1997). "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.
- Dean, D. E., D. L. Schultz, et al. (2001). "Asphyxia due to angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor mediated angioedema of the tongue during the treatment of hypertensive heart disease." J Forensic Sci **46**(5): 1239-43.
- deBlois, D. and R. A. Horlick (2001). "Endotoxin sensitization to kinin B(1) receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects." Br J Pharmacol **132**(1): 327-35.
- Decarie, A., A. Adam, et al. (1996). "Effects of captopril and Icatibant on bradykinin (BK) and des [Arg9] BK in carrageenan-induced edema." Peptides **17**(6): 1009-15.
- Decarie, A., G. Drapeau, et al. (1994). "Development of digoxigenin-labeled peptide: application to chemiluminoenzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues." Peptides **15**(3): 511-8.
- Decarie, A., P. Raymond, et al. (1996). "Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat." Am J Physiol **271**(4 Pt 2): H1340-7.
- DeLa Cadena, R. A. and R. W. Colman (1991). "Structure and functions of human kininogens." Trends Pharmacol Sci **12**(7): 272-5.
- Dendorfer, A. and P. Dominiak (2000). "Vasopeptidase inhibition as a new concept in antihypertensive therapy." Kidney Blood Press Res **23**(3-5): 178-9.
- Desmazes, C., F. Gauthier, et al. (2001). "Cathepsin L, but not cathepsin B, is a potential kininogenase." Biol Chem **382**(5): 811-5.
- Dewald, G. and K. Bork (2006). "Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor." Biochem Biophys Res Commun **343**(4): 1286-9.
- Dobrovolsky, A. B. and E. V. Titaeva (2002). "The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components." Biochemistry (Mosc) **67**(1): 99-108.
- Donaldson, V. H. and R. R. Evans (1963). "A Biochemical Abnormality In Hereditary Angioneurotic Edema: Absence Of Serum Inhibitor Of C' 1-Esterase." Am J Med **35**: 37-44.

- Donaldson, V. H. and J. Kleniewski (1977). "Kinin release from high molecular weight kininogen by thrombin." Fed. Proc. **26**: 329.
- Donaldson, V. H. and J. Kleniewski (1979). "The role of plasmin in kinin-release by preparations of human thrombin." Thromb Res **16**(3-4): 401-6.
- Donoghue, M., F. Hsieh, et al. (2000). "A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9." Circ Res **87**(5): E1-9.
- Drapeau, G., D. deBlois, et al. (1991). "Hypotensive effects of Lys-des-Arg9-bradykinin and metabolically protected agonists of B1 receptors for kinins." J Pharmacol Exp Ther **259**(3): 997-1003.
- Dray, A. (1997). "Kinins and their receptors in hyperalgesia." Can J Physiol Pharmacol **75**(6): 704-12.
- Dray, A., I. A. Patel, et al. (1992). "Bradykinin-induced activation of nociceptors: receptor and mechanistic studies on the neonatal rat spinal cord-tail preparation in vitro." Br J Pharmacol **107**(4): 1129-34.
- Dray, A. and M. Perkins (1993). "Bradykinin and inflammatory pain [see comments]." Trends Neurosci **16**(3): 99-104.
- Duan, Q. L., B. Nikpoor, et al. (2005). "A Variant in XPNPEP2 Is Associated with Angioedema Induced by Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors." Am J Hum Genet **77**(4): 617-26.
- Duchene, J., J. P. Schanstra, et al. (2002). "A novel protein-protein interaction between a G protein-coupled receptor and the phosphatase SHP-2 is involved in bradykinin-induced inhibition of cell proliferation." J Biol Chem **277**(43): 40375-83.
- Duka, I., E. Kintsurashvili, et al. (2001). "Vasoactive potential of the b(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension." Circ Res **88**(3): 275-81.
- Dumoulin, M. J., A. Adam, et al. (1998). "Metabolism of bradykinin by the rat coronary vascular bed." Cardiovasc Res **38**(1): 229-36.
- Dumoulin, M. J., A. Adam, et al. (2005). "The cardioprotective effect of dual metallopeptidase inhibition: respective roles of endogenous kinins and natriuretic peptides." Can J Physiol Pharmacol **83**(2): 166-173.
- Dunn, C. J. and K. L. Goa (1999). "Tranexamic acid: a review of its use in surgery and other indications." Drugs **57**(6): 1005-32.
- Duponchel, C., K. Djenouhat, et al. (2006). "Functional analysis of splicing mutations and of an exon 2 polymorphic variant of SERPING1/C1NH." Hum Mutat **27**(3): 295-6.
- Dykewicz, M. S. (2004). "Cough and angioedema from angiotensin-converting enzyme inhibitors: new insights into mechanisms and management." Curr Opin Allergy Clin Immunol **4**(4): 267-70.
- Elliott, D. F., E. W. Horton, et al. (1961). "The isolation of bradykinin, a plasma kinin from ox blood." Biochem J **78**: 60-5.
- Elliott, D. F., G. P. Lewis, et al. (1960). "The structure of bradykinin — A plasma kinin from ox blood." J Physiol **3**(1): 87-91.
- Emanuelli, C., M. Bonaria Salis, et al. (2002). "Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization." Circulation **105**(3): 360-6.

- Emanuelli, C., R. Maestri, et al. (1999). "Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice." Circulation **100**(23): 2359-65.
- Emeis, J. J. and T. Kooistra (1986). "Interleukin 1 and lipopolysaccharide induce an inhibitor of tissue-type plasminogen activator in vivo and in cultured endothelial cells." J Exp Med **163**(5): 1260-6.
- Erdős, E. and R. Skidgel (1997). Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease. The kinin system. S. Farmer. San Diego, Academic Press: 111-141.
- Erdos, E. G. (1975). "Angiotensin I converting enzyme." Circ Res **36**(2): 247-55.
- Erdos, E. G. (1990). "Some old and some new ideas on kinin metabolism." J Cardiovasc Pharmacol **15**(Suppl 6): S20-4.
- Ersahin, C., A. M. Szpaderska, et al. (2005). "Aminopeptidase P isozyme expression in human tissues and peripheral blood mononuclear cell fractions." Arch Biochem Biophys **435**(2): 303-10.
- Ewald, G. A. and P. R. Eisenberg (1995). "Plasmin-mediated activation of contact system in response to pharmacological thrombolysis." Circulation **91**(1): 28-36.
- Farias, N. C., T. Feres, et al. (2004). "Lys-[Leu8,des-Arg9]-bradykinin blocks lipopolysaccharide-induced SHR aorta hyperpolarization by inhibition of Ca(++)- and ATP-dependent K+ channels." Eur J Pharmacol **498**(1-3): 163-9.
- Farmer, S. G., B. A. McMillan, et al. (1991). "Induction of vascular smooth muscle bradykinin B1 receptors in vivo during antigen arthritis." Agents Actions **34**(1-2): 191-3.
- Faussner, A., D. Proud, et al. (1996). Influence of the cytosolic carboxy termini of B1 and B2 receptors on ligand internalization. . Montreal, Canada, International Multidisciplinary Symposium on Peptide Receptor.
- Faussner, A., D. Proud, et al. (1998). "Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B1 and B2 kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization, and signal transduction." J Biol Chem **273**(5): 2617-23.
- Fein, A. M., G. R. Bernard, et al. (1997). "Treatment of severe systemic inflammatory response syndrome and sepsis with a novel bradykinin antagonist, deltibant (CP-0127). Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CP-0127 SIRS and Sepsis Study Group." Jama **277**(6): 482-7.
- Ferreira, S. H. (1965). "A Bradykinin-Potentiating Factor (Bpf) Present In The Venom Of Bothrops Jararca." Br J Pharmacol Chemother **24**: 163-9.
- Ferreira, S. H. and J. R. Vane (1967). "The detection and estimation of bradykinin in the circulating blood." Br J Pharmacol Chemother **29**(3): 367-77.
- Fink, E., H. D. Lemke, et al. (1994). "Kinin generation by hemodialysis membranes as a possible cause of anaphylactoid reactions." Braz J Med Biol Res **27**(8): 1975-83.
- Fogaca, S. E., R. L. Melo, et al. (2004). "Differences in substrate and inhibitor sequence specificity of human, mouse and rat tissue kallikreins." Biochem J **380**(Pt 3): 775-81.

- Fortin, J. P., L. Gera, et al. (2005). "Endogenous aminopeptidase N decreases the potency of peptide agonists and antagonists of the kinin B1 receptors in the rabbit aorta." *J Pharmacol Exp Ther* **314**(3): 1169-76.
- Fortin, J. P. and F. O. Marceau (2006). "Advances in the development of bradykinin receptor ligands." *Curr Top Med Chem* **6**(13): 1353-63.
- Fox, K. M. (2003). "Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study)." *Lancet* **362**(9386): 782-8.
- Frank, M. M., J. S. Sargent, et al. (1972). "Epsilon aminocaproic acid therapy of hereditary angioneurotic edema. A double-blind study." *N Engl J Med* **286**(15): 808-12.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, et al. (2003). "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.
- Gabbiani, G., M. C. Badonnel, et al. (1970). "Intra-arterial injections of histamine, serotonin, or bradykinin: a topographic study of vascular leakage." *Proc Soc Exp Biol Med* **135**(2): 447-52.
- Gabra, B. H., R. Couture, et al. (2003). "[Functional duality of kinin receptors in pathophysiology]." *Med Sci (Paris)* **19**(11): 1101-10.
- Gabra, B. H. and P. Sirois (2003). "Beneficial effect of chronic treatment with the selective bradykinin B1 receptor antagonists, R-715 and R-954, in attenuating streptozotocin-diabetic thermal hyperalgesia in mice." *Peptides* **24**(8): 1131-9.
- Gabra, B. H. and P. Sirois (2003). "Kinin B1 receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice." *Neuropeptides* **37**(1): 36-44.
- Gadek, J. E., S. W. Hosea, et al. (1980). "Replacement therapy in hereditary angioedema: successful treatment of acute episodes of angioedema with partly purified C1 inhibitor." *N Engl J Med* **302**(10): 542-6.
- Gafford, J. T., R. A. Skidgel, et al. (1983). "Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides." *Biochemistry* **22**(13): 3265-71.
- Gainer, J. V., J. D. Morrow, et al. (1998). "Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin- converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects." *N Engl J Med* **339**(18): 1285-92.
- Gainer, J. V., J. D. Morrow, et al. (1998). "Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin- converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects [see comments]." *N Engl J Med* **339**(18): 1285-92.
- Ganju, P., A. Davis, et al. (2001). "p38 stress-activated protein kinase inhibitor reverses bradykinin B(1) receptor-mediated component of inflammatory hyperalgesia." *Eur J Pharmacol* **421**(3): 191-9.
- Georgiadis, D., F. Beau, et al. (2003). "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.
- Germain, L., J. Barabe, et al. (1986). "Blood levels of kinins in experimental allergic encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* **13**(2): 135-42.

- Ghosh, S., M. J. May, et al. (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." Annu Rev Immunol **16**: 225-60.
- Gilmartin, L. and G. O'Cuinn (1999). "Dipeptidyl aminopeptidase IV and aminopeptidase P, two proline specific enzymes from the cytoplasm of guinea-pig brain: their role in metabolism of peptides containing consecutive prolines." Neurosci Res **34**(1): 1-11.
- GISEN (1997). "Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. The GISEN Group (Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia)." Lancet **349**(9069): 1857-63.
- Gompels, M. M., R. J. Lock, et al. (2005). "C1 inhibitor deficiency: consensus document." Clin Exp Immunol **139**(3): 379-94.
- Gorrell, M. D., V. Gysbers, et al. (2001). "CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes." Scand J Immunol **54**(3): 249-64.
- Greaves, M. and F. Lawlor (1991). "Angioedema: manifestations and management." J Am Acad Dermatol **25**(1 Pt 2): 155-61; discussion 161-5.
- Greaves, M. and F. Lawlor (1991). "Angioedema: manifestations and management." J Am Acad Dermatol **25**(1 Pt 2): 155-61; discussion 161-5.
- Griffin, J. H. (1978). "Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XII)." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(4): 1998-2002.
- Groves, P., S. Kurz, et al. (1995). "Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control." Circulation **92**(12): 3424-30.
- Habal, F. M., C. E. Burrowes, et al. (1976). "Generation of kinin by plasma kallikrein and plasmin and the effect of alpha1-antitrypsin and antithrombin III on the kininogenases." Adv Exp Med Biol **70**(00): 23-36.
- Hagaman, J. R., J. S. Moyer, et al. (1998). "Angiotensin-converting enzyme and male fertility." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2552-7.
- Hagiwara, M., H. Murakami, et al. (2004). "Renal protective role of bradykinin B1 receptor in stroke-prone spontaneously hypertensive rats." Hypertens Res **27**(6): 399-408.
- Han, E. D., R. C. MacFarlane, et al. (2002). "Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor." J Clin Invest **109**(8): 1057-63.
- Han Lee, E. D., E. Pappalardo, et al. (2003). "Approaches toward reversal of increased vascular permeability in C1 inhibitor deficient mice." Immunol Lett **89**(2-3): 155-60.
- Harbeck, H. T. and R. Mentlein (1991). "Aminopeptidase P from rat brain. Purification and action on bioactive peptides." Eur J Biochem **198**(2): 451-8.
- Hartman, J. C. (1995). "The role of bradykinin and nitric oxide in the cardioprotective action of ACE inhibitors." Ann Thorac Surg **60**(3): 789-92.
- Hartman, J. C., T. G. Hullinger, et al. (1993). "Reduction of myocardial infarct size by ramiprilat is independent of angiotensin II synthesis inhibition." Eur J Pharmacol **234**(2-3): 229-36.

- Hasan, A. A., S. Amenta, et al. (1996). "Bradykinin and its metabolite, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, are selective inhibitors of alpha-thrombin-induced platelet activation." *Circulation* **94**(3): 517-28.
- Hasan, A. A., D. B. Cines, et al. (1995). "Mapping the cell binding site on high molecular weight kininogen domain 5." *J Biol Chem* **270**(33): 19256-61.
- Hasan, A. A., S. S. Rebello, et al. (1999). "Thrombostatin inhibits induced canine coronary thrombosis." *Thromb Haemost* **82**(3): 1182-7.
- Havelka, J., H. Vetter, et al. (1982). "Acute and chronic effects of the angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril in severe hypertension." *Am J Cardiol* **49**(6): 1467-74.
- Heddle, N. M., M. A. Blajchman, et al. (2002). "A randomized controlled trial comparing the frequency of acute reactions to plasma-removed platelets and prestorage WBC-reduced platelets." *Transfusion* **42**(5): 556-66.
- Heitsch, H. (2003). "The therapeutic potential of bradykinin B2 receptor agonists in the treatment of cardiovascular disease." *Expert Opin Investig Drugs* **12**(5): 759-70.
- Herwald, H., M. Collin, et al. (1996). "Streptococcal cysteine proteinase releases kinins: a virulence mechanism." *J Exp Med* **184**(2): 665-73.
- Herwald, H., A. A. Hasan, et al. (1995). "Identification of an endothelial cell binding site on kininogen domain D3." *J Biol Chem* **270**(24): 14634-42.
- Hess, J. F., J. A. Borkowski, et al. (1992). "Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK- 2) receptor." *Biochem Biophys Res Commun* **184**(1): 260-8.
- Higashiyama, S., I. Ohkubo, et al. (1987). "Heavy chain of human high molecular weight and low molecular weight kininogens binds calcium ion." *Biochemistry* **26**(23): 7450-8.
- Hill, M. D., P. A. Barber, et al. (2000). "Anaphylactoid reactions and angioedema during alteplase treatment of acute ischemic stroke." *Cmaj* **162**(9): 1281-4.
- Hock, F. J., K. Wirth, et al. (1991). "Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies." *Br J Pharmacol* **102**(3): 769-73.
- Hoffmann, T., J. Faust, et al. (1993). "Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) and aminopeptidase N (CD 13) catalyzed hydrolysis of cytokines and peptides with N-terminal cytokine sequences." *FEBS Lett* **336**(1): 61-4.
- Hooper, N. M. (1994). "Families of zinc metalloproteases." *FEBS Lett* **354**(1): 1-6.
- Hooper, N. M., J. Hryszko, et al. (1992). "Inhibition by converting enzyme inhibitors of pig kidney aminopeptidase P." *Hypertension* **19**(3): 281-5.
- Hooper, N. M. and A. J. Turner (1988). "Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Aminopeptidase P is anchored by a glycosyl-phosphatidylinositol moiety." *FEBS Lett* **229**(2): 340-4.
- Hooper, N. M. and A. J. Turner (2003). "An ACE structure." *Nat Struct Biol* **10**(3): 155-7.
- Horl, W. H. (2002). "Hemodialysis membranes: interleukins, biocompatibility, and middle molecules." *J Am Soc Nephrol* **13 Suppl 1**: S62-71.
- Hotchkiss, R. S. and I. E. Karl (2003). "The pathophysiology and treatment of sepsis." *N Engl J Med* **348**(2): 138-50.

- Houle, S., J. F. Larrivee, et al. (2000). "Antagonist-induced intracellular sequestration of rabbit bradykinin B(2) receptor." Hypertension **35**(6): 1319-25.
- Howard, T. E., S. Y. Shai, et al. (1990). "Transcription of testicular angiotensin-converting enzyme (ACE) is initiated within the 12th intron of the somatic ACE gene." Mol Cell Biol **10**(8): 4294-302.
- Hu, D. E. and T. P. Fan (1993). "[Leu8]des-Arg9-bradykinin inhibits the angiogenic effect of bradykinin and interleukin-1 in rats." Br J Pharmacol **109**(1): 14-7.
- Hubert, C., A. M. Houot, et al. (1991). "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.
- Ignjatovic, T., S. Stanisavljevic, et al. (2004). "Kinin B1 receptors stimulate nitric oxide production in endothelial cells: signaling pathways activated by angiotensin I-converting enzyme inhibitors and peptide ligands." Mol Pharmacol **66**(5): 1310-6.
- Ignjatovic, T., F. Tan, et al. (2002). "Novel mode of action of angiotensin I-converting enzyme inhibitors: direct activation of bradykinin B1 receptor." J Biol Chem **277**(19): 16847-52.
- Imamura, T., R. N. Pike, et al. (1994). "Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway." J Clin Invest **94**(1): 361-7.
- Inokuchi, J. and A. Nagamatsu (1981). "Tripeptidyl carboxypeptidase activity of kininase II (angiotensin-converting enzyme)." Biochim Biophys Acta **662**(2): 300-7.
- Israili, Z. H. and W. D. Hall (1992). "Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology [see comments]." Ann Intern Med **117**(3): 234-42.
- Iwata, N., S. Tsubuki, et al. (2000). "Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition." Nat Med **6**(2): 143-50.
- Jackson, E. (2006). Renin and angiotensin. Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. L. Mc Graw, J. Brunton and K. Parker, McGraw-Hill 789-821.
- Jaspard, E. and F. Alhenc-Gelas (1995). "Catalytic properties of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme on the cell surface." Biochem Biophys Res Commun **211**(2): 528-34.
- Jaspard, E., L. Wei, et al. (1993). "Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides." J Biol Chem **268**(13): 9496-503.
- Jiang, Y. P., W. Muller-Esterl, et al. (1992). "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.

- Kammerer, S., A. Braun, et al. (1995). "The human bradykinin B2 receptor gene: full length cDNA, genomic organization and identification of the regulatory region." Biochem Biophys Res Commun **211**(1): 226-33.
- Kanazawa, M., D. J. Casley, et al. (1992). "Localization and characterization of neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11), the degradative enzyme for atrial natriuretic peptide, in rat kidney using a radioiodinated neutral metalloendopeptidase inhibitor." J Pharmacol Exp Ther **261**(3): 1231-7.
- Kaplan, A. P. and M. W. Greaves (2005). "Angioedema." J Am Acad Dermatol **53**(3): 373-88; quiz 389-92.
- Kaplan, A. P., K. Joseph, et al. (1998). "Bradykinin formation. Plasma and tissue pathways and cellular interactions." Clin Rev Allergy Immunol **16**(4): 403-29.
- Kaplan, A. P., K. Joseph, et al. (2001). "Activation of the plasma kinin forming cascade along cell surfaces." Int Arch Allergy Immunol **124**(1-3): 339-42.
- Kaplan, A. P., K. Joseph, et al. (1997). "The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation." Adv Immunol **66**: 225-72.
- Kaplan, A. P., K. Joseph, et al. (2002). "Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease." J Allergy Clin Immunol **109**(2): 195-209.
- Kaplan, A. P., K. Joseph, et al. (2002). "Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease." J Allergy Clin Immunol **109**(2): 195-209. .
- Karlis, V., R. S. Glickman, et al. (1997). "Hereditary angioedema: case report and review of management." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **83**(4): 462-4.
- Kehlen, A., U. Lendeckel, et al. (2003). "Biological significance of aminopeptidase N/CD13 in thyroid carcinomas." Cancer Res **63**(23): 8500-6.
- Kemp, S. F. and R. F. Lockey (2002). "Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms." J Allergy Clin Immunol **110**(3): 341-8.
- Kerbiriou, D. M. and J. H. Griffin (1979). "Human high molecular weight kininogen. Studies of structure-function relationships and of proteolysis of the molecule occurring during contact activation of plasma." J Biol Chem **254**(23): 12020-7.
- Kerr, M. A. and A. J. Kenny (1974). "The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border." Biochem J **137**(3): 477-88.
- Kichuk, M. R., X. Zhang, et al. (1997). "Angiotensin-converting enzyme inhibitors promote nitric oxide production in coronary microvessels from failing explanted human hearts." Am J Cardiol **80**(3A): 137A-142A.
- Kim, K. S., S. Kumar, et al. (2000). "Inhibition of aminopeptidase P potentiates wheal response to bradykinin in angiotensin-converting enzyme inhibitor-treated humans." J Pharmacol Exp Ther **292**(1): 295-8.
- Kitamura, N., H. Kitagawa, et al. (1985). "Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution." J Biol Chem **260**(14): 8610-7.
- Kleniewski, J., D. T. Blankenship, et al. (1992). "Mechanism of enhanced kinin release from high molecular weight kininogen by plasma kallikrein after its exposure to plasmin." J Lab Clin Med **120**(1): 129-39.

- Kleniewski, J., D. T. Blankenship, et al. (1992). "Mechanism of enhanced kinin release from high molecular weight kininogen by plasma kallikrein after its exposure to plasmin." J Lab Clin Med **120**(1): 129-39.
- Kleniewski, J. and V. H. Donaldson (1987). "Comparison of human high molecular weight kininogen digestion by plasma kallikrein and by plasmin. A revised method of purification of high molecular weight kininogen." J Lab Clin Med **109**(4): 469-79.
- Kleniewski, J., V. H. Donaldson, et al. (1982). "Some molecular and functional changes in high molecular weight kininogen induced by plasmin and trypsin." Thromb Res **25**(5): 387-99.
- Kohlstedt, K., R. P. Brandes, et al. (2004). "Angiotensin-converting enzyme is involved in outside-in signaling in endothelial cells." Circ Res **94**(1): 60-7.
- Kohlstedt, K., R. Busse, et al. (2005). "Signaling via the angiotensin-converting enzyme enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells." Hypertension **45**(1): 126-32.
- Kohlstedt, K., R. Kellner, et al. (2006). "Signaling via the angiotensin-converting enzyme results in the phosphorylation of the nonmuscle myosin heavy chain IIA." Mol Pharmacol **69**(1): 19-26.
- Kondoh, G., H. Tojo, et al. (2005). "Angiotensin-converting enzyme is a GPI-anchored protein releasing factor crucial for fertilization." Nat Med **11**(2): 160-6.
- Konstam, M. A. (1995). "Role of angiotensin converting enzyme inhibitors in preventing left ventricular remodelling following myocardial infarction." Eur Heart J **16 Suppl K**: 42-8.
- Konzett, H. and E. Stuermer (1960). "Synthetic bradykinin: its biological identity with natural pure trypsin bradykinin." Nature **188**: 998.
- Kostis, J. B., H. J. Kim, et al. (2005). "Incidence and characteristics of angioedema associated with enalapril." Arch Intern Med **165**(14): 1637-42.
- Kostis, J. B., M. Packer, et al. (2004). "Omapatrilat and enalapril in patients with hypertension: the Omapatrilat Cardiovascular Treatment vs. Enalapril (OCTAVE) trial." Am J Hypertens **17**(2): 103-11.
- Kostis, J. B., B. Shelton, et al. (1996). "Adverse effects of enalapril in the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). SOLVD Investigators." Am Heart J **131**(2): 350-5.
- Krieter, D. H., M. Grude, et al. (1998). "Anaphylactoid reactions during hemodialysis in sheep are ACE inhibitor dose-dependent and mediated by bradykinin." Kidney Int **53**(4): 1026-35.
- Lacour, F. and H. Maheut (1992). "[AN 69 membrane and conversion enzyme inhibitors: prevention of anaphylactic shock by alkaline rinsing?]." Nephrologie **13**(3): 135-6.
- Lambeir, A. M., C. Durinx, et al. (2003). "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.

- Lamontagne, D., R. Nadeau, et al. (1995). "Effect of enalaprilat on bradykinin and des-Arg9-bradykinin release following reperfusion of the ischaemic rat heart." Br J Pharmacol **115**(3): 476-8.
- Larrivee, J. F., D. R. Bachvarov, et al. (1998). "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.
- Lasch, J., S. Moschner, et al. (1998). "Aminopeptidase P--a cell-surface antigen of endothelial and lymphoid cells: catalytic and immuno-histotopical evidences." Biol Chem **379**(6): 705-9.
- Lavee, J. and Y. Paz (2001). "Hypotensive reactions associated with transfusion of bedside leukocyte-reduction filtered blood products in heart transplanted patients." J Heart Lung Transplant **20**(7): 759-61.
- Lawson, S. R., B. H. Gabra, et al. (2005). "Enhanced dermal and retinal vascular permeability in streptozotocin-induced type 1 diabetes in Wistar rats: blockade with a selective bradykinin B1 receptor antagonist." Regul Pept **124**(1-3): 221-4.
- Leeb-Lundberg, L. M., F. Marceau, et al. (2005). "International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences." Pharmacol Rev **57**(1): 27-77.
- Leisle, L., E. T. Parkin, et al. (2005). "Angiotensin-converting enzyme as a GPIase: a critical reevaluation." Nat Med **11**(11): 1139-40.
- Lembeck, F., T. Griesbacher, et al. (1991). "New, long-acting, potent bradykinin antagonists." Br J Pharmacol **102**(2): 297-304.
- Levy, J. H. and P. S. O'Donnell (2006). "The therapeutic potential of a kallikrein inhibitor for treating hereditary angioedema." Expert Opin Investig Drugs **15**(9): 1077-90.
- Lewis, G. P. (1960). "Natural and synthetic bradykinin." Nature **188**: 999.
- Li, Q. and I. M. Verma (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." Nat Rev Immunol **2**(10): 725-34.
- Liesmaa, I., A. Kuoppala, et al. (2005). "Increased expression of bradykinin type-1 receptors in endothelium of intramyocardial coronary vessels in human failing hearts." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(5): H2317-22.
- Linz, W., P. A. Martorana, et al. (1990). "Local inhibition of bradykinin degradation in ischemic hearts." J Cardiovasc Pharmacol **15**(Suppl 6): S99-109.
- Linz, W. and B. A. Scholkens (1992). "Role of bradykinin in the cardiac effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors." J Cardiovasc Pharmacol **20**(Suppl 9): S83-90.
- Linz, W. and B. A. Scholkens (1992). "A specific B2-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril." Br J Pharmacol **105**(4): 771-2.
- Linz, W., G. Wiemer, et al. (1995). "Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin- converting enzyme inhibitors." Pharmacol Rev **47**(1): 25-49.

- Linz, W., G. Wiemer, et al. (1995). "Angiotensin converting enzyme inhibitors, left ventricular hypertrophy and fibrosis." Mol Cell Biochem **147**(1-2): 89-97.
- Liu, S. F., X. Ye, et al. (1999). "Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents In vivo expression of proinflammatory genes." Circulation **100**(12): 1330-7.
- Liu, Y. H., X. P. Yang, et al. (2000). "Role of kinins in chronic heart failure and in the therapeutic effect of ACE inhibitors in kininogen-deficient rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(2): H507-14.
- Lock, R. J. and M. M. Gompels (2007). "C1-inhibitor deficiencies (hereditary angioedema): where are we with therapies?" Curr Allergy Asthma Rep **7**(4): 264-9.
- Lortie, M., D. Regoli, et al. (1992). "The role of B1- and B2-kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin." Am J Physiol **262**(1 Pt 2): R72-6.
- Mahabeer, R. and K. D. Bhoola (2000). "Kallikrein and kinin receptor genes." Pharmacol Ther **88**(1): 77-89.
- Mahabeer, R. and K. D. Bhoola (2000). "Kallikrein and kinin receptor genes." Pharmacol Ther **88**(1): 77-89.
- Mandle, R. J., R. W. Colman, et al. (1976). "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.
- Marceau, F. (2005). "A possible common pharmacophore in the non-peptide antagonists of the bradykinin B1 receptor." Trends Pharmacol Sci **26**(3): 116-8.
- Marceau, F., J. F. Hess, et al. (1998). "The B1 receptors for kinins." Pharmacol Rev **50**(3): 357-86.
- Marceau, F. and D. Regoli (2004). "Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives." Nat Rev Drug Discov **3**(10): 845-52.
- Marcondes, S. and E. Antunes (2005). "The plasma and tissue kininogen-kallikrein-kinin system: role in the cardiovascular system." Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents **3**(1): 33-44.
- Margolius, H. S. (1996). "Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses." Diabetes **45 Suppl 1**: S14-9.
- Marin-Castano, M. E., J. P. Schanstra, et al. (2002). "Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment." Circulation **105**(5): 627-32.
- Marin-Castano, M. E., J. P. Schanstra, et al. (2002). "Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment." Circulation **105**(5): 627-32.
- Marmarou, A., M. Guy, et al. (2005). "A single dose, three-arm, placebo-controlled, phase I study of the bradykinin B2 receptor antagonist Anatibant (LF16-0687Ms) in patients with severe traumatic brain injury." J Neurotrauma **22**(12): 1444-55.

- Marmarou, A., J. Nichols, et al. (1999). "Effects of the bradykinin antagonist Bradycor (deltibant, CP-1027) in severe traumatic brain injury: results of a multi-center, randomized, placebo-controlled trial. American Brain Injury Consortium Study Group." J Neurotrauma **16**(6): 431-44.
- Martorana, P. A., B. Kettenbach, et al. (1990). "Reduction of infarct size by local angiotensin-converting enzyme inhibition is abolished by a bradykinin antagonist." Eur J Pharmacol **182**(2): 395-6.
- Maschio, G., D. Alberti, et al. (1996). "Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting- Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group." N Engl J Med **334**(15): 939-45.
- Matoba, S., T. Tatsumi, et al. (1999). "Cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition against hypoxia/reoxygenation injury in cultured rat cardiac myocytes." Circulation **99**(6): 817-22.
- Medeiros, R., D. A. Cabrini, et al. (2004). "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.
- Melamed, J., C. A. Alper, et al. (1986). "The metabolism of C1 inhibitor and C1q in patients with acquired C1-inhibitor deficiency." J Allergy Clin Immunol **77**(2): 322-6.
- Meloni, F. J., E. J. Gustafson, et al. (1992). "High molecular weight kininogen binds to platelets by its heavy and light chains and when bound has altered susceptibility to kallikrein cleavage." Blood **79**(5): 1233-44.
- Meneton, P., M. Bloch-Faure, et al. (2001). "Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2634-2639.
- Menke, J. G., J. A. Borkowski, et al. (1994). "Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor." J Biol Chem **269**(34): 21583-6.
- Mentlein, R. (1999). "Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides." Regul Pept **85**(1): 9-24.
- Merlini, P. A., M. Cugno, et al. (2004). "Activation of the contact system and inflammation after thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction." Am J Cardiol **93**(7): 822-5.
- Miller, G., M. Silverberg, et al. (1980). "Autoactivatability of human Hageman factor (factor XII)." Biochem Biophys Res Commun **92**(3): 803-10.
- Minai, K., T. Matsumoto, et al. (2001). "Bradykinin stimulates the release of tissue plasminogen activator in human coronary circulation: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors." J Am Coll Cardiol **37**(6): 1565-70.
- Molinaro, G., A. Adam, et al. (2002). "Hypotensive reaction during staphylococcal protein A column therapy in a patient with anomalous degradation of bradykinin and Des-Arg9-bradykinin after contact activation." Transfusion **42**(11): 1458-65.
- Molinaro, G., G. Boileau, et al. (2004). Aminopeptidase P and vasoactive peptides: from fundamental aspects to clinical interests. Aminopeptidases in Biology

- and Disease. N. M. Hooper and U. Lendeckel. London, Kluwer Academic/Plenum Publishers: 251-269.
- Molinaro, G., A. K. Carmona, et al. (2005). "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.
- Molinaro, G., M. Cugno, et al. (2002). "Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor-Associated Angioedema Is Characterized by a Slower Degradation of des-Arginine⁹-Bradykinin." J Pharmacol Exp Ther **303**(1): 232-237.
- Molinaro, G., Q. L. Duan, et al. (2006). "Kinin-dependent hypersensitivity reactions in hemodialysis: metabolic and genetic factors." Kidney Int **70**(10): 1823-31.
- Molinaro, G., Q. L. Duan, et al. (2006). "Kinin-dependent hypersensitivity reactions in hemodialysis: Metabolic and genetic factors." Kidney Int.
- Molinaro, G., N. Gervais, et al. (2002). "Biochemical Basis of Angioedema Associated With Recombinant Tissue Plasminogen Activator Treatment: An In Vitro Experimental Approach." Stroke **33**(6): 1712-1716.
- Molinaro, G., J. L. Rouleau, et al. (2002). "Vasopeptidase inhibitors: a new class of dual zinc metallopeptidase inhibitors for cardiorenal therapeutics." Curr Opin Pharmacol **2**(2): 131-41.
- Moore, G. P., W. T. Hurley, et al. (1988). "Hereditary angioedema." Ann Emerg Med **17**(10): 1082-6.
- Moreau, M. E., P. Dubreuil, et al. (2005). "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.
- Moreau, M. E., N. Garbacki, et al. (2005). "The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets." J Pharmacol Sci **99**(1): 6-38.
- Mori, K., W. Sakamoto, et al. (1981). "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.
- Morissette, G. and F. Marceau (2006). "Molecular identification and pharmacological profile of the bovine kinin B1 receptor." Biol Chem **387**(2): 211-5.
- Motta, G., R. Rojkaer, et al. (1998). "High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation." Blood **91**(2): 516-28.
- Mukae, S., S. Aoki, et al. (2000). "Bradykinin B(2) receptor gene polymorphism is associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor-related cough." Hypertension **36**(1): 127-31.
- Müller-Esterl, W., S. Iwanaga, et al. (1986). "Kininogens revisited " Trends Biochem Sci **11**: 336-339.
- Muller-Esterl, W., M. Vohle-Timmermann, et al. (1982). "Purification and properties of human low molecular weight kininogen." Biochim Biophys Acta **706**(2): 145-52.
- Murphey, L. J., J. V. Gainer, et al. (2000). "Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin." Circulation **102**(8): 829-32.

- Murphey, L. J., D. L. Hachey, et al. (2000). "Metabolism of bradykinin In vivo in humans: identification of BK1-5 as a stable plasma peptide metabolite." J Pharmacol Exp Ther **294**(1): 263-9.
- Murphey, L. J., H. A. Malave, et al. (2006). "Bradykinin and its metabolite bradykinin 1-5 inhibit thrombin-induced platelet aggregation in humans." J Pharmacol Exp Ther **318**(3): 1287-92.
- Myles, T., T. Nishimura, et al. (2003). "Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation." J Biol Chem **278**(51): 51059-67.
- Nakashima, Y., F. M. Fouad, et al. (1984). "Regression of left ventricular hypertrophy from systemic hypertension by enalapril." Am J Cardiol **53**(8): 1044-9.
- Nakhostine, N., C. Ribuot, et al. (1993). "Mediation by B1 and B2 receptors of vasodepressor responses to intravenously administered kinins in anaesthetized dogs." Br J Pharmacol **110**(1): 71-6.
- Nesheim, M., J. Walker, et al. (2001). "Modulation of fibrin cofactor activity in plasminogen activation." Ann N Y Acad Sci **936**: 247-60.
- Nishikawa, K., Y. Shibayama, et al. (1992). "Generation of vasoactive peptide bradykinin from human umbilical vein endothelium-bound high molecular weight kininogen by plasma kallikrein." Blood **80**(8): 1980-8.
- Nussberger, J., M. Cugno, et al. (1998). "Plasma bradykinin in angio-oedema." Lancet **351**(9117): 1693-7.
- Nussberger, J., M. Cugno, et al. (2002). "Bradykinin-mediated angioedema." N Engl J Med **347**(8): 621-2.
- Nzeako, U. C., E. Frigas, et al. (2001). "Hereditary angioedema: a broad review for clinicians." Arch Intern Med **161**(20): 2417-29.
- Ondetti, M. A., B. Rubin, et al. (1977). "Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents." Science **196**(4288): 441-4.
- Oppong, S. Y. and N. M. Hooper (1993). "Characterization of a secretase activity which releases angiotensin-converting enzyme from the membrane." Biochem J **292** (Pt 2): 597-603.
- Orawski, A. T. and W. H. Simmons (1995). "Purification and properties of membrane-bound aminopeptidase P from rat lung." Biochemistry **34**(35): 11227-36.
- Oshima, G., Y. Hiraga, et al. (1985). "Cleavage of des-Arg9-bradykinin by angiotensin I-converting enzyme from pig kidney cortex." Experientia **41**(3): 325-8.
- Overlack, A. (1996). "ACE inhibitor-induced cough and bronchospasm. Incidence, mechanisms and management." Drug Saf **15**(1): 72-8.
- Packer, M., R. M. Califf, et al. (2002). "Comparison of omapatrilat and enalapril in patients with chronic heart failure: the Omapatrilat Versus Enalapril Randomized Trial of Utility in Reducing Events (OVERTURE)." Circulation **106**(8): 920-6.

- Pappalardo, E., L. C. Zingale, et al. (2003). "Increased expression of C1-inhibitor mRNA in patients with hereditary angioedema treated with Danazol." Immunol Lett **86**(3): 271-6.
- Parkin, E. T., A. J. Turner, et al. (2004). "Secretase-mediated cell surface shedding of the angiotensin-converting enzyme." Protein Pept Lett **11**(5): 423-32.
- Pelorosso, F. G., P. T. Brodsky, et al. (2005). "Potentiation of des-Arg9-kallidin induced vasoconstrictor responses by metallopeptidase inhibition in isolated human umbilical artery." J Pharmacol Exp Ther **313**(3): 1355-1360.
- Perez, M., G. Molinaro, et al. (2001). "Bradykinin, an important mediator of the cardiovascular effects of metallopeptidase inhibitors: experimental and clinical evidences." J Clin Basic Cardiol **4**: 39-46.
- Perkins, M. N., E. Campbell, et al. (1993). "Antinociceptive activity of the bradykinin B1 and B2 receptor antagonists, des-Arg9, [Leu8]-BK and HOE 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat." Pain **53**(2): 191-7.
- Perkins, M. N. and D. Kelly (1993). "Induction of bradykinin B1 receptors in vivo in a model of ultra-violet irradiation-induced thermal hyperalgesia in the rat." Br J Pharmacol **110**(4): 1441-4.
- Pesquero, J. B., R. C. Araujo, et al. (2000). "Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8140-5.
- Pfleiderer, G. and P. G. Celliers (1963). "[Isolation Of An Aminopeptidase From Kidney Particles.]." Biochem Z **339**: 186-9.
- Phagoo, S. B., S. Poole, et al. (1999). "Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts." Mol Pharmacol **56**(2): 325-33.
- Pixley, R. A., M. Schapira, et al. (1985). "The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitors." J Biol Chem **260**(3): 1723-9.
- Prada, A. E., K. Zahedi, et al. (1998). "Regulation of C1 inhibitor synthesis." Immunobiology **199**(2): 377-88.
- Prat, A., K. Biernacki, et al. (2000). "Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells." J Neuropathol Exp Neurol **59**(10): 896-906.
- Prat, A., L. Weinrib, et al. (1999). "Bradykinin B1 receptor expression and function on T lymphocytes in active multiple sclerosis." Neurology **53**(9): 2087-92.
- Pretorius, M., D. Rosenbaum, et al. (2003). "Angiotensin-converting enzyme inhibition increases human vascular tissue-type plasminogen activator release through endogenous bradykinin." Circulation **107**(4): 579-85.
- Proud, D., J. M. Bathon, et al. (1995). "Inhibition of the response to nasal provocation with bradykinin by HOE-140: efficacy and duration of action." Can J Physiol Pharmacol **73**(7): 820-6.
- Quagraine, M. O., F. Tan, et al. (2005). "Plasmin alters the activity and quaternary structure of human plasma carboxypeptidase N." Biochem J **388**(Pt 1): 81-91.
- Raidoo, D. M., R. Ramsaroop, et al. (1997). "Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease." Immunopharmacology **36**(2-3): 153-60.

- Raut, R., J. L. Rouleau, et al. (1999). "Bradykinin metabolism in the postinfarcted rat heart: role of ACE and neutral endopeptidase 24.11." Am J Physiol **276**(5 Pt 2): H1769-79.
- Ravid, D., M. Lishner, et al. (1994). "Angiotensin-converting enzyme inhibitors and cough: a prospective evaluation in hypertension and in congestive heart failure." J Clin Pharmacol **34**(11): 1116-20.
- Rawlings, N. D. and A. J. Barrett (2000). "MEROPS: the peptidase database." Nucleic Acids Res **28**(1): 323-5.
- Raymond, P., A. Decarie, et al. (1996). "A role for B1 and B2 kinin receptors in the modulation of T-kininogen during the acute phase response of inflammation." Peptides **17**(7): 1163-70.
- Raymond, P., G. Drapeau, et al. (1995). "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.
- Reddigari, S. and A. P. Kaplan (1989). "Quantification of human high molecular weight kininogen by immunoblotting with a monoclonal anti-light chain antibody." J Immunol Methods **119**(1): 19-25.
- Reddigari, S. R., P. Kuna, et al. (1993). "Human high molecular weight kininogen binds to human umbilical vein endothelial cells via its heavy and light chains." Blood **81**(5): 1306-11.
- Regoli, D. and J. Barabe (1980). "Pharmacology of bradykinin and related kinins." Pharmacol Rev **32**(1): 1-46.
- Regoli, D., J. Barabe, et al. (1977). "Receptors for bradykinin in rabbit aortae." Can J Physiol Pharmacol **55**(4): 855-67.
- Regoli, D., G. Drapeau, et al. (1986). "The actions of kinin antagonists on B1 and B2 receptor systems." Eur J Pharmacol **123**(1): 61-5.
- Regoli, D., S. Nsa Allogho, et al. (1998). "Bradykinin receptors and their antagonists." Eur J Pharmacol **348**(1): 1-10.
- Regoli, D., A. Rizzi, et al. (2001). "Classification of kinin receptors." Biol Chem **382**(1): 31-5.
- Regoli, D. C., F. Marceau, et al. (1981). "Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide." Eur J Pharmacol **71**(1): 105-15.
- Remme, W. J. (1997). "Bradykinin-mediated cardiovascular protective actions of ACE inhibitors. A new dimension in anti-ischaemic therapy?" Drugs **54**(Suppl 5): 59-70.
- Revillard, J. P. (1990). "[Immune deficits in hemodialysis patients]." Rev Prat **40**(7): 609-12.
- Rigat, B., C. Hubert, et al. (1990). "An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels." J Clin Invest **86**(4): 1343-6.
- Rivard, G. E., K. E. Brummel-Ziedins, et al. (2005). "Evaluation of the profile of thrombin generation during the process of whole blood clotting as assessed by thrombelastography." J Thromb Haemost **3**(9): 2039-43.

- Rocha e Silva, M., W. Beraldo, et al. (1949). "Bradykinin, hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin." Am J Physiol **156**: 261-273.
- Rosenkrans, B., S. Russmann, et al. (2004). Clinical proof-of-concept for the bradykinin B₂ antagonist; icatibant in liver cirrhosis and hereditary angioedema. . Peptide Receptors Montreal 2004 Symposium. Montreal, Canada.
- Rusu, I. and A. Yaron (1992). "Aminopeptidase P from human leukocytes." Eur J Biochem **210**(1): 93-100.
- Sabourin, T., L. Bastien, et al. (2002). "Agonist-induced translocation of the kinin B(1) receptor to caveolae-related rafts." Mol Pharmacol **61**(3): 546-53.
- Sabourin, T., K. Guay, et al. (2001). "Absence of ligand-induced regulation of kinin receptor expression in the rabbit." Br J Pharmacol **133**(7): 1154-62.
- Sabroe, R. A. and A. K. Black (1997). "Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and angio-oedema." Br J Dermatol **136**(2): 153-8.
- Salvesen, G., C. Parkes, et al. (1986). "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.
- Salvino, J. M., P. R. Seoane, et al. (1993). "Design of potent non-peptide competitive antagonists of the human bradykinin B₂ receptor." J Med Chem **36**(17): 2583-4.
- Sato, T., T. Miwa, et al. (2000). "Pro-carboxypeptidase R is an acute phase protein in the mouse, whereas carboxypeptidase N is not." J Immunol **165**(2): 1053-8.
- Sawutz, D. G., J. M. Salvino, et al. (1994). "The nonpeptide WIN 64338 is a bradykinin B₂ receptor antagonist." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(11): 4693-7.
- Sayed-Tabatabaei, F. A., B. A. Oostra, et al. (2006). "ACE polymorphisms." Circ Res **98**(9): 1123-33.
- Schaefer, R. M., E. Fink, et al. (1993). "Role of bradykinin in anaphylactoid reactions during hemodialysis with AN69 dialyzers." Am J Nephrol **13**(6): 473-7.
- Schaefer, R. M., L. Schaefer, et al. (1994). "Anaphylactoid reactions during hemodialysis." Clin Nephrol **42 Suppl 1**: S44-7.
- Schanstra, J. P., E. Bataille, et al. (1998). "The B₁-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF- κ B and induces homologous upregulation of the bradykinin B₁- receptor in cultured human lung fibroblasts." J Clin Invest **101**(10): 2080-91.
- Schapira, M., C. F. Scott, et al. (1982). "Contribution of plasma protease inhibitors to the inactivation of kallikrein in plasma." J Clin Invest **69**(2): 462-8.
- Schmaier, A. H., A. Kuo, et al. (1988). "The expression of high molecular weight kininogen on human umbilical vein endothelial cells." J Biol Chem **263**(31): 16327-33.
- Scholken, B. A., W. Linz, et al. (1988). "Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor, ramipril, in isolated ischaemic rat heart are abolished by a bradykinin antagonist." J Hypertens Suppl **6**(4): S25-8.

- Schulman, G., R. Hakim, et al. (1993). "Bradykinin generation by dialysis membranes: possible role in anaphylactic reaction." J Am Soc Nephrol **3**(9): 1563-9.
- Schulz, J., N. Plesnila, et al. (2000). "LF16-0687 a novel non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist reduces vasogenic brain edema from a focal lesion in rats." Acta Neurochir Suppl **76**: 137-9.
- Scott, C. F., E. J. Whitaker, et al. (1993). "Purification and characterization of a potent 70-kDa thiol lysyl- proteinase (Lys-gingivain) from *Porphyromonas gingivalis* that cleaves kininogens and fibrinogen." J Biol Chem **268**(11): 7935-42.
- Sen, G. C., T. J. Thekkumkara, et al. (1990). "Angiotensin-converting enzyme: structural relationship of the testicular and the pulmonary forms." J Cardiovasc Pharmacol **16 Suppl 4**: S14-8.
- Shariat-Madar, Z., F. Mahdi, et al. (2002). "Identification and characterization of prolylcarboxypeptidase as an endothelial cell prekallikrein activator." J Biol Chem **277**(20): 17962-9.
- Shiba, M., K. Tadokoro, et al. (1997). "Activation of the contact system by filtration of platelet concentrates with a negatively charged white cell-removal filter and measurement of venous blood bradykinin level in patients who received filtered platelets." Transfusion **37**(5): 457-62.
- Shionoiri, H., I. Takasaki, et al. (1996). "A case report of angioedema during long-term (66 months) angiotensin converting enzyme inhibition therapy with enalapril." Jpn Circ J **60**(3): 166-70.
- Shipp, M. A. and A. T. Look (1993). "Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key!" Blood **82**(4): 1052-70.
- Simmons, W. H. and A. T. Orawski (1992). "Membrane-bound aminopeptidase P from bovine lung. Its purification, properties, and degradation of bradykinin." J Biol Chem **267**(7): 4897-903.
- Simon, P., J. Potier, et al. (1996). "[Risk factors for acute hypersensitivity reactions in hemodialysis]." Nephrologie **17**(3): 163-70.
- Skidgel, R. A. (1988). "Basic carboxypeptidases: regulators of peptide hormone activity." Trends Pharmacol Sci **9**(8): 299-304.
- Skidgel, R. A., S. Stanisavljevic, et al. (2006). "Kinin- and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor-mediated nitric oxide production in endothelial cells." Biol Chem **387**(2): 159-65.
- Smith, D., M. Gilbert, et al. (1985). "Tissue plasminogen activator release in vivo in response to vasoactive agents." Blood **66**(4): 835-9.
- Sorensen, B., P. Johansen, et al. (2003). "Whole blood coagulation thrombelastographic profiles employing minimal tissue factor activation." J Thromb Haemost **1**(3): 551-8.
- Soubrier, F., F. Alhenc-Gelas, et al. (1988). "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.
- Sprinkle, T. J., C. Caldwell, et al. (2000). "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.
- Sprinkle, T. J., A. A. Stone, et al. (1998). "Assignment of the membrane-bound human aminopeptidase P gene (XPNPEP2) to chromosome Xq25." Genomics **50**(1): 114-6.
- Suarez, M., P. W. Ho, et al. (1986). "Angioneurotic edema, agranulocytosis, and fatal septicemia following captopril therapy." Am J Med **81**(2): 336-8.
- Tait, J. F. and K. Fujikawa (1987). "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.
- Takagaki, Y., N. Kitamura, et al. (1985). "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.
- Takahama, K., T. Araki, et al. (1996). "Studies on the magnitude and the mechanism of cough potentiation by angiotensin-converting enzyme inhibitors in guinea-pigs: involvement of bradykinin in the potentiation." J Pharm Pharmacol **48**(10): 1027-33.
- Tan, F., S. J. Chan, et al. (1989). "Molecular cloning and sequencing of the cDNA for human membrane-bound carboxypeptidase M. Comparison with carboxypeptidases A, B, H, and N." J Biol Chem **264**(22): 13165-70.
- Tanaka, K. A., F. Szlam, et al. (2004). "Evaluation of a novel kallikrein inhibitor on hemostatic activation in vitro." Thromb Res **113**(5): 333-9.
- Tayeh, M. A., S. T. Olson, et al. (1994). "Surface-induced alterations in the kinetic pathway for cleavage of human high molecular weight kininogen by plasma kallikrein." J Biol Chem **269**(23): 16318-25.
- Tikellis, C., M. E. Cooper, et al. (2006). "Developmental expression of ACE2 in the SHR kidney: a role in hypertension?" Kidney Int **70**(1): 34-41.
- Tipnis, S. R., N. M. Hooper, et al. (2000). "A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase." J Biol Chem **275**(43): 33238-43.
- Tissot, M., D. Regoli, et al. (1985). "Bradykinin levels in inflammatory exudates." Inflammation **9**(4): 419-24.
- Trippodo, N. C., M. Fox, et al. (1993). "Combined inhibition of neutral endopeptidase and angiotensin converting enzyme in cardiomyopathic hamsters with compensated heart failure." J Pharmacol Exp Ther **267**(1): 108-16.
- Tschope, C., P. Gohlke, et al. (1997). "Antihypertensive and cardioprotective effects after angiotensin-converting enzyme inhibition: role of kinins." J Card Fail **3**(2): 133-48.
- Tschope, C., F. Spillmann, et al. (2004). "The bradykinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effects of AT1 blockade after experimental myocardial infarction." Cardiovasc Res **61**(3): 559-69.
- Turner, A. J. and N. M. Hooper (2002). "The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology." Trends Pharmacol Sci **23**(4): 177-83.

- Turner, P., J. Dear, et al. (2001). "Role of kinins in seasonal allergic rhinitis: icatibant, a bradykinin B2 receptor antagonist, abolishes the hyperresponsiveness and nasal eosinophilia induced by antigen." J Allergy Clin Immunol **107**(1): 105-13.
- Unger, T. and P. Gohlke (1994). "Converting enzyme inhibitors in cardiovascular therapy: current status and future potential." Cardiovasc Res **28**(2): 146-58.
- van der Graaf, F., J. A. Koedam, et al. (1983). "Inactivation of kallikrein in human plasma." J Clin Invest **71**(1): 149-58.
- Van der Niepen, P. and D. L. Verbeelen (1995). "Anaphylactoid reactions during haemodialysis in sheep are mediated by bradykinin and can be prevented by bradykinin receptor antagonist." Nephrol Dial Transplant **10**(11): 2156-7.
- van Doorn, M. B., J. Burggraaf, et al. (2005). "A phase I study of recombinant human C1 inhibitor in asymptomatic patients with hereditary angioedema." J Allergy Clin Immunol **116**(4): 876-83.
- van Iwaarden, F., P. G. de Groot, et al. (1988). "The binding of high molecular weight kininogen to cultured human endothelial cells." J Biol Chem **263**(10): 4698-703.
- Vanhoof, G., I. De Meester, et al. (1992). "Distribution of proline-specific aminopeptidases in human tissues and body fluids." Eur J Clin Chem Clin Biochem **30**(6): 333-8.
- Vanhoutte, P. M. (1989). "Endothelium and control of vascular function. State of the Art lecture." Hypertension **13**(6 Pt 2): 658-67.
- Vavrek, R. J. and J. M. Stewart (1985). "Competitive antagonists of bradykinin." Peptides **6**(2): 161-4.
- Velarde, V., M. E. Ullian, et al. (1999). "Mechanisms of MAPK activation by bradykinin in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol **277**(2 Pt 1): C253-61.
- Venema, R. C., H. Ju, et al. (1997). "Cloning and tissue distribution of human membrane-bound aminopeptidase P." Biochim Biophys Acta **1354**(1): 45-8.
- Verme-Gibboney, C. (1997). "Oral angiotensin-converting-enzyme inhibitors." Am J Health Syst Pharm **54**(23): 2689-703.
- Verresen, L., E. Fink, et al. (1994). "Bradykinin is a mediator of anaphylactoid reactions during hemodialysis with AN69 membranes." Kidney Int **45**(5): 1497-503.
- Verresen, L., M. Waer, et al. (1990). "Angiotensin-converting-enzyme inhibitors and anaphylactoid reactions to high-flux membrane dialysis." Lancet **336**(8727): 1360-2.
- Verresen, L., M. Waer, et al. (1991). "Anaphylactoid reactions, haemodialysis, and ACE inhibitors." Lancet **337**(8752): 1294.
- Vickers, C., P. Hales, et al. (2002). "Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2)." J Biol Chem **28**: 28.
- Vleeming, W., J. G. van Amsterdam, et al. (1998). "ACE inhibitor-induced angioedema. Incidence, prevention and management." Drug Saf **18**(3): 171-88.

- Wang, W., M. B. Boffa, et al. (1998). "A study of the mechanism of inhibition of fibrinolysis by activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor." J Biol Chem **273**(42): 27176-81.
- Ward, P. E., I. F. Benter, et al. (1990). "Metabolism of vasoactive peptides by plasma and purified renal aminopeptidase M." Biochem Pharmacol **40**(8): 1725-32.
- Waytes, A. T., F. S. Rosen, et al. (1996). "Treatment of hereditary angioedema with a vapor-heated C1 inhibitor concentrate." N Engl J Med **334**(25): 1630-4.
- Wei, L., E. Clauser, et al. (1992). "The two homologous domains of human angiotensin I-converting enzyme interact differently with competitive inhibitors." J Biol Chem **267**(19): 13398-405.
- Whalley, E. T., S. Clegg, et al. (1987). "The effect of kinin agonists and antagonists on the pain response of the human blister base." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **336**(6): 652-5.
- Wiemer, G., R. Popp, et al. (1994). "Enhancement of cytosolic calcium, prostacyclin and nitric oxide by bradykinin and the ACE inhibitor ramiprilat in porcine brain capillary endothelial cells." Brain Res **638**(1-2): 261-6.
- Wiemer, G., B. A. Scholkens, et al. (1991). "Ramiprilat enhances endothelial autacid formation by inhibiting breakdown of endothelium-derived bradykinin." Hypertension **18**(4): 558-63.
- Wiemer, G., B. A. Scholkens, et al. (1994). "Endothelial protection by converting enzyme inhibitors." Cardiovasc Res **28**(2): 166-72.
- Wiggins, R. C. (1983). "Kinin release from high molecular weight kininogen by the action of Hageman factor in the absence of kallikrein." J Biol Chem **258**(14): 8963-70.
- Willemse, J., J. Leurs, et al. (2005). "Development of a fast kinetic method for the determination of carboxypeptidase U (TAFIa) using C-terminal arginine containing peptides as substrate." Anal Biochem **340**(1): 106-12.
- Williams, A. and L. G. Baird (2003). "DX-88 and HAE: a developmental perspective." Transfus Apher Sci **29**(3): 255-8.
- Williams, A. and L. G. Baird (2003). "DX-88 and HAE: a developmental perspective." Transfus Apheresis Sci **29**(3): 255-8.
- Wirth, K. J., W. Linz, et al. (1997). "Kinins and cardioprotection." Pharmacol Res **35**(6): 527-30.
- Witherow, F. N., A. Helmy, et al. (2001). "Bradykinin contributes to the vasodilator effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with heart failure." Circulation **104**(18): 2177-81.
- Wolff, M. W., F. Zhang, et al. (2001). "Expression of C1 esterase inhibitor by the baculovirus expression vector system: preparation, purification, and characterization." Protein Expr Purif **22**(3): 414-21.
- Wuillemin, W. A., M. Minnema, et al. (1995). "Inactivation of factor XIa in human plasma assessed by measuring factor XIa-protease inhibitor complexes: major role for C1-inhibitor." Blood **85**(6): 1517-26.
- Yang, H. Y., E. G. Erdos, et al. (1970). "A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin." Biochim Biophys Acta **214**(2): 374-6.

- Yang, H. Y., E. G. Erdos, et al. (1971). "Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme)." J Pharmacol Exp Ther **177**(1): 291-300.
- Yoshimoto, T., A. T. Orawski, et al. (1994). "Substrate specificity of aminopeptidase P from *Escherichia coli*: comparison with membrane-bound forms from rat and bovine lung." Arch Biochem Biophys **311**(1): 28-34.
- Yusuf, S., P. Sleight, et al. (2000). "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.
- Yusuf, S., P. Sleight, et al. (2000). "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.
- Zhao, Y., Q. Qiu, et al. (2001). "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.
- Zhou, G. X., L. Chao, et al. (1992). "Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence." J Biol Chem **267**(36): 25873-80.
- Zhu, P., C. E. Zaugg, et al. (1999). "Bradykinin-dependent cardioprotective effects of losartan against ischemia and reperfusion in rat hearts." J Cardiovasc Pharmacol **33**(5): 785-90.
- Zuccollo, A., M. Navarro, et al. (1999). "The involvement of kallikrein-kinin system in diabetes type I (insulinitis)." Immunopharmacology **45**(1-3): 69-74.
- Zuraw, B. L. (2005). "Current and future therapy for hereditary angioedema." Clin Immunol **114**(1): 10-6.

CHAPITRE VIII

ANNEXES

Articles secondaires

Suit une liste d'articles auxquels j'ai participé au cours de mon doctorat :

1. A. Désormeaux, M.E. Moreau, Y. Lepage, J. Chanard and A. Adam. ***The effect of electronegativity and angiotensin-converting enzyme inhibition on the kinin-forming capacity of polyacrylonitrile dialysis membranes.*** Biomaterials (sous presse, 2007).
2. A. Désormeaux, M.E. Moreau et A. Adam. ***Physiopathologie des effets secondaires aigus des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine.*** Bulletin de l'Académie de Médecine de France (in press, 2007).
3. M-T. Bawolak, K. Touzin, M.E. Moreau, A. Désormeaux, A. Adam and F. Marceau. ***Cardiovascular expression of inflammatory signaling molecules, the kinin B(1) receptor and COX2, in the rabbit : Effects of LPS, anti-inflammatory and anti-hypertensive drugs.*** Regul Peptides. 2007 Sep 14.
4. Molinaro G, Duan QL, Chagnon M, Moreau ME, Simon P, Clavel P, Lavaud S, Boileau G, Rouleau GA, Lepage Y, Adam A and Chanard J. ***Kinin-dependent hypersensitivity reactions in hemodialysis : metabolic and genetic factors.*** Kidney Int. 2006 Nov; 70(10): 1823-31.
5. Moreau ME and Adam A. ***Multifactorial aspect of acute side effects of angiotensin converting enzyme inhibitors.*** Ann Pharm Fr. 2006 Jul; 64(4): 276-86.
6. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F and Adam A. ***The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets.*** J Pharmacol Sci. 2005 Sep; 99(1): 6-38.