

Université de Montréal

**Distribution et altération des récepteurs centraux des kinines en
physiopathologie**

Par

Brice Ongali

Département de physiologie

Faculté de médecine

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

Juin 2004

©Brice Ongali, 2004



W

4

U58

2005

V. 003

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

**Distribution et altération des récepteurs centraux des kinines en
physiopathologie**

Présentée par

Brice Ongali

a été évaluée par le jury composé des membres suivants:

Dr Allan Smith.....Président rapporteur
Dr Réjean Couture.....Directeur de recherche
Dr Guy DoucetExamineur interne
Dr Pierre Sirois.....Examineur externe

Thèse acceptée le

SOMMAIRE

Les kinines [bradykinine (BK), kallidine (KD, Lys-BK) et leurs métabolites actifs (desArg⁹BK et desArg¹⁰KD)] sont des peptides qui agissent via l'activation de deux récepteurs liés aux protéines G, dénommés B₁ et B₂. Alors que le récepteur B₂ est ubiquitaire et joue le rôle principal de l'action des kinines, le récepteur B₁ est le plus souvent induit et surexprimé durant les états pathologiques. En périphérie, les kinines sont impliquées dans l'homéostasie cardiovasculaire, la contraction et la relaxation des muscles lisses, l'inflammation et la nociception. Elles jouent aussi un rôle prédominant dans les maladies telles l'asthme, les allergies, l'arthrite rhumatoïde, mais contribuent également aux effets bénéfiques des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) dans l'hypertension artérielle et le diabète.

Dans le système nerveux central, les kinines sont des neuromédiateurs impliqués dans le contrôle autonome des fonctions cardiovasculaires. L'administration intrathécale (i.t.) ou intra cérébro-ventriculaire (i.c.v.) de la BK induit une augmentation de la pression artérielle, laquelle est exagérée (hypersensibilité) chez le rat spontanément hypertendu (SHR). Bien que l'injection i.t. de la desArg⁹BK reste sans effet chez le rat normal (témoin) et SHR, des réponses hyperalgésiques et cardiovasculaires sont observées chez le rat rendu diabétique avec la streptozotocine (STZ). De plus, l'utilisation d'antagonistes B₁ ou B₂ a récemment mis en évidence les potentiels thérapeutiques des récepteurs des kinines dans le traitement des maladies cérébrovasculaires et neurologiques. Toutefois, leur dualité d'action périphérique et centrale soulève des questions importantes, notamment dans le mécanisme d'action des IEC.

Cette thèse a donc pour but d'examiner la distribution des récepteurs B₁ and B₂ des kinines dans le cerveau et la moelle épinière du rat normal ou souffrant d'hypertension, du diabète ou de l'épilepsie du lobe temporal. Pour ce faire, nos études feront appel à la radiolisation sur coupes histologiques conjuguée à l'autoradiographie quantitative (l'autoradiographie quantitative) et à l'hybridation *in situ*.

Les résultats montrent que l'hypersensibilité de la réponse pressive à la BK chez le rat SHR est liée à une surexpression des récepteurs B₂ dans la moelle épinière et dans les centres cardiovasculaires dans le cerveau. Cette surexpression des récepteurs B₂ n'est pas secondaire à l'hypertension artérielle, mais pourrait refléter un caractère génétique. Les effets de la desArg⁹BK chez le rat diabétique-STZ sont liés à une surexpression des récepteurs B₁ dans la moelle épinière. Chez le rat épileptique, alors que la moelle épinière ne montre aucune particularité par rapport au rat témoin, on note une surexpression du récepteur B₁ accompagnée d'une diminution prononcée des récepteurs B₂ dans plusieurs noyaux centraux associés au cortex cérébral et à l'hippocampe où la relâche accrue du glutamate (un puissant neurotransmetteur excitateur) a été rapportée en présence de l'agoniste B₁ LysdesArg⁹BK.

Les résultats de cette thèse ont également mis en évidence la grande plasticité des récepteurs B₁ et B₂ des kinines en fonction de l'âge, de l'état pathologique et du traitement chronique avec des IEC. La plasticité induite par l'âge soutient l'expression du récepteur B₂ dans les conditions normales, suggérant que le B₁ ne joue pas un rôle dans le vieillissement.

Différente de la périphérie, la modulation centrale des récepteurs B₁ et B₂ par les IEC infirme l'implication directe des kinines centrales dans le maintien de l'hypertension artérielle chez le rat SHR. Ainsi, bien que le rôle du récepteur B₁ dans le système nerveux central demeure une question ouverte, les résultats obtenus chez les rats diabétique et épileptique suggèrent l'implication de ce récepteur en physiopathologie. Ces modèles expérimentaux permettent donc d'étudier le récepteur B₁ central en vue d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques pour le traitement des maladies neurologiques et cardiovasculaires.

SUMMARY

Kinins [bradykinin (BK), kallidin (KD, Lys-BK) and their active metabolites (desArg⁹BK and desArg¹⁰KD)] are peptides acting via the activation of two G-protein coupled receptors denoted as B₁ and B₂. While B₂ receptor is ubiquitous, mediating most effects of kinins, B₁ receptor is induced and up regulated during pathological states. In the periphery, kinins are implicated in cardiovascular homeostasis, contraction and relaxation of smooth muscles, inflammation and nociception. They also play a predominant role in diseases such as asthma, allergies and rheumatoid arthritis, in addition to contributing to the beneficial effects of angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi) in arterial hypertension and diabetes mellitus.

In the central nervous system, kinins are mediators of neuronal pathways involved in the autonomic control of cardiovascular functions. Intrathecal (i.t.) or intra cerebro-ventricular (i.c.v.) administration of BK induces pressor effects that are found to be exaggerated (hypersensitivity) in spontaneously hypertensive rats (SHR). While i.t. administration of desArg⁹BK remains without effect in normal (control) and SHR rats, cardiovascular and nociceptive responses were observed in streptozotocin (STZ)-diabetic rats. Moreover, the recent use of B₁ or B₂ receptor antagonists evidenced therapeutic potential for kinin receptors in the treatment of cerebrovascular and neurological diseases.

However, the duality of their central and peripheral actions raises important questions, particularly in the mechanism of action of ACEi.

This thesis aims at examining the normal and pathological distribution of kinin B₁ and B₂ receptors in the brain and spinal cord of control rats or rats affected by arterial hypertension, diabetes and temporal lobe epilepsy. The experimental approach includes radiolabeling on histological sample conjugated to quantitative autoradiography (*in vitro* autoradiography) and *in situ* hybridization.

Results show that the hypersensitivity of the pressor response to BK in SHR is related to an over expression of B₂ receptors in the spinal cord and cardiovascular centers of the brain. This over expression of B₂ receptor is not secondary to arterial hypertension, but may reflect a genetic feature. However, the effects of desArg⁹BK in STZ diabetic rats are related to an over expression of B₁ receptors in the spinal cord. In epileptic rats, while the spinal cord shows no particularity compared to control rats, an up regulation of B₁ receptors, accompanied by a pronounced down regulation of B₂ receptors occur in various nuclei associated with the cerebral cortex and hippocampus where an acute release of glutamate (a potent excitatory neurotransmitter) has been reported in the presence of the B₁ agonist, LysdesArg⁹BK.

Results of the thesis also evidenced plasticity of kinin B₁ and B₂ receptors in relation with the age, pathological state and treatment with ACEi. The plasticity induced by ageing suggests a role for B₂ receptors in normal conditions, while B₁ receptors are unlikely involved in ageing. Different from the periphery, the modulation of B₁ and B₂ receptors by ACEi in the central nervous system does not support a role for central kinins in the sustenance of arterial hypertension in SHR rat. Whereas the role of B₁ receptor in the CNS remains an open question, results in diabetic and epileptic rats suggest its involvement in physiopathology. Thus diabetic and epileptic kindling rats represent experimental models which allow studying the role of central B₁ receptor with the goal to identify new therapeutic targets for the treatment of neurological and cardiovascular diseases.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-------------|
| <i>SOMMAIRE</i> | <i>i</i> |
| <i>SUMMARY</i> | <i>iii</i> |
| <i>TABLe DES MATIÈRES</i> | <i>v</i> |
| <i>LISTE DES FIGURES</i> | <i>ix</i> |
| <i>LISTE DES TABLEAUX</i> | <i>x</i> |
| <i>LISTE DES ABRÉVIATIONS</i> | <i>x</i> |
| <i>DÉDICACE</i> | <i>xiii</i> |
| <i>REMERCIEMENTS</i> | <i>xiv</i> |
| | |
| <i>CHAPITRE I : INTRODUCTION GÉNÉRALE</i> | <i>1</i> |
| 1.0 <i>Généralités</i> | <i>2</i> |
| 1.1. <i>Les kïnines: quelques moments forts de l'histoire</i> | <i>4</i> |
| 2.0. <i>Le système kallibréine-kïnines</i> | <i>6</i> |
| 2.1. <i>Les kïninogènes</i> | <i>7</i> |
| 2.2. <i>Les kallibréines</i> | <i>8</i> |
| 2.2.1. <i>La kallibréine tissulaire</i> | <i>8</i> |
| 2.2.2. <i>La kallibréine plasmatique</i> | <i>10</i> |
| 2.3. <i>Les kïnines</i> | <i>12</i> |
| 2.4. <i>Les kïninases</i> | <i>13</i> |
| 2.4.1. <i>Les aminopeptidases</i> | <i>13</i> |
| 2.4.2. <i>Les carboxypeptidases</i> | <i>13</i> |
| 2.4.2.1. <i>Les kïninases I</i> | <i>13</i> |
| 2.4.2.2. <i>La NEP et l'EC</i> | <i>14</i> |
| 2.4.2.2.1. <i>Interaction des systèmes rénine-angiotensine et kallibréine-kïnines</i> | <i>15</i> |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.5. | <i>Les récepteurs des kïnines</i> | 17 |
| 2.5.1. | <i>Le récepteur B₁</i> | 19 |
| 2.5.1.1. | <i>Régulation du récepteur B₁</i> | 20 |
| 2.5.1.2. | <i>Mécanismes de signalisation intracellulaire du récepteur B₁</i> | 23 |
| 2.5.2. | <i>Le récepteur B₂</i> | 24 |
| 2.5.2.1. | <i>Régulation du récepteur B₂</i> | 26 |
| 2.5.2.2. | <i>Mécanismes de signalisation intracellulaire du récepteur B₂</i> | 28 |
| 3.0. | <i>Les kïnines périphériques en physiopathologie cardiovasculaire</i> | 33 |
| 3.1. | <i>L'hypertension artérielle: le système rénine-angiotensine</i> | 33 |
| 3.1.1. | <i>Place des kïnines dans l'hypertension artérielle</i> | 35 |
| 3.2. | <i>Place des kïnines dans le diabète</i> | 38 |
| 4.0. | <i>Les kïnines dans le traitement des maladies cardiovasculaires aux incidences cardiovasculaires</i> | 42 |
| 4.1. | <i>Kïnines et Insuline</i> | 42 |
| 4.2. | <i>Participation des kïnines aux effets des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 (IEC)</i> | 43 |
| 5.0. | <i>Présence du système kallibréine-kïnines dans le système nerveux central</i> | 45 |
| 5.1. | <i>Les kïninogènes</i> | 45 |
| 5.2. | <i>Kïninogénases</i> | 46 |
| 5.3. | <i>Les kïnines</i> | 47 |
| 5.4. | <i>Les kïninases</i> | 48 |
| 5.5. | <i>Les récepteurs</i> | 49 |

| | | |
|----------|---|----|
| 5.5.1 | <i>Le récepteur B₂</i> | 49 |
| 5.5.2. | <i>Le récepteur B₁</i> | 51 |
| 5.6. | <i>Rôle des kïnines dans le système nerveux central</i> | 52 |
| 5.6.1. | <i>Contrôle de la température corporelle par les kïnines</i> | 52 |
| 5.6.2. | <i>Contrôle de la nociception par les kïnines</i> | 53 |
| 5.6.3. | <i>Contrôle cardiovasculaire par les kïnines</i> | 55 |
| 5.6.3.1. | <i>Régions centrales impliquées dans le contrôle cardiovasculaire</i> | 55 |
| 5.6.3.2. | <i>Implication des récepteurs B₁ dans le contrôle cardiovasculaire?</i> | 56 |
| 5.6.3.3. | <i>Mécanismes impliqués dans le contrôle cardiovasculaire</i> | 57 |
| 6.0. | <i>Les kïnines centrales en physiopathologie: bases rationnelles, problématiques et objectifs de la thèse</i> | 61 |
| 6.1. | <i>Les kïnines centrales et les maladies neurologiques</i> | 61 |
| 6.1.1. | <i>L'épilepsie temporale</i> | 61 |
| 6.1.1.1. | <i>Problématiques 1</i> | 63 |
| 6.1.1.2. | <i>Objectifs 1</i> | 63 |
| 6.2. | <i>Les kïnines centrales et les maladies aux incidences cardiovasculaires</i> | 64 |
| 6.2.1. | <i>L'hypertension artérielle</i> | 64 |
| 6.2.1.1. | <i>Problématiques 2</i> | 65 |
| 6.2.1.2. | <i>Objectifs 2</i> | 65 |
| 6.2.2. | <i>Le diabète</i> | 66 |
| 6.2.2.1. | <i>Problématiques 3</i> | 67 |
| 6.2.2.2. | <i>Objectifs 3</i> | 67 |

| | |
|---|------|
| | viii |
| <i>CHAPITRE III : L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE</i> | 112 |
| <i>CHAPITRE IV : LE DIABÈTE DE TYPE 1</i> | 145 |
| <i>CHAPITRE V : DISCUSSION GÉNÉRALE</i> | 161 |
| 1.0. <i>Considérations méthodologiques</i> | 162 |
| 1.1. <i>Choix méthodologiques</i> | 162 |
| 1.2. <i>Radiolisation sur coupes histologiques</i> | 163 |
| 1.2.1. <i>L'autoradiographie quantitative</i> | 163 |
| 1.2.1.1. <i>Principes de l'autoradiographie quantitative</i> | 164 |
| 1.2.1.2. <i>L'hybridation in situ</i> | 172 |
| 2.0. <i>Les récepteurs des kïnines en physiopathologie centrale</i> | 173 |
| 2.1. <i>L'épilepsie temporale</i> | 173 |
| 2.1.1. <i>Perspectives</i> | 178 |
| 2.2.0. <i>L'hypertension artérielle</i> | 179 |
| 2.2.1. <i>Perspectives</i> | 186 |
| 2.3.0. <i>Le diabète de type 1</i> | 187 |
| 2.3.1. <i>Perspectives</i> | 193 |
| 3.0. <i>Conclusions</i> | 195 |
| <i>Références</i> | 197 |
| <i>Annexes</i> | 266 |
| - <i>Contribution des auteurs</i> | 267 |
| - <i>Contribution scientifique de l'auteur</i> | 269 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| <i>Figure 1: Système Kallibréine-kinines</i> | 6 |
| <i>Figure 2a: Genèse des kinines dans les tissus</i> | 10 |
| <i>Figure 2b: le système de contact</i> | 11 |
| <i>Figure 3a: Sites d'action des kininases</i> | 14 |
| <i>Figure 3b: Systèmes kallibréine-kinines et rénine-angiotensine</i> | 15 |
| <i>Figure 4: Les récepteurs B₂ et B₁ des kinines</i> | 18 |
| <i>Figure 5: Organisation du gène des récepteurs B₁ et B₂ sur le chromosome 14q32</i> | 19 |
| <i>Figure 6 : Promoteur du gène du récepteur B₁</i> | 22 |
| <i>Figure 7: Topologie du Récepteur B₂</i> | 26 |
| <i>Figure 8: Signalisation intracellulaire du récepteur B₂ (cellule endothéliale)</i> | 32 |
| <i>Figure 9: Système rénine-angiotensine</i> | 34 |
| <i>Figure 10: Activation du RAAS</i> | 40 |
| <i>Figure 11: Représentation des afférences sensorielles chez l'humain</i> | 51 |
| <i>Figure 12 : Effet cardiovasculaire de la BK dans la moelle épinière</i> | 60 |
| <i>Figure 13: Récepteurs B₂ marqués par [¹²⁵I]H[PP-Hoe 140 et [¹²⁵I]Tyr⁸BK</i> | 166 |
| <i>Figure 14: Sélection de lames pour l'autoradiographie chez le rat</i> | 167 |
| <i>Figure 15 : Distribution des récepteurs B₁ et B₂ dans diverses conditions expérimentales chez le rat diabétique STZ, 7 jours post traitement</i> | 170 |
| <i>Figure 16: Densité des liaisons spécifiques des récepteurs B₁ et B₂ dans diverses conditions expérimentales chez le rat diabétique STZ.</i> | 171 |
| <i>Figure 17: Carte du plasmide du récepteur B₁ du rat</i> | 173 |
| <i>Figure 18: Schéma hypothétique de la présence présynaptique des récepteurs B₁ sur les neurones glutamatergiques dans le modèle kindling</i> | 178 |
| <i>Figure 19: distribution des récepteurs B₁ et B₂ chez le rats traités à l'angiotensine</i> | 186 |

Figure 20: Distribution des récepteurs des kinines dans deux modèles de résistance à l'insuline chez le rat

192

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Structure primaire des kinines chez les mammifères

12

Tableau 2: Conditions expérimentales pour l'autoradiographie des récepteurs des kinines

168

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AGES: Advanced glycation end products (produits finaux de glycation avancée)

AP-1: activator protein

AMPc: adenosine monophosphate cyclique

ARNm: messenger de l'acide ribonucléique

BK: bradykinine

CGRP: calcitonin gene-related peptide (peptide relié au gène de la calcitonine)

COX-1: cyclooxygénase -1

COX-2: cyclooxygénase -2

DAG: diacylglycerol

DH: dorsal horn (corne dorsale)

EDHF: le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium

EGF: Facteur de croissance de l'épiderme

ERK: extracellular signal-regulated kinase (kinase régulée par un signal extracellulaire)

GLUT4: la protéine transporteuse de glucose 4

GMPC: guanosine monophosphate cyclique

HMWK: high molecular weight kininogen (kininogène de haut poids moléculaire)

IEC: inhibiteur de l'enzyme de conversion à l'angiotensine-1

IFN- γ : interferon γ

IL-1 β : interleukine -1 β

I κ B: inhibiteur du facteur nucléaire kappa B

IL-1 RA: naturally occurring IL-1 receptor antagonist (antagoniste naturel au récepteur à interleukine-1)

IML: colonne intermédiolatérale

IP3: inositol triphosphate

KD: kallidine

LCR: Liquide céphalo rachidien

L (I-X): laminae

LMWK: low molecular weight kininogen (kininogène de faible poids moléculaire)

LPS: lipopolysaccharides

MAP-kinase: mitogen-activated protein kinase (protéine active par un mitogène)

NF- κ B: facteur de transcription nucléaire (NF) kappa B

NGF: nerve growth factor (facteur de croissance du tissu nerveux)

NO: monoxyde d'azote

ODN: oligodénucléotide

PGE₂: prostaglandine E₂

PGI₂: prostacycline

PKC: protéine kinase C

PLA₂: phospholipase A₂

PLC: phospholipase C

RAGES: récepteurs des AGES

ROS : reactive oxygen species (formes réactives d'oxygène)

SHR: rat spontanément hypertendu

SP1: protéine 1 de spécificité

STATE: signal transducer and activators of transcription (transducteurs de signaux et activateur de transcriptions)

TGF- β : transforming growth factor β

TLE: épilepsie du lobe temporal

TNF- α : facteur de tumeur nécrosant (TNF) alpha

VCAM-1: la molécule d'adhérence vasculaire

VEGF: vascular endothelial cell growth factor (facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires)

WKY: rat Wistar Kyoto

ZE: zone épileptique

DEDICACES

- *Aux disparus: ma grand-mère, AMBROISINE AMWANINI; mon grand père : ANTOINE OLUMUNA, mon très cher père, ANTOINE ONGALI; mon mentor en autoradiographie, le Dr TOMÁS A. READER. Évoquer vos noms entraîne toujours une intense mélancolie, suivie d'un moment de paix intérieure et de recueillement.*
- *Aux vivants: le Vieux AKOUMBOU, MADELEINE MPIRIKALA, LAURENT NGUETSARAT LENDOYE, SIDOINE MBOUNA, ALEXANDRINE NDOGUÉFOUBA, JUSTINE MALEVOULOU et FABIENNE OVOUGUIYISSA. Un geste, un avis, peu importe sa nature, ont été un acquis pour mon jugement et ont forgé ma détermination.*
- *À ma conjointe MARIE YVONNE AKOUME NDONG et à mes filles TIYE et CARELLE ONGALI. Votre présence à mes côtés m'a procuré l'équilibre mental nécessaire.*
- *A vous autres, Boris LENDOYE, Gaston OVEM, Bernard NGAMANKALA, Ben Rocky MBOUNA, Jean Batiste OKONGO, Francis OYOUYOU, Ida ANDAGUI, Cathia Laure ONGANGA, Alexja ONGALI, Carey ONGALI et autres membres de ma très grande famille, je n'ai oublié personne, même si je ne puis tous vous citer.*

« À mon ignorance, source du doute que je préfère aux certitudes. Douter est une mise en cause intelligente, un exercice qui sans cesse cherche à ouvrir les portes enfermées par les convictions et l'idéologie ».

REMERCIEMENTS

Je remercie en premier lieu le Dr RÉJEAN COUTURE, mon directeur de recherche. Je lui destine spécialement ce travail, rendu possible par sa patience, ses enseignements, sa conviction et sa confiance. Ces années passées auprès de lui ont constitué un enrichissement humain et scientifique inoubliable. Son humanisme incontestable et sa compréhension auront été d'une aide colossale.

Je me considère particulièrement privilégié d'avoir profité de son dévouement grâce auquel j'ai pu collaborer fructueusement avec de merveilleux chercheurs au Québec et à travers le monde. Qu'il me soit, en cet instant, permis de remercier toutes ces personnes qui ont favorisé l'expansion de mes compétences et de mon apprentissage en dehors de mon laboratoire d'accueil. J'ai cité les Drs CHANTAL LAMBERT (Pharmacologie, Université de Montréal), GAÉTAN THIBAUT (IRCM, Université de Montréal), DENIS DEBLOIS (CHUM, Université de Montréal), JACQUES DE CHAMPLAIN (Physiologie, Université de Montréal), LAURENT DESCARRES (Pathologie et Biologie cellulaire, Université de Montréal), RÉJEAN DUBUC (kinésiologie, UQAM), DIDIER PRUNEAU (Les laboratoires Fourniers, France), DOMENICO REGOLI (Pharmacologie, Université de Sherbrooke), JOAN BATISTA CALIXTO (Pharmacologie, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil), CHARLES LINDSEY (Biophysique, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de Sao Paulo, Brazil), MICHELE SIMONATO (Pharmacologie et centre des Neurosciences, Université Ferrara, Italie), JEAN-PIERRE GIROLAMI (Inserm, CHU Rangueil, Toulouse, France), HAROUT HASSESIAN (Hôpital Maisonneuve Rosemont, Université de Montréal), JEAN GUY CHABOT et RÉMI QUIRION (Hôpital Douglas, Université McGill).

Je tiens à apporter toute ma reconnaissance à mes parrains, les Drs TREVOR DREW et RICHARD ROBITAILLE pour l'attention et les merveilleux conseils, Merci de m'avoir enduré durant tout ce temps.

Je profite également de cet instant pour remercier mes collègues de laboratoire, MARIA MARTHA CAMPOS, DONATA RODI, CATHLEEN DESCHAMPS, ANDRÉE LESSARD, ROSE MARI VIANNA, NADINE MICHAUD, MADELAINE HARRISSON, FRANK CLOUTIER, HUDSON DE SOUZA BUCK, LIONEL BARBOT, MIHAI PETCU et CALIN SUNGU pour leur aimable sympathie.

Je m'en voudrais énormément si j'oubliais de remercier la contribution de tout le personnel de l'animalerie et les services rendus du personnel de soutien. Mes remerciements vont en particulier à Mesdames CHRISTIANE LAURJER et JEANNE LAVOIE pour leur endurance, leur bonne humeur, leur dextérité et surtout leur amitié qui ont été très appréciés.

Pour finir, Je dirais un sincère gros MERCI à L'UNIVERSITE DE MONTRÉAL; particulièrement aux départements de BIOCHIMIE et de PHYSIOLOGIE, ainsi qu'à la FACULTE DE MEDECINE pour la formation de haute qualité que j'ai reçue. Je t'âcherais d'être le bon ambassadeur par qui ce rayonnement continuera à se perpétuer de génération en génération.

PREMIER CHAPITRE: INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.0. Généralités

Les kinines, incluant la bradykinine (BK), la kallidine (KD; Lys-BK) et la T-kinine (Ile-Ser-BK) sont les membres d'un système biologique complexe, le système kallibréine-kinines. Elles sont formées à partir de leurs précurseurs kininogènes par les enzymes kallibréines, puis elles sont partiellement dégradées en métabolites actifs (desArg⁹-BK, desArg¹⁰-KD et desArg¹¹-T-kinine) par la kininase I et en métabolites inactifs par la kininase II. Leurs effets biologiques sont produits par l'intermédiaire des récepteurs B₁ et B₂ qui appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines trans-membranaires couplés aux protéines G. Le récepteur B₂ est un récepteur constitutif, exprimé de manière ubiquitaire et spécifiquement activé par la BK, la KD et la T-Kinine. Le récepteur B₁ est faiblement exprimé dans les conditions physiologiques normales. Il est induit par ses agonistes (desArg⁹-BK, desArg¹⁰-KD et desArg¹¹-T-Kinine), les cytokines et par les agents pro-inflammatoires.

En périphérie, les kinines sont des peptides vasoactifs, libérés localement et impliqués à titre d'autacoïdes dans l'inflammation, l'immunité, la perméabilité vasculaire, la vasodilatation, la contraction des muscles lisses et la douleur. Elles sont également impliquées dans une variété de pathologies telles le diabète, l'asthme, l'arthrite et les maladies cardiovasculaires.

Toutefois, des études effectuées sur des souris invalidées pour le gène des récepteurs B₁ ou B₂ ou pour le gène des enzymes de synthèse ou de dégradation des kinines ont permis de mettre en évidence des rôles bénéfiques pour les kinines et leurs récepteurs sur le système cardiovasculaire. Entre autres, les récepteurs des kinines participent aux mécanismes d'action des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (IEC), des médicaments de choix dans le traitement des maladies cardiovasculaires et du diabète.

Dans le système nerveux central, les données pharmacologiques et neuroanatomiques suggèrent que les kinines sont des neuromédiateurs extra-synaptiques impliqués dans les circuits associés à la nociception et au contrôle autonome des fonctions cardiovasculaires.

Alors que l'administration systémique de la BK produit une hypotension, son administration centrale (moelle épinière thoracique, tronc cérébral et ventricules cérébraux) entraîne une augmentation de la pression artérielle via l'activation du système nerveux sympathique. De plus, des données récentes suggèrent un potentiel thérapeutique pour les antagonistes des récepteurs des kinines dans les maladies neurologiques et les traumatismes crâniens.

Malgré la dualité fonctionnelle des kinines sur le système cardiovasculaire ainsi que leur implication possible dans les maladies neurologiques, il existe très peu d'études sur la régulation des récepteurs centraux des kinines en physiopathologie cardiovasculaire et neurologique.

Ainsi, l'objectif de cette thèse est de combler ces lacunes dans un modèle de diabète et d'hypertension artérielle (deux maladies aux incidences cardiovasculaires) et un modèle d'épilepsie du lobe temporal (maladie neurologique).

Nous étudierons la distribution et la densité des récepteurs B_1 et B_2 des kinines dans la moelle épinière et le cerveau de rats diabétiques, hypertendus et épileptiques. D'abord, nous examinerons la distribution et les densités normales de ces récepteurs chez les rats sains, puis nous évaluerons les altérations induites par ces pathologies. Chez les rats spontanément hypertendus, les récepteurs seront étudiés à différents stades du développement de la maladie et sous traitement avec des IEC (lisinopril et zopenopril) ou avec un antagoniste des récepteurs AT1 de l'angiotensine II (losartan). Chez les rats diabétiques, l'étude des récepteurs B_1 sera couplée à celle de son ARNm.

Les récepteurs B_1 et B_2 ainsi que l'ARNm du récepteur B_1 seront localisés avec des sondes radioactives sur des coupes histologiques de 20 μm en utilisant respectivement l'autoradiographie quantitative et l'hybridation *in situ*.

1.1. Les kinines: quelques moments forts de l'histoire

La recherche sur les kinines a débuté au début du XX^e siècle après qu'une hypotension fut observée chez l'homme et le lapin à la suite de l'injection intraveineuse d'une fraction d'urine humaine (Abelous et Bardier, 1909). Cependant, les concepts modernes de l'action des kinines et de leur métabolisme ont réellement pris forme en 1926, lorsque, voulant découvrir le responsable de l'anurie chez les patients opérés, Frey confirma l'hypotension produite par l'urine humaine chez le chien (Frey, 1926). Pour la première fois, les effets observés étaient attribués à l'action d'un agent bioactif urinaire, non dialysable, thermolabile et de haut poids moléculaire (Frey et Kraut, 1928). Subséquemment, la présence de cette «substance hypotensive» qui affectait les vaisseaux sanguins fut démontrée dans le sang, le pancréas, les glandes salivaires et prit le nom de *Kreislaufhormon* (hormone circulante) (Frey et Kraut, 1928), ensuite de *kallikreas* (pancréas en Grec) en référence aux grandes concentrations retrouvées dans le pancréas (Kraut et al., 1930). Dix ans plus tard, Eugen Werle découvrait que la kallicroïne (tissulaire) était finalement un enzyme protéolytique qui libérait un polypeptide de haute activité biologique (la kallidine, KD), à partir des protéines plasmatiques kallidinogènes ou kininogènes (Werle et al., 1937), lequel était dégradé par des peptidases (Werle et Grunz, 1939). En 1949, l'équipe du Brésilien Rocha e Silva observa que l'incubation du sang de mammifère avec de la trypsine ou du venin de serpent *Bothrops jararaca* entraînait la libération d'une nouvelle substance relaxante dans le plasma, capable de provoquer des hypotensions et une contraction lente de l'iléum de cobaye. Cette substance vasoactive était alors qualifiée de peptide et prit le nom de bradykinine (BK) du Grec *bradys* (lent) et *kinesia* (mouvement) (Rocha e Silva et al., 1949). Plus tard, la BK fut isolée (Andrade et Rocha e Silva, 1956), grossièrement purifiée (Elliot et al., 1959), puis sa séquence exacte en acides aminés fut établie (Boissonnas et al., 1960). Subséquemment, les kininogènes furent découvertes (Habermann 1963) et la kininase II fut associée à l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (Yang et al., 1970). Les

années 70 marquèrent un tournant déterminant dans la recherche des effets physiologiques de la BK et de ses analogues. C'est ainsi qu'en 1980, Regoli et Barabé décrivent pour la première fois dans une revue, les effets de la BK, de la desArg⁹-BK et de plusieurs analogues de synthèse sur une variété de préparations pharmacologiques (bio-essais). Cette contribution a permis de proposer l'existence de deux types de récepteurs pour les kinines: le récepteur B₁, activé par la desArg⁹-BK et bloqué par la [Leu⁸]-desArg⁹-BK et le récepteur B₂, activé par la BK (Regoli et Barabé, 1980). Un peu plus tard, les premiers antagonistes du récepteur B₂ virent le jour (Vavrek et Stewart, 1985). Enfin, le gène du récepteur B₂ chez le rat (Hess et al., 1994) et celui du récepteur B₁ chez l'humain (Menke et al., 1994) furent clonés.

Depuis lors, les recherches sur les kinines se sont intensifiées, soulignant au passage la complexité du système kallibréine-kinines.

Ainsi, de simples autacoïdes qu'elles étaient, les kinines possèdent désormais un statut de neuromédiateur central (Couture et Lindsey, 2000).

2.0. Le système kalicréine-kinines

Le système peptidergique kalicréine-kinines est complexe. Il englobe les kinines et leurs métabolites actifs, les récepteurs B₁ et B₂, les précurseurs (kininogènes), les enzymes de synthèse (kalicréines) et de dégradation (kininases) (figure 1).

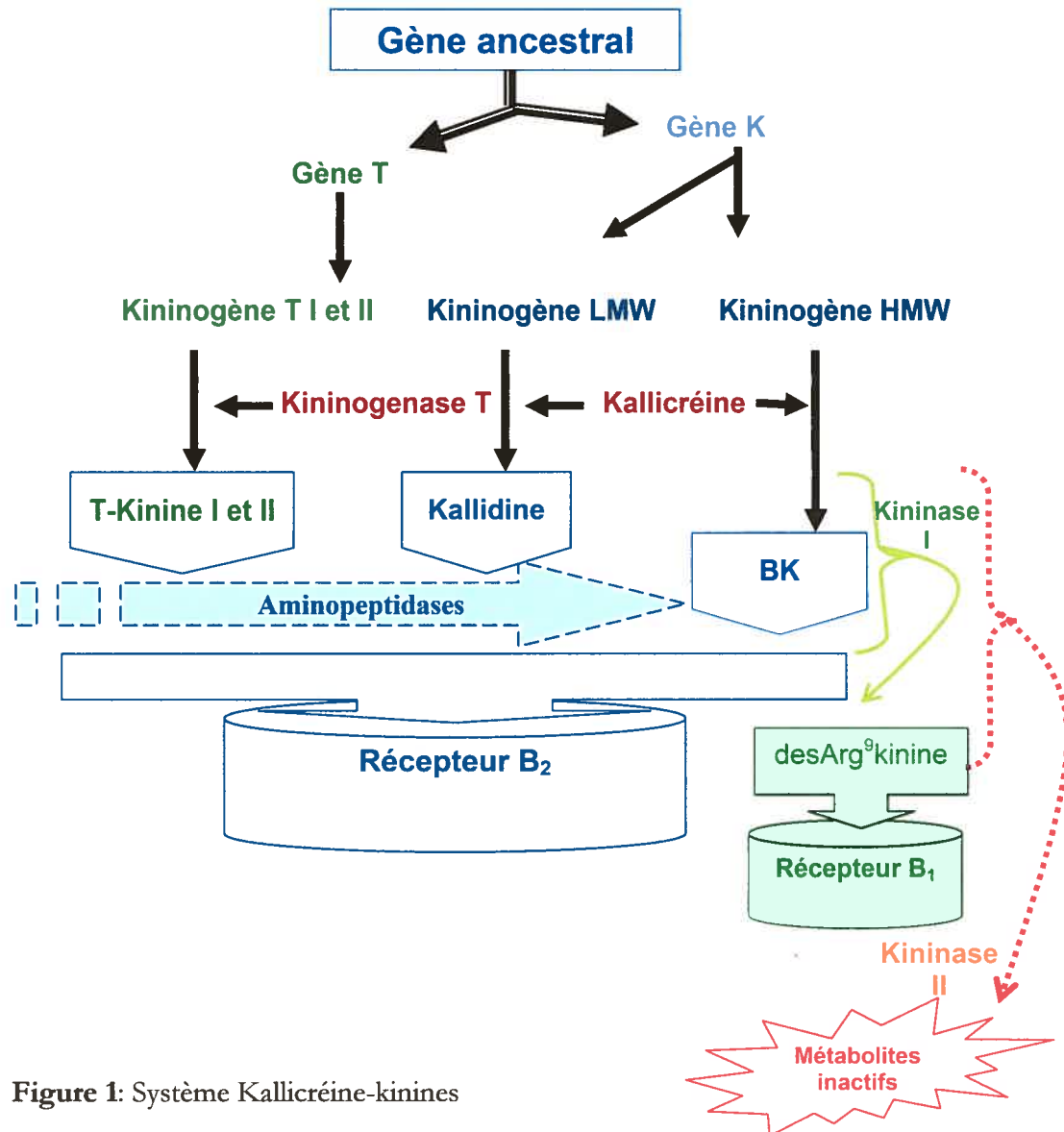


Figure 1: Système Kalicréine-kinines

Les kinines sont générées par clivage protéolytique des kininogènes par les enzymes kalicréines. Elles agissent sur le récepteur B₂ et sont rapidement dégradées par les kininases I et II, respectivement en desArg⁹kinines, agonistes du récepteur B₁, et en métabolites inactifs. Adapté de Couture et Lindsey, 2000.

2.1. Les kininogènes

Les kininogènes sont les substrats sur lesquels les enzymes kalllicréines agissent pour libérer les kinines. Les kininogènes sont constitués de six domaines différents: Le premier domaine sert à la liaison du calcium; les domaines 2 et 3 servent à l'inhibition des protéases à cystéines comme la cathepsine; le domaine 5 sert à lier les surfaces cellulaires comme l'endothélium; le domaine 4 contient la séquence structurelle de la BK et le domaine 6 sert à lier le facteur XI (Weisel et al., 1994). Chez l'humain, les kinines sont formées à partir de deux types de kininogènes hépatiques. Un de haut (HMW, 88 à 120 kDa) et l'autre de faible (LMW, 50 à 68kDa) poids moléculaire. Chez le rat, il existe un autre kininogène, le T-kininogène (68 kDa) qui se présente sous deux isoformes protéiques, T-I et T-II kininogènes, avec 96% d'homologie (Okamoto et Grennbaum 1983). Les deux T-kininogènes proviennent de la duplication du gène T (figure 1), alors que les kininogènes LMW et HMW proviennent de l'épissage alternatif du gène K, un gène de 27 Kb de long (11 exons), retrouvé sur le chromosome 3q26 (Kitamura et al., 1985). Le kininogène HMW est obtenu par la traduction des dix premiers exons alors que le kininogène LMW nécessite la traduction des neuf premiers exons. La séquence de la BK commence respectivement aux dixième et onzième exons (Müller Esterl et al., 1986). Les deux gènes T et K sont issus d'un gène ancestral commun (Nakanishi, 1987; Cole et Schreiber, 1992). Après la libération de la BK, le fragment du kininogène résiduel (kininogène HMW-BK) n'est pas dépourvu d'activité biologique. Entre autres, il participe à l'inhibition des protéases à cystéines, à l'anti-angiogénèse et à l'inhibition de la croissance cellulaire (Gafford et al., 1983; Hu et Fan, 1993; Colman et al., 2000). Parallèlement, la kalllicréine, la BK et les deux types de kininogènes possèdent des propriétés proangiogéniques (Emanueli et al., 2001; Colman et al., 2003).

2.2. Les kallibréines

Les kallibréines ou kininogénases sont des enzymes protéolytiques (protéases à sérines) qui clivent les kininogènes pour libérer les kinines. En marge de ce rôle, les kallibréines et d'autres protéases à sérine, peuvent directement stimuler le récepteur B₂ (Hecquet et al., 2000). De même, en dehors des kallibréines, il existe plusieurs enzymes à activité kininogénase. Mais de toutes, seules les élastases des neutrophiles et la tryptase des mastocytes produisent la BK dans des conditions inflammatoires (Kozik et al., 1998). Toutefois, on ne dénote à l'heure actuelle que deux types de kallibréines: les kallibréines tissulaire et plasmatique.

2.2.1. La kallibréine tissulaire

La famille des gènes encodant pour la kallibréine tissulaire compte un total de 13 différentes kallibréines (famille multigénique). Mais à date, une seule d'entre elles est considérée comme véritable: la "*true-kallibréine*" ou vraie-kallibréine (v-kallibréine). Le gène de la v-kallibréine est localisé sur le chromosome 19, en position 19q13.3-13.4 (Evans et al., 1988). Même si des variantes du gène ont été décrites, le gène de la v-kallibréine dispose d'un seul transcrit (Evans et al., 1988; Rae et al., 1999). Cela suggère la possibilité de gènes non fonctionnels et justifie l'absence protéique des autres variantes du gène. La v-kallibréine est sécrétée sous forme de zymogène (Deperthes et al., 1997) d'une préproenzyme et maturée en proenzyme par un processus protéolytique qui consiste au retrait du dix-septième acide aminé (acide aminé signal). L'activation de la proenzyme se fait par le clivage subséquent de l'acide aminé 7 (acide aminé d'activation). Le clivage de la proenzyme peut aussi se faire par auto-activation ou par d'autres protéases, voire d'autres membres de la famille des kallibréines (Yousef et al., 2001). La v-kallibréine est fortement exprimée dans les glandes salivaires, le colon et le pancréas, mais en faible quantité dans les vaisseaux sanguins, le cœur, les glandes sudoripares, l'intestin, le système nerveux central, les neutrophiles, l'utérus, la prostate, les testicules, le sein et le

placenta (Bhoola et al., 1992; Nolly et al., 1993; Wu et al., 1993; Clements, 1997; Harvey et al., 2000; Meneton et al., 2001). Il existe cependant une autre enzyme, la kallibréine B₁ qui dispose aussi d'une puissante activité kininogénase, mais qui n'a aucun lien génétique avec la v-kallibréine. Bien que le kininogène LMW soit le substrat principal de la v-kallibréine (Hilgenfeldt et al., 1998), cette dernière peut aussi produire des kinines (principalement la KD) à partir du kininogène HMW (Colman et al., 1997). De plus, en dehors des kininogènes, la v-kallibréine dispose d'autres substrats, tel le facteur nerveux β (Bothwell et al., 1979) et peut avoir une activité enzymatique sur d'autres protéines incluant la pro-insuline, les lipoprotéines de faible densité, le précurseur du peptide natriurétique de type A, la prorénine, le peptide intestinal vasoactif, la pro-collagénase et l'angiotensinogène.

Chez l'humain, la kallibréine tissulaire se présente sous la forme de trois enzymes reliées (hk1 à hk3). L'enzyme hk1, considérée comme étant la kallibréine classique, est très efficace dans la production des kinines. L'enzyme hk2 est le puissant intermédiaire entre les enzymes hk1 et hk3. L'enzyme hk3, considérée inactive, est aussi appelée antigène spécifique de la prostate (Deperthes et al., 1997). Néanmoins, sur la base des valeurs de la constante d'affinité (K_m), la formation des kinines reste l'activité primaire de la v-kallibréine *in vivo* (Bhoola et al., 1992). C'est d'autant plus vrai que dans la plupart des tissus incluant les reins, le colon, les glandes salivaires et le pancréas de la souris invalidée pour le gène de la v-kallibréine (Knock out ou KO du gène de la v-kallibréine), on a observé une réduction de 30 à 500 fois la concentration en BK, comparativement à la souris de type sauvage (Meneton et al., 2001). Le processus de la libération de la KD débute par l'activation de la v-kallibréine par des enzymes protéolytiques à la suite d'une lésion tissulaire, un trauma ou en présence d'endotoxines. Puis la v-kallibréine activée agit sur le kininogène LMW et libère la KD (figure 2a).

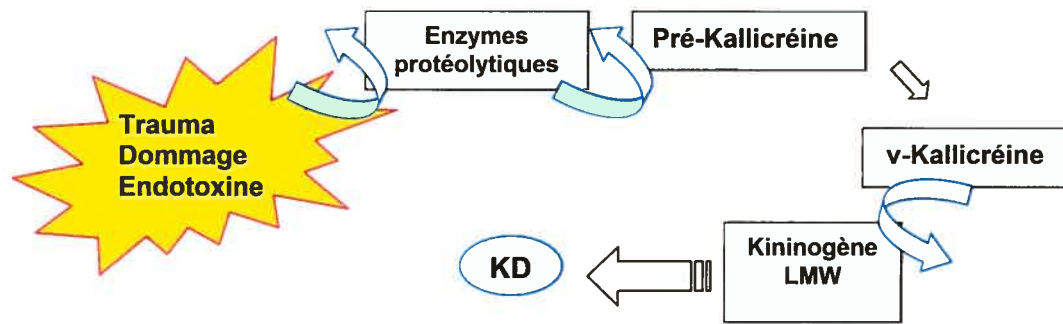


Figure 2a: Genèse des kinines dans les tissus.

Dans le tissu, les kinines sont libérées du kininogène LMW suite à une activation des kallicréines, elles-mêmes activées par les enzymes protéolytiques à la suite d'un trauma tissulaire. Tiré de Gabra et al., 2003.

2.2.2. La kallicréine plasmatique

Le gène de la kallicréine plasmatique (p-kallicréine) est localisé sur le chromosome 4, en position 4q34-35 (Beaubien et al., 1991; Goold et al., 1993). Le messager ribonucléique (ARNm) encode pour une protéine à deux chaînes: une chaîne lourde de 371 acides aminés et une chaîne légère de 248 acides aminés (Chung et al., 1986; McMullen et al., 1991). Bien que l'expression du gène de la p-kallicréine semble plus élevée dans le foie, sa présence a également été montrée dans d'autres tissus incluant le pancréas, le rein et dans différents types cellulaires (Hermann et al., 1999; Neth et al., 2001). Les niveaux de p-kallicréine sont souvent régulés à la baisse dans les pathologies hépatiques, ce qui supporte fort bien le foie comme étant l'organe producteur le plus important de la p-kallicréine (Fisher et al., 1982). *In vivo*, l'activation de la p-kallicréine suit une cascade d'événements particuliers. Le kininogène HMW se lie à l'endothélium, puis un site multi-protéique de la pré-p-kallicréine s'attache au-dessus. La liaison de la pré-p-kallicréine au kininogène HMW entraîne l'activation simultanée de la pré-p-kallicréine en p-kallicréine et le clivage de la BK à partir du kininogène HMW. Cette réaction est suivie de la séparation de la p-kallicréine (nouvellement formée) du kininogène HMW (Motta et al., 1998). *In vitro*, la pré-p-kallicréine peut s'auto-activer (Burger et al., 1986). Bien que le kininogène HMW soit le principal substrat de la p-kallicréine (Margolius, 1995), cette

dernière peut aussi générer la BK à partir du kininogène LMW. De même, en dehors des kininogènes, la p-kallicréine dispose d'autres substrats, incluant la pro-urokinase et le facteur XII (facteur de Hageman). C'est ainsi que la p-kallicréine est le cofacteur de coagulation impliqué dans la réaction d'activation réciproque avec le facteur de Hageman dans le système de contact (figure 2b). La réaction dite de contact est due à la fixation des facteurs XII et XI, de la p-kallicréine et du kininogène sur une surface électronégative comme le sous-endothélium vasculaire ou les plaquettes sanguines (Mandle et al., 1976; Thompson et al., 1977). *In vitro*, cette réaction est observée quand le sang est en contact avec du verre, du kaolin ou des polymères. D'autres faits expérimentaux montrent qu'en présence des p-kallicréines, les kininogènes (HMW) adsorbent les molécules des protéines extracellulaires des py-ogènes *streptococcus* pour libérer la BK; ce qui étend le système de contact aux infections bactériennes (Ben Nasr et al., 1997).

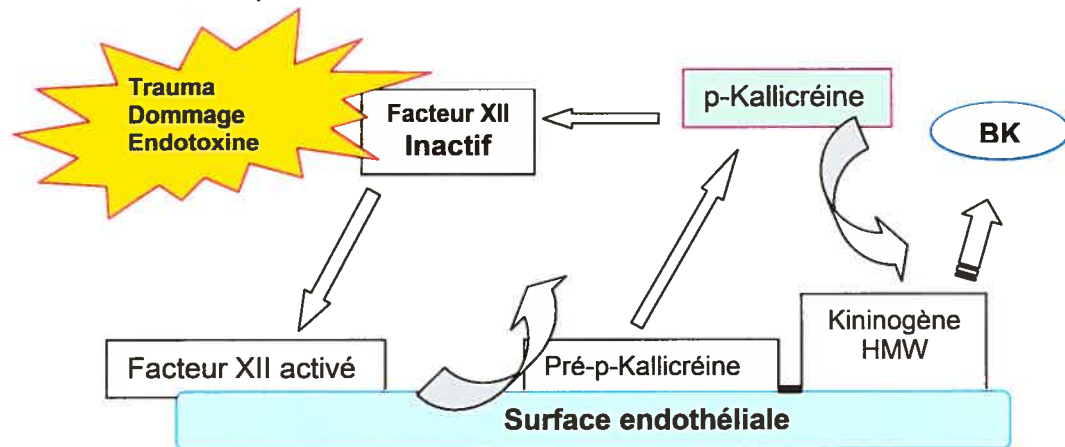


Figure 2b: le système de contact.

Dans le plasma, la formation de la BK est amorcée par l'activation du facteur de Hageman (facteur XII de la coagulation) après un dommage tissulaire, à la présence d'endotoxine ou lorsque le sang rentre en contact avec une surface électronégative telles les composantes de la matrice cellulaire (le collagène, les protéoglycanes et l'héparine) ou les particules négatives comme l'urate, les phospholipides acides, le sulfate de cholestérol, le sulfate de chondroïtine, la carragénine et les lipopolysaccharides. Une fois activé, le facteur de Hageman active, à son tour, la kallicréine qui agira sur le kininogène HMW pour libérer la BK. Adapté de Gabra et al., 2003.

2.3. Les kinines

Tableau 1: Structure primaire des kinines chez les mammifères.

| Nombre d'acides aminés | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|------------------------------------|----------|---|---|---|---|---|---|---|--------|
| BK | | | | | | | | | Arg-OH |
| Kallidine | Lys- | | | | | | | | Arg-OH |
| T-Kinine | Ile-Ser- | | | | | | | | Arg-OH |
| des-Arg⁹-kinines | | | | | | | | | OH |

La structure des kinines s'apparente à celle de la BK. Le retrait de l'arginine en C-terminal génère les des-Arg⁹-kinines. (Adapté de Couture et Lindsey, 2000)

Chez les mammifères, les kinines les plus connues sont la BK, la KD (Lys-BK) et leurs métabolites actifs (desArg⁹-BK et desArg¹⁰-KD) (Hall, 1992).

On compte aussi la T-kinine, retrouvée uniquement chez le rat (Okamoto et Greenbaum, 1983) et dont la production est assurée par une enzyme de synthèse encore inconnue. La structure des kinines s'apparente beaucoup à celle de la BK et compte 9 à 11 acides aminés (tableau 1). Leurs métabolites actifs sont obtenus à partir de la dégradation partielle des kinines par la kininase I. Les kinines sont d'importants médiateurs impliqués dans une variété d'effets biologiques telles l'homéostasie cardiovasculaire, l'inflammation et la nociception (Marceau et al., 1998; Couture et al., 2001). Elles font partie des premiers autacoïdes libérés dans les tissus lésés. Le tout se faisant soit tôt dans la cascade de coagulation (au niveau plasmatique), soit par les protéases produites au sein de la lésion tissulaire (Bhoola et al., 1992). Dans le système nerveux central, les kinines jouent un rôle de médiateurs extra-synaptiques importants dans le contrôle autonome de la pression artérielle et la nociception (Couture et Lindsey, 2000).

2.4. Les kininases

Les kininases sont les enzymes de dégradation des kinines. Elles sont très efficaces (demi-vie de 30 sec pour la BK) (Décarie et al., 1996) et elles sont présentes dans le sang, les tissus et les liquides biologiques. On compte deux grands groupes de kininases: Les aminopeptidases et les carboxypeptidases (figure 3a & b).

2.4.1. Les aminopeptidases

Les aminopeptidases n'inactivent pas les kinines et leurs métabolites actifs. Ils agissent sur la T-kinine, la KD et leurs métabolites actifs desArg¹¹T-kinine et desArg¹⁰KD à l'extrémité N-terminale pour les transformer respectivement en BK et desArg⁹BK (Wolfrum et al., 1999).

Il existe deux types d'aminopeptidases: l'aminopeptidase M (KD et desArg¹⁰KD) et l'aminopeptidase P (T-kinine et desArg¹¹T-kinine) chez le rat (Chen et al., 1991) (figure 3a).

2.4.2. Les carboxypeptidases

Les carboxypeptidases sont les kininases les plus importantes du système kallicréine-kinines. Elles clivent les kinines à l'extrémité C-terminale et peuvent être également divisées en sous-groupes sur la base de leurs activités enzymatiques: les kininases I, la kininase II ou enzyme de conversion de l'angiotensine-I (EC) et l'enképhalinase (encéphaline) ou endopeptidase neutre (NEP).

2.4.2.1. Les kininases I

Les kininases I ont été découvertes dans les années 60. Elles englobent les carboxypeptidases M (dans les membranes cellulaires) et N (dans le plasma). Les kininases I clivent spécifiquement le lien entre l'arginine en C-terminal (position 9) et la phénylalanine en position

2.4.2.2.1. Interaction des systèmes rénine-angiotensine et kallibréine-kinines

Les systèmes rénine-angiotensine et kallibréine-kinines interagissent à plusieurs niveaux (figure 3b).

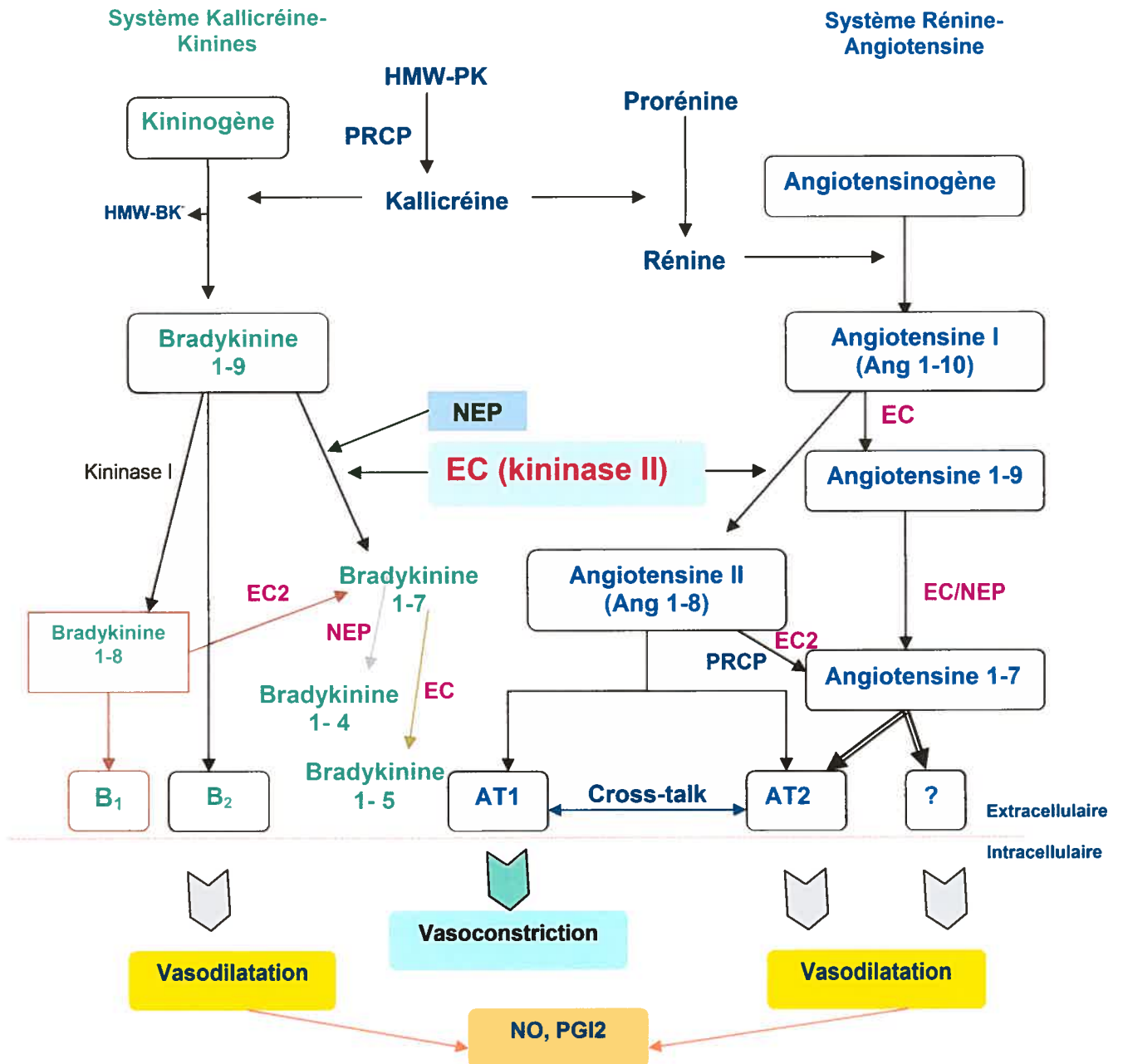


Figure 3b: Systèmes kallibréine-kinines et rénine-angiotensine.

La kallibréine, l'enzyme de conversion et la communication intracellulaire permettent des interactions entre les deux systèmes (Palkhivala et al., 2001; Tschöpe et al., 2002; Howl et Payne, 2003). Les IEC et les

bloqueurs AT1 assument la vasodilatation principalement par le truchement des récepteurs B₂, AT2 et d'un récepteur à l'Ang 1-7 encore inconnu. PRCP : enzyme lysosomiale pro-X carboxypeptidase assurant l'activation de la pré-kallicréine plasmatique à partir du complexe kininogène HMW-PK-Cellule endothéliale entraînant la libération de la kallicréine, une enzyme à plusieurs substrats qui hydrolyse le kininogène HMW ou le kininogène LMW (avec une faible affinité) pour libérer la BK et transformer la prorénine inactive en rénine (Hummerich et al., 1979; Morris et Catanzaro, 1981; Kim et al., 1991). Graphique adapté de Schmaier, 2003.

La rénine est une protéase aspartyle essentielle pour la transformation de l'angiotensinogène en angiotensine I, un composé complètement inactif. Son activation en angiotensine II est assurée par l'EC ou kininase II qui parallèlement dégrade la BK (Erdös et Yang, 1967; Yang et Erdös, 1967; Yang et al., 1968, 1970; 1971). L'EC est responsable de 40 à 100% de l'activité des kininases dans le plasma sanguin et les tissus (Blais et al., 1997), suggérant que les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'EC (IEC) sont tributaires de la potentialisation des effets des kinines (Dendorfer et al., 2000; Tom et al., 2003).

Récemment, un autre type d'EC a été découvert, c'est l'enzyme de conversion 2 (EC2), principalement retrouvée dans le cœur, les reins et les testicules (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000; Bernstein, 2002; Crackower et al., 2002; Acharya et al., 2003). Chez l'humain, le gène qui encode pour l'EC2 est largement exprimé dans le cœur, les reins, le colon, le petit intestin et les testicules où il existe une homologie de 60% entre les deux ECs.

Au niveau protéique, l'EC2 comprend 805 acides aminés avec un domaine trans-membranaire et une séquence consensus liant le zinc (acides aminés en position 374-378). Son domaine catalytique dispose d'une homologie identique de 40-42% avec le premier site de l'EC classique (Donoghue et al., 2000). Alors que l'EC classique possède deux sites actifs spécifiques et distincts, l'EC2 est une métalloprotéase avec un seul site actif (Tipnis et al., 2000). C'est

probablement la raison pour laquelle les IEC conventionnels sont sans effet sur les substrats de l'EC2 (Tikellis et al., 2003). Par contre, l'EC2 agit en clivant le résidu en position C terminale des peptides dont certains sont des substrats de l'EC. Entre autres, l'EC2 agit sur l'angiotensine I et la transforme en Ang I (1-9) (Turner et al., 2002) qui sera convertie par la suite en Ang (1-7) par l'EC (Donoghue et al., 2000). Notons au passage que l'Ang (1-7) est le peptide prédominant libéré par l'action de l'EC2 sur l'angiotensine II (Brosnihan, 1998; Turner et al., 2002). L'Ang (1-7) stimule la relâche des prostaglandines et du NO. Il potentialise les effets de la BK en augmentant sa relâche (Deddish et al., 1998; Gorelik et al., 1998) et s'oppose à la vasoconstriction induite par l'angiotensine II. Il produit également d'autres effets dont l'anti-apoptose et la prolifération cellulaire (Ferrario et Lyer, 1998; Tallant et al., 1999; Ueda et al., 2000) en activant un récepteur non identifié et le récepteur AT2 (Shmaier, 2003), suggérant un rôle essentiel dans la régulation des fonctions cardiovasculaires (Crackower et al., 2002; Oudit et al., 2003). L'EC2 agit également sur la neurotensine et la kinetensine qui sont aussi ses substrats (Turner et al., 2002). Il ne dégrade pas la BK alors qu'il dégrade la desArg⁹BK ou BK(1-8) en BK (1-7). L'implication physiopathologique de cette action de l'EC2 sur la desArg⁹BK reste inconnue (Shmaier, 2003).

2.5. Les récepteurs des kinines

Sur la base de critères pharmacologiques, plusieurs types de récepteurs ont été proposés pour les kinines (Liona et al., 1987 ; Rifo et al., 1987; Regoli et al., 1993). Toutefois, seulement les récepteurs B₁ et B₂ ont été clonés (leur topologie est présentée sur la figure 4). Chez l'humain, malgré une homologie de près de 36% entre les deux récepteurs, l'analyse structurale révèle que les messagers ribonucléiques (ARNm) des deux récepteurs sont encodés dans des gènes distincts (Powell et al., 1993; Webb et al., 1994) existant en une seule copie sur le chromosome 14 (figure 5), en position q32 (Ma et al., 1994; Kammerer et al., 1995), entre les marqueurs

D14S265 et D14S267 (Bachvarov et al., 1996, Chai et al., 1996 ; Yang et Polgar, 1996). Les ADN complémentaires (ADNc) des deux récepteurs codent pour deux peptides de même masse moléculaire (41kDa) composés de 353 (B_1) et de 364 acides aminés (B_2) (Menke et al., 1994).

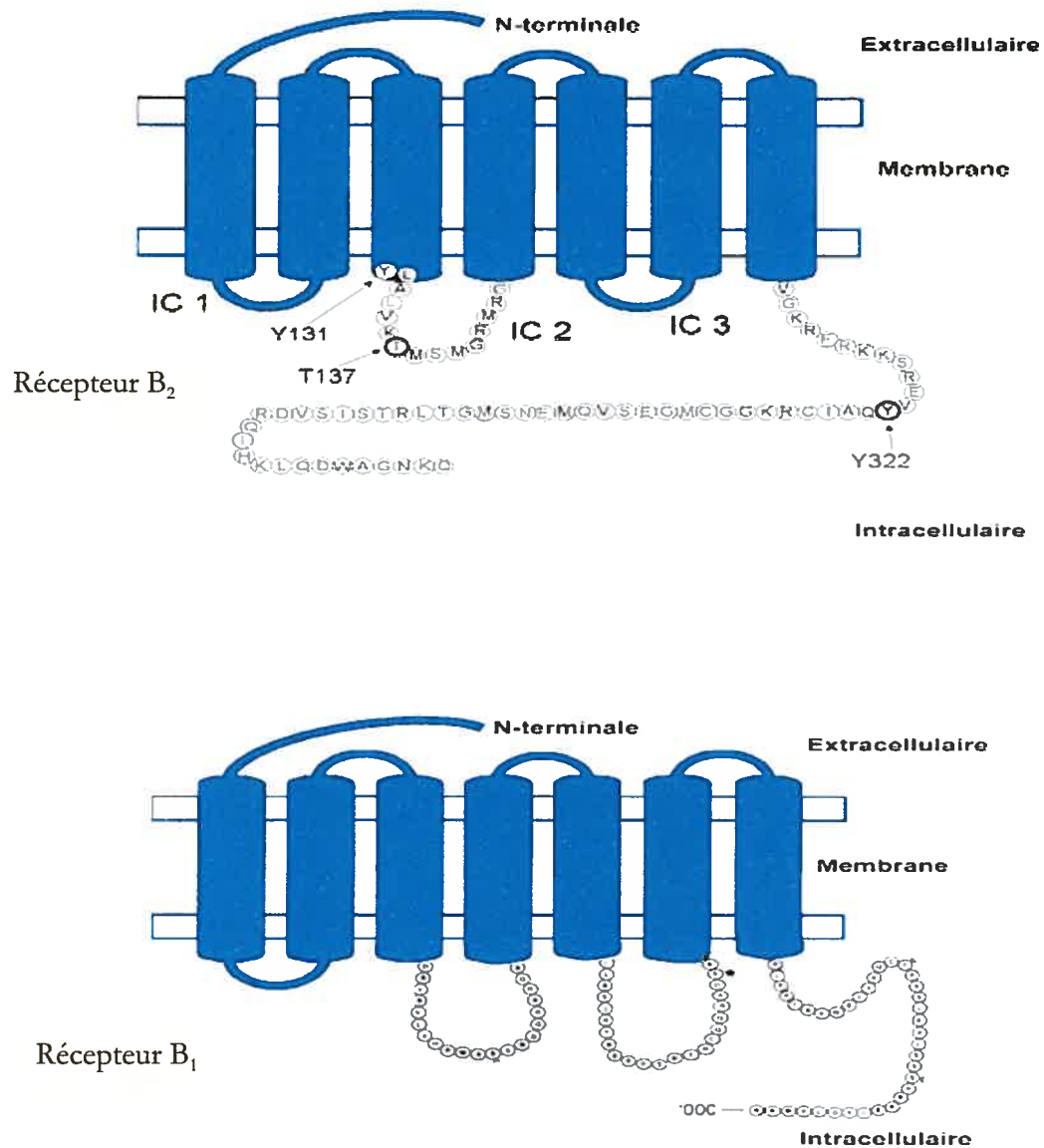


Figure 4: Les récepteurs B_2 et B_1 des kinines.

Les différences notables concernent surtout l'extrémité C-terminale et les boucles intracellulaires (IC) 2 et 3.

Adapté de Raidoo et Bhoola, 1998 et de Prado et al., 1998

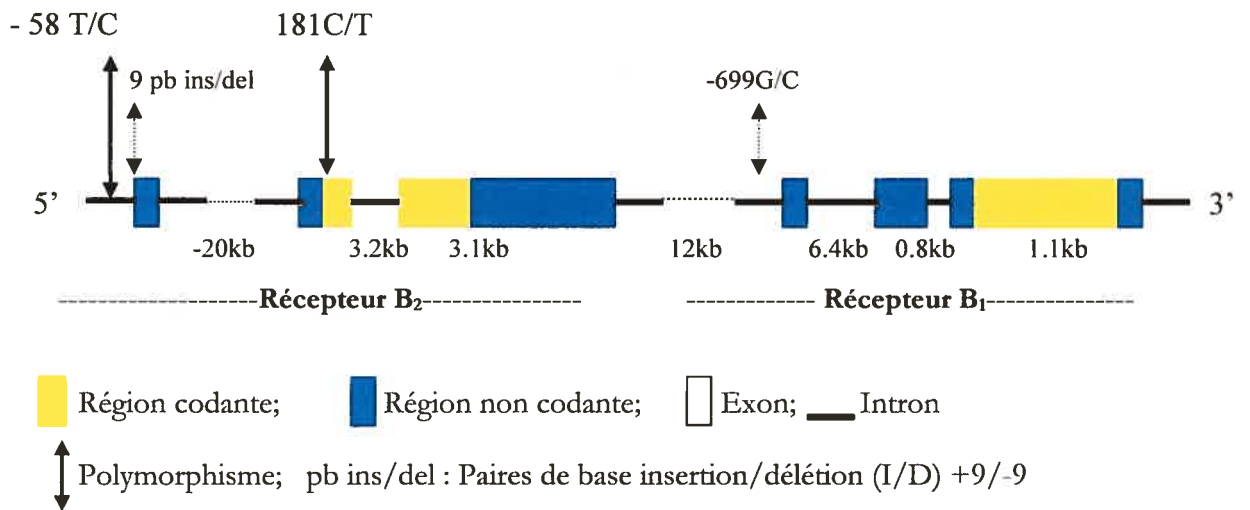


Figure 5: Organisation du gène des récepteurs B₁ et B₂ sur le chromosome 14q32. Pour le récepteur B₁, le bloc transcrit est l'exon 3 (en jaune) alors que les exons 1 et 2 (en bleu) représentent l'extrémité 5' de la région non transcrite. Quant au récepteur B₂, l'exon 1 et une portion de l'exon 2 (en bleu) représentent la région 5' non transcrite. Les exons 2 et 3 codent pour le récepteur (en jaune). On peut également remarquer les nombreux polymorphismes (en double flèches) présentés sur le gène du récepteur B₂. Adapté de Prado et al., 2002.

2.5.1. Le récepteur B₁

La caractérisation pharmacologique du récepteur B₁ a été effectuée dans les années 70 (Regoli et al., 1977). Le récepteur B₁ a été cloné chez le lapin où il a été découvert ainsi que chez l'humain, la souris, le rat et le chien avec une homologie de près de 68-89% (Menke et al., 1994; MacNeil et al., 1995; Pesquero et al., 1996; Hess et al., 2001). Selon les espèces, l'affinité du récepteur B₁ n'est pas la même pour ses deux principaux ligands endogènes (desArg¹⁰kallidine et desArg⁹BK). En effet, alors que le récepteur B₁ humain montre une haute affinité pour la desArg¹⁰kallidine, il présente une affinité 2000 fois inférieure pour la desArg⁹BK (Menke et al., 1994). Chez le lapin, le récepteur B₁ a une affinité 150 fois plus faible

pour la desArg⁹BK que pour la desArg¹⁰kallidine. Par contre, le récepteur B₁ de la souris, dont l'homologie est de près de 73% avec celui du lapin, dispose d'une affinité trois fois plus élevée pour la desArg⁹BK. Chez la gènte canine, l'affinité du récepteur B₁ est similaire pour les deux ligands, alors que son homologie est de 81% avec le récepteur B₁ humain (Prado et al., 2002). Ainsi, selon l'espèce, le récepteur B₁ peut préférer l'un ou l'autre de ses agonistes endogènes ou les deux (Hess et al., 1996; Regoli et al., 1998).

2.5.1.1. Régulation du récepteur B₁

À l'exception de certaines espèces comme la souris (Nsa Allogho et al., 1998), le chien (Lortie et al., 1992; Su et al., 2000) ou le chat (DeWitt et al., 1994) qui expriment le récepteur B₁ de manière constitutive, son expression est très faible dans les tissus sains (Bhoola et al., 1992). Le récepteur B₁ peut être induit par ses agonistes endogènes, desArg⁹BK et desArg¹⁰KD (Schanstra et al., 1998; Campos et al., 1999), et par les cytokines dans les conditions inflammatoires (Galizzi et al., 1994 ; Marin-Castaño et al., 1998).

En effet, le gène du récepteur B₁ est intimement lié à des éléments régulateurs négatifs en amont des -682 et -604 paires de bases du site d'initiation transcriptionnel (figure 6) et dispose des sites de liaison pour la famille d'activateurs de protéine-1 (AP-1), la sous-famille d'éléments de transcription 3 (PEA3), la protéine 1 de spécificité (SP1), le facteur 1a inductible de la PMA (Pif-1a), le facteur transcriptase liant l'Octamer (Oct-1), les éléments de réponse à l'acide monophosphate cyclique (CREB), le facteur de transcription nucléaire kappa B (NFκB), l'élément de réponse à l'AMP cyclique et même pour la boîte CAAT (Ni et al., 1998a et b, Yang et al., 1998 ; Angers et al., 2000).

De même, les régions s'étendant de -2582 à +34 contiennent les éléments de régulation des lipopolysaccharides (LPS), de l'interleukine 1 bêta (IL-1β), du facteur nécrosant de tumeur alpha (TNF-α), du NFκB et des éléments de réponse à l'AMPc (Ni et al., 1998 a et b).

Toutefois, de tous ces éléments, le facteur AP-1 semble le plus crucial pour induire complètement l'activation du récepteur B₁ (Yang et al., 1998) via un intermédiaire clé, le gène C-Jun (Yang et al., 2001).

En effet, les sites de liaison pour la famille AP-1 sont logés à l'intérieur de l'amplificateur de la région promotrice du récepteur B₁ où ils sont essentiels pour l'activation de la transcription du récepteur B₁ (Yang et al., 1998). De même, la transcription de la famille des facteurs AP-1 est importante dans l'expression de plusieurs gènes inductibles, comme la cyclooxygénase-2 (COX-2) ou la synthèse du monoxyde d'azote inductible (Benbow et Brinckerhoff, 1997; Marks-Konczalik et al., 1998; Guan et al., 1998; 1999).

De plus, les membres de la famille AP-1 interagissent avec d'autres facteurs de transcription, dont le NFκB (Zhu et al., 2003) et activent les voies mitogéniques avec les protéines MAP Kinase (MAPK) ERK, JNK et P 38 kinase (Wisdom, 1999). Cependant, l'activation des MAPK et de la Protéine kinase C (PKC) peut également entraîner l'activation du facteur NFκB (Levesque et al., 1995; Schanstra et al., 1998 ; Campos et al., 1999 ; Christopher et al., 2001) et la production des cytokines (IL-1, -6, -8 et TNF-α), des facteurs de croissance de l'épiderme (EGF) et du collagène, qui à leur tour entraînent l'augmentation du récepteur B₁, la fibrose et la croissance tissulaire (Tiffany et Burch, 1989; Levesque et al., 1995 ; Phagoo et al., 1999 ; Ricupero et al., 2000 ; Parenti et al., 2001).

Aussi, étant donné que d'une part, la mutagenèse du facteur NFκB est suffisante pour abolir la majorité des effets obtenus à la suite de l'action des LPS, IL-1β, et TNF-α (Ni et al., 1998 a et b) et que d'autre part, la surexpression du gène du récepteur B₁ est à la fois régulée au niveau de la transcription et de la stabilisation post-transcriptionnelle de l'ARNm (Zhou et al., 1998, 1999, 2000), le NFκB semble être le médiateur commun des stimuli qui augmentent la transcription du récepteur B₁ (Sabourin et al., 2002; Sardi et al., 2002).

Le récepteur B₁ ne se désensibilise pas par internalisation comme c'est généralement le cas pour la majorité des récepteurs liés aux protéines G (Faussner et al., 1998, 1999). Cette caractéristique permet au récepteur B₁ de jouer un rôle potentiel dans les maladies chroniques et d'être la molécule clé de la signalisation des kinines lors de certains états pathologiques (Marceau et al., 1998 ; Naicker et al., 1999), tel le processus inflammatoire au cours duquel le récepteur B₁ sert au recrutement des leucocytes, à l'initiation de la réponse inflammatoire (Pesquero et al., 2000 ; Vianna et al., 2003) et à la douleur (Couture et al., 2001).

La stimulation du récepteur B₁ induit une vasodilatation (Audet et al., 1997, Su et al., 2000). Ce phénomène semble se produire aussi bien sur le récepteur B₁ constitutif dans les vaisseaux du chien (Nakhostine et al., 1993) que sur celui qui est induit par l'inflammation causée par le LPS chez le lapin (Audet et al., 1997).

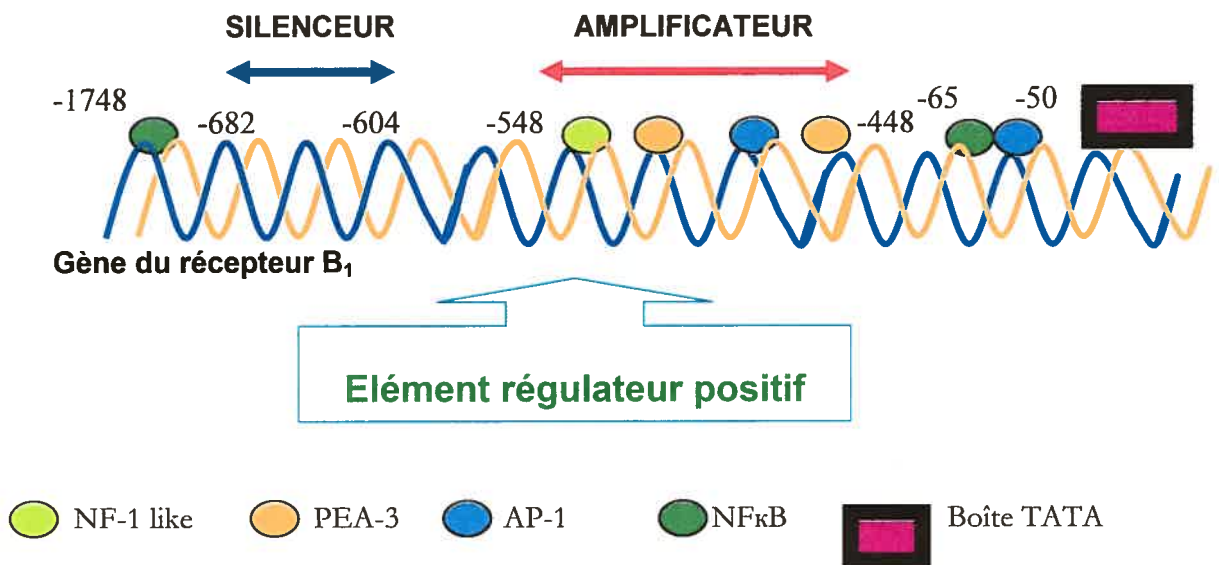


Figure 6 : Promoteur du gène du récepteur B₁.

Représentation schématique du promoteur du récepteur B₁ chez l'humain. Les cercles de couleur représentent les éléments cis. Pour permettre l'intégration des signaux extracellulaires, les différents facteurs transcriptionnels interagissent entre eux et modulent leurs activités transcriptionnelles réciproques de manière synergique ou contradictoire (Vlaeminck-Guillem et al., 2003). Adapté de Prado et al., 2002.

2.5.1.2. Mécanismes de signalisation intracellulaire du récepteur B₁

Les analyses en immunoprécipitation montrent que le récepteur B₁ est couplé aux protéines G α q11 et G α i (1,2) (Austin et al., 1997). La liaison de la desArg⁹BK ou de desArg¹⁰KD au récepteur B₁ entraîne l'activation des protéines Gq et i₂ et l'activation de systèmes de seconds messagers différents selon le type cellulaire.

Parmi les systèmes de seconds messagers associés au récepteur B₁, on note l'activation des phospholipases C (PLC) et A₂ (PLA₂) ainsi que l'adénylate cyclase menant à la formation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc diffuse très rapidement dans la cellule pour activer la protéine kinase A qui phosphoryle les canaux potassiques. La PLC entraîne l'augmentation de l'inositol triphosphate (IP₃) et du diacyl glycérol (DAG). L'IP₃ augmente les niveaux intracellulaires de Ca²⁺ et active l'enzyme NOS qui favorise la relâche du NO, un puissant vasodilatateur capable également d'augmenter la concentration de la GMPc dans le muscle lisse (Drummond et Cocks, 1995; Belichard et al., 1996; Agata et al., 2000; Prat et al., 2000; Su et al., 2000). Le DAG active la protéine kinase C (PKC) (Austin et al., 1997; Agata et al., 2000; Prat et al., 2000; Bascand et al., 2003).

Il a été montré que la liaison du récepteur B₁ par son agoniste pouvait également aboutir à la stimulation de la PLA₂ qui cause la relâche de l'acide arachidonique (AA), lequel est transformé en prostaglandines (PGE₂) par les cyclooxygénases (Levesque et al., 1995; Meini et al., 1998; Mclean et al., 1999). Notons que la phosphorylation de P42 MAPK et P44 MAPK via la PKC, Src kinase et MEK, fournit les possibilités d'effets mitogéniques de la desArg⁹BK (Christopher et al., 2001). L'induction de la cascade des MAPK (Larrivée et al., 1998; Campos et al., 1999), des cytokines (Phagoo et al., 2001), des tyrosine kinases et des éléments de réponse au facteur de croissance ou de transcription favorise la surexpression du récepteur B₁ par son agoniste; un effet impliqué dans la prolifération cellulaire (Patel et Schrey, 1992; Graness et al., 2000; Stewart et al., 2002; Taub et al., 2003).

2.5.2. Le récepteur B₂

Le récepteur B₂ a été initialement caractérisé dans des études pharmacologiques sur l'utérus du rat, la veine jugulaire et l'aorte du lapin (Barabé et al., 1975; 1979; Regoli et al., 1977).

La prédiction en acides aminés établit une homologie de 81% entre le gène humain et celui du rat. Les études moléculaires ainsi que le clonage du récepteur B₂ ont été entrepris à partir du muscle lisse du rat (McEachern et al., 1991) et des fibroblastes de poumons humains (Hess et al., 1992). La structure du gène du récepteur B₂ est organisée en trois exons, deux introns et code pour un unique transcrit de 41kb (figure 5). La région codant pour la protéine mature est localisée dans le troisième exon (Ma et al., 1994). Le gène du récepteur B₂ contient plusieurs régions polymorphes tant dans la région promotrice que dans les exons. Cette disposition suggère l'expression de plusieurs ARNm différents, surtout qu'il existe dans ces régions polymorphes des mutations de bases intéressantes. C'est le cas des mutations aux niveaux des bases -58 (T/C) et -412 (C/G) (Braun et al., 1996) dans la région promotrice que l'on sait être impliquée dans l'hypertension artérielle chez les Chinois, les Japonais et les Afro-américains (Gainer et al., 2000 ; Mukae et al., 1999).

Un autre point de mutation a aussi été décrit dans l'exon 2 au niveau +181 (C/T) (Braun et al., 1996; Houle et al., 2000). Le polymorphe le plus important est l'insertion/délétion (I/D) de 9 paires de bases (+9/-9) à +21 -29 dans l'exon 1. Cette délétion est associée à l'expression d'une panoplie d'ARNm par l'allèle supprimé (Lung et al., 1997). Elle marque le lien entre le gène de la kinase II (EC) et le système des kinines. En effet, dans le polymorphe I/D, l'allèle D est adjoint à l'augmentation de l'activité de l'EC (Murphy et al., 2000) en plus d'être associé à la relâche stimulée du NO endothélial chez le jeune adulte (Butler et al., 1999).

Au niveau protéique, la structure du récepteur B₂ humain (figure 4) présente, comme la majorité des récepteurs couplés aux protéines G, sept domaines trans-membranaires, trois

boucles intracellulaires et une extrémité C-terminale. L'extrémité N-terminale contient un motif YXXL et la boucle intracellulaire 2 (IC2) contient un motif étendu.

Des études sur la permutation des extrémités C-terminales des récepteurs B₁ et B₂ démontrent que l'extrémité C-terminale du récepteur B₂ contient des séquences qui sont absentes dans le récepteur B₁ et qui seraient impliquées dans l'internalisation et l'endocytose du récepteur B₂ (Faussner et al., 1998).

Les études en spectroscopie de masse montrent que les motifs Y322 et Y131 du récepteur B₂ (figures 4 et 7), critiques pour la transduction du récepteur (Prado et al., 1997), sont phosphorylés chez le rat (Soskic et al., 1999). La thréonine (T) en position 137 a aussi un potentiel de phosphorylation important pour l'internalisation du récepteur (Prado et al., 1998). Le remplacement de n'importe lequel des trois résidus sérine (S) en position 335, 341 ou 350 de l'extrémité C-terminale par une alanine (A) et le remplacement de la T en position 347 par une valine (V) résultent en un défaut d'internalisation du récepteur.

L'analyse approfondie montre que la présence de la S348 favorise l'internalisation alors que la S341 l'empêche (Prado et al., 2001). Chez l'humain, toute modification en aval des positions Y320 et L334 ou la délétion à l'intérieur du segment couvrant les positions 335-351 ou encore la substitution des S339, 346, 348 ou des T342, T345 (S341, 348, 350, T344 et 347 chez le rat) par l'A diminue le potentiel d'internalisation du récepteur (Pizard et al., 1999).

Une incapacité de phosphorylation du récepteur a été notée après son activation par la BK quand le potentiel d'internalisation est diminué ou altéré, suggérant que la phosphorylation est impliquée dans l'internalisation du récepteur (Pizard et al., 1999).

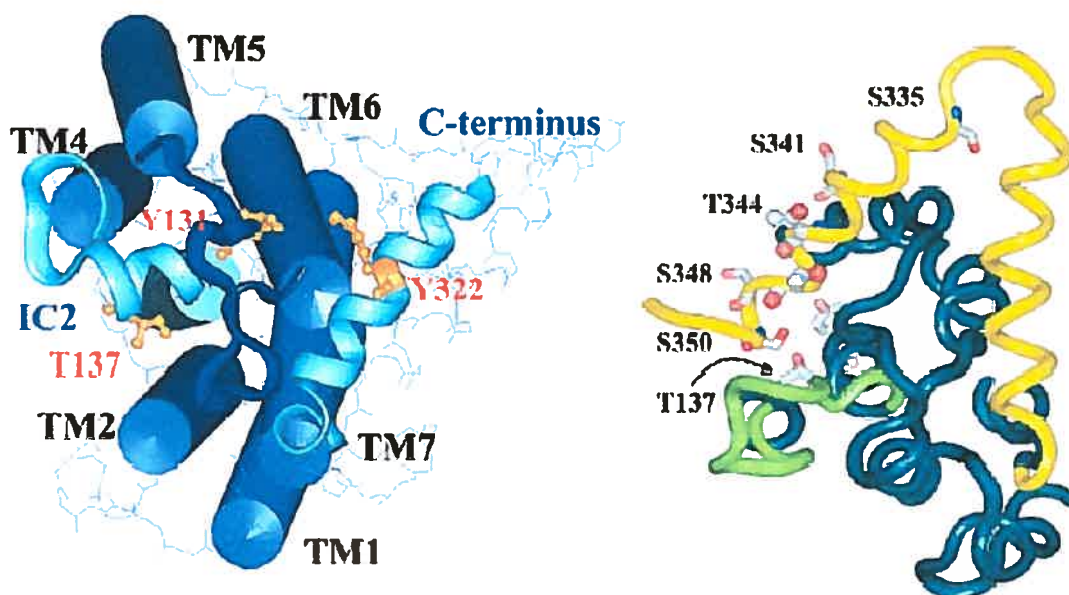


Figure 7: Topologie du Récepteur B₂.

À gauche, le récepteur B₂ humain vu par la face intracellulaire. La proximité du motif Y131 de la deuxième boucle intracellulaire (IC2) et le motif Y322 de l'extrémité C-terminale (noté C-terminus, en bleu pourpre) favorisent l'internalisation du récepteur. À droite, le récepteur B₂ vu au niveau des acides aminés. Il faut cette fois-ci noter la proximité de T137 dans IC2 (en vert clair) avec la grappe S/T à l'intérieur de l'extrémité C-terminale (en jaune), toujours important pour l'internalisation du récepteur. S341 et T137 sont dans le même plan alors que S348 projette en dehors. Les régions transmembranaires sont représentées en vert foncé alors que les acides aminés sont en points gris et rouge. Tiré de Prado et al., 2002.

2.5.2.1. Régulation du récepteur B₂

Les facteurs nucléaires impliqués dans la régulation de l'expression du gène du récepteur B₂ sont inconnus. Une étude sur le gène de rat avait déjà révélé l'absence de la boîte TATA et la présence de certains domaines pour de potentiels facteurs de transcription, comme l'élément de réponse à l'AMPC, l'AP-1, le NF κ B, le SP-1 et l'Egr-1 (Pesquero et al., 1994).

Récemment, l'étude de la région promotrice du gène de rat a permis d'identifier un site de liaison pour le gène suppresseur de tumeur p53 (Saifudeen et al., 2000). Son rôle biologique

dans l'augmentation du récepteur B₂ reste toutefois encore inconnu. Néanmoins, il a été montré que l'induction et l'augmentation respectives des récepteurs B₁ et B₂ par le TNF- α et IL-1 β sont les phénomènes qui se déroulent via des mécanismes post-transcriptionnels impliquant la p38 des MAPK et/ou la PKA (Sawutz et al., 1992 ; Haddad et al., 2000). Aussi, étant donné que la stimulation du récepteur B₂ n'affecte pas les concentrations circulantes de BK, il semble ne pas exister de boucles momentanées de rétrocontrôle entre les kinines et le récepteur B₂ (Campbell et al., 1999a-c).

À cet effet, il a été montré que les taux de kinines endogènes n'exercent aucune régulation de rétrocontrôle négatif, tant sur le récepteur B₂ que sur son expression (Marceau et al., 1999; Tschöpe et al., 1999a & b).

Par contre, il a été aussi montré que la stimulation du récepteur B₂ par son agoniste réduit son affinité à l'égard du ligand, requérant par ce moyen, de plus fortes concentrations de ligand pour le stimuler (Dendorfer et al., 2000). L'internalisation du récepteur B₂ est de courte durée et est complètement réversible après 30 minutes (Windischhofer et Leis, 1997). Ainsi, après sa liaison par la BK, le récepteur B₂ est désensibilisé par internalisation et en majorité recyclé par endocytose (Bachvarov et al., 2001; Marceau et al., 2001; Lamb et al., 2001). La désensibilisation du récepteur B₂ peut être aussi induite par l'antagoniste Hoe 140 ou par l'augmentation intracellulaire des ions Na⁺ alors que la diminution de Na⁺ intracellulaire augmente l'activation du récepteur B₂ en absence d'agoniste (Quitterer et al., 1996; Pizard et al., 1998; Abdalla et al., 1999; Houle et al., 2000). Dans les modèles de souris génétiquement déficientes en G α i, l'expression du récepteur B₂ est augmentée, suggérant un rétrocontrôle entre le récepteur B₂ et les protéines G produisant ses effets biologiques (Mattera et al., 1998). Ce rétrocontrôle intracellulaire pourrait dépendre de la libération du NO qui exerce un rétrocontrôle négatif par l'inhibition sélective des isoformes Gi et Gq des protéines G via un mécanisme GMPc dépendant (Miyamoto et al., 1997).

2.5.2.2. Mécanismes de signalisation intracellulaire du récepteur B₂

La stimulation du récepteur B₂ par la BK déclenche plusieurs mécanismes de signalisation intracellulaire (figure 8) via l'activation des protéines G α_{12} et G α_q (Gutowski et al., 1991; Liao et Homcy, 1993; Busse et Fleming, 1996). Parmi les seconds messagers activés, on note les phospholipases C (PLC), D (PLD) et A₂ (PLA₂) (Revtyak et al., 1990; Farmer et Bursh, 1992; Minshall et al., 1995; Banno et al., 1999). L'activation de la PLC entraîne l'augmentation intracellulaire de l'inositol triphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG) (Francel et al., 1987). L'activation de la PLA₂ conduit à l'activation de l'IP₃ et à la relâche de l'acide arachidonique (AA) qui à son tour, assure la formation des prostaglandines (PGE₂) et de la prostacycline (PGI₂) (Burch et Axelrod, 1987; Gallagher et al., 1998; Saunders et al., 1999; Yamasaki et al., 2000). L'activation concertée des deux phospholipases (PLC et PLA₂) cause une augmentation bi-phasique du Ca²⁺ intracellulaire qui, avec le DAG stimule la PKC (Blaukat et al., 1996). La PLD est activée à travers la PKC α et PKC δ et possiblement par une tyrosine kinase non encore identifiée (Vasta et al., 1998; Lee et al., 2000; Levine et al., 2000; Meacci et al., 2000). L'activation de la PLD entraîne l'augmentation de l'acide phosphatidique (PA) et du DAG, lesquels augmentent les niveaux de Ca²⁺ intracellulaire (Angel et al., 1994 ; Walter et al., 2000). Ainsi, toutes les phospholipases en aval de la cascade de signalisation du récepteur B₂ augmentent les niveaux de Ca²⁺ et/ou la synthèse des prostaglandines dans les cellules cibles. C'est par le Ca²⁺ que la stimulation du récepteur B₂ active la NOS pour produire du NO.

Dans les tissus endothéliaux, la NOS (eNOS) est co-localisée avec les protéines Gi et Gq, les kinases janus/signaux transducteurs et activateurs de transcription (JAK/STAT) des voies des tyrosine kinases (TyK₂, STAT₃) et de la voie des MAP kinases (MAPK) (Belhassen et al., 1997) et de la PLD (Meacci et al., 2000). Dans ces tissus, le récepteur B₂ peut être phosphorylé de manière transitoire au niveau des résidus tyrosines en réponse à la stimulation par la BK. Cet événement, catalysé par les MAPK (Zhang et al., 1995; Wen et al., 1995; 1997; Amiri et al.,

1999; Liang et al., 1999), se passe pendant que la eNOS se dissocie temporairement du récepteur B₂ en favorisant l'augmentation transitoire de la production du NO (Marrero et al., 1999). Ces données supportent la régulation de eNOS dans les cellules endothéliales par des interactions inhibitrices et réversibles avec les récepteurs couplés aux protéines G et suggèrent surtout que ces interactions peuvent moduler la phosphorylation du récepteur B₂ et entraîner des conséquences métaboliques.

En effet, la phosphorylation des résidus tyrosine et/ou de sérine/thréonine du récepteur B₂ favorise sa dimérisation et la formation des complexes avec les TyK2 ou les facteurs de transcription dépendant de la tyrosine kinase connus sous le nom de STAT (signal transducer and activators of transcription). L'isoforme STAT3 qui est stimulé dans la cellule endothéliale par phosphorylation de ses résidus sérine par les MAPK forme à son tour des homo- et/ ou hétéro-dimères qui subissent une translocation subséquente du cytosol au noyau cellulaire après 30 à 60 minutes (Marrero et al., 1999; Ju et al., 2000; Oh et Schnitzer, 2001) (voir figure 8). Il existe un mécanisme de rétrocontrôle négatif suivant l'activité de la NOS qui implique la phosphorylation de tyrosines de la MAPK et l'atténuation de l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire qui inhibe la cascade de signalisation du récepteur B₂ et la production de NO. En dehors du NO, la vasodilatation induite par le récepteur B₂ peut aussi provenir de deux autres agents vasodilatateurs. La prostacycline et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF) dont l'identité reste encore mal connue. Il représente la catégorie de composés qui provoquent l'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses induisant ainsi la dilatation du vaisseau (Campbell et al., 1999a). Dans la vasodilatation induite par le récepteur B₂, la contribution de l'EDHF est de 10 à 50% selon les vaisseaux et l'espèce (Zhang et al., 2001; Brandes et al., 2000; Kamei et al., 2000).

Chez la souris génétiquement déficiente pour le gène de la NOS (Brandes et al., 2000), l'EDHF est capable de remplacer le NO dans ses effets vasodilatateurs induits par le récepteur B₂.

Aussi, l'EDHF produit toujours ses effets vasodilatateurs durant l'inhibition de la NOS et de la synthèse des prostaglandines, suggérant une action inhibitrice directe du NO sur l'EDHF (Taddei et al., 1998). Dans les conditions physiologiques normales, le NO pourrait inhiber l'activité de l'EDHF synthase (EDHFS) qui, à son tour, pourrait se mettre en branle dès la diminution de l'activité de la NOS permettant à l'EDHF de remplacer partiellement le NO. D'autre part, l'activation du récepteur B₂ entraîne l'augmentation de l'AMPc/GMPc indirectement via la libération des prostacyclines et du NO qui entraîne la vasodilatation (Gabra et al., 2003).

Par ailleurs, bien que les signaux générés par le récepteur B₂ pour augmenter le Ca²⁺ intracellulaire semblent identiques à ceux du récepteur B₁, il existe des particularités dans la cinétique de l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire. Ceci suggère des divergences dans les voies de signalisation intracellulaires responsables de l'augmentation du Ca²⁺.

En effet, il a été montré que le récepteur B₁ utilise fortement le Ca²⁺ extracellulaire alors que le récepteur B₂ utilise le Ca²⁺ intracellulaire libéré par l'IP₃ du réticulum endoplasmique (Mombouli et Vanhoutte, 1995; Zhou et al., 2000). De plus, plusieurs auteurs ont relevé des différences majeures dans les voies de signalisation entre la cellule musculaire lisse et les autres types cellulaires. En effet, la liaison de la BK au récepteur B₂ de la fibre musculaire lisse vasculaire entraîne une vasoconstriction (Dixon et al., 1994). Cette activation par la BK serait due au Ca²⁺ intracellulaire libéré par l'IP₃ à la suite de l'activation de la PLC.

Mais, contrairement aux autres types cellulaires, dans la cellule musculaire lisse, la BK stimule les voies de ERK/ElK-1/AP-1 (extracellular signal-regulated kinase/activator protein) qui activent l'expression de c-fos par la voie des ROS (reactive oxygen species ou formes réactives de l'oxygène) et la production du TGF-β (transforming growth factor β). La conséquence tangible est l'augmentation de la prolifération cellulaire et de la fibrose par l'accroissement de la production du collagène dans les cellules des muscles lisses vasculaires. Cette prolifération

cellulaire influence négativement les matrices métalloprotéases ainsi que leurs inhibiteurs tissulaires (Douillet et al., 2000; Green et al., 2000; Yau et al., 2001) alors que, dans la cellule endothéliale, l'activation du récepteur B₂ induit des effets antifibrosant et hypotrophique (Matoba et al., 1999). Cette dichotomie prend son sens dans les processus de réparation tissulaire. Car, dans les conditions normales, la BK stimule en prédominance ses récepteurs endothéliaux, vu que les récepteurs B₁ et B₂ des muscles lisses sont en-dessous des cellules endothéliales. Mais après un dommage endothélial, la BK peut directement activer ses récepteurs sur les muscles lisses, causant la contraction et la prolifération afin de minimiser le dommage tissulaire et d'initier la réparation. Cette situation est une belle illustration des effets fibrosants et antifibrosants de la BK (Bascands et al., 2003); effets également observés au niveau pulmonaire, cardiaque et rénal (Gallagher et al., 1998; Ricupero et al., 2000; Schanstra et al., 2002).

Dans la cellule musculaire des voies aériennes supérieures, Huang et collaborateurs (2003) ont observé que la BK pouvait, une fois liée au récepteur B₂, induire l'expression de l'IL-6 par un processus impliquant ERK1/2 et le facteur P38 de la voie des MAPK et la transcription du facteur AP-1 (Huang et al., 2003).

De plus, vu que l'activation du récepteur B₂ peut activer le facteur NFκB qui à son tour est inducteur du récepteur B₁ (Phagoo et al., 1999) via une voie qui implique la sérine/thréonine kinase Akt (Xie et al., 2000), on peut suggérer une autorégulation réciproque entre les deux récepteurs, d'autant plus que l'invalidation du récepteur B₂ entraîne une surexpression du récepteur B₁ (Duka et al., 2001; Marin-Castaño et al., 2002). Mais cette idée demeure controversée puisque l'expression des récepteurs B₁ et B₂ demeure inchangée après un traitement chronique avec des agonistes et des antagonistes pour l'un ou l'autre des deux récepteurs (Sabourin et al., 2001).

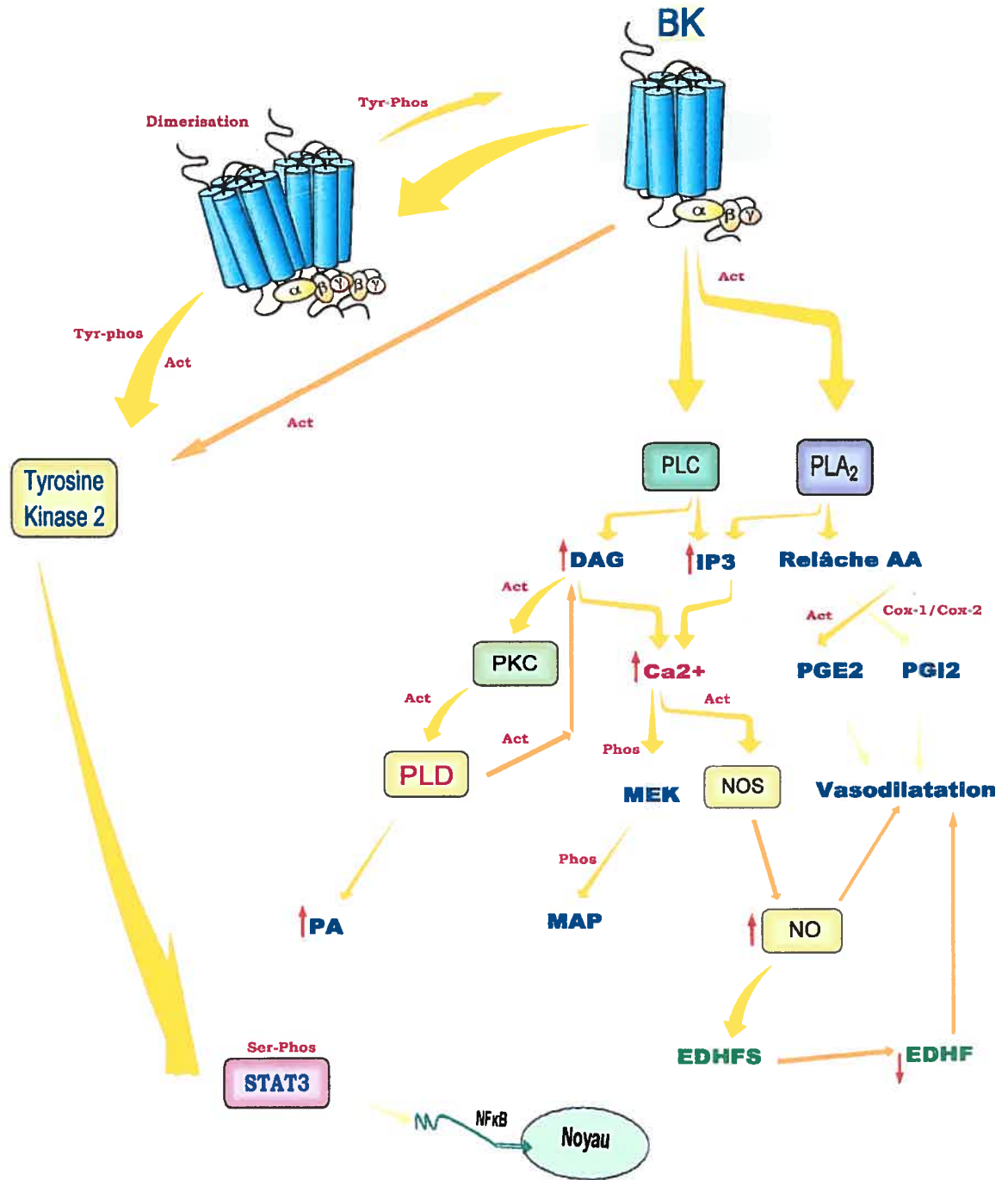


Figure 8: Signalisation intracellulaire du récepteur B₂ (cellule endothéliale).

L'activation des MAPK catalyse la phosphorylation d'une sérine de STAT₃, maximisant ainsi son activité transformationnelle et résultant en la translocation de STAT₃ dans le noyau cellulaire (Ju et al., 2000). La stimulation du récepteur B₂ peut activer le facteur NFκB et aboutir à la production des cytokines telle IL-1β

(Pan et al., 1998; Xie et al., 2000). *Act*: activation; *Phos*: Phosphorylation; *ser*: serine; *tyr*: tyrosine; *AA*: arachidonique; *PA*: acide phosphatidique; *EDHFS*: facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium synthetase; *Cox*: cyclooxygénases; *NOS*: Oxyde nitrique synthetase; *NO*: monoxyde d'azote ou oxyde nitrique.

3.0. Les kinines périphériques en physiopathologie cardiovasculaire

3.1. L'hypertension artérielle: le système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine (figure 9) est par excellence le principal système régulateur des volumes de fluide corporel, de la balance électrolytique et de la pression artérielle (Ardaillou, 1999). Une hyperactivité de ce système entraîne l'hypertension artérielle. L'angiotensine assure ses effets par le relais de deux types de récepteurs (Ardaillou, 1999), le récepteur AT1 qui est bloqué par les biphenylimidazoles (exemple le losartan) et le récepteur AT2 qui est bloqué par les tetrahydroimidazopyridines (exemple le PD123319) (Chiu et al., 1990; Timmermans et al., 1993). Ces deux récepteurs ont été clonés et caractérisés. Ce sont des récepteurs couplés aux protéines G (Yamada et al., 1996) dont l'expression varie en fonction de l'âge.

Le récepteur AT2 est surexprimé chez le fœtus et décline rapidement après la naissance et chez l'adulte (Ozono et al., 1997). L'activation du récepteur AT1 par l'Ang II cause la vasoconstriction, la rétention sodique, des effets antidiurétiques et hypertenseurs par l'intermédiaire de l'IP3.

La stimulation du récepteur AT2 provoque l'inhibition de l'IP3, la vasodilatation, l'arrêt de l'absorption sodique, la natriurèse et l'hypotension (Jin et al., 1998; Siragy et Carey, 1999; Siragy et al., 1999; Haithcock et al., 1999). Le récepteur AT2 cause aussi la vasodilatation et la natriurèse via la relâche rénale de la BK, laquelle active le métabolisme des prostaglandines et la relâche du NO par le récepteur B₂ (Tsutsumi et al., 1999; Carey et al., 2000 a et b).

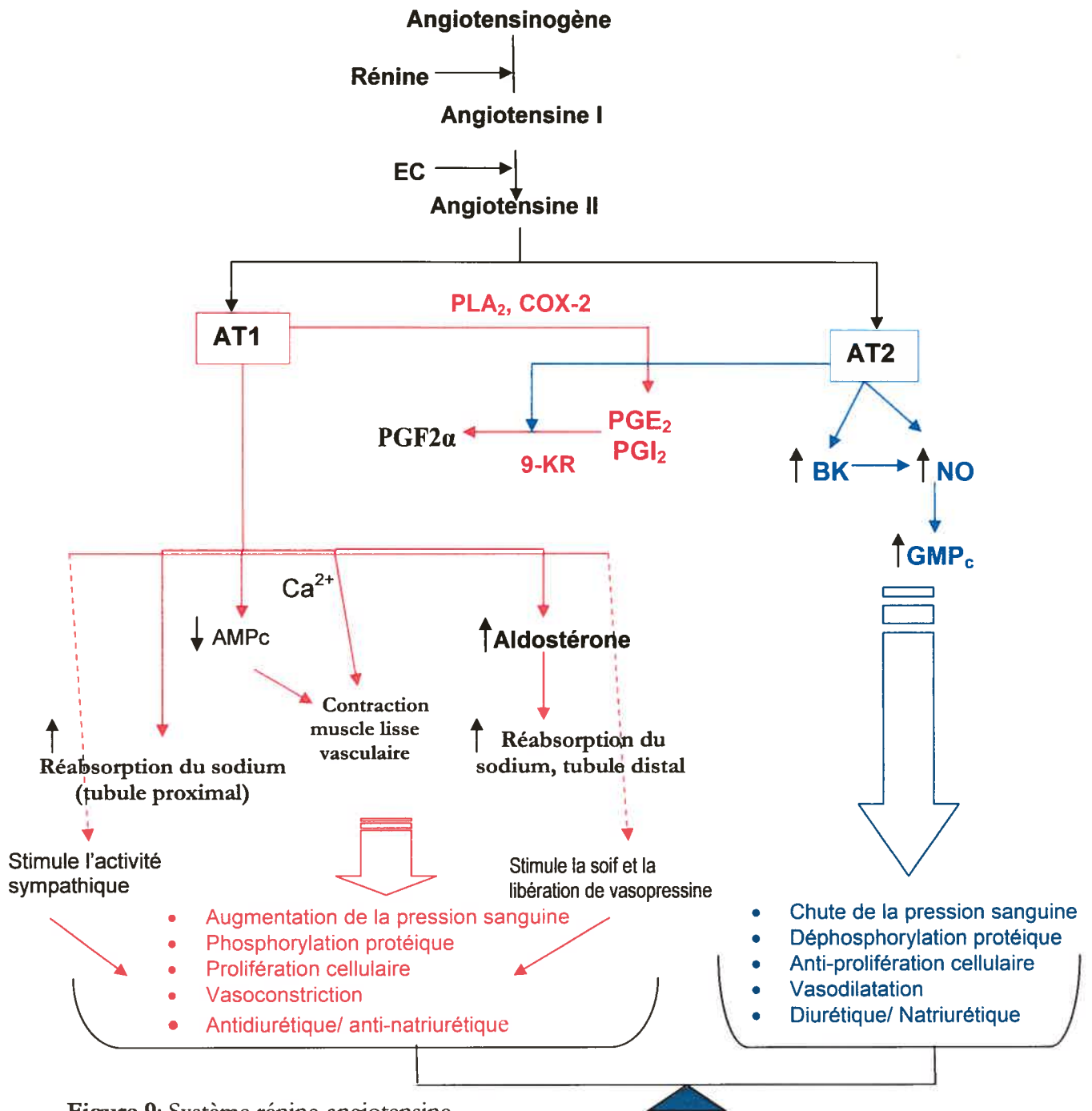


Figure 9: Système rénine-angiotensine.

Les effets opposés des récepteurs AT1 et AT2 sur l'homéostasie cardiovasculaire et rénale. 9-KR: 9 cétoréductase.

Adapté de Carey et al., 2000 a et b

Il apparaît toutefois que le NO peut être produit directement par le récepteur AT₂ tel que montré chez la souris dont le gène du récepteur B₂ est inactivé (Abadir et al., 2003). La relâche de NO est continue et antagonise l'action vasoconstrictrice de l'Ang II sur le récepteur AT₁ (Drexler et al., 1995). Le blocage du récepteur AT₁ entraîne des effets hypotenseurs qui sont prévenus par le blocage du récepteur AT₂ (Siragy et Carey, 1999; Tanaka et al., 1999; Inagami et al., 1999). Contrairement au récepteur AT₁, le récepteur AT₂ inhibe la prolifération cellulaire et pourrait provoquer l'apoptose, un rôle qui reste cependant controversé (Carey et al., 2000a). L'infusion d'Ang II augmente l'ARNm du récepteur B₁, déjà surexprimé dans les cardiomyocytes de souris KOB₂ (Kintsurashvili et al., 2001). Dans les cardiomyocytes de souris normales, l'infusion d'Ang II augmente seulement l'ARNm des récepteurs B₂. Ces effets sont inhibés en présence de l'antagoniste du récepteur AT₁ et non du récepteur AT₂. Ainsi, l'Ang II augmente l'expression des récepteurs B₂ ou B₁ (en absence du récepteur B₂) ou encore des deux récepteurs (*in vitro*). Ceci met en évidence une réponse régulatrice de l'Ang II sur le système des kinines au niveau récepteuriel (Kintsurashvili et al., 2001).

3.1.1. Place des kinines dans l'hypertension artérielle

La diminution de la synthèse de la BK favorise le développement de l'hypertension artérielle. Dans ce cas, des effets bénéfiques sont obtenus par la stimulation de ces récepteurs (Bascands et al., 2003). L'un des changements pathologiques majeurs dans l'hypertension essentielle est l'induction des dysfonctions endothéliales, similaires au déficit général de la vasodilatation obtenue en absence de la BK (Panza et al., 1995). La création des modèles de souris déficientes en récepteurs B₂ (souris KOB₂ ou B₂^{-/-}) ou en kallibréine a permis de mettre en lumière la part des kinines dans le maintien de l'homéostasie de la pression sanguine chez le sujet normal. Par exemple, la souris déficiente (B₂^{-/-}) présente une fréquence cardiaque et une pression systolique élevées comparativement aux souris normales ou partiellement déficientes (B₂^{+/-}) (Emanuelli et

al., 1998). Une autre étude montre toutefois que l'absence du récepteur B₂ n'affecte pas la fréquence cardiaque (Yang et al., 2001). Le remplacement fonctionnel des récepteurs B₂ par la surexpression du récepteur B₁ tel qu'observé dans le modèle déficient KOB₂ reste matière à controverse (Marceau et al., 1998; Pesquero et al., 2000; Duka et al., 2003). Le KOB₂ présente toutefois une hypertrophie cardiaque ainsi qu'une résistance accrue aux situations d'ischémie à la reperfusion (Yang et al., 1997 a) dans des conditions basales.

De plus, une administration prolongée d'un minéralocorticoïde chez la souris KOB₂ entraîne une plus forte augmentation de la pression systolique accompagnée d'une baisse d'excrétion urinaire en sel, comparativement à la souris normale qui présente une hausse d'excrétion urinaire en sel.

Chez la souris KOB₂, il a été aussi rapporté qu'une diète riche en sel ou en sodium entraîne une hypertension hydro-sodée due à une anomalie de rétention saline ou du flux sanguin rénal, suggérant que les kinines rénales jouent un rôle important dans la prévention de l'hypertension hydro-sodée (Alfie et al., 1996 ; 1997). Ces observations ont été confirmées par l'équipe de Cervenka qui a montré une sévérité d'hypertension chez les souris KOB₂ par rapport aux souris normales, lorsqu'elles étaient, cette fois-ci, infusées avec de l'Ang II (Cervenka et al., 2001). Dans le même ordre d'idées, l'inhibition aiguë de la eNOS augmente la pression sanguine chez les souris normales à des niveaux similaires à ceux observés chez la souris KOB₂, suggérant que la susceptibilité dans ce modèle de souris KOB₂ à exprimer l'hypertension induite par l'angiotensine II dépend en partie du déficit des kinines endogènes à relâcher le NO.

D'autre part, l'association « kallicréine – excrétion sodique » a été rapportée chez les patients hypertendus (Margolius et al., 1974a-c; Levy et al., 1977). Des études ont montré effectivement que les kinines stimulent l'excrétion de l'eau et des électrolytes en augmentant le flux sanguin rénal (Gill et al., 1965). Le flux sanguin rénal augmenté est causé par la diminution de la

résistance vasculaire et n'affecte pas le ratio de la filtration glomérulaire ou la réabsorption proximale. La BK peut donc sérieusement augmenter la délivrance du fluide au néphron distal (Stein et al., 1972) et les effets natriurétiques semblent dépendre de l'inhibition de la réabsorption distale du sodium.

En revanche, les faibles conditions sodiques baissent l'excrétion de la kallibréine plasmatique qui à son tour entraîne la chute de production des kinines (Hilgenfeldt et al., 1998). Dans les conditions normales, l'excès de sel est excrété via le système kallibréine-kinines qui fonctionnerait comme une valve de sécurité. La défaillance de cette valve entraîne automatiquement une accumulation de sodium dans les cellules après un excès de re-capture (Katori et al., 2001). Le dysfonctionnement du système d'excrétion kallibréine rénal pourrait déclencher l'accumulation de sodium dans les cellules et induire l'hypertension. Cela serait probablement le cas dans l'hypertension sensible au sel chez l'humain, vu que l'excrétion urinaire de faibles quantités de kallibréines a été associée à l'hypertension chez les patients hypertendus (Margolius et al., 1972). De fait, les faibles quantités urinaires de kallibréines seraient un marqueur génétique associé à l'histoire de l'hypertension.

L'implication du récepteur B₂ dans la normo-tension a aussi été démontrée par l'induction des hypotensions chez des souris et des rats sur-exprimant respectivement le récepteur B₂ humain et la v-kallibréine. Chez ces animaux, il a été montré que la surexpression du récepteur B₂ cause une réduction soutenue de la pression sanguine (Wang et al., 1997; Zhang et al., 1999).

Dans le modèle génétique du rat spontanément hypertendu (SHR), l'équipe de Stewen (2003) a observé qu'une charge en sel augmentait la densité rénale des récepteurs AT1 et abaissait celle des récepteurs B₂, suggérant que c'est l'altération de la balance entre ces deux récepteurs qui est associée à l'hypertension causée par le sel. Chez le SHR, alors que les niveaux de kininases demeurent in affectés en périphérie (Dendorfer et al., 2001), une réduction des taux de kininogènes plasmiques et cardiaques et de kallibréines tissulaires a été documentée (Sharma et

al., 1998; 1999). On note toutefois une augmentation de la concentration des kinines dans le rein du rat SHR (Campbell et al., 1995) et dans celui d'autres modèles de rats hypertendus (Jin et al., 1999; Katori et al., 2001), alors que les éléments du système kallibréine-kinines sont réduits dans d'autres tissus périphériques.

Chez le rat SHR, le récepteur B₂ joue un rôle important dans l'homéostasie cardiovasculaire (Emanueli et Madedu, 1997; Benetos et al., 1997). En effet, l'infusion continue de FR190997, un agoniste non peptidique B₂, dans l'artère rénale permet de prévenir l'hypertension lorsque l'infusion est pratiquée dans la phase critique, avant 7-8 semaines d'âge chez le SHR (Majima et al., 2000; Katori et al., 2001). Des résultats semblables ont été obtenus avec l'infusion de kininogène chez le rat déficient en kininogène (rat Brown Norway-Katholiek), un modèle d'hypertension hydrosodée (Majima et al., 1993).

3.2. Place des kinines dans le diabète

Le diabète est une maladie multiforme complexe définie par une hyperglycémie majeure due soit à une carence absolue en insuline, secondaire à la destruction des îlots de Langerhans par un processus auto-immun (diabète insulino-dépendant ou de type 1) (Atkinson et Maclaren, 1994), soit à une mauvaise utilisation de l'insuline (diabète de type 2) (Valensi et al., 1995). Aussi, peu importe la forme de diabète, l'hyperglycémie reste le facteur caractéristique qui, à long terme, entraîne des changements physiopathologiques majeurs conduisant à des dommages d'organes. Le dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire et l'altération de la perméabilité des-micro et macro-vaisseaux sont associés aux complications diabétiques. Au cours des états diabétiques, la vasodilatation induite par la BK est déficiente dans les reins, l'aorte, les coronaires et dans les artères mésentériques, particulièrement dans les petites artères (Quilley et al., 1992; Shen et al., 1999; Vallejo et al., 2000). Plusieurs mécanismes potentiels expliquent la déficience des effets vasodilatateurs de la BK. Parmi ceux-ci, on

dénote: la réduction de la vasodilatation induite par l'EDHF (Wigg et al., 2001), la baisse des niveaux et de l'activité de la NOS (Zhao et al., 1999) qui peut être subséquente à l'inhibition de son expression par les taux élevés de glucose. Car, en plus de jouer un rôle d'éboueur de NO, les niveaux élevés de glucose peuvent aussi réduire le Ca^{2+} intracellulaire (important pour la relâche de l'insuline) en augmentant les radicaux libres. Tous ces mécanismes interfèrent avec la vasodilatation induite par la BK (Pieper et Dondlinger, 1997; Brodsky et al., 2001). L'équipe de Rosenkranz a montré que l'hyperglycémie qui cause des dysfonctions endothéliales perturbe aussi la réponse anti-hypertrophique dans la cellule musculaire lisse (Rosenkranz et al., 1999).

De plus, les hyperglycémies soutenues conduisent à la production des AGES (Advanced glycation end-products ou produits de glycation avancés), un ensemble de produits finaux de réactions de glycation non enzymatique, par opposition à la glycosylation qui fait intervenir la glycosyl-transférase. Les AGES sont un groupe hétérogène de molécules sans classification chimique définitive et constituant les produits de liaison entre un ose (glucose, fructose, galactose) et la fonction amine libre (lysine, arginine) d'une protéine ou apolipoprotéine. Le processus de formation des AGES est long et se fait avec plusieurs intermédiaires non enzymatiques, réversibles ou non, dépendant du temps et de la concentration du sucre (Brownlee et al., 1984). Une fois formés, le catabolisme des taux sériques des AGES dépend, d'une part, du catabolisme de la protéine qui a subi le processus de glycation et, d'autre part, de sa clairance rénale (Brownlee et al., 1984). Les différents AGES agissent sur des récepteurs variés. Il existe trois types de récepteurs pour les AGES : le RAGE, le DN-RAGE et le sRAGE (Schmidt et al., 2001). Seul le récepteur RAGE est capable de produire des effets intracellulaires à la suite son activation. Le RAGE dispose d'une région extracellulaire comportant un domaine variable et deux domaines constants, une région transmembranaire et une intracellulaire (figure 10).

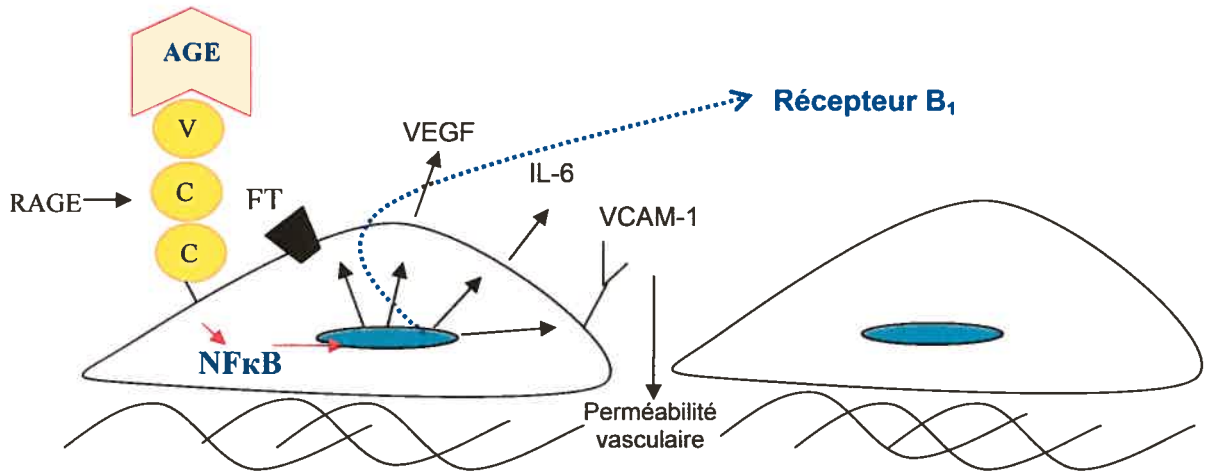


Figure 10: Activation du RAGE

C: domaines constants, V: domaine variable, FT: facteur tissulaire, VEGF: Vascular endothelial cell growth factor, VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1. Un des effets de la liaison AGE-RAGE est l'augmentation de l'adhésion des globules rouges des sujets diabétiques à l'endothélium et l'induction du récepteur B₁ (Wautier et al., 1981; 1994). Adapté de (Boulangier et al., 2002a et b)

Le récepteur RAGE a été isolé, purifié et cloné à partir des membranes cellulaires des monocytes, des macrophages et des cellules endothéliales (Gilcrease et Hoover, 1990) et il est exprimé par toutes les cellules de l'organisme. La liaison des AGES aux récepteurs RAGES entraîne une transduction faisant intervenir des mécanismes oxydatifs. La production de formes réactives d'oxygène par la stimulation de la voie de la NADPH-oxydase (Wautier et al., 2001) conduit à la transduction active du facteur NFκB (Schmidt, 1997) qui à son tour, permettra des transcriptions génétiques, favorisant la survenue de conditions inflammatoires et pro-fibrosantes, l'apparition du stress oxydatif, des augmentations de la perméabilité endothéliale, de la synthèse d'IL-6 et de facteurs de croissance comme le vascular endothelial cell growth factor ou facteur de croissance des cellules endothéliales (VEGF), de l'expression de la molécule d'adhésion vasculaire (VCAM-1) et du facteur tissulaire (figure 10). Par l'intermédiaire du NFκB, les AGES participent aux complications du diabète mellitus (Bierhaus

et al., 1998) telles la néphropathie, la rétinopathie, la neuropathie et l'hypertension artérielle (Gabra et Sirois, 2003). Les complications les plus importantes restent les atteintes vasculaires cérébrales et coronariennes qui représentent une cause importante de morbidité et de mortalité chez les patients diabétiques (Stratton et al., 2000). L'activation des récepteurs RAGES donne lieu à un stress oxydatif secondaire au cours duquel les effets du NO sont limités par son interaction avec l'anion super oxyde, conduisant au peroxy-nitrite (Beckman et Koppenol, 1996).

Chez le patient diabétique, on note également l'inhibition du eNOS par la présence des AGES (Rojas et al., 2000) entraînant l'absence d'effets antiprolifératifs et de relaxation vasculaire assurés par le NO (Bucala et al., 1991). L'injection chronique d'AGES à des rats normaux a conduit à des lésions identiques à celles de la néphropathie diabétique. Deux mécanismes responsables des néphropathies sont suggérés: l'altération des matrices extracellulaires secondaire à la glycation des protéines les composant et l'action secondaire de la liaison AGES-RAGE. Étant donné que l'hyperglycémie conduit à la production des AGES dont la liaison aux récepteurs RAGE stimule le facteur NFκB et la production des cytokines, il devient possible de suggérer une implication du récepteur B₁ dans la pathogenèse du diabète.

En effet, le récepteur B₁ dont l'expression est absente ou basale dans les conditions normales, est induit et surexprimé en présence des cytokines TNF-α, IL-1β (Bachvarov et al., 1996; Marceau et al., 1998; DeBlois et al., 2001), IL-6, IL-4 et du facteur TGF-β1 (Sardi et al., 2002). L'induction du récepteur B₁ implique le facteur NFκB et la voie des MAP kinases (Schanstra et al., 1998; Yerneni et al., 1999; Phagoo et al., 1999; Sabourin et al., 2002). L'implication du NFκB dans l'expression du récepteur B₁ lors de l'inflammation a été démontrée (Ni et al., 1998 a et b). En effet, dans la cellule normale au repos, le facteur NFκB est maintenu inactif dans le cytosol par sa liaison à des protéines inhibitrices de la famille des IκB (Baldwin, 1996; Schanstra et al., 1998). Une fois que la voie des NFκB est activée par des agents comme les

lipopolysaccharides, les cytokines et, probablement, par la liaison AGE-RAGE, une dégradation protéolytique dépendant de la phosphorylation de I κ B est initiée. Cette phosphorylation de I κ B entraîne alors la libération du facteur NF κ B qui subira une translocation nucléaire et amorcera la transcription d'une diversité de gènes dont celui du récepteur B₁ (Baldwin et al., 1996; Schanstra et al., 1998) soutenant ainsi l'implication pathogénique du récepteur B₁ dans le diabète induit par la streptozotocine (STZ) (Zuccollo et al., 1996; 1999). La STZ est un antibiotique extrait du *streptomyces acromogens* (Tomlinson et al., 1992), spécifiquement toxique pour les îlots β de Langerhans du pancréas. Conséquent avec ces observations, le récepteur B₁ est surexprimé dans les pattes où il cause l'oedème (Campos et al., 2001), les poumons où il produit l'infiltration des leukocytes (Vianna et al., 2003) et la rétine où il dilate les micro-vaisseaux (Abdouh et al., 2003) du rat diabétique.

4.0. Les kinines dans le traitement des maladies aux incidences cardiovasculaires

4.1. Kinines et Insuline

La BK, par l'intermédiaire du récepteur B₂, induit la mobilisation intracellulaire du calcium dans la majorité des cellules. Cette propriété est très importante et essentielle dans les cellules β du pancréas du fait que le calcium intracellulaire est le principal signal de sécrétion d'insuline (Yang et al., 1997a; Moura, 2000). En effet, à la suite de la stimulation du récepteur B₂, la formation d'IP₃ résultant de l'activation de la PLC induit la relâche du Ca²⁺ du réticulum endoplasmique et déclenche l'influx du Ca²⁺ via les canaux calciques voltage dépendants, ce qui augmente la concentration du Ca²⁺ intracellulaire et la sécrétion de l'insuline (Yang et al., 1997b; Haring et al., 1996; Kudoh et al., 2000). Dans les cellules β des îlots de Langerhans, la sécrétion d'insuline stimulée par la BK dépend de la présence et surtout de la concentration du glucose circulant (Damas et al., 1999). Dans les cellules du muscle squelettique, le transport du glucose est également relayé par la PLC, la tyrosine kinase et l'augmentation intracellulaire de

calcium (Kishi et al., 1998; Kudoh et al., 2000). Chez le rat Zucker, un modèle de résistance à l'insuline et d'intolérance au glucose, le traitement chronique à la BK améliore significativement la tolérance de tous les tissus au glucose (Henriksen et al., 1998). Ces données suggèrent qu'en marge de stimuler la sécrétion d'insuline, la BK régule également la disponibilité et l'utilisation du glucose dans les tissus cibles (Jauch et al., 1989) comme chez le patient diabétique non insulino dépendant, dont les concentrations de glucose sanguin sont abaissées par la BK (Dietze et Wicklmayr, 1977). De plus, il a été montré que le récepteur B₂ joue un rôle très important dans la sensibilité à l'insuline, parce qu'en son absence, comme c'est le cas chez les animaux KOB₂, on a observé une résistance à l'insuline (Duka et al., 2001). Enfin, le kininogène et la prékallicréine sont augmentés dans le sang des rats diabétiques STZ et normalisés par l'insuline (Rothschild et al., 1999), suggérant une modulation directe entre la BK et l'insuline.

4.2. Participation des kinines aux effets des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 (IEC)

Les IEC sont des médicaments qui améliorent les fonctions cardiovasculaires, le remodelage vasculaire et qui prolongent la survie des patients hypertendus et diabétiques (Jaffa et al., 1986; Rosenthal et al., 1997). Leurs effets thérapeutiques sont en partie assurés par la participation des récepteurs aux kinines (Kintsurashvili et al., 2001). L'avantage des IEC est de promouvoir la disponibilité de la BK, en plus d'être capables de réduire le stress oxydatif dans les conditions hyperglycémiantes en activant les voies de signalisation intracellulaire des récepteurs B₂. De plus, plusieurs études confirment des propriétés réno-protectrices aux IEC du fait qu'ils retardent significativement la progression de plusieurs maladies rénales et la néphropathie diabétique (Lewis et al., 1993).

Chez le rat diabétique-STZ, la phosphorylation élevée des MAP kinases, ERK 1 et 2, un événement précoce observé lors de l'instauration de la néphropathie diabétique (le phénomène est associé à la production de matrice et à l'hyper-prolifération mésangiale) est normalisée par le traitement à l'insuline ou aux IEC. L'administration d'antagonistes des kinines renverse la réduction de phosphorylation des ERK 1 et 2 induite par un IEC, suggérant la participation des récepteurs B₁ et B₂ (confirmée par l'augmentation de l'ARNm et de la protéine) pendant la phase précoce de l'instauration du diabète (Mage et al., 2002).

De même, Henriksen et Jacob (1995) ont montré que des traitements aigus ou chroniques avec le captopril, un IEC, améliorent significativement le transport du glucose induit par l'insuline dans les muscles squelettiques du rat Zucker. Cet effet, qui est aussi observé chez le chien diabétique, est complètement prévenu par l'utilisation de l'antagoniste B₂, Hoe 140 (Uehara et al., 1994). En présence d'IEC ou de BK, le transport du glucose par la translocation de la protéine transporteuse de glucose 4 (GLUT4) augmente 3 fois, un effet bloqué par l'antagoniste B₂, le Hoe 140 (Rett et al., 1997; Kishi et al., 1998; Kudoh et al., 2000). Il faut aussi noter que GLUT4 est une protéine déficiente chez le rat obèse Zucker (King et al., 1993; Etgen et al., 1996).

Ainsi, les effets bénéfiques de la BK sur le diabète pourraient s'exercer de diverses manières, incluant l'augmentation de la re-capture du glucose, l'amélioration de l'utilisation du glucose, la prévention de la production de matrice et de la prolifération glomérulaire (Damas et al., 1999; Henriksen et al., 1998).

D'autre part, il a été montré que l'Ang (1-7) et l'Ang (1-9) potentialisent les effets de la BK en induisant une interaction hétérologue ou « cross-talk » entre l'EC et le récepteur B₂ (Marcic et al., 1999) ou le récepteur B₁ (Ignjatovic et al., 2002) en présence des IEC. Ce dernier point reste controversé du fait que des études avec des analogues de la BK résistants à l'EC n'ont pas confirmé la potentialisation de la BK et/ou la re-sensibilisation du récepteur B₂

indépendamment de l'hydrolyse du peptide dans des modèles physiologiques (Dendorfer et al., 2001; Gobeil et al., 2002; Tom et al., 2003).

5.0. Présence du système kallibréine-kinines dans le système nerveux central

La présence du récepteur B₂ dans le tissu cérébral du rat, du cobaye et du bovin a été mise en évidence sur des préparations membranaires à l'aide de la BK marquée au tritium, [³H]-BK (Innis et al., 1981). La détection de la présence du kininogène dans le liquide céphalo-rachidien du rat et de l'homme (Scicli et al., 1984) a fortement renforcé l'idée de la présence d'un système kallibréine-kinines dans le système nerveux central (SNC).

À date, tous les éléments du système kallibréine-kinines ont été identifiés sur des composantes du SNC (Couture et Lindsey, 2000). Leur localisation anatomique et/ou détection biochimique dans le SNC a été effectuée chez plusieurs espèces, incluant le rat (Hermann et al., 1986; Alvarez et al., 1992; Khan et al., 1993; Lopes et al., 1995; Chen et al., 2000; Privitera et al., 2003), le chien (Thomas et al., 1984), la souris (Chen et al., 1996; Takano et al., 1997), le cobaye (Lopes et al., 1993a), le mouton (Murone et al., 1997) et l'humain (Scicli et al., 1984; Raidoo et al., 1996 a et b; Buck et al., 2002).

5.1. Les kininogènes

L'abondance du T-kininogène dans le SNC du rat, observée par immuno-histochimie, dépend de l'âge (plus abondant chez les jeunes animaux) et du sexe (plus abondant chez les femelles) (Damas et al., 1992). Le T-kininogène est distribué uniformément dans le tronc cérébral, le cortex, le mésencéphale et le cervelet du rat (Marks et al., 1988). Les éléments neuronaux présentant le T-kininogène dans leur cytoplasme incluent les neurones des ganglions de la racine dorsale, les neurones embryonnaires de l'hippocampe, les astrocytes, les cellules gliales et endothéliales. La T-kinine est restreinte aux les neurones magno-cellulaires des noyaux péri-

ventriculaire et supra-optique ainsi qu'aux neurones parvocellulaires du noyau supra-chiasmatique (Richoux et al., 1991). Également chez le rat, le kininogène HMW a été identifié dans les neurones de l'aire péri-ventriculaire de l'hypothalamus qui projettent dans la zone externe de l'éminence médiane (Richoux et al., 1991). D'autres études ont associé la présence du kininogène HMW à plusieurs autres régions du SNC, incluant le cervelet (noyau dentelé), le cortex cérébral (couches III et V), l'hippocampe (cellules pyramidales), le corps calleux et surtout le tronc cérébral au niveau des noyaux du tractus solitaire, du para-trijumeau, des noyaux vestibulaires, cochléaire, géniculé médian et rouge, le corps trapézoïde et la substance grise périaqueducale (Li et al., 1999). Dans la moelle épinière, le kininogène HMW a été détecté dans les laminae I, II, VII et IX, particulièrement sur des petits neurones, des cellules satellites et des cellules de Schwann dans les ganglions de la racine dorsale (Li et al., 1999; Takano et al., 1997; 2003). Le kininogène LMW a été aussi observé dans un modèle de traumatisme de la moelle chez le rat (Xu et al., 1991).

5.2. Kininogénases

Les kininogénases ou protéases du SNC incluent les kallicréines plasmatique et tissulaire ainsi que les protéases à sérine hautement spécifiques pour le substrat kininogène (Bhoola et al., 1992; Raidoo et Bhoola, 1998). La présence de la kallicréine dans le SNC a été mise en évidence par des techniques d'essais radio-immunologiques (Powers et Nasjletti, 1983; Scicli et al., 1984; Chao et al., 1987) et d'hybridation *in situ* (Chao et al., 1987).

L'activité de la kallicréine est détectée dans le liquide céphalorachidien humain (Scicli et al., 1984) et dans les ventricules latéraux du rat, après l'administration de la méllitine, une composante du venin d'abeille qui active la kallicréine membranaire (Nishimura et al., 1980).

De même, il a été observé des augmentations de la pression sanguine par suite de l'injection directe de la kallicréine dans les ventricules cérébraux du rat. Cet effet est prévenu par

l'injection d'aprotinine, un inhibiteur de la kallibréine (Kariya et Yamauchi, 1987). La kallibréine a été localisée dans plusieurs régions du SNC du rat, incluant le cortex, le cervelet, le tronc cérébral, particulièrement les noyaux oculomoteurs, rouge et réticulé (Kizuki et al., 1994) ainsi que dans les cellules épendymaires qui tapissent le III^e ventricule, les corps cellulaires des neurones des noyaux arqué, supra-optique, para-ventriculaire, ventro médian et postérieur de l'hypothalamus (Simson et al., 1985; Snyman et al., 1994).

De plus grandes quantités ont été trouvées dans l'hypothalamus, l'hypophyse et la glande pinéale. La présence de la protéine a été corrélée avec l'expression de son ARNm (Iwadate et al., 2002), soutenant ainsi la biosynthèse de cet enzyme par les neurones.

5.3. Les kinines

La première détection des kinines dans le SNC a été effectuée avec des essais biologiques (Werle et Zach, 1970; Pela et al., 1975). Par la suite, l'immuno-cytochimie a permis d'observer la BK immunoréactive dans les cellules neuronales de l'hypothalamus avec de denses amas excédant les noyaux périventriculaires et dorso-médiaux. Les fibres marquées à la fluorescence et des projections variqueuses ont été observées dans la matière grise périaqueductale, le cortex cingulaire, la portion ventrale du néostriatum et de l'aire septal latérale (Corrêa et al., 1979). La BK immunoréactive a été observée dans les segments cervical, thoracique, lombaire et sacré de la moelle épinière du rat (Lopes et Couture, 1997) et du cobaye (Couture et Lindsey 2000). Dans chaque segment de la moelle, une très forte densité de la BK immunoréactive, particulièrement concentrée dans les péricarions des motoneurones, dans les laminae VIII et IX de la corne ventrale a été observée, suggérant la biosynthèse, le stockage et la libération de BK dans ces types cellulaires (Lopes et Couture, 1997). Une population plus restreinte de petites cellules est également observée dans les laminae III et IV de la corne dorsale, mais pas dans la substance gélatineuse.

Dans le segment thoracique, on observe des cellules immunoréactives au niveau médian, à la base de la colonne postérieure (Lopes et Couture, 1997). La dégénérescence des fibres sensorielles primaires (rhizotomie, section du nerf sciatique) entraîne une augmentation marquée de la BK immunoréactive dans les cornes dorsales et une diminution dans les cornes ventrales alors que la destruction spécifique des fibres afférentes primaires de petits calibres (C et A δ) par la capsaïcine entraîne des augmentations de la BK immunoréactive à la fois dans les cornes dorsales et ventrales, suggérant que la BK immunoréactive dans les cornes dorsales ne se trouve pas dans les terminaisons nerveuses sensorielles, mais plutôt dans des inter-neurones ou des neurones projetant vers d'autres parties de la moelle épinière et les centres supra-spinaux (Lopes et Couture, 1997).

La BK observée dans les couches les plus profondes pourrait hypothétiquement diffuser vers la lamina II (dépourvue de BK observable, mais riche en récepteurs B₂) pour induire des effets neuronaux via un mécanisme extra-synaptique, mettant ainsi en évidence un cas de neurotransmission par volume dans la moelle épinière (Couture et Lindsey 2000).

En dehors de la moelle épinière, de grandes quantités de BK immunoréactive ont été observées dans le fluide cérébral de plusieurs espèces incluant le rat (Alvarez et al., 1992; Khan et al., 1995), le chien (Thomas et al., 1984) et l'humain (Scicli et al., 1984).

5.4. Les kininases

La BK est rapidement métabolisée dans le cerveau après administration i.c.v. chez le rat éveillé où sa demi-vie a été estimée à 26.6 secondes (Kariya et al., 1982). Plusieurs types d'endo- et d'exopeptidases ont été retrouvés dans le SNC de nombreuses espèces (Couture et Lindsey 2000), mais il semble que la présence de la kininase II est prédominante, particulièrement dans le LCR, le striatum, la substance noire, la glande hypophyse, l'organe sub-fornical, le globus pallidus, l'area postrema et le plexus choroïde chez le rat (Kariya et al., 1981; Strittmatter et al.,

1985; Tani et al., 1986; Yoshida et Nosaka, 1990), l'homme (Schweisfurth et Schiöberg-Schiegnitz, 1984; Zubenko et al., 1985), le chat (Whalley et Wahl, 1988) et le chien (Schelling et al., 1980).

La localisation de la kininase II par immuno-cytochimie (Defendini et al., 1983) ou par autoradiographie sur des sections de cerveau de rats incubées en présence de [³H]captopril (Strittmatter et al., 1984, 1986) ou de [¹²⁵I]-MK351A (Mendelsohn et al., 1984; Corrêa et al., 1985) a révélé des marquages de fortes intensités dans l'hypophyse, les organes circumventriculaires, le putamen, le noyau caudé, la substance noire, les noyaux hypothalamiques, le septum et le tronc cérébral. C'est dans le cervelet et le striatum que l'activité de la kininase II est la plus élevée, alors qu'elle est plus faible dans la moelle épinière (Cushman et Cheung, 1971; Yang et Neff, 1972; Kariya et al., 1981; Elrod et al., 1986).

Par contre, on ne trouve pas de kininase I dans le LCR du rat normal (Pesquero et al., 1992; Décarie et al., 1996).

5.5. Les récepteurs

5.5.1 Le récepteur B₂

Les sites de liaison pour le récepteur B₂ ont été d'abord montrés avec le radioligand [³H]-BK sur les astrocytes en culture provenant du cortex, du tronc cérébral, de la moelle épinière de rats fœtaux et du cervelet de rats nouveau-nés (Cholewinski et al., 1991; Hösli et Hösli, 1993), sur les homogénats d'hippocampe de bovin (Kozłowski et al., 1988), sur les neurones sensoriels (Steranka et al., 1988) et sur des membranes de cerveaux de cobaye chez qui des densités très élevées du récepteur B₂ ont été observées dans les pons, la *medulla oblongata*, la moelle épinière, le cortex cérébral et l'hippocampe (Fujiwara et al., 1988; 1989). À l'aide du ligand [¹²⁵I]Tyr⁸-BK, le récepteur B₂ a été montré dans les cellules gliales et les neurones des rats nouveau-nés (Lewis et al., 1985) ainsi que dans la région de la *medulla oblongata*, précisément

dans le noyau du tractus solitaire (NTS), dans l'*area postrema*, le noyau dorsal moteur du nerf vague (X) et le noyau spinal du trijumeau (Privitera et al., 1992). L'utilisation du même ligand a permis de mettre en évidence la présence des récepteurs B₂ dans la moelle épinière du cobaye et du rat (Lopes et al., 1993a; 1995), particulièrement au niveau des laminae I et II où les marquages sont plus importants que dans d'autres laminae, incluant la colonne intermédiolatérale (IML) où l'on trouve les corps cellulaires et les dendrites des fibres pré-ganglionnaires sympathiques. Ces résultats ont été confirmés avec l'antagoniste B₂ [¹²⁵I]HPP-Hoe 140 utilisé comme radioligand (Murone et al., 1997; Cloutier et al., 2002). Il faut cependant noter que le traitement à la capsaïcine (neurotoxine spécifique pour les fibres sensorielles de type C) chez le rat nouveau-né cause une baisse significative de la densité des sites dans les laminae I et II, suggérant une localisation pré-synaptique sur les afférences sensorielles primaires et vraisemblablement sur des neurones sensoriels de petit diamètre (C et Aδ) terminant dans les laminae superficielles de la corne dorsale (Figure 11) (Lopes et al., 1995). De plus, le traitement intra-spinal avec la 6-hydroxydopamine, une neurotoxine spécifique pour les fibres catécholaminergiques, provoque une baisse significative des récepteurs B₂, suggérant également la présence du récepteur de la BK sur des fibres noradrénergiques bulbo spinales (Lopes et al., 1995).

Toutefois, d'autres régions de la corne ventrale présentent des marquages B₂ (Murone et al., 1997; Lopes et Couture 1997; Cloutier et al., 2002) n'excluant pas la présence de ce récepteur sur des fibres motrices et des interneurons. Les études en PCR ont permis de localiser l'ARNm du récepteur B₂ dans la moelle épinière chez l'humain (Mahabeer et al., 2000). L'utilisation des techniques d'immuno-cytochimie a permis d'associer le récepteur B₂ à toutes les régions du cerveau, particulièrement les neurones du cortex cérébral, du bulbe olfactif, de l'hippocampe, des noyaux gris centraux, du thalamus, de l'hypothalamus et du cervelet incluant le soma des cellules pyramidales et des cellules de Purkinje chez le rat (Chen et al., 2000). Chez

l'homme, l'immuno réactivité pour le récepteur B_2 a été observée dans les neurones de l'hypothalamus, du thalamus, du noyau caudé, du cortex cérébral et du tronc cérébral (Bhoola, 1996; Raidoo et al., 1996 a et b; Raidoo et Bhoola, 1997). L'utilisation de l'autoradiographie a montré des marquages évidents pour le récepteur B_2 dans plusieurs noyaux du tronc cérébral chez des donneurs humains (Buck et al., 2002).

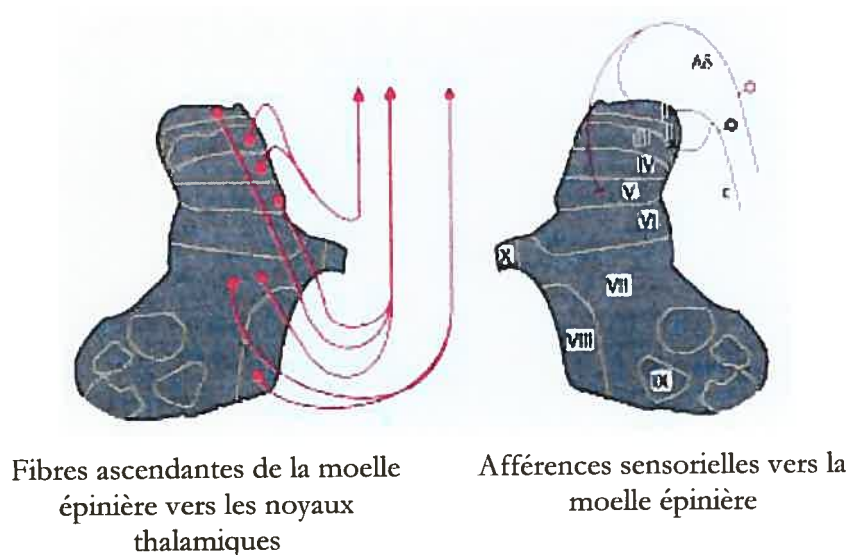


Figure 11: Représentation des afférences sensorielles chez l'humain

Les voies ascendantes spinothalamique (à gauche) et des afférences sensorielles (à droite). Les fibres C (en gris) et Aδ (en mauve) sur lesquelles on retrouve les récepteurs B_1 et B_2 sont porteuses d'informations sensorielles.

Adapté de Millan 1999; Julius et Basbam, 2001.

5.5.2. Le récepteur B_1

L'immunocytochimie a permis de montrer le récepteur B_1 sur des neurones de l'hypothalamus, du noyau caudé, des noyaux thalamiques ainsi que dans le tronc cérébral, la substance gélatineuse et la moelle épinière chez l'homme (Bhoola, 1996; Raidoo et Bhoola, 1997) et le rat (Qadri et al., 2002). Puisque la présence de la kininase I n'a pas été montrée dans le LCR du rat normal, la présence du récepteur B_1 dans le SNC peut sembler curieuse. Pourtant, la présence ubiquitaire d'ARNm et des sites de liaison du récepteur B_1 a bien été observée dans le cerveau

et la moelle épinière chez le singe (Shughrue et al., 2003), sur les neurones des ganglions de la racine dorsale et dans la corne dorsale chez le rat Wistar normal (Seabrook et al., 1997; Ma et Heavens, 2001), particulièrement dans les laminae I et II (Wotherspoon et Winter, 2000), ainsi que sur les terminaisons nerveuses des fibres de type C et A δ du nerf sciatique chez le rat (Ma et al., 2000; Wotherspoon et Winter, 2000; Ma, 2001; Ma et Heavens, 2001) et l'humain (Ma et Heavens, 2001). Mais le rôle central du récepteur B₁ demeure incertain en situation physiologique normale.

5.6. Rôle des kinines dans le SNC

La distribution étendue des récepteurs des kinines soutient diverses fonctions, qui malheureusement ne sont pas encore toutes élucidées (Chen et al., 2000; Couture et Lindsey, 2000). Certaines observations expérimentales permettent de suggérer un rôle dans le contrôle de la température corporelle, de la nociception et de la pression artérielle.

5.6.1. Contrôle de la température corporelle par les kinines

La production des prostaglandines en aval de la stimulation des récepteurs aux kinines soutient une action centrale de la BK sur la température corporelle (McGiff et al., 1976). En effet, l'injection i.c.v. des prostaglandines provoque une augmentation dose dépendante de la température corporelle chez le chat et le lapin (Milton et Wendlandt, 1970). De même, chez le lapin et le rat, l'injection i.c.v. de la BK cause une augmentation de la température corporelle qui est partiellement inhibée par la pré-administration i.c.v. d'indométhacine (Rao et Bhattacharya, 1988), ce qui suggère l'implication du récepteur B₂ et des prostaglandines dans le contrôle de la température corporelle.

De plus, il a été montré que l'administration i.c.v. de LPS (connu pour induire le récepteur B₁) entraîne une hyperthermie induite par la libération endogène des kinines et des prostaglandines

chez le rat (Walker et al., 1996a, b; Coelho et al., 1997; Takano et al., 2003). Le récepteur B₂ et les prostaglandines seraient impliqués dans les événements précoces de l'hyperthermie (Walker et al., 1996a,b) alors que le récepteur B₁ participerait à la maintenance de la fièvre (Coelho et al., 1997). Le récepteur B₂ et les prostaglandines seraient aussi impliqués dans l'hyperalgésie thermique et mécanique observée à la suite de l'injection i.c.v. de LPS (Walker et al., 1996b). La destruction des noyaux péri-ventriculaires de la région parvo-cellulaire de l'hypothalamus par l'acide iboténique réduit significativement la fièvre induite par la BK ou par l'injection systémique de LPS, suggérant la participation de cette région dans le contrôle de la température par les kinines (Caldeira et al., 1998).

5.6.2. Contrôle de la nociception par les kinines

La douleur est avant tout un mécanisme de protection physiologique normal à l'égard d'un dommage tissulaire limité. Les fibres polymodales sensorielles de petit calibre (fibres C et A δ), répondent aux stimuli nociceptifs mécaniques, thermiques et chimiques. Évidemment, les médiateurs chimiques produits pendant l'inflammation sont responsables de la multiplicité d'événements y compris l'hyperalgésie (douleur exagérée en réponse aux stimuli nocifs), les altérations des phénotypes cellulaires et l'expression de nouvelles molécules (Dray, 1994). Or, plusieurs données indiquent que les kinines sont rapidement générées après un dommage tissulaire (Calixto et al, 2000) et qu'elles modulent la majorité des événements observés durant le processus inflammatoire tels la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la migration cellulaire, la douleur et l'hyperalgésie (Hall et Morton, 1991; Marceau et Bachvarov, 1998; Couture et al., 2001).

L'injection intrathécale de BK, KD ou de T-kinine dans la moelle épinière, induit une réponse comportementale de nature nociceptive par l'activation des récepteurs B₂ sur les terminaisons nerveuses sensorielles chez le rat éveillé (Laneuville et Couture, 1987; Lopes et al., 1992).

Par contre, la BK produit un effet antinociceptif en facilitant la libération de noradrénaline par les terminaisons nerveuses des fibres noradrénergiques bulbo-spinales (Laneuville et al., 1989). Dans ce modèle, les sites du récepteur B_1 sont inactifs sur le seuil nociceptif. L'administration intrathécale d'agonistes B_2 produit également une hyperalgésie thermique chez la souris normale. Toutefois, chez la souris, l'activation du récepteur B_1 produit aussi un effet hyperalgésique, quoique d'intensité plus faible mais plus persistante que celle obtenue avec l'activation du récepteur B_2 (Ferreira et al., 2002).

Il est intéressant de noter que le traitement à la BK entraîne un effet hyperalgésique de plus forte intensité chez la souris KOB_2 alors que l'agoniste B_1 ne cause pas d'effet chez la souris KOB_1 chez qui des réponses hypoalgésiques à la $desArg^9BK$ ont plutôt été observées (Pesquero et al., 2000). Ceci suggère fortement la participation des deux récepteurs des kinines dans l'hyperalgésie thermique chez la souris (Ferreira et al., 2002; Levy et Zochodne, 2000; Pesquero et al., 2000) où le récepteur B_1 serait constitutif (Nsa Allogho et al., 1998) contrairement au rat.

Par ailleurs, la participation des deux récepteurs des kinines dans l'hyperalgésie mécanique a été soulignée chez le rat, dans les conditions persistantes de l'inflammation (Dray et Perkins, 1993).

En effet, pendant que la BK active directement les fibres sensorielles $A\delta$ et C, l'agoniste B_1 activerait les nocicepteurs par un mécanisme indirect impliquant des prostaglandines (Dray et Perkins, 1993), des cytokines ($IL-1\beta$, $TNF\alpha$) et des facteurs de croissance tels le nerf growth factor (NGF) ou facteur de croissance du tissu nerveux et le transforming growth factor ($TGF-\beta$) ou facteur de croissance β transformant (McMahon et Priestley, 1995; Phagoo et al., 2000), générés pendant le dommage tissulaire (Fox et al., 2003).

5.6.3. Contrôle cardiovasculaire par les kinines

La présence des récepteurs des kinines a été clairement montrée dans plusieurs régions connues pour leur implication dans le contrôle cardiovasculaire tant au niveau spinal que supra-spinal.

5.6.3.1. Régions centrales impliquées dans le contrôle cardiovasculaire

Les sites centraux de la BK dans le contrôle cardiovasculaire ont fait l'objet d'une investigation continue. Différents sites d'action incluant l'aire latérale du septum (Corrêa et Graeff, 1975), l'hypothalamus (Diz, 1985), la portion ventrale du III^e ventricule (Lewis et Phillips, 1984), les aires péri-ventriculaires dorsales de la medulla oblongata (Lindsey et al., 1988, 1997; Fior et al., 1993), la moelle épinière (Lopes et Couture, 1992; Cloutier et al., 2002) ont été proposés. L'injection de la BK dans des régions comme l'hypothalamus postérieur, la substance grise périaqueducale, le noyau caudé et l'aire septale médiane ne produit aucun effet sur la pression artérielle (Corrêa et Graeff, 1975; Corrêa et al., 1979) alors que son injection dans d'autres parties de l'hypothalamus comme les noyaux hypothalamiques antérieurs entraîne des effets cardiovasculaires (Diz et Jacobowitz, 1984; Diz, 1985). Plus récemment, les structures de la région bulbaire (en dessous du IV^e ventricule), incluant la medulla oblongata, le noyau du tractus solitaire (NTS), le noyau du paratrigumeau (Pa5), l'area postrema, le noyau dorsal moteur du nerf vague (X), le noyau spinal du trigumeau, les noyaux thalamiques et spinaux ont été identifiés comme sites d'action importants des kinines sur le système cardiovasculaire (Lindsey et al., 1988; Couture et Lindsey, 2000; Privitera et al., 2003; Cloutier et al., 2004).

En effet, chez le chien anesthésié, la destruction de l'area postrema abolit la réponse pressive induite par l'injection de la BK dans l'artère vertébrale (Wilkinson et Scroop, 1985). De plus, l'injection de très petites quantités de BK (1-10 pmol) dans le IV^e ventricule, au-dessus du NTS ou une micro-injection dans le Pa5 chez le rat éveillé montre une augmentation de la pression artérielle, accompagnée d'un effet biphasique sur la fréquence cardiaque (Lindsey et al., 1997;

Couture et Lindsey, 2000). L'intensité de ces effets est dix fois plus grande que lorsque la BK est injectée dans le III^e ventricule ou dans les ventricules latéraux (Lindsey et al., 1988; Fior et al., 1993). Le Pa5 (siège de l'action pressive de la BK dans la medulla dorsale latérale) montre une sensibilité particulière pour la BK de 0,6 à 1,8 pmole ($ED_{50}=0,9$ pmole).

D'autre part, l'injection i.t. de BK, KD et de T-kinine, au niveau du neuvième segment thoracique chez le rat éveillé augmente la pression sanguine et diminue la fréquence cardiaque via l'activation du récepteur B₂ (Lopes et Couture, 1992). Chez le rat WKY, les kinines du LCR diminuent avec l'âge tandis que chez le SHR, les concentrations de kinines, kalllicréine et kininase II ainsi que l'activité de cette dernière sont élevées chez les vieux rats SHR (Israel et Saavedra, 1987; Khan et al., 1995). Les antagonistes sélectifs du récepteur B₂ montrent un blocage spécifique et réversible des effets presseurs causés par l'administration de la BK, dans l'air septal latérale (Corrêa et Graeff, 1975), le IV^e ventricule, le noyau Pa5 (Lindsey et al., 1989; Martins et al., 1991) et la moelle épinière (Lopes et al., 1993b). De larges doses d'agonistes et d'antagonistes B₁ ne produisent aucun effet chez les rats WKY ou SHR. Les études en autoradiographie ont également permis de mettre en évidence de fortes intensités de marquage pour les sites du récepteurs B₂ dans les régions bulbaires, spécifiquement dans les noyaux NTS, Ambigus (Amb), du trijumeau (SP5) et Pa5 (Privitera et al., 1992; Couture et Lindsey, 2000; Cloutier et al., 2004) ainsi que dans la moelle épinière (Lopes et al., 1993a; 1995 ; Cloutier et al., 2002).

5.6.3.2. Implication des récepteurs B₁ dans le contrôle cardiovasculaire?

L'injection d'un agoniste B₁ dans le IV^e ventricule n'affecte pas la pression artérielle chez les rats WKY et SHR (Martins et al., 1991). Toutefois, Alvarez et collaborateurs (1992) ont observé une longue réduction de la pression sanguine et de la fréquence cardiaque chez le rat SHR à la suite de l'injection i.c.v. de l'antagoniste des-Arg⁹-Leu⁸-BK dans les ventricules

latéraux (Alvarez et al., 1992). L'injection i.c.v. de Sar-[D-Phe⁸]-des-Arg⁹-BK, un agoniste B₁ plus stable, montre une augmentation de la pression sanguine chez les rats SHR et WKY (Emanuelli et al., 1999). Ces auteurs ont aussi rapporté une diminution de la pression sanguine chez le rat SHR en injectant du R715, un antagoniste B₁ résistant aux peptidases, ou un anti-sens sous forme d'oligodénucléotide (ODN) capable d'inhiber la synthèse du récepteur B₁. La durée de la réduction de la pression sanguine par les ODN pouvait atteindre 48 heures chez le SHR (Emanuelli et al., 1999). Cependant, en utilisant les mêmes outils pharmacologiques, des études récentes n'ont pas confirmé la participation des récepteurs B₁ dans le contrôle cardiovasculaire chez le rat SHR (Cloutier et al., 2002; 2004). Ces résultats controversés peuvent s'expliquer par le fait que le récepteur B₁ est induit par l'application de stressseurs externes tels les cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) et les produits bactériens présents lors des manipulations chirurgicales ou dans les cages (Zhang & Rivest, 2001; Cloutier et al., 2004). De plus, des études de liaison par autoradiographie ont montré une faible densité de sites de liaison pour le récepteur B₁ chez les rats SHR et WKY, suggérant que le récepteur B₁ ne participe pas aux effets presseurs des kinines et encore moins dans la maintenance de l'hypertension chez le rat SHR (Cloutier et al., 2002; 2004).

5.6.3.3. Mécanismes impliqués dans le contrôle cardiovasculaire

Le fait de bloquer les réponses pressives obtenues par l'administration i.c.v. de BK avec un prétraitement à la phentolamine ou à la pyrolamine montre que son action centrale est associée à des mécanismes centraux α -adrénergiques ou histaminergiques (Corrêa et Graeff, 1974; Corrêa et Graeff, 1975; Pirola et al., 1987; Lopes et Couture, 1992; Bhoola et al., 1992). De plus, des études montrent l'implication centrale des prostaglandines dans la réponse pressive de la BK qui est réduite par la pré-administration i.c.v. d'indométhacine (Kondo et al., 1979;

Takahashi et Buñag, 1981). L'implication des prostaglandines n'est pas en contradiction avec l'hypothèse d'un mécanisme adrénergique central puisque l'injection i.c.v. de prostaglandine E₂ produit un effet presseur similaire à celui produit par la BK (Kondo et al., 1979) et les prostaglandines sont capables de moduler la relâche de transmetteurs des neurones noradrénergiques dans le SNC et en périphérie (Regoli et Barabé, 1980; Bhoola et al., 1992).

D'autre part, il a été montré que l'infusion i.c.v. de doses supra-pressives de BK augmente la sensibilité des réflexes des barorécepteurs chez le rat éveillé (Gerken et Santos, 1992). L'infusion i.c.v. de l'antagoniste sélectif pour le récepteur B₂, Hoe 140, réduit à court terme la sensibilité des barorécepteurs chez le rat SHR, mais pas chez le rat normotendu (Lindsey et al., 1989; Madeddu et al., 1994). L'injection i.c.v. de BK produit une augmentation de la résistance vasculaire périphérique dans plusieurs organes (Thomas et Hiley, 1988).

Le blocage périphérique des récepteurs α_1 -adrénergiques avec le prazosin prévient l'effet presseur de la BK injectée en i.c.v. alors qu'un traitement périphérique avec l'aténolol (antagoniste du récepteur β_1 -adrénergique) reste sans effet (Qadri et al., 1999), suggérant que l'augmentation de la pression artérielle après l'injection i.c.v. de BK est provoquée par une vasoconstriction périphérique après la libération de catécholamines (Buñag et Takahashi, 1981; Takahashi et Buñag, 1981). La réponse pressive est accompagnée d'une diminution de la fréquence cardiaque (Buccafusco et Serra, 1985 ; Qadri et al., 1999).

De plus, le prétraitement au prazosin induit un effet vasodépresseur en présence de BK; cet effet est prévenu par le propranolol et l'ablation des médullosurrénales, suggérant la participation d'adrénaline des médullosurrénales.

Ainsi, la réponse pressive de la BK serait due à la libération des catécholamines puis à l'activation subséquente des récepteurs α -adrénergiques centraux et périphériques, alors que la diminution de la fréquence cardiaque serait due à l'activation des barorécepteurs qui implique le nerf vague.

Dans la moelle épinière, l'injection intrathécale de la BK au 9^e segment thoracique chez le rat éveillé entraîne une augmentation transitoire de la pression artérielle moyenne, suivie d'une chute plus prolongée de la fréquence cardiaque (figure 12). Ces effets sont respectivement attribués à l'activation du système sympatho-surrénalien et à un réflexe vagal impliquant les fibres sensorielles de type C (Lopes et Couture, 1992).

Puisqu'un prétraitement à la capsaïcine ou l'injection intrathécale d'un antagoniste de la substance P n'affecte pas l'effet presseur de la BK (Lopes et Couture, 1992; Pham et Couture, 1993), la BK agirait directement sur les récepteurs B₂ situés sur les fibres pré-ganglionnaires sympathiques de la colonne intermédio-latérale ou indirectement via des interneurons.

Ainsi, cet effet modulateur excitateur de la BK sur les fibres pré-ganglionnaires sympathiques de la moelle épinière pourrait jouer un rôle physiologique dans les mécanismes de régulation de la pression artérielle par le système nerveux autonome (Lopes et Couture 1992).

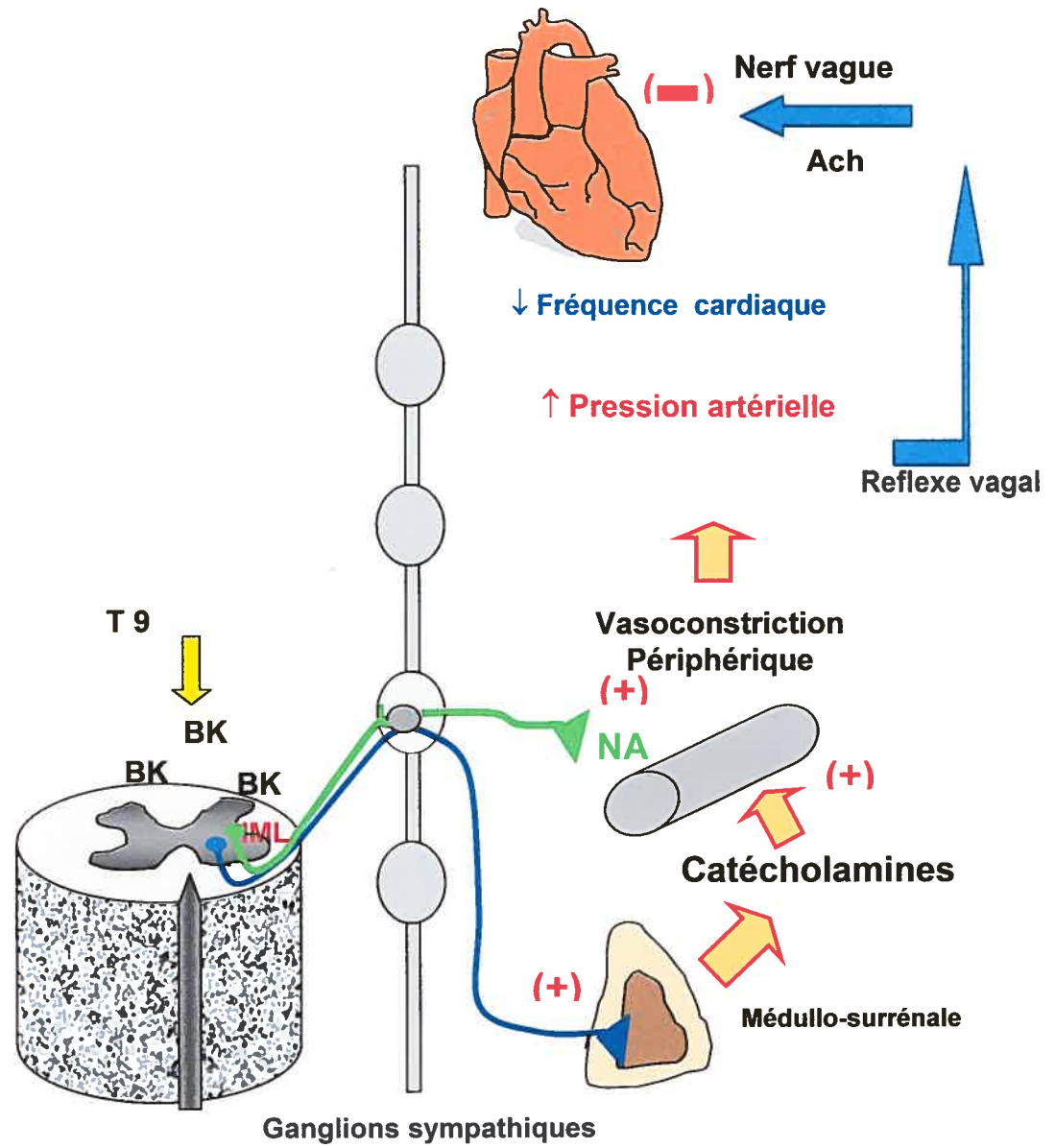


Figure 12 : Effet cardiovasculaire de la BK dans la moelle épinière.

La BK produit l'élévation de la pression artérielle par le système sympatho-surrénalien et la bradycardie par un réflexe vagal.

6.0 Les kinines centrales en physiopathologie: bases rationnelles, problématiques et Objectifs de la thèse

6.1. Les kinines centrales et les maladies neurologiques

6.1.1. L'épilepsie temporale

L'épilepsie est un trouble neurologique qui se manifeste par des convulsions récurrentes référant à une constellation compliquée de plus de 40 désordres distincts (Lees et al., 2000). L'activité épileptiforme peut être décrite comme un ensemble de bouffées d'activités anormales de très hautes fréquences dans différentes régions du cerveau (Wheal et Thomson, 1984). La manifestation de la maladie pourrait s'apparenter à un déséquilibre entre excitation et inhibition du cerveau, ne lui permettant plus d'interpréter tous signaux auditifs, visuels ou sensoriels. La forme temporale est la plus fréquente chez l'adulte. C'est une forme d'épilepsie dite partielle qui est toujours secondaire à une pathologie de type traumatique, tumorale ou autre, résultant d'une anormalité intrinsèque des structures cérébrales du lobe temporal (d'où son nom) et des structures sous-jacentes, incluant le cortex temporal, l'amygdale et l'hippocampe (Pollen et Trachtenberg, 1970; Heinemann et al., 2000). Une des hypothèses retenues est l'hypersensibilité des cellules nerveuses à l'intérieur du lobe temporal, ou des structures sous-jacentes, aux messagers chimiques excitateurs environnants. Comme pour les autres formes d'épilepsie, la régulation anormale de l'inhibition induite par le neuromédiateur GABA (acide γ aminobutyrique) est toujours observée. Ceci implique un déséquilibre dans le ratio des influences excitatrices/inhibitrices qui résulte en activités convulsives et en motifs de décharges neuronales altérées. Ces derniers découlent de la décharge excessive des populations additionnelles de cellules pyramidales, normalement régulées via une inhibition tonique relayée par le GABA (Bernard et al., 2000). Toutefois, les convulsions épileptiques peuvent aussi impliquer d'autres types cellulaires, incluant les cellules endothéliales, les micro-vaisseaux, les astrocytes et les cellules micro-gliales (de Bock et al., 1996).

À ce jour, peu d'études se sont penchées sur le rôle du système kalicréine-kinines dans l'épilepsie; en particulier, dans les situations post-traumatiques où la BK pourrait jouer un rôle pro épileptique en assurant la dépolarisation neuronale (Bhoola et al., 1992). En effet, la Lys-desArg⁹BK, le métabolite actif de la kallidine sur le récepteur B₁, produit une augmentation de la relâche du glutamate sur des échantillons d'hippocampe dans deux modèles d'épilepsie temporelle (modèles de *kindling* et kainate). Ces effets sont prévenus par le R715, un antagoniste B₁, suggérant l'induction et la surexpression du récepteur B₁ dans le cerveau du rat épileptique (Bregola et al., 1999). Même si les mécanismes qui soutiennent l'induction et la surexpression du récepteur B₁ dans l'épilepsie temporelle restent méconnus, plusieurs données montrent que la généralisation des convulsions dans le modèle du *kindling* est accompagnée de l'altération de plusieurs récepteurs appartenant à plusieurs systèmes effecteurs (Albensi 2001; Yaari et Beck, 2002). De plus, étant donné que les cytokines sont impliquées dans diverses formes de neurodégénérescence, dans les processus inflammatoires ainsi que dans une variété d'actions centrales (Allan et Rothwell, 2001), on peut suggérer que les cytokines sont impliquées dans l'induction centrale du récepteur B₁.

En effet, des changements au niveau de l'expression des cytokines ont été montrés dans l'épilepsie (Allan et Rothwell, 2001; Albensi, 2001; Yaari et Beck, 2002; Shandra et al, 2002), en particulier les cytokines proinflammatoires IL-1 α , IL-1 β (Jankowsky et Patterson, 2001), les facteurs TNF α et NF κ B (Albensi, 2001; Shandra et al., 2002).

De plus, l'administration de l'antagoniste au récepteur de l'interleukine-1 naturel (IL-1RA) prévient les convulsions (Vezzani et al., 2000). Ces données ouvrent une nouvelle avenue thérapeutique étant donné que les médicaments actuellement disponibles contre l'épilepsie contrôlent très peu les convulsions.

De plus, étant donné que le système kalicréine-kinines influence grandement la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (Kamiya et al., 1993; Wagner et al., 2002; Borlongan et

Emerich, 2003) et que l'utilisation du LF16-0687, un antagoniste B₂ non peptidique, apporte des effets bénéfiques dans le traumatisme crânien chez le rat et la souris (Zausinger et al., 2002; Kaplanski et al., 2003; Ding-Zhou et al., 2003), on peut suggérer de nouvelles directions pour le traitement des traumatismes crâniens et des accidents cérébrovasculaires (Sobey, 2003). Ainsi, il est approprié de connaître la distribution et la plasticité des récepteurs des kinines dans un modèle d'épilepsie temporelle

6.1.1.1. Problématiques 1

- 1- Toutes les composantes du système kalicréine-kinines sont présentes dans le système nerveux central.
- 2- Dans un modèle de rat épileptique (*kindling*), une réponse excitatrice favorisant la relâche du glutamate dans l'hippocampe, attribuable à la surexpression du récepteur B₁, a été rapportée. Or le glutamate est l'un des neurotransmetteurs excitateurs associés à l'épilepsie.
- 3- À ce jour, il n'existe aucune distribution détaillée des récepteurs B₁ et B₂ des kinines dans le système nerveux central du rat normal ou épileptique.

6.1.1.2. Objectifs 1

(1) Établir la distribution des récepteurs B₁ et B₂ des kinines dans le cerveau et la moelle épinière du rat normal. (2) Étudier les altérations possibles de ces récepteurs dans l'épilepsie et voir si le *kindling* chez le rat peut constituer un modèle d'étude du récepteur B₁ central.

Approche expérimentale: Autoradiographie quantitative sur le cerveau et la moelle épinière de rats témoins et épileptiques (modèle *kindling*).

Cette étude a fait l'objet d'une publication qui est présentée au **CHAPITRE II: Ongali, B., Campos M.M., Bregola, G., Rodi, D., Regoli D., Thibault, G., Simonato, M. and Couture, R**

(2003). Autoradiographic analysis of rat brain kinin B₁ and B₂ receptors: normal distribution and alterations induced by epilepsy. *Journal of Comparative Neurology* 461:506-519

6.2. Les kinines centrales et les maladies aux incidences cardiovasculaires

6.2.1. L'hypertension artérielle

Les kinines contribuent aux effets cardio et néphro-protecteurs des IEC dans le traitement des maladies cardiovasculaires (Linz et al., 1995). En effet, il est connu que les IEC, efficaces dans le traitement de l'hypertension artérielle chez l'homme (Couture et Girolami, 2004; Tom, et al., 2003; Hernandez-Hernandez et al., 2002), potentialisent l'effet des kinines en prévenant leur dégradation mais aussi en altérant l'expression de leurs récepteurs par des mécanismes non encore totalement élucidés. A cet égard, la surexpression du récepteur B₁ a été rapportée dans les vaisseaux de lapin (Nwator et Whalley, 1989; Whalley et Nwator, 1989), dans ceux des rats normotendus/hypertendus et des souris normales et KOB₂ (Marin-Castaño et al., 2002; Dugay et al., 2004) en présence des IEC. Bien que ce phénomène demeure controversé (Marceau et al., 1999), le récepteur B₁ semble contribuer à l'effet hypotenseur des IEC chez le rat et l'homme (Ignjatovic et al., 2002).

Or, une hypersensibilité des réponses cardiovasculaires à la BK administrée par voie intrathécale et corrélée à la surexpression des récepteurs B₂ dans la moelle épinière du rat SHR a été montrée (Cloutier et al., 2002). Cette hypersensibilité centrale aux kinines observée aussi au niveau supraspinal chez les rats SHR (Cloutier et al., 2002; 2004) ouvre un nouvel aspect dans la compréhension de la participation des kinines dans les effets des IEC et bloqueurs AT1 utilisés pour traiter l'hypertension artérielle. Les IEC et les bloqueurs AT1, relativement lipophiliques, passent la barrière hématoencéphalique (Ranadive et al., 1992; Cushman et al., 1995) et pourraient moduler l'expression des récepteurs des kinines (Marin-Castaño et al., 2002) ou potentialiser les effets centraux des kinines. Il existe donc un paradoxe à élucider dans

les effets centraux et périphériques de ces médicaments anti-hypertenseurs sur le système des kinines. D'où l'importance de comprendre: (1) Si la surexpression des récepteurs B_2 dans la moelle épinière du rat SHR est secondaire ou pas à l'hypertension artérielle. (2) Si les IEC modulent l'expression des récepteurs centraux des kinines comme en périphérie. (3) Si une modulation de l'expression des récepteurs centraux des kinines par les IEC entrave leurs effets bénéfiques. Autant de questions cruciales que l'on se doit d'aborder pour comprendre l'implication des kinines centrales dans l'hypertension artérielle.

6.2.1.1. Problématiques 2

- 1- En périphérie, les effets bénéfiques des IEC sont en partie assurés par l'inhibition du métabolisme des kinines, lesquelles produisent des vasodilatations et une diminution de la pression artérielle via le récepteur B_2 .
- 2- Le récepteur B_2 est surexprimé dans la moelle épinière du rat hypertendu (SHR) et son activation entraîne des effets presseurs très importants.
- 3- Les IEC potentialisent les effets des kinines par un mécanisme qui favorise la surexpression des récepteurs B_1 et B_2 , lesquels participent aux effets bénéfiques des IEC
- 4- Bien que vasodilatatrices en périphérie, les kinines centrales sont vasopresseuses.

6.2.1.2. Objectifs 2

Déterminer si (1) la surexpression des récepteurs B_2 des kinines dans la moelle épinière du rat SHR est secondaire à l'hypertension artérielle; (2) les traitements chroniques aux IEC peuvent réguler l'expression des récepteurs B_1 et B_2 spinaux comme c'est le cas en périphérie.

Approche méthodologique : Autoradiographie quantitative sur les moelles épinières de rats WKY et SHR non traités ou traités aux IEC ou au losartan (bloqueur AT1).

Cette étude a fait l'objet d'une publication qui est présentée au **CHAPITRE III : Ongali, B., Buck De Sousa, H., Cloutier, F., Legault, F., Regoli, D., Lambert, C., Thibault, G., Couture, R. (2003) Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord. Am J Physiol Heart Circ Physiol.284:H1949-H1958**

6.2.2. Le diabète

Une corrélation significative entre la présence du diabète, sa durée et le déficit des performances cognitives a été montrée chez des femmes atteintes de diabète (Pellerin et al., 1998). Ceci suggère que le SNC est aussi bien exposé aux hyperglycémies marquées que les organes en périphérie (Jacob et al., 2002) et qu'il serait également susceptible d'être affecté par le diabète (Di Mario et al., 1995; Mooradian 1997). Chez le rat diabétique-STZ, l'activation spinale du récepteur B₁ cause des augmentations de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque ainsi qu'une réponse hyperalgésique. Ces réponses sont absentes chez les rats témoins (Cloutier et Couture, 2000). L'administration d'un antagoniste B₁ ou NK₁ (récepteur à la substance P) ou d'un inhibiteur de la NOS (L-NNA), des prostaglandines (indométhacine) ou de la cyclo-oxygénase 2 (L745337) inhibe l'hyperalgésie (Couture et al., 2001). Ces données suggèrent qu'au cours du diabète, le récepteur B₁ central peut jouer un rôle délétère et qu'il peut également constituer une cible thérapeutique.

En effet, la souris diabétique-STZ manifeste une hyperalgésie à des stimuli nociceptifs thermiques. Cet effet est potentialisé par l'administration de desArg⁹BK (agoniste B₁). L'administration subséquente d'antagonistes B₁, en présence ou non de la desArg⁹BK, inhibe cette hyperalgésie (Gabra et Sirois, 2003).

De plus, les antagonistes B₁ réduisent significativement l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans plusieurs organes périphériques causée par la surexpression du récepteur B₁ chez la souris diabétique STZ (Simard et al., 2002). L'inhibition du récepteur B₁ normalise la

glycémie ainsi que les fonctions rénales chez la souris diabétique (Zuccollo et al., 1996, 1999). Étant donné ces différentes relations entre l'hyperglycémie, le diabète et l'induction du récepteur B₁, il devient important et pertinent d'étudier ce récepteur dans les complications du diabète tels l'hyperalgésie, la neuropathie, la rétinopathie, la néphropathie et l'atteinte vasculaire (Wautier et al., 1996; Gabra et Sirois 2003; Abdouh et al., 2003).

Malgré la surexpression marquée du récepteur B₁ dans plusieurs tissus du rat STZ-diabétique (Cloutier et Couture, 2000; Couture et al., 2001; Vianna et al., 2003; Abdouh et al., 2003), sa surexpression centrale telle que suggérée dans les études fonctionnelles demande à être validée au niveau moléculaire et anatomique.

6.2.2.1. Problématiques 3

- 1- L'hyperglycémie chronique augmente les niveaux de glucose dans le système nerveux central; un facteur pouvant participer aux complications de cette pathologie.
- 2- La production des AGES au cours du diabète favorise l'induction et la surexpression des récepteurs B₁ des kinines, lesquels sont retrouvés en abondance dans plusieurs tissus des rats diabétiques traités à la streptozotocine (STZ).
- 3- L'injection intrathécale de l'agoniste du récepteur B₁ cause des élévations de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque ainsi qu'une réponse hyperalgésique à un stimulus thermique nociceptif chez le rat STZ.

6.2.2.2 Objectifs 3

Fournir des données anatomiques et moléculaires qui appuient les résultats fonctionnels suggérant l'induction et la surexpression du récepteur B₁ dans la moelle épinière du rat STZ-diabétique.

Approches expérimentales: Autoradiographie quantitative et *hybridation in situ* sur la moelle épinière de rats témoins et diabétiques.

Cette étude a fait l'objet d'une publication qui est présentée au **CHAPITRE IV** : Brice Ongali, Maria Martha Campos, Mihai Petcu, Donata Rodi, Frank Cloutier, Jean-Guy Chabot, Gaetan Thibault & Réjean Couture (2004). Expression of kinin B₁ receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *NeuroReport*, 15: 2463-2466

DEUXIÈME CHAPITRE: L'ÉPILEPSIE TEMPORALE

AUTORADIOGRAPHIC ANALYSIS OF RAT BRAIN KININ B₁ AND B₂ RECEPTORS: NORMAL DISTRIBUTION AND ALTERATIONS INDUCED BY EPILEPSY

BRICE ONGALI,^{1†} MARIA MARTHA CAMPOS,^{1†} GIANNI BREGOLA,² DONATA RODI,^{1,2} DOMENICO REGOLI,³ GAETAN THIBAUT,⁴ MICHELE SIMONATO,² AND RE' JEAN COUTURE^{1*}

¹Department of Physiology, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7. ²Department of Clinical and Experimental Medicine, Section of Pharmacology, and Neuroscience Center, University of Ferrara, 44100 Ferrara, Italy ³Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec J1H 5N4, Canada ⁴Clinical Research Institute, Université de Montréal, Montréal, Québec H2W 1R7, Canada

* Address for correspondence:

Réjean Couture, PhD.
Université de Montréal
Pavillon Paul-G.-Desmarais
2960, Chemin de la Tour
Montréal, Québec, Canada
H3T 1J4
Tel.: 1-514-343-7060
Fax: 1-514-343-2111

Indexing terms: epileptogenesis; seizures; bradykinin; kinin receptors

[†] Both authors have contributed equally to this work.

Abbreviations

ACnu accumbens nucleus

Amy amygdala

BK bradykinin

BSA bovine serum albumin

CA1 CA1 field of Ammon's horn

CA2 CA2 field of Ammon's horn

CA3 CA3 field of Ammon's horn

Cer cerebellum

Cg cingulate cortex

CG central gray

Cla claustrum

Coll colliculus

CPu caudate putamen

DG dentate gyrus

DRnu dorsal raphe nucleus

Ent entorhinal cortex

Fr frontal cortex

HPP- 3-4 hydroxyphenyl-propionyl-desArg⁹-D-Arg^o-[Hyp³, Thi⁵,
des Arg¹⁰- D-Tic⁷, Oic⁸]-BK

Hoe 140 HPP-Hoe 140 3-4 hydroxyphenyl-propionyl-D-Arg^o-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷,
Oic⁸]-BK

Hyp hypothalamus

ICP inferior cerebellar peduncles

IL-1 β interleukin-1 β

IO inferior olive

IPn interpeduncular nucleus

LSnu lateral septal nucleus

mGluR metabotropic glutamate receptor

MGnu marginal geniculate nucleus

MPnu median preoptic nucleus

MVnu mediovestibular nucleus

NF- κ B transcriptional nuclear factor κ B

Oc occipital cortex

Peri/Pir perirhinal and piriform cortex

PIPES piperazine-*N,N*-bis[2-ethanesulfonic-acid]

Py pyramidal tract

SHnu septohippocampal nucleus

SN substantia nigra

SP5 spinal trigeminal nucleus

S subiculum

Temp/Par temporal and parietal cortices

Thal thalamus

TNF α tumor necrosis factor- α

VTa ventral tegmental area

ABSTRACT

Kindling-induced seizures constitute an experimental model of human temporal lobe epilepsy that is associated with changes in the expression of several inflammatory proteins and/or their receptors in distinct brain regions. In the present study, alterations of kinin receptors in the brain of amygdaloid-kindled rats were assessed by means of *in vitro* autoradiography, using [¹²⁵I]-3-4 hydroxyphenyl-propionyl-desArg⁹-D-Arg⁰-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-bradykinin (B₁ receptors) and [¹²⁵I]-3-4 hydroxyphenyl-propionyl-D-Arg⁰-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-bradykinin (B₂ receptors) as ligands. Results demonstrate that B₂ receptors are widely distributed throughout the brain of control rats. The highest densities were observed in lateral septal nucleus, median preoptic nucleus, dentate gyrus, amygdala, spinal trigeminal nucleus, mediovestibular nucleus, inferior cerebellar peduncles, and in most of cortical regions (0.81–1.4 fmol/mg tissue). In contrast, very low densities of B₁ receptors were detected in all analyzed areas from control rats (0.18–0.26 fmol/mg tissue). When assessed in kindled rats, specific binding sites for B₂ receptors were significantly decreased (41 to 76%) in various brain areas. Conversely, B₁ receptor binding sites were markedly increased in kindled rats, especially in hippocampus (CA2 – CA1 – CA3), Amy and entorhinal, peririnal/piriform, and occipital cortices (152–258%). Data show for the first time that kindling-induced epilepsy results in a significant decline of B₂ receptor binding sites, accompanied by a striking increase of B₁ receptor labeling in the rat brain. An altered balance between B₁ and B₂ receptor populations may play a pivotal role in the onset and/or maintenance of epilepsy.

INTRODUCTION

The group of peptides generically named kinins are involved in a variety of biological functions, including the control of blood pressure, contraction and relaxation of smooth muscles, inflammatory responses, pain, and hyperalgesia (Regoli and Barabé, 1980; Bhoola et al., 1992; Couture et al., 2001; Kaplan et al., 2002). Kinins act through the activation of two G-protein coupled receptors denoted as B₁ and B₂. Both receptors have been cloned in several animal species and in man (Marceau et al., 1998; Couture and Lindsey, 2000). B₂ receptors are widely distributed in the periphery, being described as constitutive entities responsible for most biological effects of kinins. Conversely, B₁ receptor expression is limited under normal conditions but can be induced and up-regulated in specific situations, mainly associated with inflammatory states and dependent on activation of the cytokine network (reviewed by Marceau et al., 1998; Couture et al., 2001). In the periphery, B₁ and B₂ receptors have been associated with the onset and development of several pathologic conditions, including asthma, arthritis, diabetes, and cardiovascular diseases (Linz et al., 1999; Kaplan et al., 2002). However, only a few studies have reported a putative role for kinin receptors in neurologic disorders. An up-regulation of B₂ receptors has been reported in human medulla from hypertensive and diabetic donors (De Sousa Buck et al., 2002) and in the spinal cord (Cloutier et al., 2002) and hypothalamus (Qadri et al., 2002) of spontaneously hypertensive rats. Moreover, a recent pharmacologic study has demonstrated that glutamate overflow was significantly increased by B₁ receptor stimulation in cortical and hippocampal slices taken from kainate-treated and, even more so, from kindled rats, two models of temporal lobe epilepsy (Bregola et al., 1999). Plastic changes affecting kinin receptors may be relevant in the physiopathology of seizures and epilepsy, because they mediate excitatory effects in the central and peripheral nervous system (Marceau et al., 1998; Couture and Lindsey, 2000). The observation of B₁ receptor-mediated excitatory effects in a

chronic (kindling), more than in an acute (kainate), model of epilepsy suggests that they do not merely depend on seizure severity and/or duration, but may contribute to the epileptic condition of latent hyperexcitability.

Despite this functional evidence, however, no study has demonstrated the presence of B₁ receptors nor the possibility that B₂ receptors can be affected in epileptic brains. Thus, the present work aimed at studying the distribution of B₁ and B₂ receptors in the whole brain and spinal cord of kindled rats, and at directly examining possible changes in the density of these receptors when compared with sham-stimulated control rats.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and materials

HPP-des-Arg¹⁰-Hoe 140 (3-4 hydroxyphenyl-propionyl-desArg⁹-D-Arg⁰-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-bradykinin [BK]) and HPP-Hoe 140 (3-4 hydroxyphenyl-propionyl-DArg⁰-[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]-BK) were developed from the selective B₁ receptor antagonist desArg¹⁰-Hoe 140 (Wirth et al., 1991) and the B₂ receptor antagonist Hoe 140 or Icatibant (Hock et al., 1991), respectively. They were synthesized in the laboratory of D. Regoli (Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke, Canada). Autoradiographic [¹²⁵I]-labeled microscales (20 µm) and Kodak Scientific imaging film BIOMAX MS (doublecoated, 24 x 30 cm) were purchased from Amersham Pharmacia Biotech Canada. Bacitracin, bovine serum albumin (BSA; protease-free), captopril, dithiothreitol (DTT), magnesium chloride, piperazine-*N,N*-bis[2-ethanesulfonic-acid] (PIPES), 1,10-phenanthroline were purchased from Sigma-Aldrich, Canada.

Peptide iodination

Iodination of HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 and HPP-Hoe 140 was performed according to the chloramine T method (Hunter and Greenwood, 1962). Briefly, 5 µg of peptide were incubated in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4) for 30 seconds in the presence of 0.5 mCi (18.5 MBq) of Na¹²⁵I and 220 nmol of chloramine T in a total volume of 85 µl. The monoiodinated peptide was then immediately purified by high pressure liquid chromatography on a C4 Vydac column (0.4 x 250 mm; The Separations Group, Hesperia, CA) with 0.1% trifluoroacetic acid and acetonitrile as mobile phases. The specific activity of the iodinated peptides corresponds to 2,000 cpm/fmol or 1,212 Ci/mmol.

Animals

Male Sprague-Dawley rats (300–350 g; n = 8; Stefano Morini, Reggio Emilia, Italy) were kept in controlled room temperature (22–24°C) and humidity (55–65%), with free access to food and water and maintained under a 12 hours:12 hours light–dark cycle (lights on 7:00 AM). The experiments were carried out in accordance with European and Canadian Council on Animal Care and approved by the Animal Care Committee of our Universities. All efforts have been made to keep at a minimum the number of animals used and their level of suffering.

Kindling model of epilepsy

Kindling was performed according to the method described previously (Bregola et al., 1999). Briefly, a twisted bipolar electrode was implanted into the right amygdale (coordinates: 4.8 mm lateral and 0.8 mm posterior to bregma; 8.3 mm deep from dura) under ketamine (100 mg/kg) anesthesia. Thereafter, animals were allowed to recover for 7 days and then stimulated once a day with a single 1-second train of bipolar pulses (1 msec, 60 Hz, 25% above after-

discharge threshold). For every animal, behaviour and the duration of after-discharge measured in the right amygdala were recorded after each stimulation.

Kindling criteria, i.e., three consecutive class 4 (forelimb clonus and rearing) or five (rearing and falling) seizures were reached after 18 ± 2 stimulations (staging according to Racine, 1972; for review, see Coulter et al., 2002). Rats were killed 7 days after the last stimulation. Age-matched control rats have been submitted to the same surgical procedure (including the electrode implantation) and daily handling, but they were not electrically stimulated (shamstimulated group).

Tissue preparation

After killing under light diethyl ether anesthesia, rats were decapitated and brains and spinal cords were immediately removed, frozen in 2-methyl butane cooled at -45 to -55°C in a bath of dry ice, and then stored at -80°C until use. Matched whole brains or spinal cords were mounted together (two brains or four spinal cords per gelatin block) and serially cut into $20\mu\text{m}$ thick sections on a cryostat with temperature varying between -10 to -12°C . Adjacent sections were taken for experiments by using B_1 and B_2 receptor ligands and alternatively thawmounted on 0.2% gelatin/0.033% chromium potassium sulfate-coated slides and stored at -80°C . Sets of three slides were used for total binding and sets of two slides for nonspecific binding. Approximately 500 slides with three sections each were obtained per block, giving a total of 1,000 slides (3,000 sections) per group of control and kindled rats.

Quantitative autoradiography

B₁ and B₂ receptor autoradiography was performed according to the procedures described earlier (Murone et al., 1997; De Sousa Buck et al., 2002; Cloutier et al., 2002). Sections were thawed at room temperature and preincubated for 30 seconds in 25 mM PIPES buffer (pH 7.4; 4°C). Thereafter, slides were incubated for 90 minutes at room temperature in 25 mM PIPES buffer containing: 1 mM 1,10-phenanthroline, 1 mM DTT, 0.014% bacitracin, 0.1 mM captopril, 0.2% BSA (protease-free), and 7.5 mM magnesium chloride in the presence of 150 pM [¹²⁵I]HPPdesArg10-Hoe 140 (for B₁ receptor) or 200 pM [¹²⁵I]HPPHoe 140 (for B₂ receptor). The nonspecific binding was determined in the presence of 1 μM of unlabeled ligands (HPP-desArg10-Hoe 140 for B₁ receptor and HPP-Hoe 140 for B₂ receptor). To ascertain the specificity of the labelled B₂ radioligand, the same concentration of unlabeled B₁ ligand was added to the solution. Likewise, the same concentration of the unlabeled B₂ ligand was added to the labeled B₁ ligand solution. The concentrations of radioligands were chosen based on previous studies (Murone et al., 1997; Cloutier et al., 2002) and on pilot experiments. At the end of the incubation period, slides were transferred sequentially through four rinses of 4 minutes each in 25 mM PIPES (pH 7.4; 4°C) and dipped for 15 seconds in distilled water (4°C) to remove the excess salts and air-dried. Kodak Scientific Imaging Films BIOMAX MS were juxtaposed onto the slides in the presence of ¹²⁵I-labeled microscales and exposed at room temperature for 3 days (B₁ ligand) or 2 days (B₂ ligand). Densitometric readings were performed with an image analysis system (MCID, Imaging Research, Ontario, Canada). A standard curve from ¹²⁵I-labeled microscales was used to convert density levels into femtomoles per milligram of tissue (fmol/mg tissue). Specific binding was determined by subtracting superimposed digitalized images of non-specific labeling from total binding. The number of replicates analyzed for each brain region was a minimum of three per animal. The

anatomic structures accompanied by their nomenclature are adapted from the atlas of Paxinos and Watson (1998) and are shown in Figure 1.

Statistical analysis

The results are presented as the mean \pm SE mean of four animals per group. Statistical comparison of the data was performed with Graph-Pad Prism computer program using Student's unpaired *t* test. All *P* values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

The percentages of decrease (B_2 receptors) or increase (B_1 receptors) of receptor densities are reported as the mean \pm SE mean of percentage obtained from each animal.

RESULTS

Autoradiographic localization and corresponding specific binding values for kinin B_1 and B_2 receptors in shamstimulated and kindled rats are illustrated in Figures 2 to 10 and described in detail subsequently. It is worth noting that whatever the analyzed area, B_1 and B_2 receptor binding sites were not significantly different in both brain hemispheres, ipsi- and contralateral to the electrode implantation; thus, data from both hemispheres were pooled for sham-stimulated control and kindled rats (Figs. 2, 3).

B_2 receptor distribution

When analyzed in sham-stimulated control animals, B_2 receptor binding sites were observed throughout various regions of the brain. Specific labeling for B_2 receptors in forebrain areas presented moderate levels (ranging between 0.55 ± 0.03 and 0.87 ± 0.08 fmol/mg tissue) and included amygdala (Amy) > lateral septal nucleus (LSnu) > median preoptic nucleus (MPnu) claustrum > caudate putamen (CPu) > accumbens nucleus (ACnu; Fig. 4). B_2 receptor-specific

binding sites, with densities varying between 0.52 ± 0.12 and 0.72 ± 0.14 fmol/mg tissue, were also observed at the midbrain level in the following areas: superior and inferior colliculus > dorsal raphe nucleus (DRnu) > central gray (CG) and related areas (Fig. 5). Results of Figure 6 show that, in sham-stimulated rats, B₂ receptors were found distinctly distributed in hippocampal structures such as DG fields CA1, CA2, and CA3 (values ranging from 0.49 ± 0.04 to 0.99 ± 0.07 fmol/mg tissue). Moderate B₂ receptor-specific binding sites were found in the hypothalamus (0.68 ± 0.07 fmol/mg tissue) and the thalamus (0.64 ± 0.08 fmol/mg tissue) (Fig. 7). The highest values for B₂ receptor-specific binding were found at the hindbrain level of control rats (0.74 ± 0.10 to 1.36 ± 0.11 fmol/mg tissue) and included SP5 medi vestibular nucleus (MVnu) > inferior cerebellar peduncles (ICP) > inferior olive (IO) > pyramidal tract (Py) (Fig. 8). The exception in the hindbrain was the molecular layer of cerebellum, which showed moderate levels of B₂ receptor labeling (0.51 ± 0.11 fmol/mg tissue) (Fig. 7). Finally, B₂ receptor-specific binding sites were seen in cingulate cortex (Cg) – perirhinal and piriform cortex (Peri/Pir) > frontal cortex (Fr) > temporal and parietal cortices (Temp/par) > occipital cortex (Oc) > entorhinal (Ent) cerebral cortices, with densities of 0.60 ± 0.05 to 0.86 ± 0.09 fmol/mg tissue (Fig. 9). When measured in kindled rats, densities of B₂ receptor-specific binding were significantly reduced in many regions of the brain in comparison to shamstimulated animals. The decrease in B₂ receptor labelling ranged between $41 \pm 5\%$ and $76 \pm 6\%$, and the greatest reductions (70% of decrease) were observed in claustrum, LSnu, ICP, and IO (Table 1; Figs. 4–9). Many other regions presented reductions of more than 50% of specific B₂ receptor binding, in particular Amy, ACnu, CPu, MPnu, DG, hypothalamus, thalamus, superior and inferior colliculus, Mvnu, Py, SP5, and all cortical regions.

Although reduced in kindled rats, B₂ receptor labelling was not significantly different from that observed in sham-stimulated animals when assessed in CG and related

areas, DRnu, and in the molecular layer of cerebellum (Table 1; Figs. 4–9). B₂ receptor binding sites were observed in various structures of the cervical, thoracic, and lumbar spinal cord gray matter, such as laminae I, II, III, and X (values ranging between 11.10 ± 0.50 and 18.84 ± 1.10 fmol/mg tissue) of sham-stimulated control rats. The density and distribution of B₂ receptor-specific binding sites were not significantly different from the same spinal cord laminae of kindled rats (values ranging from 10.48 ± 0.22 to 19.96 ± 0.60 fmol/mg tissue) (Fig. 10A,B).

B₁ receptor distribution

With respect to kinin B₁ receptors, low density values were seen throughout the brain of sham-stimulated control rats (0.19 ± 0.001 to 0.26 ± 0.04 fmol/mg tissue). On the other hand, when analyzed in kindled animals, densities of B₁ receptor binding sites were dramatically increased compared with sham-stimulated animals. The most striking increases were observed in all structures associated with amygdaloid stimulation, including hippocampal areas (fields CA1, CA2, and CA3), Amy and Ent, Peri/Pir, and Oc cortices (152 to 258% of increases; Table 1; Figs. 4–6, 9). The highest density values were obtained in Amy (0.66 ± 0.07 fmol/mg tissue), Peri/Pir cortex (0.61 ± 0.06 fmol/mg tissue), and CA2 field of hippocampus (0.55 ± 0.06 fmol/mg tissue) of epileptic rats. Increases of more than 100% in B₁ receptor binding sites were still observed in other regions, such as DG, hypothalamus, CG and related areas, superior and inferior colliculus, DRnu, and substantia nigra (Table 1; Figs. 5–7). In addition, some hindbrain areas, including interpeduncular nucleus (IPn), MGnu, and subiculum (S; Fig. 8), and also Temp/Par cortices (Fig. 9) presented increases of more than 100% in B₁ receptor binding sites. Moderate increases in B₁ receptor binding sites were observed in ACnu and CPu (forebrain, Fig. 4) and thalamus and ventral tegmental area (VTa; midbrain, Figs. 5, 7) of epileptic rats. When evaluated at some other brain structures, such as SHnu, Cg, and Fr, and molecular layer of cerebellum, no significant differences were noticed in densities of B₁

receptor between kindled and sham-stimulated animals. In the spinal cord, B₁ receptor-specific binding sites were undetectable when analyzed in either sham-stimulated or epileptic rats (data not shown).

DISCUSSION

The main finding of the present study is that kindling epileptogenesis is associated with marked changes in kinin receptor densities. Furthermore, to the best of our knowledge, this is the first study providing a complete autoradiographic mapping of B₂ receptor distribution in the rat brain. When measured in epileptic (kindled) rats, B₂ receptor binding sites were found to be significantly reduced in several brain areas in comparison with shamstimulated control animals. In contrast, B₁ receptor densities were markedly increased in various brain regions, notably those related to the electrical amygdaloid stimulation.

Kinin B₁ and B₂ receptors densities were not significantly altered in the cerebellum and spinal cord of kindled compared with control rats. Kindling represents a chronic experimental model of temporal lobe epilepsy where the repeated application of an initially subconvulsive electrical stimulus results in a progressive increase of the evoked seizures, culminating with the development of generalized tonic-clonic convulsions. It has been largely described that these events are accompanied by alterations in several receptor-effector systems (Albensi, 2001; Allan and Rothwell, 2002; Yaari and Beck, 2002). One could suggest that kinins and their receptors are associated with the epileptogenesis, i.e., with the transition from a normal to an epileptic brain. This hypothesis was originally put forward by demonstrating a marked increase of B₁ receptor-mediated glutamate release in hippocampal and cortical slices obtained from kindled rats (Bregola et al., 1999). The present study shows the effects of kindling-induced epilepsy on the plasticity of kinin receptors throughout the whole rat brain.

Distribution of B₂ receptors

Previous studies have reported the laminar distribution of B₂ receptor binding sites and immunoreactivity in major segments of the rat and guinea pig spinal cord (Lopes et al., 1993, 1995; Couture and Lindsey, 2000; Cloutier et al., 2002). However, as stated above, the present study is the first quantitative distribution of B₂ receptors in the rat brain. The present data reveal a widespread B₂ receptor distribution, including the forebrain (accumbens nucleus, caudate putamen, lateral septal nucleus, median preoptic nucleus, claustrum, amygdala), hippocampus (CA1, CA2, and CA3 fields of Ammon's horn, dentate gyrus), hypothalamus, thalamus, midbrain (central gray, colliculus, dorsal raphe nucleus), cerebellum, hindbrain (inferior cerebellar peduncles, inferior olive, mediovestibular nucleus, pyramidal tract, spinal trigeminal nucleus), and all cortical regions. This finding is consistent with the ubiquitous cellular distribution of B₂ receptor immunoreactivity in Fischer 344 rat brain (Chen et al., 2000) and with the autoradiographic distribution of B₂ receptors (also using [¹²⁵I]HPP-Hoe 140) previously reported throughout motor, sensory, and autonomic areas of the sheep and guinea pig brain (Murone et al., 1996, 1997), and of the human medulla (De Sousa Buck et al., 2002). The recent study of Chen et al. (2000) revealed that virtually 100% of the B₂ receptor-immunoreactive positive cells were neurons and that no labeling was seen in astrocytes or blood vessels in any brain region examined. Such a wide cerebral distribution of B₂ receptors suggests that kinins are likely mediators of several neuronal pathways associated with the control of motor, sensory, behavioral, autonomic, and neuroendocrine functions.

Opposite regulation of B₁ and B₂ receptors

We show here that kindling epileptogenesis is associated with dramatic plastic changes in kinin receptor representation in critical brain areas. These changes involve the two kinin receptors in an opposite manner and consist of a significant reduction in B₂ and a marked increase in B₁

receptor binding sites. These observations are in line with data obtained in peripheral preparations supporting the notion that, contrary to B₂ receptors, B₁ receptors are normally not expressed under physiological conditions, but they are induced and up-regulated in pathologic states associated with infection or inflammation (for review, see Marceau et al., 1998; Couture et al., 2001). Consistent with the low expression of B₁ receptors in healthy animals, the present study shows very low densities of kinin B₁ receptor binding sites in several regions of the brain from control rats. We can rule out the possibility that B₂ receptor binding sites are reduced because of neuronal damage on the basis of two arguments: (1) it was shown that amygdaloid kindling is not associated with massive neuronal cell degeneration (Tuunanen and Pitkanen, 2000; McIntyre et al., 2002), and (2) several brain areas displaying a downregulation of B₂ receptors (such as ACnu, CPu, Amy, CG, colliculus, DRnu, fields CA1, CA2, and CA3 of hippocampus, DG, and most of cortical regions) showed a parallel, marked up-regulation of B₁ receptors. However, it is worth mentioning that other brain regions, devoid of detectable B₁ receptors (such as LSnu, claustrum, MPnu, ICP, IO, MVnu, Py, and SP5), displayed a decrease of B₂ receptor binding sites. Conversely, other brain regions (substantia nigra [SN], VTa, IPn, MGnu, and S) displaying undetectable or very low levels of B₂ receptors showed a significant increase of B₁ receptor binding sites. Hence, the down-regulation of B₂ receptors and the up-regulation of B₁ receptors do not seem to require the presence of both receptors in the same area. A similar balance between the two populations of kinin receptors has been described in other paradigms. It was shown that a subacute treatment with lipopolysaccharide from *Escherichia coli* induces an up-regulation of B₁ receptor-mediated edematogenic response, associated with a significant decrease of B₂ receptor-induced edema in the rat paw (Campos et al., 1996). Likewise, Phagoo et al. (1999) have reported the occurrence of a downregulation of B₂ receptors associated with B₁ receptors up-regulation after treatment of human lung fibroblasts with BK. The studies described above were performed in acute or

subacute peripheral models, while we report here that similar changes also occur in a chronic neuropathology. This new notion is in line with recent studies indicating that targeted disruption of the B₂ receptor gene results in the up-regulation of B₁ receptors in renal, cardiac, skeletal muscle, and adipose tissues of adult mice (Duka et al., 2001a,b; Marin-Castaño et al., 2002). Thus, plastic changes in kinin receptors can occur under chronic pathologic conditions. Comparable effects were demonstrated for neuropeptide Y receptors after induction of kindling, where a reduction of Y1 receptors was associated with an increase of Y2 receptors in the granular layer of the dentate gyrus (Gobbi et al., 1998). Induction of kindling in rats has also been correlated with a down-regulation of adenosine A1 receptors in the CA2 and CA3 fields of the hippocampal formation (Ochiishi et al., 1999) and with an up-regulation of cortical *N*-methyl-D-aspartate receptor 1 (Kikuchi et al., 2000) and hippocampal metabotropic glutamate receptor (mGluR) 1 or mGluR2/3 receptors (Aronica et al., 2000; Blumcke et al., 2000). Despite this evidence, no comparable phenomenon was yet demonstrated with kinin receptors, either acutely or chronically in the central nervous system (Couture and Lindsey, 2000).

Putative mechanisms underlying B₁ receptors up-regulation

Although it seems plausible that B₂ receptor downregulation may be agonist-induced, i.e., depend on an increased bradykinin signal (Phagoo et al., 1999), several putative mechanisms may contribute to the up-regulation of B₁ receptors after kindling stimulation. As discussed earlier, B₁ receptor expression is mainly associated with inflammatory conditions. This process has been characterized in various systems, and it seems to be secondary to the production of proinflammatory cytokines, especially interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF) α (Marceau et al., 1998; Couture et al., 2001). A rapid upregulation of several proinflammatory cytokines (such as IL-1 β and TNF α), as well as their receptors, has been observed in epilepsy

models, including kindling (Vezzani et al., 1999; De Simoni et al., 2000; Plata-Salaman et al., 2000; Jankowsky and Patterson, 2001, Shandra et al., 2002). Furthermore, it has been demonstrated that the administration of IL-1 β or TNF α causes an exacerbation of seizures, whereas treatment with the natural interleukin receptor antagonist (IL-RA) prevents the occurrence of convulsions (Vezzani et al., 2000, 2002). Finally, recent data have shown a polymorphism of IL-1 β gene in patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis (Kanemoto et al., 2000). Another possible mechanism for B₁ receptor upregulation may be the activation of transcriptional factors, especially transcriptional nuclear factor κ B (NF- κ B; Marceau et al., 1998; Couture et al., 2001). This possibility is congruent with the presence of a binding site for NF- κ B in the promoter region of B₁ receptor gene (Ni et al., 1998; Yang et al., 1998) and with the inhibition of B₁ receptor induction by selective blockers of the NF- κ B pathway (Schanstra et al., 1998; Campos et al., 1999; Medeiros et al., 2001; Sabourin et al., 2002). Interestingly, kindling causes the activation of transcriptional factors in the brain, in particular several animal models have demonstrated the involvement of NF- κ B in seizure activity, secondary to the stimulation of astrocytes by proinflammatory cytokines (Lerner-Natoli et al., 2000; Albeni, 2001; Allan and Rothwell, 2002). Data obtained in sham-stimulated rats extend the notion that B₂ receptors are constitutive and related to the physiological component of kinin responses (Couture and Lindsey, 2000). Hence, the down-regulation of B₂ receptors together with the up-regulation of B₁ receptors observed in kindled rats suggests an involvement of the kinin system in the mechanism of development and/or maintenance of kindling hyperexcitability. The upregulation of B₁ receptors in the kindled hippocampus has been linked to increased release of glutamate, i.e., to increased excitability (Bregola et al., 1999). However, the functional implications of B₂ receptor down-regulation remain to be investigated.

CONCLUSION

The present study confirms and extends functional data indicating that brain kinin B₁ receptors are up-regulated in amygdaloid-kindled rats (Bregola et al., 1999), demonstrating marked increases of B₁ receptor-specific binding sites in many critical areas of the kindled rat brain. Furthermore, our data show for the first time that B₁ receptors induction is associated with a significant decrease of B₂ receptor binding sites in many brain areas. It is plausible that the opposite regulation of kinin receptors after kindling-induced seizures play a role in the pathophysiology of epilepsy. However, because both B₁ and B₂ receptors appear to exert primary excitatory effects on neurons (Bhoola et al., 1992; Couture and Lindsey, 2000), the functional consequences of the present observations must be explored to define the net consequences of B₁ receptor up-regulation and B₂ receptor down-regulation in cell populations directly involved in the development of temporal lobe epilepsy. In this respect (epileptogenesis), further studies are also required to examine the time-course and the extent of the changes we observed. It should be noticed that we have studied here only the fully kindled situation, i.e., one in which animals respond to stimulation with a generalized, tonic-clonic seizure: analysis of the changes occurring at earlier stages of kindling development, when seizures are still partial, are required to validate the hypothesis that the changes observed correlate with epileptogenesis. Finally, tools are available to challenge both pharmacologically (using B₁ and B₂ receptor antagonists) and genetically (using B₁ and B₂ receptor knock-outs) the idea that kinin receptors play a causal role in the development of epilepsy.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Jean-Guy Chabot from Department of Psychiatry, Douglas Hospital Research Center, McGill University, for conceding the use of the Image Analysis System (MCID, Imaging Research, Ontario, Canada) and for his kind help with quantification.

LITERATURE CITED

- Albensi BC. 2001. Potential roles for tumor necrosis factor and nuclear factor- κ B in seizure activity. *J Neurosci Res* 66:151–154.
- Allan SM, Rothwell NJ. 2002. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Neurosci* 2:735–744.
- Aronica E, Van Vliet EA, Mayboroda OA, Troost D, Da Silva FH, Gorter JA. 2000. Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 12:2333–2344.
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. 1992. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol Rev* 44:1–80.
- Blumcke I, Becker AJ, Klein C, Scheiwe C, Lie AA, Beck H, Waha A, Friedl MG, Kuhn R, Emson P, Elger C, Wiestler OD. 2000. Temporal lobe epilepsy associated up-regulation of metabotropic glutamate receptors: correlated changes in mGluR1 mRNA and protein expression in experimental animals and human patients. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:1–10.
- Bregola G, Varani K, Gessi S, Beani L, Binachi C, Borea PA, Regoli D, Simonato M. 1999. Changes in hippocampal and cortical B₁ bradykinin receptor biological activity in two experimental models of epilepsy. *Neuroscience* 92:1043–1049.
- Campos MM, Souza GEP, Calixto JB. 1996. Up-regulation of B₁ receptor mediating des-Arg⁹-BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. *Br J Pharmacol* 117:793–798.
- Campos MM, Souza GEP, Calixto JB. 1999. In vivo B₁ kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor- κ B pathways. *Br J Pharmacol* 127:1851–1859.

- Chen E-Y, Emerich DF, Bartus RT, Kordower JH. 2000. B₂ bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 427:1–18.
- Cloutier F, de Sousa Buck H, Ongali B, Couture R. 2002. Pharmacologic and autoradiographic evidence for an up-regulation of kinin B₂ receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 135:1641–1654.
- Coulter DA, McIntyre DC, Loscher W. 2002. Animal models of limbic epilepsies: what can they tell us? *Brain Res Pathol* 12:240–252.
- Couture R, Lindsey CJ. 2000. Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neural pathways and physiological functions. In: Quirion R, Björklund A, Hökfelt T, editors. *Handbook of chemical neuroanatomy: peptide receptors. Part 1. Vol. 16.* Amsterdam: Elsevier Science B.V. p 241–300.
- Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. 2001. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 429:161–176.
- De Simoni MG, Perego C, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Marchesi F, De Luigi A, Garattini S, Vezzani A. 2000. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci* 12:2623–2633.
- De Sousa Buck H, Ongali B, Thibault G, Lindsey CJ, Couture R. 2002. Autoradiographic detection of kinin receptors in the human medulla of control, hypertensive, and diabetic donors. *Can J Physiol Pharmacol* 80:249–257.
- Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, Gavras H. 2001a. Vasoactive potential of the B₁ bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circ Res* 88:275–281.
- Duka I, Shenouda S, Johns C, Kintsurashvili E, Gavras I, Gavras H. 2001b. Role of the B₂ receptor of bradykinin in insulin sensitivity. *Hypertension* 38:1355–1360.

- Gobbi M, Gariboldi M, Piwko C, Hoyer D, Sperk G, Vezzani A. 1998. Distinct changes in peptide YY to, and mRNA levels of, Y1 and Y2 receptors in the rat hippocampus associated with kindling epileptogenesis. *J Neurochem* 70:1615–1622.
- Hock FJ, Wirth K, Albus U, Linz W, Gerhards HJ, Wiemer G, Henke St, Breipohl G, König W, Knolle J, Scholkens BA. 1991. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br J Pharmacol* 102:769–773.
- Hunter WM, Greenwood FC. 1962. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194:495–496.
- Jankowsky JL, Patterson PH. 2001. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol* 63:125–149.
- Kanemoto K, Kawasaki J, Miyamoto T, Obayashi H, Nishimura M. 2000. Interleukin (IL)-1 α , IL-1 β and IL-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 47:571–574.
- Kaplan AP, Joseph K, Silverberg M. 2002. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol* 109:195–209.
- Kikuchi S, Iwasa H, Sato T. 2000. Lasting changes in NMDAR1 mRNA level in various regions of cerebral cortex in epileptogenesis of amygdaloid-kindled rat. *Psychiatr Clin Neurosci* 54:573–577.
- Lerner-Natoli M, Montpied P, Rousset MC, Bockaert J, Rondouin G. 2000. Sequential expression of surface antigens and transcription factor NF- κ B by hippocampal cells in excitotoxicity and experimental epilepsy. *Epilepsy Res* 41:141–154.
- Linz W, Wohlfart P, Scholkens BA, Malinski T, Wiemer G. 1999. Interactions among ACE, kinins and NO. *Cardiovasc Res* 43:549–561.

- Lopes P, Kar S, Tousignant C, Regoli D, Quirion R, Couture R. 1993. Autoradiographic localization of [125I-Tyr8]-bradykinin receptor binding sites in the guinea-pig spinal cord. *Synapse* 15:48–57.
- Lopes P, Kar S, Chrétien I, Regoli D, Quirion R, Couture R. 1995. Quantitative autoradiographic localization of [125I-Tyr8] bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience* 68:867–881.
- Marceau F, Hess F, Bachvarov DR. 1998. The B₁ receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50:357–386.
- Marin-Castaño ME, Schanstra JP, Neau E, Praddaude F, Pecher C, Ader J-L, Girolami J-P, Bascands J-L. 2002. Induction of functional bradykinin B₁-receptors in normotensive rats and mice under chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation* 105:627–632.
- McIntyre DC, Poulter MO, Gilby K. 2002. Kindling: some old and some new. *Epilepsy Res* 50:79–92.
- Medeiros R, Cabrini DA, Calixto JB. 2001. The in vivo and ex vivo roles of cyclooxygenase-2, nuclear factor-κB and protein kinases pathways in the up-regulation of B₁ receptor mediated contraction of the rabbit aorta. *Regul Pept* 97:121–130.
- Murone C, Perich RB, Schlawe I, Chai SY, Casley D, MacGregor DP, Müller-Esterl W, Mendelsohn FAO. 1996. Characterization and localization of bradykinin B₂ receptors in the guinea pig using a radioiodinated HOE 140 analogue. *Eur J Pharmacol* 306:237–247.
- Murone C, Paxinos G, Mckinley MJ, Oldfield BJ, Müller-Esterl W, Mendelsohn FAO, Chai SY. 1997. Distribution of bradykinin B₂ receptors in sheep brain and spinal cord visualized by in vitro autoradiography. *J Comp Neurol* 381:203–218.

- Ni A, Chao L, Chao J. 1998. Transcription factor nuclear factor κ B regulates the inducible expression of the human B₁ receptor gene in inflammation. *J Biol Chem* 273:2784–2791.
- Ochiishi T, Takita M, Ikemoto M, Nakata H, Suzuki SS. 1999. Immunohistochemical analysis on the role of adenosine A1 receptors in epilepsy. *Neuroreport* 10:3535–3541.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4th ed. San Diego: Academic Press.
- Phagoo SB, Poole S, 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.
- Plata-Salaman CR, Ilyin SE, Turrin NP, Gayle D, Flynn MC, Romanovitch AE, Kelly ME, Bureau Y, Anisman H, McIntyre DC. 2000. Kindling modulates the IL-1 β system, TNF α , TGF- β 1 and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. *Mol Brain Res* 75:248–258.
- Qadri F, Hauser W, Jöhren O, Dominiak P. 2002. Kinin B₁ and B₂ receptor mRNA expression in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 80:258–263.
- Racine RJ. 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:281–294.
- Regoli D, Barabé J. 1980. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 32:1–46.
- Sabourin T, Morissette G, Bouthillier J, Levesque L, Marceau F. 2002. Expression of kinin B₁ receptor in fresh or cultured rabbit aortic smooth muscle: role of NF- κ B. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H227–H237.
- Schanstra JP, Bataille E, Castaño MEM, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami J-P, Bascands J-L. 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.
- Shandra AA, Godlevsky LS, Oleinik AA, Konovalenko VL, Rapoport EN, Korobka NN. 2002. The role of TNF α in amygdala kindled rats. *Neurosci Res* 42:147–153.
- Tuunanen J, Pitkanen A. 2000. Do seizures cause neuronal damage in rat amygdala kindling. *Epilepsy Res* 39:171–176.
- Vezzani A, Conti M, De Luigi A, Ravizza T, Moneta D, Marchesi F, De Simoni MG. 1999. Interleukin-1 β immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J Neurosci* 19:5054–5065.
- Vezzani A, Moneta D, Conti M, Richichi C, Ravizza T, De Luigi A, De Simoni MG, Sperk G, Andell-Jonsson S, Lundkvist J, Iverfeldt K, Bartfai T. 2000. Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11534–11539.
- Vezzani A, Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Burrows SJ, Ravizza T, Perego C, De Simoni MG. 2002. Functional role of inflammatory cytokines and anti-inflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia* 443:30–35.
- Wirth K, Breipohl G, Stechl J, Knolle J, Henke S, Scho'lkens BA. 1991. Des-Arg⁹-D-Arg-[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸]-BK (des-Arg¹⁰-[Hoe140]) is a potent bradykinin B₁ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 205:217–218.
- Yaari Y, Beck H. 2002. "Epileptic neurons" in temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol* 12:234–239.
- Yang X, Taylor L, Polgar P. 1998. Mechanisms in the transcription regulation of bradykinin B₁ receptor gene expression. *J Biol Chem* 273: 10763–10770.

Legends

TABLE 1. Kindling-Induced Changes in the Densities of B₁ and B₂

Receptor Binding Sites in the Rat Brain ¹Data represent the mean \pm SEM in percentage of increase and decrease of B₁ and B₂ receptor binding sites, respectively, in kindled rats. Statistical significance to shamstimulated control values: **P* < 0.05; ***P* < 0.01, ****P* < 0.0001. ns, not significant; n.d., not detectable.

Fig. 1. Coronal sections of the rat brain representative of the four main regions analyzed in the present study. Pictures on the left were taken from the Atlas of Paxinos and Watson (1998). Autoradiograms are presented as obtained with the image analysis system. CPU, caudate putamen; DR, dorsal raphe nucleus; PY, pyramidal tract. For other abbreviations, see list.

Fig. 2. Autoradiographic localization of brain kinin B₂ receptors.

Shown are autoradiograms representing total binding of [¹²⁵I]HPPHoe 140 (200 pM) in control and kindled rats. The nonspecific binding (NS) in the presence of unlabeled HPP-Hoe 140 (1 μM) is also shown in kindled rats. Pictures are presented as obtained with the image analysis system.

Fig. 3. Autoradiographic localization of brain kinin B₁ receptors.

Shown are autoradiograms representing total binding of [¹²⁵I]HPPdes-Arg¹⁰-Hoe 140 (150 pM) in control and kindled rats. The non-specific binding (NS) in the presence of unlabeled HPP-des-Arg¹⁰-Hoe 140 (1 μM) is also shown in kindled rats. Pictures are presented as obtained with the image analysis system.

Fig. 4. Specific binding sites for B₂ (upper panel) and B₁ (lower panel) kinin receptors in the forebrain of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.

The columns represent the mean \pm SE mean of the values in femtomoles per milligram of tissue from four animals. Statistical comparison to sham-stimulated control values is indicated by **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. For abbreviations, see list.

Fig. 5. Specific binding sites for B₂ (upper panel) and B₁ (lower panel) kinin receptors in the midbrain of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.

The columns represent the mean \pm SE mean of the values in femtomoles per milligram of tissue from four animals. Statistical comparison to sham-stimulated control values is indicated by **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. For abbreviations, see list.

Fig. 6. Specific binding sites for B₂ (upper panel) and B₁ (lower panel) kinin receptors in the hippocampus of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.

The columns represent the mean \pm SE mean of the values in femtomoles per milligram of tissue from four animals. Statistical comparison to sham-stimulated control values is indicated by **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. For abbreviations, see list.

Fig. 7. Specific binding sites for B₂ (upper panel) and B₁ (lower panel) kinin receptors in hypothalamus, thalamus, and cerebellum of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.

The columns represent the mean \pm SE mean of the values in femtomoles per milligram of tissue from four animals. Statistical comparison to shamstimulated control values is indicated by ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. For abbreviations, see list.

Fig. 8. Specific binding sites for B₂ (upper panel) and B₁ (lower panel) kinin receptors in the hindbrain of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.

The columns represent the mean \pm SE mean of the values in femtomoles per milligram of tissue from four animals. Statistical comparison to sham-stimulated control values is indicated by **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. For abbreviations, see list.

Fig. 9. Specific binding sites for B₂ (upper panel) and B₁ (lower panel) kinin receptors in the cortex of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.

The columns represent the mean \pm SE mean of the values in femtomoles per milligram of tissue from four animals. Statistical comparison to sham-stimulated control values is indicated by **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. For abbreviations, see list.

Fig. 10. Autoradiographic localization (A) and quantification of specific binding sites (B) for B₂ kinin receptors in the spinal cord of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.

The non-specific binding (NS) in the presence of unlabeled HPP-Hoe 140 (1 μ M) is also shown in kindled rats. The columns represent the means \pm SE mean of the values in femtomoles per milligram of tissue from four animals. No statistical differences were found between sham-stimulated control and kindled rats. LI, LII, LIII, and LX, laminae number.

Table & Figures

Table 1. Kindling-induced changes in the densities of B₁ and B₂ receptor binding sites in the rat brain

| <i>Regions</i> | B ₂ receptors (% of decrease) | B ₁ receptors (% of increase) |
|--------------------------|---|---|
| <i>Forebrain</i> | | |
| Amygdala | 55 ± 8 ** | 258 ± 40 *** |
| Accumbens nucleus | 66 ± 9** | 79 ± 2* |
| Caudate putamen | 65 ± 8*** | 81 ± 2* |
| Clastrum | 72 ± 5*** | n.d. |
| Lateral septal nucleus | 72 ± 10* | n.d. |
| Median preoptic nucleus | 53 ± 7* | n.d. |
| Septohippocampal nucleus | n.d. | 41 ± 20 (ns) |
| <i>Hippocampus</i> | | |
| Total | 44 ± 5** | 152 ± 30** |
| CA1 field | 43 ± 7* | 174 ± 36** |
| CA2 field | 41 ± 5 ** | 200 ± 35** |
| CA3 field | 47 ± 3** | 157 ± 26** |
| Dentate gyrus | 61 ± 5*** | 110 ± 34* |

| | | |
|--------------------------------------|--------------|-------------|
| <i>Hypothalamus</i> | 59 ± 5** | 107 ± 9*** |
| <i>Thalamus</i> | 56 ± 4** | 96 ± 13*** |
| <i>Midbrain</i> | | |
| Central gray and related regions | 57 ± 10 (ns) | 128 ± 36* |
| Superior and inferior colliculus | 57 ± 9* | 130 ± 42* |
| Dorsal raphe nucleus | 62 ± 9 (ns) | 122 ± 39* |
| Substantia nigra | n.d. | 112 ± 15*** |
| Ventral tegmental area | n.d. | 66 ± 21* |
| <i>Hindbrain</i> | | |
| <i>Inferior cerebellar peduncles</i> | 71 ± 2*** | n.d. |
| <i>Inferior olive</i> | 76 ± 6** | n.d. |
| <i>Interpeduncular nucleus</i> | n.d. | 137 ± 38* |
| <i>Marginal geniculate nucleus</i> | n.d. | 135 ± 32** |
| <i>Mediovestibular nucleus</i> | 65 ± 9*** | n.d. |
| <i>Pyramidal tract</i> | 62 ± 8** | n.d. |
| <i>Spinal trigeminal nucleus</i> | 63 ± 5*** | n.d. |
| <i>Subiculum</i> | n.d. | 127 ± 24** |

| <i>Cortical regions</i> | | |
|--------------------------------------|-------------|--------------|
| <i>Cingulate cortex</i> | 65 ± 10** | 57 ± 19 (ns) |
| <i>Frontal cortex</i> | 62 ± 9** | 51 ± 17 (ns) |
| <i>Temporal and parietal cortex</i> | 69 ± 9** | 138 ± 23*** |
| <i>Entorhinal cortex</i> | 59 ± 6** | 168 ± 16*** |
| <i>Perihinal and piriform cortex</i> | 63 ± 11** | 231 ± 19*** |
| <i>Occipital cortex</i> | 61 ± 5* | 198 ± 57* |
| | | |
| <i>Cerebellum</i> | 46 ± 9 (ns) | 55 ± 26 (ns) |

Fig. 1. Coronal sections of the rat brain representative of the four main regions analyzed in the present study. Pictures on the left were taken from the Atlas of Paxinos and Watson (1998).

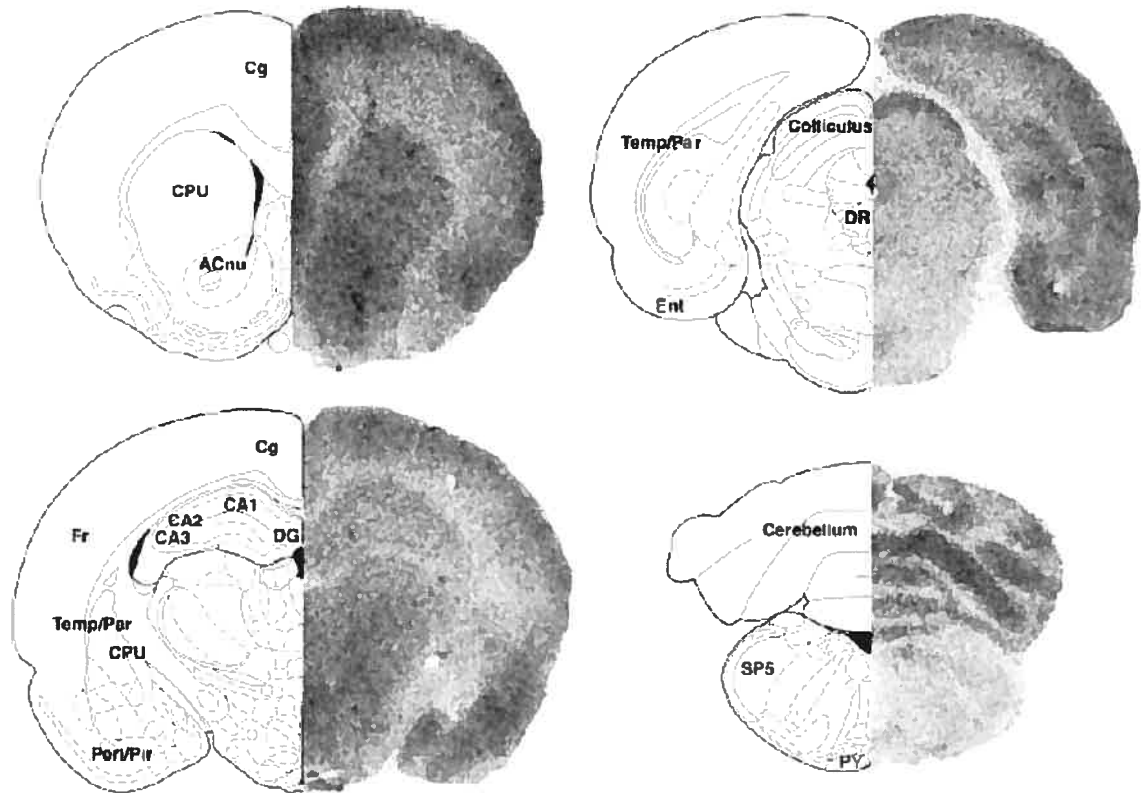


Figure 2. Autoradiographic localization of brain kinin B₂ receptors.

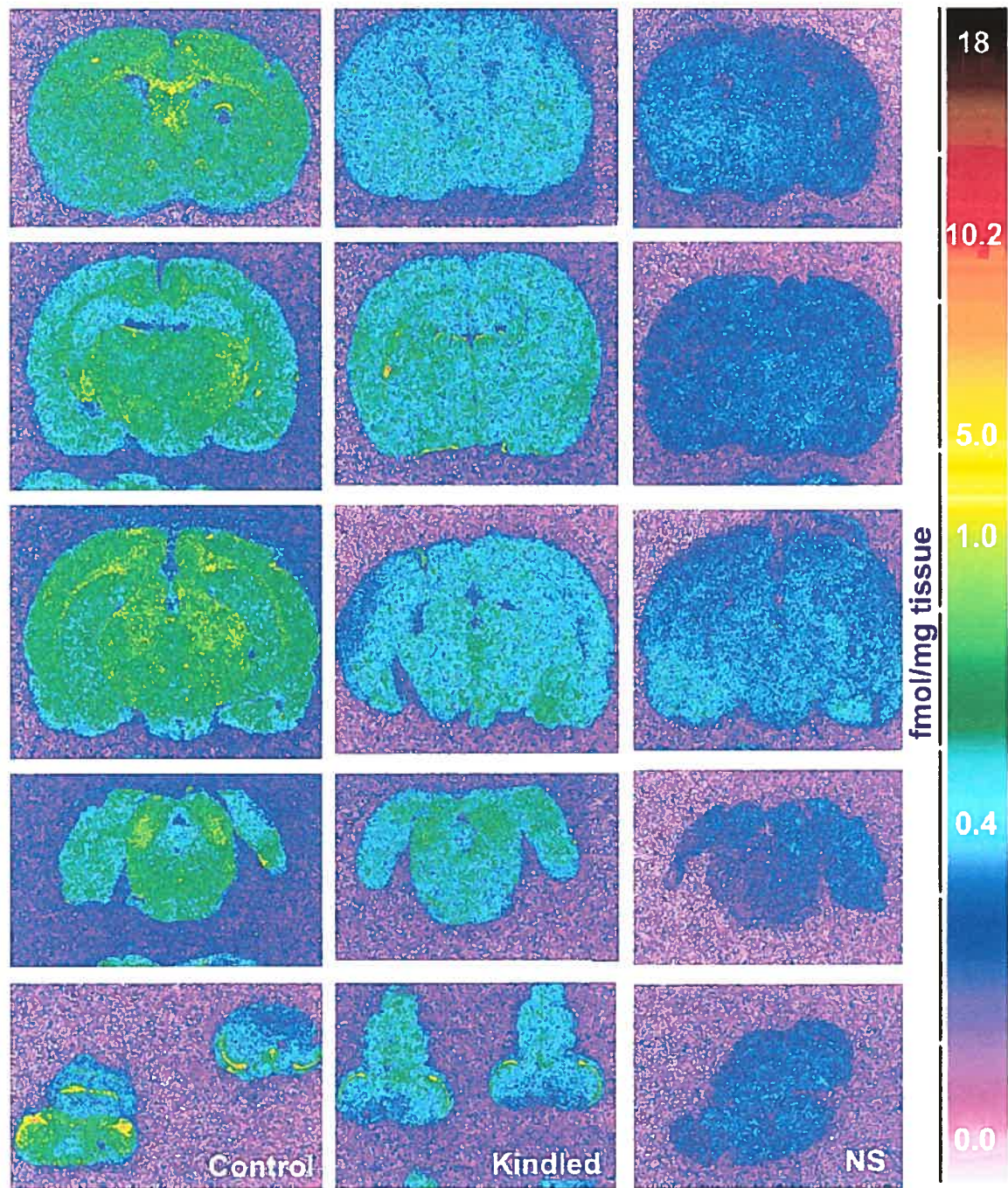


Fig. 3. Autoradiographic localization of brain kinin B₁ receptors.

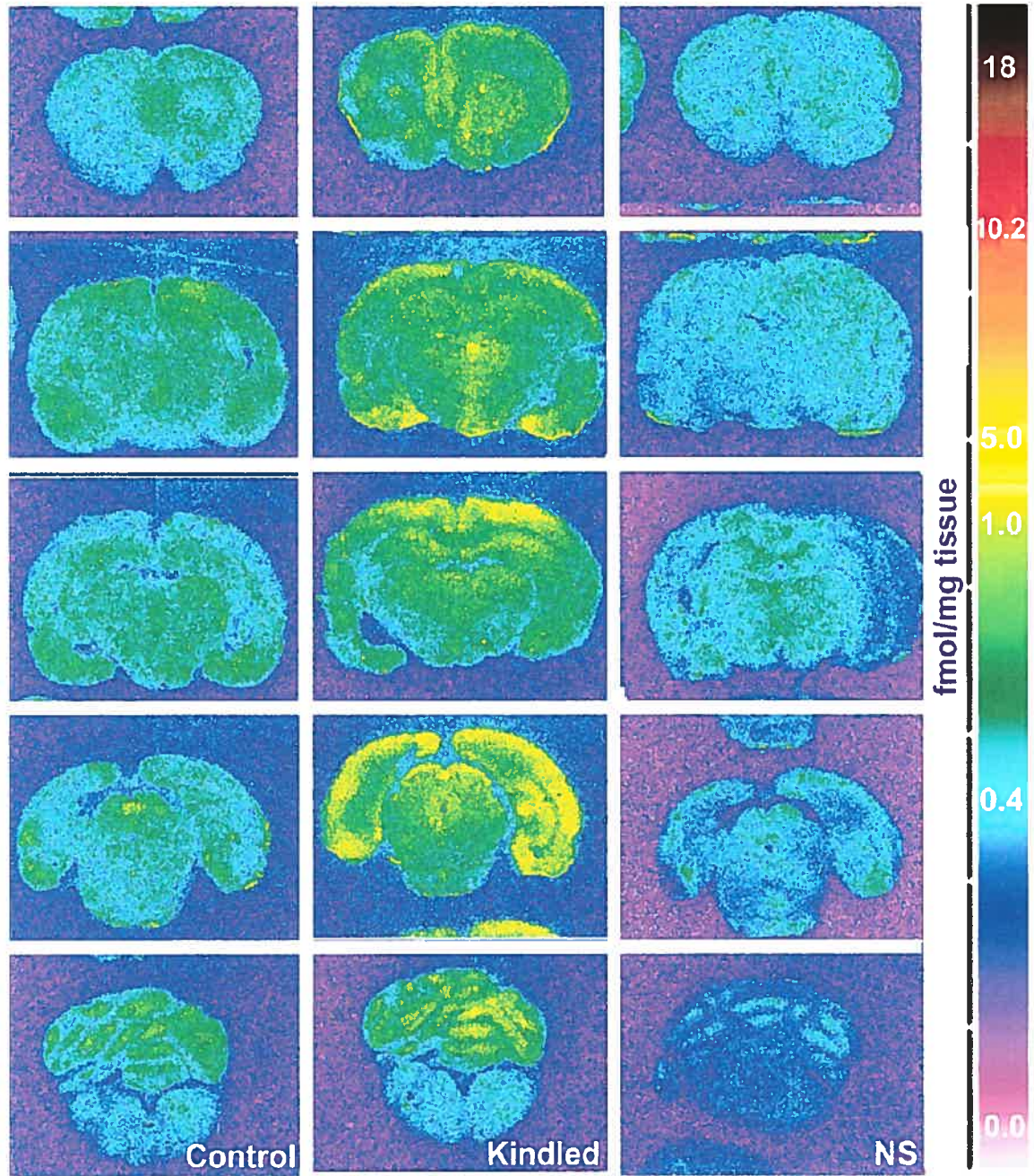


Fig. 4. Specific binding sites for B₂ (upper panel) and B₁ (lower panel) kinin receptors in the forebrain of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.

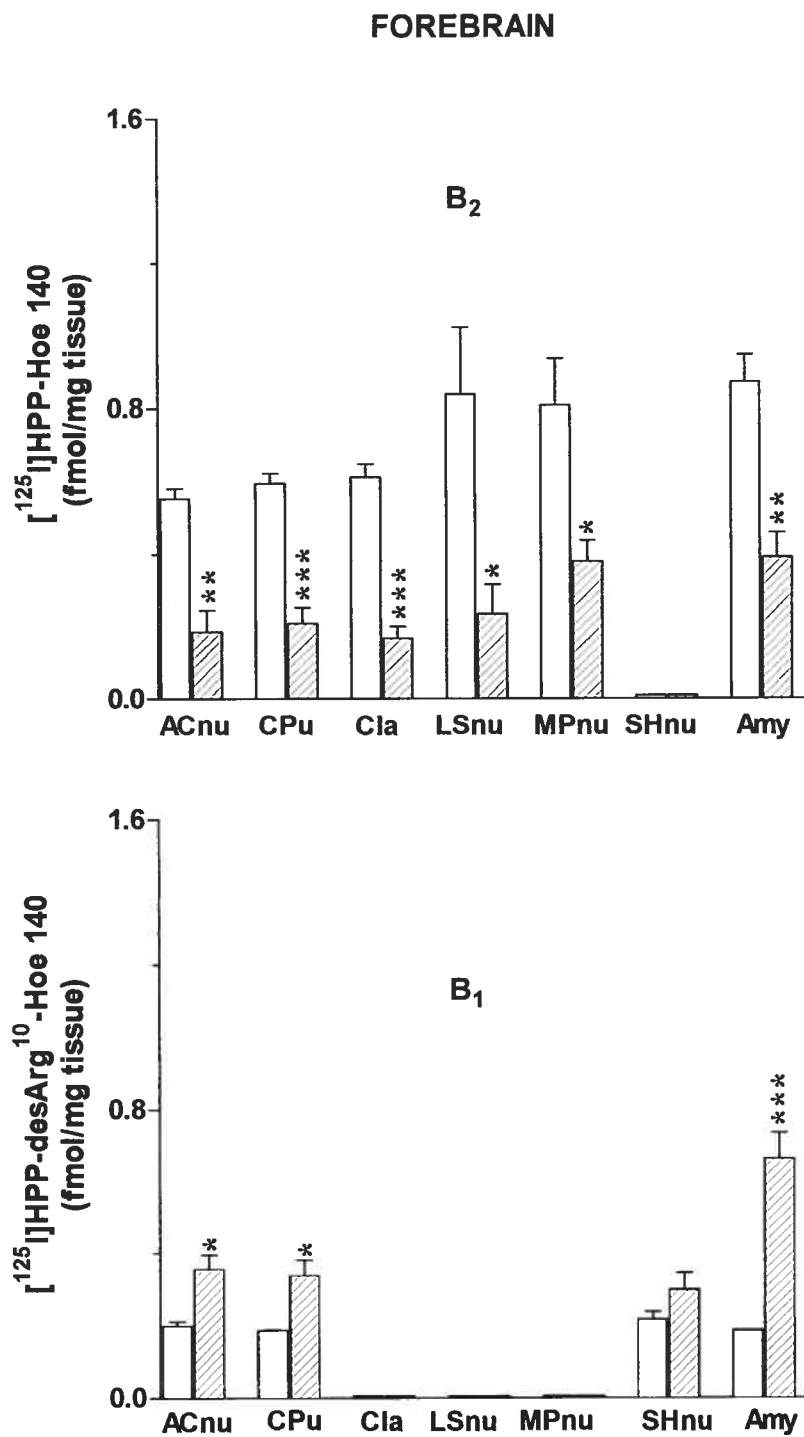


Fig. 5. Specific binding sites for B₂ (upper panel) and B₁ (lower panel) kinin receptors in the midbrain of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.

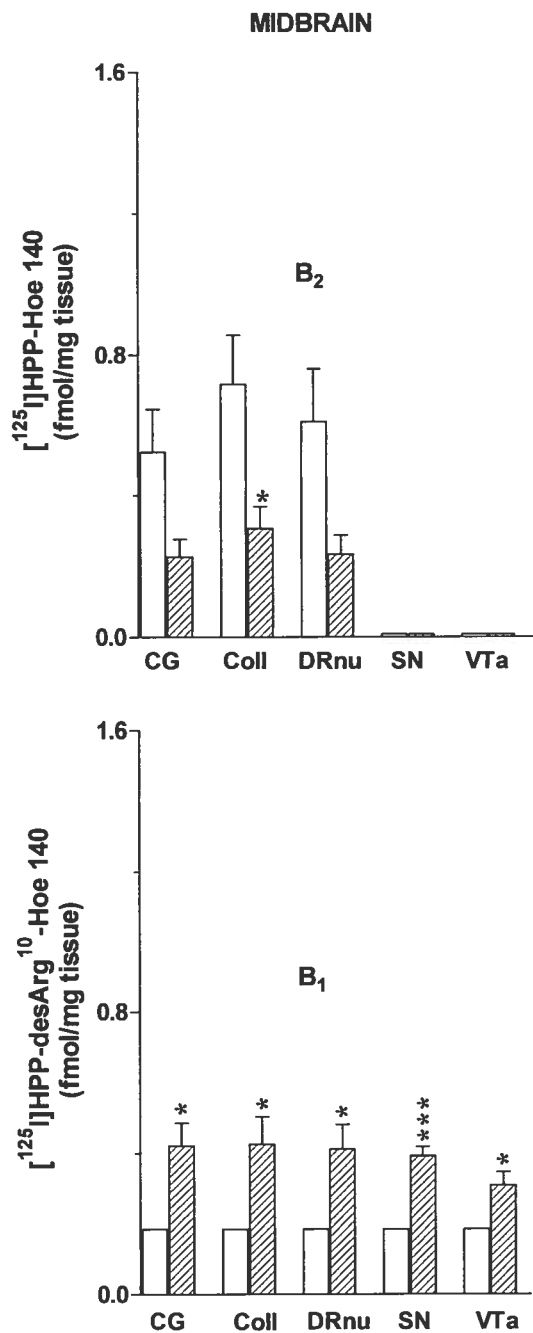


Fig. 6. Specific binding sites for B₂ (upper panel) and B₁ (lower panel) kinin receptors in the hippocampus of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.

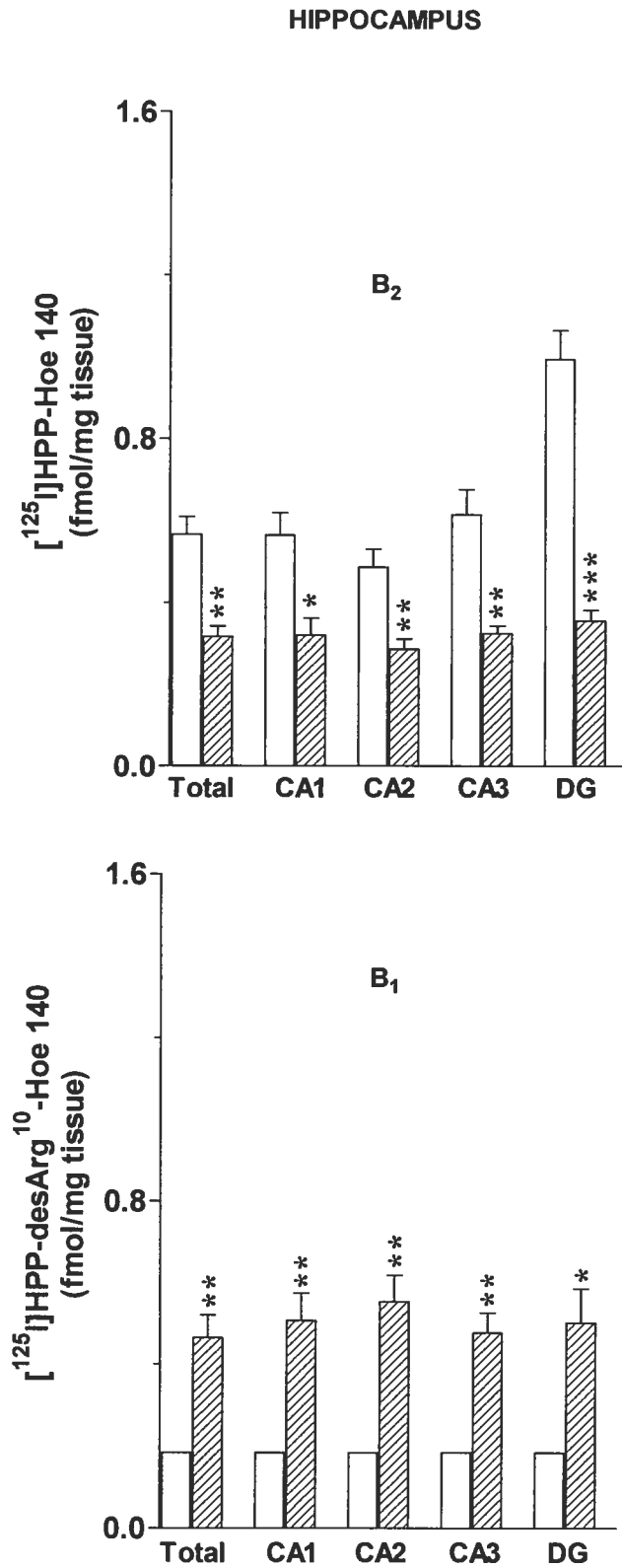


Fig. 7. Specific binding sites for B₂ (upper panel) and B₁ (lower panel) kinin receptors in hypothalamus, thalamus, and cerebellum of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.

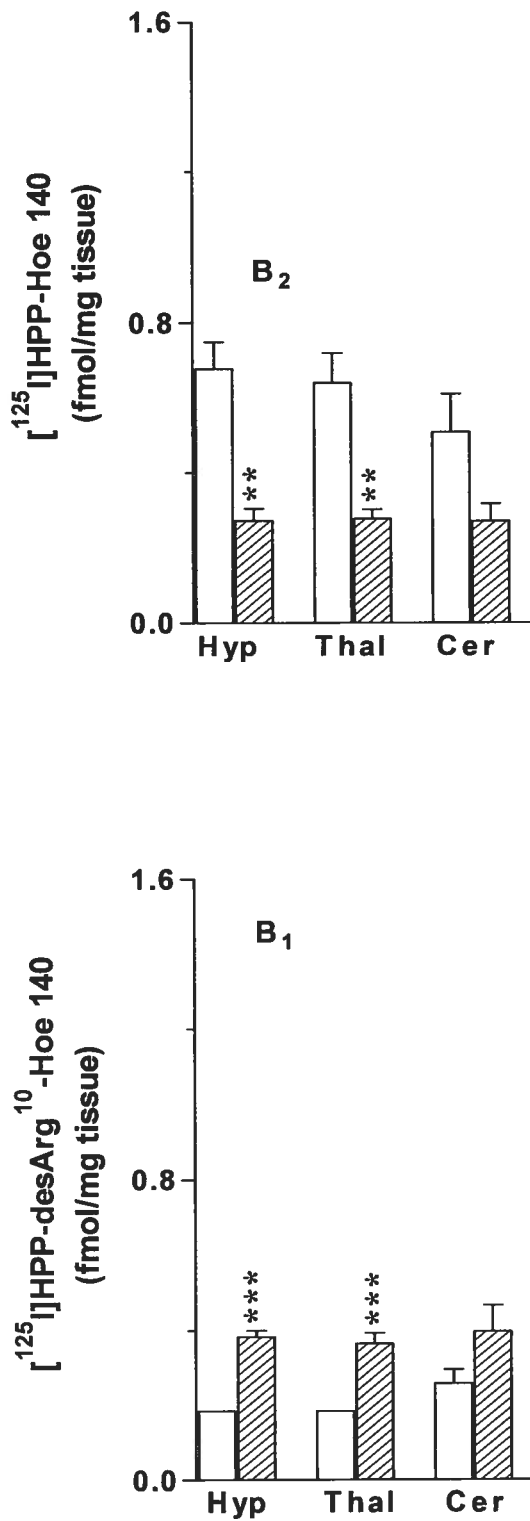


Fig. 8. Specific binding sites for B₂ (upper panel) and B₁ (lower panel) kinin receptors in the hindbrain of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.

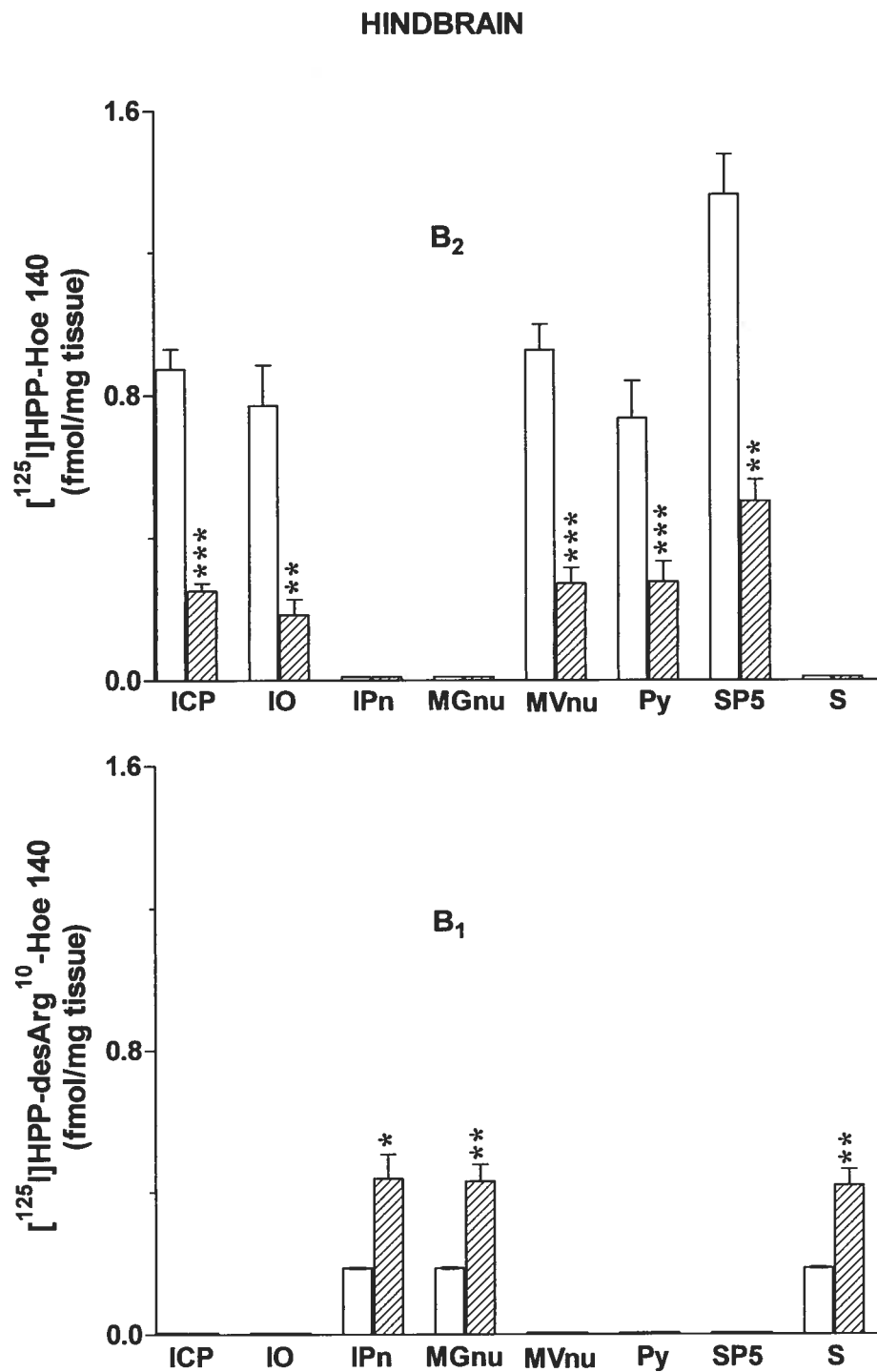


Fig. 9. Specific binding sites for B₂ (upper panel) and B₁ (lower panel) kinin receptors in the cortex of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.

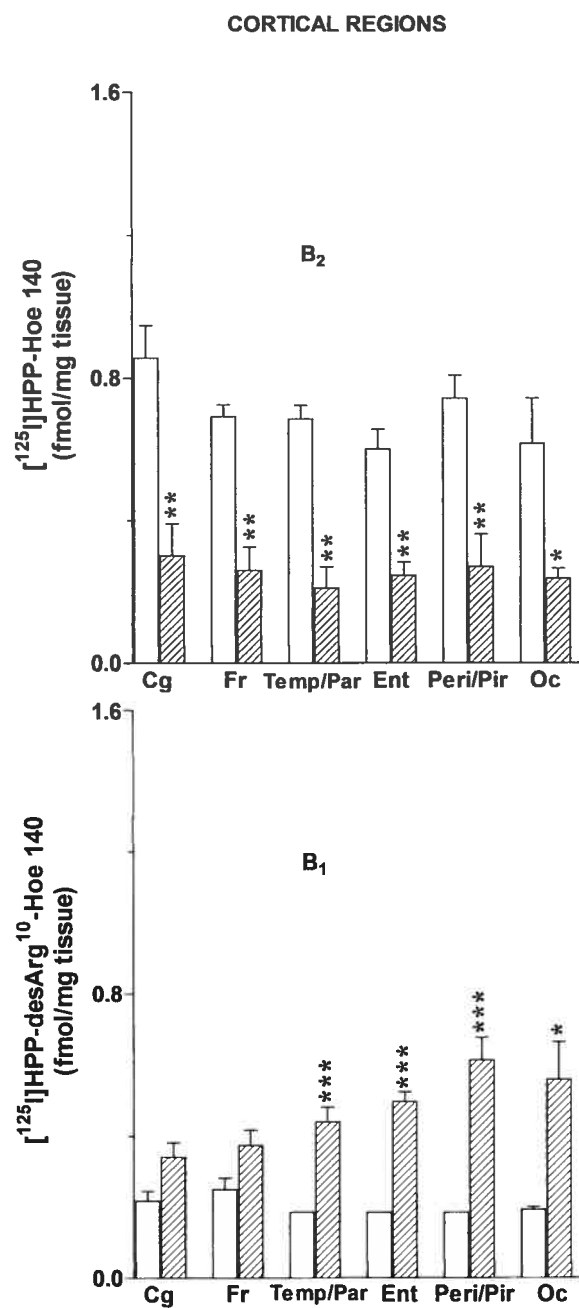
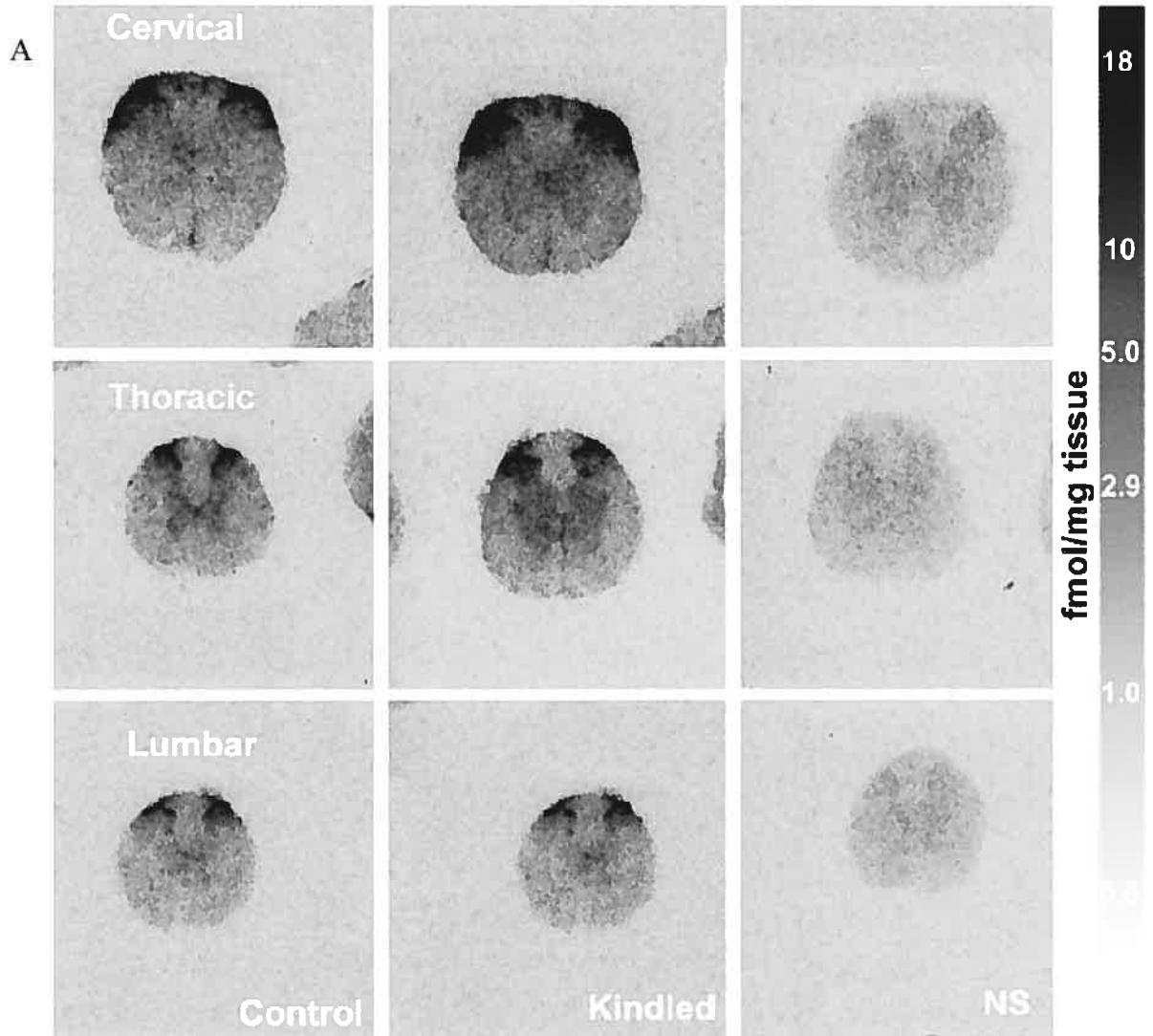
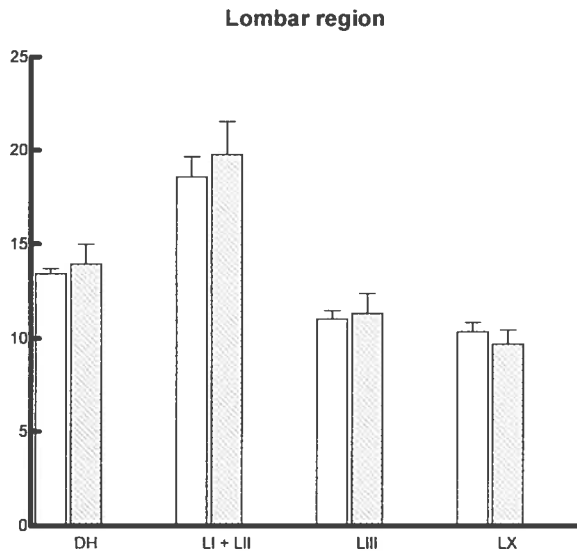
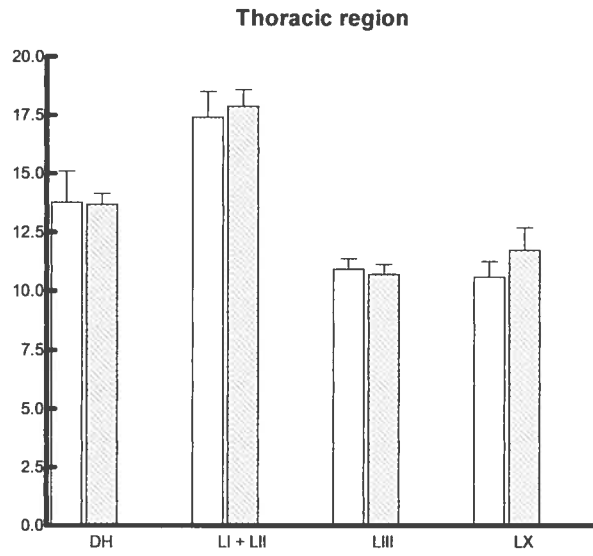
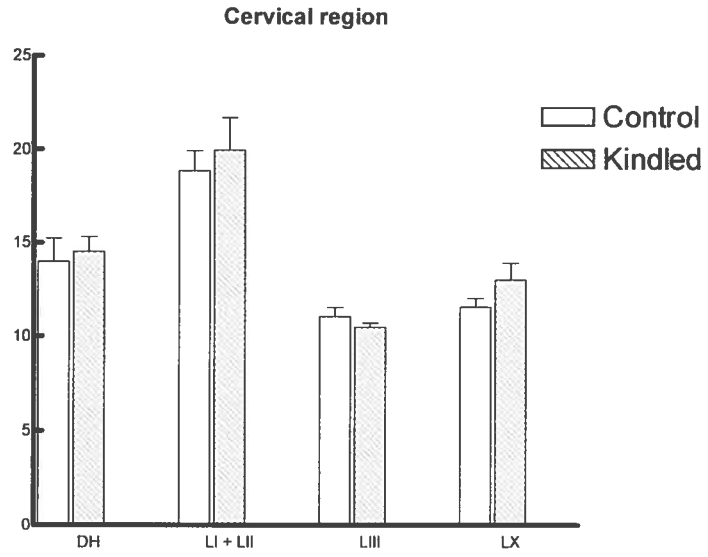


Fig. 10. Autoradiographic localization (A) and quantification of specific binding sites (B) for B₂ kinin receptors in the spinal cord of control (open columns) and kindled (hatched columns) rats.



B



**TROISIÈME CHAPITRE: L'HYPERTENSION
ARTÉRIELLE**

Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord

¹Brice Ongali, ¹Hudson de Sousa Buck, ¹Frank Cloutier, ²Francine Legault, ³Domenico Regoli, ²Chantal Lambert, ⁴Gaétan Thibault, and ¹Réjean Couture

Departments of ¹Physiology, ²Pharmacology, and ⁴Clinical Research Institute, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7; Department of ³Pharmacology, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4

*** Address for correspondence:**

Réjean Couture, PhD.
Université de Montréal
Pavillon Paul-G.-Desmarais
2960, Chemin de la Tour
Montréal, Québec, Canada
H3T 1J4
Tel.: 1-514-343-7060
Fax: 1-514-343-2111



Key word: bradykinin; B₁ receptor; B₂ receptor; hypertension

ABSTRACT

With the use of *in vitro* receptor autoradiography, this study aims at determining whether the higher level of kinin B₂ receptor density in the spinal cord of the spontaneously hypertensive rat (SHR) is secondary to arterial hypertension and whether chronic treatment with angiotensin I-converting enzyme inhibitors (ACEI) can regulate neuronal B₁ and B₂ receptors. SHR received, from the age of 4 wk, one of the two ACEI (lisinopril or zofenopril, 10 mg.kg⁻¹.day⁻¹) or for comparison, the selective AT1 antagonist (losartan, 20 mg.kg⁻¹.day⁻¹) in their drinking water for a period of 4, 12, and 20 wk. Age matched untreated SHR and Wistar-Kyoto rats (WKY) were used as controls. B₂ receptor binding sites in most laminae were higher in SHR than in WKY from the age of 8 to 24 wk. Whereas B₁ receptor binding sites were significantly present in young SHR and WKY, they were barely detectable in adult rats. ACEI (16 and 24 wk) and AT1 antagonist (24 wk) enhanced the number of B₂ without changing B₁ receptor binding sites. However, at 8 wk the three treatments significantly increased B₁ and decreased B₂ receptors in lamina I. It is concluded that 1) the higher density of B₂ receptors in the spinal cord of SHR is not due to hypertension, 2) kinin receptors are regulated differently by ACEI in neuronal and vascular tissues, and 3) aging may have a profound impact on levels of B₁ and B₂ receptors in the rat spinal cord.

INTRODUCTION

Kinin-related peptides referring mainly to bradykinin (BK) and kallidin (Lys-BK) were identified as neuromediators in the central control of arterial blood pressure and nociceptive information (7, 8). Kinins act on two transmembrane G protein-coupled receptors denoted as B₁ and B₂ receptors (38, 39). The widely distributed B₂ receptor is constitutive and mediates most of the biological effects of kinins. Whereas the B₁ receptor is absent or underexpressed under physiological conditions, this receptor is induced and upregulated during tissue injury or in the presence of cytokines (27). The induction of B₁ receptor by cytokines involves the transcriptional nuclear factor κ B and the mitogen-activated protein kinase (35, 40, 46). Kinins are metabolized by a group of carboxypeptidases named kininases I and II. Kininase I removes the COOH-terminal arginine from the parent molecules to yield the active metabolites des-Arg⁹-BK and des-Arg¹⁰-kallidine, which act as potent B₁ receptor agonists (39). Kininase II, also known as angiotensin I-converting enzyme (ACE), is responsible for the inactivation of kinins and the generation of angiotensin II (14). Breakdown inhibition of vasoactive kinins is believed to contribute to the therapeutic effects of ACE inhibitors (ACEI) in the treatment of hypertension and other cardiovascular diseases (21, 22). A recent study also reported an upregulation of B₁ receptors at both mRNA and functional levels in vascular and renal tissues from normotensive rats and mice under chronic treatment with ramipril, an ACEI (29). Recent work suggests a putative role for central kinin receptors in arterial hypertension. For instance, the increased number and expression of B₂ receptors have been shown in the cardiovascular centers of the human medulla from hypertensive donors (12) and in the hypothalamus and cardiovascular medullary nuclei of spontaneously hypertensive rats (SHR) (8, 36). Higher density of B₂ receptor binding sites in the thoracic spinal cord, an important center of autonomic control of blood pressure, was correlated with a greater cardiovascular response to intrathecal injection of BK in 16-wk-old SHR (6). However, there is no evidence so far that the

upregulation of B₂ receptors in the spinal cord and brain of SHR is causal or secondary to arterial hypertension. Therefore, the aims of this study were to determine whether 1) the higher density of spinal B₂ receptors in SHR is secondary to arterial hypertension or is related to a genetic feature of the strain, and 2) ACEI can regulate the expression of B₁ receptors in the thoracic spinal cord of SHR as observed in peripheral vascular and renal tissues. These issues were addressed by measuring the effects of three antihypertensive agents, including two unrelated classes of ACEI [lisinopril without sulfhydryl (SH) group and zofenopril with SH group] and one antagonist of angiotensin AT₁ receptor (losartan), which is commonly used in the treatment of human hypertension (17), on the density of B₁ and B₂ receptor binding sites in the thoracic spinal cord (T₉–T₁₀) of SHR by *in vitro* autoradiography. The effects of ACEI and losartan on kinin receptor densities were evaluated in young SHR at the onset of hypertension (8 wk old, after 4 wk of treatment) and in adult SHR during the established phase of hypertension (16 and 24 wk old, after 12 and 20 wk of treatment). Data were compared with age-matched untreated SHR and normotensive Wistar-Kyoto rats (WKY), which also allowed the determination of the effect of aging on the level of receptor binding sites.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Chemicals and materials.

HPP-desArg10-HOE 140 (3–4 hydroxyphenyl-propionyl-desArg⁹-D-Arg[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸]-BK) and HPP-HOE 140 (3–4 hydroxyphenyl-propionyl-DArg[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸]-BK) were developed from the selective B₁ receptor antagonist desArg10-HOE 140 (44) and the B₂ receptor antagonist HOE 140 or Icatibant (18), respectively. They were synthesized in the laboratory of D. Regoli (Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke). Autoradiographic ¹²⁵I-labeled microscales (20 μm) and ³H Hyperfilm (single-coated, 24 × 30 cm) were purchased from Amersham Pharmacia Biotech Canada. Losartan (Cozaar tablet), lisinopril, PIPES, 1,10-phenanthroline, dithiothreitol, bacitracin, captopril, and BSA (protease free) were purchased from Sigma-Aldrich Canada, and zofenopril was a gift from Menarini Ricerche Sireneze in Italy.

Peptide iodination.

Iodination of HPP-desArg10-HOE 140 and HPP-HOE 140 was performed according to the chloramines T method (19). Briefly, 5 μg of peptide were incubated in 0.05 M phosphate buffer for 30 s in the presence of 0.5 mCi (18.5 MBq) of ¹²⁵I-Na and 220 nmol of chloramine T in a total volume of 85 μl. The monoiodinated peptide was then immediately purified by high pressure liquid chromatography on a C4 Vydac column (0.4x250 mm) (The Separations Group, Hesperia, CA) with 0.1% trifluoroacetic acid and acetonitrile as mobile phases. The specific activity of the iodinated peptides corresponds to 2,000 counts.min⁻¹ . fmol⁻¹ or 1,212 Ci/mmol.

Animal source and care. Male SHR (*n* = 48) and WKY (*n*=12) were purchased from Charles River (St-Constant, Québec, Canada). They were individually housed in wire-bottom cages, in rooms under controlled temperature (23°C), humidity (50%), and lighting (12:12-h light-dark cycle)

with food (Charles River Rodent) and tap water available ad libitum. All animal procedures were in strict compliance with the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal Care and approved by the Animal Care Committee of our University.

Treatments of SHR.

SHR received from the age of 4 wk, one of the two ACEI, lisinopril or zofenopril ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$), or the selective AT1 receptor antagonist, losartan ($20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$), in their drinking water for a period of 4, 12, and 20 wk. To ascertain that the animals took the expected dose of the drug, the daily water intake and body weight were taken into account and adjusted accordingly. Control age-matched SHR and WKY had no treatment during the same periods. Equiactive oral dose of zofenopril and lisinopril was selected, based on an earlier study using ex vivo inhibition of tissue ACE in SHR (9). The dose of losartan selected was found to be effective in chronic studies in SHR (16, 42, 43). Before euthanasia, mean arterial blood pressure (MAP) was measured in awake animals at the age of 8, 16, and 24 wk with a catheter implanted 24 h earlier into the abdominal aorta through the femoral artery and exteriorized at the back of the neck. The latter surgery was made under anesthesia with pentobarbital sodium ($65 \text{ mg}/\text{kg}$ ip). Body weight of animals was measured daily from the onset of treatments.

Tissue preparation for autoradiography.

Rats were euthanized at the age of 8, 16, and 24 wk by asphyxia by respiratory CO₂ inhalation and subjected to dorsal laminectomy. Spinal cords (segments T8–T11) were immediately removed after careful incision of the dura mater and frozen in 2-methylbutane cooled at -45 to -55°C with liquid nitrogen and then stored at -80°C until use. Matched spinal

cord segments (T9 to T10) of the four rats from the same experimental group were mounted together in a gelatin block and serially cut into 20 μ m thick coronal sections with a cryostat fixed at temperatures varied between -11 and -13°C. Thus each section of the cryostat was from four spinal cords. A total of eight sections per slide were then alternatively thawmounted on 0.2% gelatin-0.033% chromium potassium sulfate-coated slides. Three slides were taken for the total binding and two slides (adjacent sections) for the non-specific binding. A total of 50 slides (1,600 sections) were obtained for each group studied and kept at -80°C until use.

In vitro receptor autoradiography.

Sections were thawed, preincubated for 30 s in 25 mM PIPES buffer (pH 7.4; 4°C), and incubated at room temperature for 90 min in the same buffer containing 1 mM 1,10-phenanthroline, 1 mM dithiothreitol, 0.014% bacitracin, 0.1 mM captopril, 0.2% BSA (protease free), and 7.5 mM magnesium chloride in the presence of 150 pM ¹²⁵I-HPP-desArg10-HOE 140 ([¹²⁵I]HPP-desArg10-HOE 140) (for B₁ receptor) or 200 pM ¹²⁵I-HPP-HOE 140 ([¹²⁵I]HPP-HOE 140) (for B₂ receptor). The concentrations of radioligands chosen yielded maximal specific binding (B_{max}) on the saturation curves in the spinal dorsal horn of SHR and WKY (6). The dissociation constant (K_d) of [¹²⁵I]HPP-HOE 140 was identical in SHR and WKY (K_d = 30 pM), whereas that of [¹²⁵I]HPP-desArg10-HOE 140 was calculated at 27 pM in SHR. The non-specific binding was determined in the presence of 1 μ M of unlabeled ligands (HPP-desArg10-HOE 140 for B₁ receptor and HPP-HOE 140 for B₂ receptor). To ascertain the specificity of the labeled B₂ radioligand, the same concentration of unlabeled B₁ ligand was added to the solution. Likewise, the same concentration of the unlabeled B₂ ligand was added to the labeled B₁ ligand solution. At the end of the incubation period, slides were transferred sequentially through four rinses of 4 min each in 25 mM PIPES (pH 7.4; 4°C), dipped for 15 s in distilled water (4°C) to remove the

excess of salts, and then air-dried. ^3H Hyperfilm was juxtaposed onto the slides in the presence of ^{125}I microscales and exposed at room temperature for 3 days (B_1 ligand) or 2 days (B_2 ligand). The films were developed in D-19 (Kodak developer) and fixed in Kodak Ektaflo. Autoradiograms were quantified by densitometry using an image analysis system (MCID Imaging Research; Ontario, Canada). Standard curve from ^{125}I microscales was used to convert density levels into femtomoles per milligram of tissue. Specific binding was determined by subtracting superimposed digitalized images of non-specific labeling from total binding. The anatomic structures with the corresponding nomenclature are depicted in Fig. 1 and adapted from the Atlas of Paxinos and Watson (33).

Statistical analysis of data.

Results represent the means \pm SE of four animals per group. Quantification was performed on 400 sections for each spinal cord (T9–T10) on both sides. Statistical analysis of data was performed with the Graph-Pad Prism computer program, and the statistical significance between SHR and WKY was determined with a Student's *t*-test for unpaired samples. For multiple comparisons to the same control group (untreated SHR), a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the test of Dunnett was employed. A one-way ANOVA in conjunction with Bonferroni confidence intervals was used for multiple comparisons between WKY and SHR. Only *P* values < 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Body weight and blood pressure.

Body weight and baseline MAP in SHR and WKY are shown in Fig. 2. At the onset of the treatment (4 wk) and at 24 wk, no statistical difference was found in body weight between

SHR and WKY in all groups. However, the body weight of SHR at 8 and 16 wk was significantly higher than in age-matched WKY. Chronic treatment with zofenopril and lisinopril (16 wk) prevented excessive body weight gain in SHR. At 8 wk, the difference in body weight between strains was no more significant with lisinopril. MAP was significantly augmented in SHR at 8, 16, and 24 wk compared with age-matched WKY. Whereas zofenopril and losartan prevented the development of hypertension from 8 to 24 wk in SHR, the reduction of MAP produced by lisinopril was greater and caused significant hypotension throughout the treatment.

B₁ receptor binding sites.

Representative distribution of B₁ receptor binding sites in the lower thoracic spinal cord of 8-, 16-, and 24-wk-old WKY and SHR is depicted in Fig. 3, and the corresponding quantitative values are shown in Fig. 4. Discrete distribution of [¹²⁵I]HPP-desArg10-HOE 140 labeling was detected in the dorsal horn lamina I of which its density was significantly higher at 8 wk in SHR (2 fmol/mg tissue) than in age-matched WKY (1.14 fmol/mg tissue). The other structures of the spinal cord gray matter of 8-wk-old SHR and WKY had lower specific densities of B₁ receptors (around 1.0 fmol/mg tissue) with no statistical difference between strains (Fig. 4). The addition of 1 μM of unlabeled HPP-desArg10-HOE 140 to the incubation medium completely eliminated the labeling in all laminae (Fig. 3). However, a background of very low specific labeling to B₁ receptor was found in all laminae (values ≤ 0.5 fmol/mg tissue) in 16- and 24-wk-old WKY and SHR (data not shown).

B₂ receptor binding sites.

The distribution of B₂ receptor binding sites and their relative densities in each

lamina of the spinal cord of 8-, 16-, and 24-wk-old WKY and SHR are shown in Figs. 5 and 6 and Table 1. The labeling of [125 I]HPP-HOE 140 was observed all over the structures of the gray matter, with discrete definition in the dorsal horn of all studied animals. The addition of 1 μ M of unlabeled HPP-HOE 140 to the incubation medium largely eliminated the total labeling. Densities of B₂ receptors were higher in the dorsal horn (lamina I - lamina II), and one- to eightfold greater in SHR. Also, values in lamina I were significantly higher at 16 wk than at 8 and 24 wk in SHR ($P < 0.01$), whereas values were lower at 8 wk ($P < 0.01$) and similar at 16 and 24 wk in WKY. The corresponding densities in lamina I were as follows: 3.35, 9.90, and 9.42 fmol/mg tissue for WKY and 20.14, 47.11 and 24.29 fmol/mg tissue for SHR at the age of 8, 16, and 24 wk, respectively. Although densities of specific binding sites were relatively low in most other laminae, most values were generally significantly higher in SHR than in age-matched WKY at 16 and 24 wk old (Table 1).

Effects of long-term treatment with antihypertensive

drugs. Effects of chronic treatments with ACEI (zofenopril or lisinopril) and a selective AT1 receptor antagonist (losartan) were assessed on the densities of both kinin receptors in the spinal cord of SHR. The density of B₁ receptors in lamina I was significantly increased after 4 wk of treatment with lisinopril (+16%, $P < 0.01$), losartan (+6%, $P < 0.01$), and zofenopril (+36%, $P < 0.01$), yet no significant changes were measured in the other laminae. In contrast, the density of B₂ receptors was markedly decreased in lamina I by the three treatments (-57% to -65%, $P < 0.01$) (Figs. 5 and 6). B₂ receptor binding values in other laminae (except lamina II) were too small to discriminate a real effect with the drugs, and therefore they were not considered for the remainder of the study.

Contrary to results obtained at 8 wk, a longer period of treatment (16- and 24-wk-old SHR) with either ACEI produced a marked increase of B₂ receptor binding sites in laminae I and II

of the spinal cord (Fig. 6). Whereas the reduction of B₂ receptor binding sites seen with losartan at 8 wk persisted at 16 wk in SHR, the latter treatment caused a significant increase of B₂ receptor binding sites in laminae I and II at 24 wk (Fig.6). The latter augmentation of B₂ receptor binding sites was similar to that occurring with ACEI. However, at 16 and 24 wk, ACEI and losartan had no significant effect on B₁ receptor binding sites, which remained barely detectable in the spinal cord of SHR (data not shown).

DISCUSSION

The main findings of this study are 1) the greater density of B₂ receptor binding sites in the thoracic spinal cord of SHR is unlikely secondary to arterial hypertension because it subsisted in SHR subjected to antihypertensive therapy with ACEI or losartan; 2) aging has an opposite effect on the level of B₁ and B₂ receptors densities in the spinal cord because adult SHR displayed greater density of B₂ but scarce density of B₁ receptor binding sites compared with young SHR, which displayed the highest density of B₁ and the lowest density of B₂ receptor binding sites; 3) ACEI enhanced the density of spinal B₁ receptor binding sites as in vascular and renal organs, yet this occurred only after 4 wk of treatment in young SHR and not in adult SHR exposed to a longer period of antihypertensive therapy; 4) ACEI has an opposite influence on B₁ and B₂ receptors because B₂ receptor binding sites were decreased after 4 wk of treatment in young SHR

and increased after a longer period (8 and 16 wk) of antihypertensive therapy in adult SHR; and 5) the effect of ACEI on the expression of B₂ receptors is not shared by losartan after 12 wk of treatment (16 wk old SHR), and therefore a dissociation could be established between the changes of receptors and the antihypertensive effect of ACEI.

Distribution and density of B₁ receptors in the thoracic spinal cord of SHR and WKY.

Aging had a profound influence on the density of [125 I]HPP-desArg¹⁰-HOE 140 binding to B₁ receptors in the spinal cord of WKY and SHR as it was present at 8 wk (SHR >> WKY) and severely decreased in both strains at the age of 16 and 24 wk. Notwithstanding, this limited life span of B₁ receptors, a low but detectable density of specific binding sites persisted in all laminae in both strains, suggesting the presence of a basal expression of B₁ receptors in the spinal cord of adult SHR and WKY. This finding is in agreement with the basal B₁ receptor expression (mRNA) and its immunohistochemical detection in rat and human spinal cord dorsal horn (26, 45). The significance of the higher level of B₁ receptor expression in young SHR (lamina I) and its decline in all laminae in adult is not understood at the present time, yet the present finding is congruent with an earlier study that concluded that B₁ receptors are not involved in spinal cardiovascular regulation in adult SHR and WKY (6). Because B₁ receptors are detectable only in young SHR, it is unlikely that they are responsible for the maintenance of high blood pressure in adult SHR.

Distribution and density of B₂ receptors in the thoracic spinal cord of SHR and WKY.

The distribution of [125 I]HPP-HOE 140 binding sites in the spinal cord of WKY and SHR is in agreement with previous observations made in the rat, guinea pig, and sheep spinal cord with [125 I-Tyr⁸]BK or [125 I]HPP-HOE 140 as the radioligand (24, 25, 31). The highest density of specific binding sites was found in superficial layers of the dorsal horn, whereas moderate to lower specific B₂ receptor binding sites were detected in other laminae with no evidence of labeling in the white matter. However, contrary to the Wistar rat, which displayed the highest density of 125 I[Tyr⁸]BK binding in lamina II (substantia gelatinosa) (24), the highest level of binding with [125 I]HPPHOE 140 was located in lamina I in both SHR and WKY.

This discrepancy is likely due to the strain difference and not to the radioligand because the use of ^{125}I -HPP-HOE 140 confirms the highest concentration of B_2 receptor binding sites in lamina II in the Wistar rat (data not shown). This strain difference remains unknown at this time but may indicate a differential expression of B_2 receptors on A- and C-fiber primary sensory neurons. B_2 receptors are predominantly located on terminals of capsaicin-sensitive primary sensory C-fibers and of bulbospinal noradrenergic neurons in the spinal dorsal horn of Wistar rats (24). Activation of these receptors on sensory and noradrenergic terminals led to nociceptive and antinociceptive responses, respectively, in the rat tail-flick test (7, 20). A small population of B_2 receptors is also present in deeper laminae, including the intermediomedial and intermediolateral cell columns, the location of cell bodies, and dendrites of preganglionic sympathetic fibers, which are involved in the autonomic control of blood pressure (8). Thus our data suggest that B_2 receptors are extensively distributed throughout sensory and autonomic areas in the spinal cord of WKY and SHR, where they may be implicated in the modulation of nociceptive information and in the spinal control of blood pressure (8).

Effect of ACEI and AT1 receptor antagonist on spinalkinin receptors.

Apart from their distinctive pharmacokinetic and pharmacodynamic features, the therapeutic benefits of ACEI in the treatment of hypertension are thought to be class effects (41). Two major groups of ACEI have been documented: those containing a SH group as captopril and zofenopril and those without a SH group represented by lisinopril (4). Lisinopril and zofenopril can pass the blood-brain barrier to produce significant inhibition of brain ACE activity after oral administration in SHR (9, 37). However, in our study, while zofenopril normalized blood pressure and lisinopril caused hypotension, both ACEI produced similar changes in the density of B_1 and B_2 receptors in the spinal cord of SHR, suggesting that these changes are not associated with or without the presence of SH group of ACEI.

Pharmacodynamic differences between zofenopril and lisinopril may however explain their distinct antihypertensive profile. Lisinopril was also more effective than zofenopril in reducing the body weight of overweight SHR. Because losartan was less effective in reducing body weight increase in SHR, the antiobesity effect of ACEI cannot be entirely ascribed to inhibition of the hypertrophic feature of angiotensin II. Thus a role for endogenous kinins cannot be excluded in this additional beneficial effect of ACEI on body weight. In addition, pretreatment for 4 wk with ACEI or losartan, which prevented the development of hypertension in SHR, caused a further increase of B₁ receptors in lamina I yet a decrease of B₂ receptors. Upregulation of B₂ receptors occurred only after a longer treatment with ACEI (16 and 24 wk) or losartan (24wk). These changes of B₁ and B₂ receptor densities in SHR are unlikely attributable to the antihypertensive effect of the treatment, because the prevention of hypertension with losartan did not reproduce ACEI-induced B₂ receptor upregulation at 16 wk. Although both ACEI and losartan reduced the number of B₂ receptors in SHR after 4 wk of treatment (8 wk old), the levels of B₂ receptors were still significantly higher in the dorsal horn of SHR compared with age-matched WKY. This evidence suggests that the higher densities of B₂ receptor binding sites in most laminae in SHR are related to a genetic feature of the strain and not to hypertension.

Whereas it is uncertain whether the greater number of B₂ receptors found in the spinal cord of SHR, particularly between the age of 8 and 16 wk, contributes to the pathogenesis of hypertension, the higher density of B₂ receptor binding sites was ascribed as the likely mechanism to explain the hypersensitivity of the pressor response to BK injected in the spinal cord of awake SHR (6). Higher concentrations of kinins, kininogen, kallikrein, and kininase II (ACE) activity were also reported in the cerebrospinal fluid of adult SHR compared with their normotensive controls, suggesting a hyperactive kallikrein-kinin system in the brain and spinal cord of SHR (for a review, see Ref. 8). Because the activation of B₂ receptors in the spinal cord

leads to increases of blood pressure through the stimulation of the sympathoadrenal system and the peripheral release of catecholamines (23), increased sensitivity to the pressor action of BK along with increased number of receptors and endogenous ligands may contribute to the higher sympathetic tone generally reported in different models of hypertension, including SHR (10, 11). This hypothesis remains to be challenged with a prolonged infusion of the entire spinal cord with specific kinin receptor antagonists because acute blockade of B₁ and B₂ receptors at the T-9 spinal cord level in SHR was insufficient to alter baseline blood pressure (6). It is also possible that kinins act chiefly as neuromodulators and not as primary mediators of spinal autonomic functions (8).

Reciprocal regulation of B₁ and B₂ receptors during aging and antihypertensive therapy. Interestingly, the downregulation of B₁ receptors from 8 to 24 wk was accompanied by an upregulation of B₂ receptors, suggesting an age-dependent regulation of kinin receptors in WKY and SHR. Moreover, the upregulation of B₁ receptors induced by the two ACEI and losartan at 8 wk was accompanied by a downregulation of B₂ receptors, suggesting again that these receptors are regulated in an opposite way by ACEI and losartan in SHR. This is in keeping with the phenomenon described previously where complete desensitization of B₂ receptors in inflammatory models or its deletion in B₂ receptor gene knockout mice led to overexpression of B₁ receptors (5, 13, 29). Conflicting data have been reported regarding the regulation of kinin receptors by ACEI. An early pharmacological study has reported an upregulation of B₁ receptors in the rabbit vascular system both in vivo and in vitro following acute treatment (18 h) with ACEI (32). More recently, acute inhibition of ACE (48 h) failed to upregulate the B₁ receptor (mRNA expression and function) in vascular and nonvascular peripheral organs of rabbits (28). However, a 6-wk treatment with ramipril is associated with functional induction of vascular and renal B₁ receptor in normotensive rats,

wild-type and B₂ receptor gene knockout mice (29). Our results at 8 wk support an upregulation of B₁ receptors after 4 wk of treatment with ACEI, although a longer period of treatment (12 and 20 wk) had no effect. It is therefore apparent that this phenomenon occurs within a specific time window, and different conclusions can be drawn depending on the duration of the treatment. It is also noteworthy that contrary to B₁ receptors, vascular and renal B₂ receptor mRNA was not affected by ACEI in rats (29), suggesting that kinin receptor expression is regulated differently in peripheral and central nervous tissues.

Possible mechanisms underlying the effects of ACEI and losartan on kinin receptors

The mechanism of downregulation and upregulation of neuronal B₂ receptors and upregulation of B₁ receptors by ACEI is still unknown. We can exclude that the radioligand binds to ACE or to other proteins as captopril was present throughout the autoradiographic procedure in all experimental groups and B₂ receptor binding sites seen with the same radioligand in the spinal cord of wild-type mice were gone in B₂ receptor gene knockout mice (8). Although ACEI do not act directly on B₂ receptors (14), they can interfere with the sequestration and internalization of B₂ receptors within the cellular membrane in native porcine aortic endothelial cells (3) and in Chinese hamster ovary cells (30). An interaction with the process of B₂ receptor dimerization, which is directly involved in the endogenous and recycling of receptors, may represent another putative mechanism by which ACEI could affect B₂ receptor binding (2). Also, the formation of stable heterodimers between B₂ and AT₁ receptors, which change the endocytotic pathway of both receptors and enhance G protein activation (1), may provide a possible mechanism by which losartan can affect the expression of B₂ receptors in our paradigm. On the other hand, the B₁ receptor is not subjected to internalization and resensitization; therefore, its regulation is more likely to occur at the transcriptional and mRNA levels (15, 46). Because B₂ and B₁ receptors are largely

synthesized outside the spinal cord in dorsal root ganglia (24, 34, 45), one cannot exclude the possibility that the site of regulation of kinin receptors by ACEI and losartan is at the level of the cell body of primary sensory fibers.

AKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge G. Lapalme (Clinical Research Institute of Montréal) for technical assistance in the iodination of ligands and Dr. Jean-Guy Chabot (Department of Psychiatry, Douglas Hospital Research Center, McGill University) for conceding the use of the Image Analysis System (MCID, Imaging Research, Ontario, Canada).

This project was supported by Grant-In-Aid Canadian Institutes of Health Research MOP-14379. B. Ongali holds a Studentship from the Republic of Gabon, and H. S. Buck was the recipient of a Postdoctoral Fellowship from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (São Paulo, Brazil).

REFERENCES

1. **AbdAlla S, Lothar H, and Quitterer U.** AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* 407: 94–98, 2000.
2. **AbdAlla S, Zaki E, Lothar H, and Quitterer U.** Involvement of the amino terminus of the B2 receptor in agonist-induced receptor dimerization. *J Biol Chem* 274: 26079–26084, 1999.
3. **Benzing T, Fleming I, Blaukat A, Müller-Esterl W, and Busse R.** Angiotensin-converting enzyme inhibitor ramiprilat interferes with the sequestration of the B2 kinin receptor within the plasma membrane of native endothelial cells. *Circulation* 99: 2034–2040, 1999.
4. **Buikema H, Monnick SHJ, Tio RA, Crijns HJGM, de Zeeuw D, and van Gilst WH.** Comparison of zofenopril and lisinopril to study the role of the sulfhydryl-group in improvement of endothelial dysfunction with ACE-inhibitors in experimental heart failure. *Br J Pharmacol* 130: 1999–2007, 2000.
5. **Campos MM and Calixto JB.** Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *Br J Pharmacol* 114: 1005–1013, 1995.
6. **Cloutier F, De Sousa Buck H, Ongali B, and Couture R.** Pharmacologic and autoradiographic evidence for an up-regulation of kinin B2 receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 135: 1641–1654, 2002.
7. **Couture R, Harrisson M, Vianna RM, and Cloutier F.** Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 429: 161–176, 2001.
8. **Couture R and Lindsey CJ.** Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neural pathways and physiological functions. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Peptide Receptors*, edited by Quirion R, Björklund A, and Hökfelt, T. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, 2000, part 1, vol. 16, p. 241–300.

9. **Cushman DW, Wang FL, Fung WC, Grover GJ, Harvey CM, Scalese RJ, Mitch SL, and DeForrest JM.** Comparisons in vitro, ex vivo, and in vivo of the actions of seven structurally diverse inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE). *Br J Clin Pharmacol* 28: 115S–131S, 1989.
10. **De Champlain J.** Participation du système nerveux autonome dans l'hypertension artérielle. *Médecine Sciences* 14, *Suppl* 2: 10–22, 1998.
11. **De Champlain J.** Pre- and postsynaptic adrenergic dysfunctions in hypertension. *J Hypertens* 8, *Suppl* 7: S77–S85, 1990.
12. **De Sousa Buck H, Ongali B, Thibault G, Lindsey CJ, and Couture R.** Autoradiographic detection of kinin receptors in the human medulla of control, hypertensive, and diabetic donors. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 249–257, 2002.
13. **Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, and Gavras H.** Vasoactive potential of the B1 bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circ Res* 88: 275–281, 2001.
14. **Erdős EG and Marcic BM.** Kinins, receptors, kininases and inhibitors—where did they lead us? *Biol Chem* 382: 43–47, 2001.
15. **Faussner A, Proud D, Towns M, and Bathon JM.** 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: 2617–2623, 1998.
16. **Fortuno MA, Ravassa S, Etayo JC, and Diez J.** Overexpression of Bax protein and enhanced apoptosis in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats: effects of AT1 blockade with losartan. *Hypertension* 32: 280–286, 1998.
17. **Hernandez-Hernandez R, Sosa-Canache B, Velasco M, Armas-Hernandez MJ, Armas-Padilla MC, and Cammarata R.** Angiotensin II receptor antagonists role in arterial hypertension. *J Hum Hypertens* 16: S93–S99, 2002.

18. Hock FJ, Wirth K, Albus U, Linz W, Gerhards HJ, Wiemer G, Henke St Breipohl G, König W, Knolle J, and Schölkens BA. HOE 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist:in vitro studies. *Br J Pharmacol* 102: 769–773, 1991.
19. Hunter WM and Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 194: 495–496, 1962.
20. Laneuville O, Reader TA, and Couture R. Intrathecal bradykinin acts presynaptically on spinal noradrenergic terminals to produce antinociception in the rat. *Eur J Pharmacol* 159: 273–283, 1989.
21. Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger Th, and Scholkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* 47: 25–49, 1995.
22. Linz W, Wohlfart P, Schölkens BA, Malinski T, and Wiemer G. Interactions among ACE, kinins and NO. *Cardiovasc Res* 43: 549–561, 1999.
23. Lopes P and Couture R. Cardiovascular responses elicited by intrathecal kinins in the conscious rat. *Eur J Pharmacol* 210: 137–147, 1992.
24. Lopes P, Kar S, Chrétien L, Regoli D, Quirion R, and Couture R. Quantitative autoradiographic localization of [¹²⁵I-Tyr8] bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience* 68: 867–881, 1995.
25. Lopes P, Kar S, Tousignant C, Regoli D, Quirion R, and Couture R. Autoradiographic localization of [¹²⁵I-Tyr8]-bradykinin receptor binding sites in the guinea pig spinal cord. *Synapse* 15: 48–57, 1993.
26. Ma QP and Heavens R. Basal expression of bradykinin B₁ receptor in the spinal cord in humans and rats. *Neuroreport* 12: 2311–2314, 2001.

27. **Marceau F, Hess JF, and Bachvarov DR.** The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50: 357–386, 1998.
28. **Marceau F, Larrivé JF, Bouthillier J, Bachvarova M, Houle S, and Bachvarov DR.** Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B1 and B2 receptor expression in the rabbit. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 277: R1568–R1578, 1999.
29. **Marin-Castaño ME, Schanstra JP, Neau E, Praddaude F, Pecher C, Ader JL, Girolami JP, and Bascands JL.** Induction of functional bradykinin B1-receptors in normotensive rats and mice under chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation* 105: 627–632, 2002.
30. **Minshall RD, Tan F, Nakamura F, Rabito SF, Becker RP, Marcic B, and Erdös EG.** Potentiation of the actions of bradykinin by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. The role of expressed human bradykinin B2 receptors and angiotensin-converting enzyme in CHO cells. *Circ Res* 81: 848–856, 1997.
31. **Murone C, Paxinos G, McKinley MJ, Oldfield BJ, Müller-Esterl W, Mendelsohn FAO, and Chai SY.** Distribution of bradykinin B2 receptors in sheep brain and spinal cord visualized by in vitro autoradiography. *J Comp Neurol* 381: 203–218, 1997.
32. **Nwator IA and Whalley ET.** Angiotensin converting enzyme inhibitors and expression of des-Arg⁹-BK (kinin B1) receptors in vivo. *Eur J Pharmacol* 160: 125–132, 1989.
33. **Paxinos G and Watson C.** *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (4th ed). San Diego, CA: Academic, 1998.
34. **Petersen M, Eckert AS, Segond von Banchet G, Heppelmann B, Klusch A, and Kniffki KD.** Plasticity in the expression of bradykinin binding sites in sensory neurons after mechanical nerve injury. *Neuroscience* 83: 949–959, 1998.

35. **Phagoo SB, Poole S, and Leeb-Lundberg LMF.** 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: 325–333, 1999.
36. **Qadri F, Hauser W, Johren O, and Dominiak P.** Kinin B1 and B2 receptor mRNA expression in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 258–263, 2002.
37. **Ranadive SA, Chen AX, and Serajuddin AT.** Relative lipophilicities and structural-pharmacological considerations of various angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. *Pharmacol Res* 9: 1480–1486, 1992.
38. **Regoli D and Barabé J.** Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 32: 1–46, 1980.
39. **Regoli D, Rizzi A, Perron SI, and Gobeil F.** Classification of kinin receptors. *Biol Chem* 382: 31–35, 2001.
40. **Schanstra JP, Bataille E, Marin-Castaño ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP, and Bascands JL.** The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription Factor NF-kappa B and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 101: 2080–2091, 1998.
41. **Sica DA.** Class effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Am J Manag Care* 6: S85–S108, 2000.
42. **Varo N, Etayo JC, Zalba G, Beaumont J, Iraburu MJ, Montiel C, Gil MJ, Monreal I, and Diez J.** Losartan inhibits the post-transcriptional synthesis of collagen type I and reverses left ventricular fibrosis in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 17: 107–114, 1999.
43. **Wagner J, Drab M, Bohlender J, Amann K, Wiene W, and Ganten D.** Effects of AT1 receptor blockade on blood pressure and the renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats of the stroke prone strain. *Clin Exp Hypertens* 20: 205–221, 1998.

44. **Wirth K, Breipohl G, Stechl J, Knolle J, Henke S, and Schölkens B.** DesArg⁹-D-Arg[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸]bradykinin (desArg¹⁰-[Hoe140]) is a potent bradykinin B1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 205: 217–218, 1991.
45. **Wotherspoon G and Winter J.** Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neurosci Lett* 294: 175–178, 2000.
46. **Zhou X, Prado GN, Taylor L, Yang X, and Polgar P.** Regulation of inducible bradykinin B1 receptor gene expression through absence of internalization and resensitization. *J Cell Biochem* 78: 351–362, 2000.

LEGENDS

Figure 1. Schematic representation of anatomic structures of a coronal section of lower thoracic spinal cord (*left*) along with the autoradiographic distribution of B₂ receptor binding sites in 8-wk-old spontaneously hypertensive rats (SHR) (*right*). I–X, number of spinal cord laminae; D, dorsal nucleus; DH (LI, LII, LIII), dorsal horn; IML, intermediolateral cell column; IMM, intermediomedial cell column; Py, pyramidal tract.

Figure 2. Body weight and mean arterial pressure (MAP) of SHR and Wistar-Kyoto rats (WKY) used in the study. Values represent the means \pm SE of 12 rats (4 wk) and 4 rats (8, 16, and 24 wk) per group. Statistical comparison to WKY (\dagger) or untreated SHR (*) is indicated by $*\dagger P < 0.05$, $**\dagger\dagger P < 0.01$, and $***\dagger\dagger\dagger P < 0.001$ (one-way ANOVA with a post hoc Bonferroni test).

Figure 3. Autoradiographic distribution of ¹²⁵IHPP-desArg10-HOE 140 binding sites in the thoracic spinal cord of 8-, 16-, and 24-wk-old WKY (W), SHR without treatment (S), and SHR treated with losartan (L), zofenopril (Z), or lisinopril (Li). Note the high level of specific B₁ receptor binding sites in the dorsal horn of both strains (SHR > WKY) at 8 wk only. Nonspecific binding (NS) in the presence of 1 μ M of HPP-desArg10-HOE 140 is also Shown

Figure 4. Quantification of specific B₁ receptor binding sites in the various laminae of the thoracic spinal cord of WKY and SHR at the age of 8 wk (4 wk of treatment). Values represent the means \pm SE of 4 rats per group. SE are too small to be illustrated. Statistical comparison to WKY (\dagger) or untreated SHR (*) is indicated by $**P < 0.01$ (one-way ANOVA with a post hoc Dunnett test) and $\dagger\dagger\dagger P < 0.001$ (Student's *t*-test).

Figure 5. Autoradiographic distribution of ^{125}I -HPP-HOE 140 binding sites in the thoracic spinal cord of 8-, 16-, and 24-wk-old WKY (W), SHR without treatment (S), and SHR treated with losartan (L), zofenopril (Z), or lisinopril (Li). Note the high level of specific B₂ receptor binding sites in the dorsal horn of both strains and the greater intensity of labeling in SHR. Nonspecific binding (NS) in the presence of 1 μM of HPP-HOE 140 is also shown.

Figure 6. Quantification of specific B₂ receptor binding sites in the superficial laminae (LI and LII) of the thoracic spinal cord of WKY and SHR at the age of 8, 16, and 24 wk (4, 12, 20 wk of treatment, respectively). Values represent the means \pm SE of 4 rats per group. SE are too small to be illustrated. Statistical comparison to WKY (†) or untreated SHR (*) is indicated by ** $P < 0.01$ (one-way ANOVA with a post hoc Dunnett test) and ††† $P < 0.001$ (Student's t -test).

Table 1. Densities of specific B₂ receptor binding sites in various thoracic spinal cord laminae in WKY and SHR. Values are means \pm SE (in fmol/mg tissue) of 4 rats in each group. WKY, Wistar-Kyoto rats; SHR, spontaneously hypertensive rats; I-X, number of spinal cord laminae; D, dorsal nucleus; DH (LI, LII, and LIII), dorsal horn; IML, intermediolateral cell column; IMM, intermediomedial cell column; Py, pyramidal tract. Statistical comparison to WKY (* $P < 0.05$; † $P < 0.001$) was calculated with a Student's t -test for unpaired samples

FIGURES & TABLE

Figure 1: Schematic representation of anatomic structures of a coronal section of lower thoracic spinal cord (*left*) along with the autoradiographic distribution of B₂ receptor binding sites in 8-wk-old spontaneously hypertensive rats (SHR) (*right*).

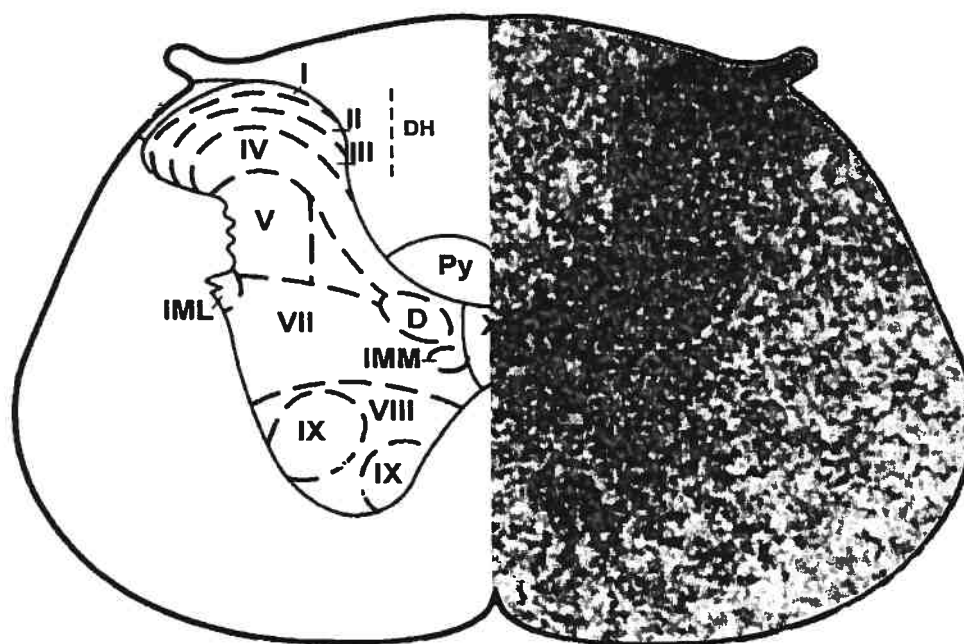


Figure 2: Body weight and mean arterial pressure (MAP) of SHR and Wistar-Kyoto rats (WKY) used in the study. Values represent the means \pm SE of 12 rats (4 wk) and 4 rats (8, 16, and 24 wk) per group.

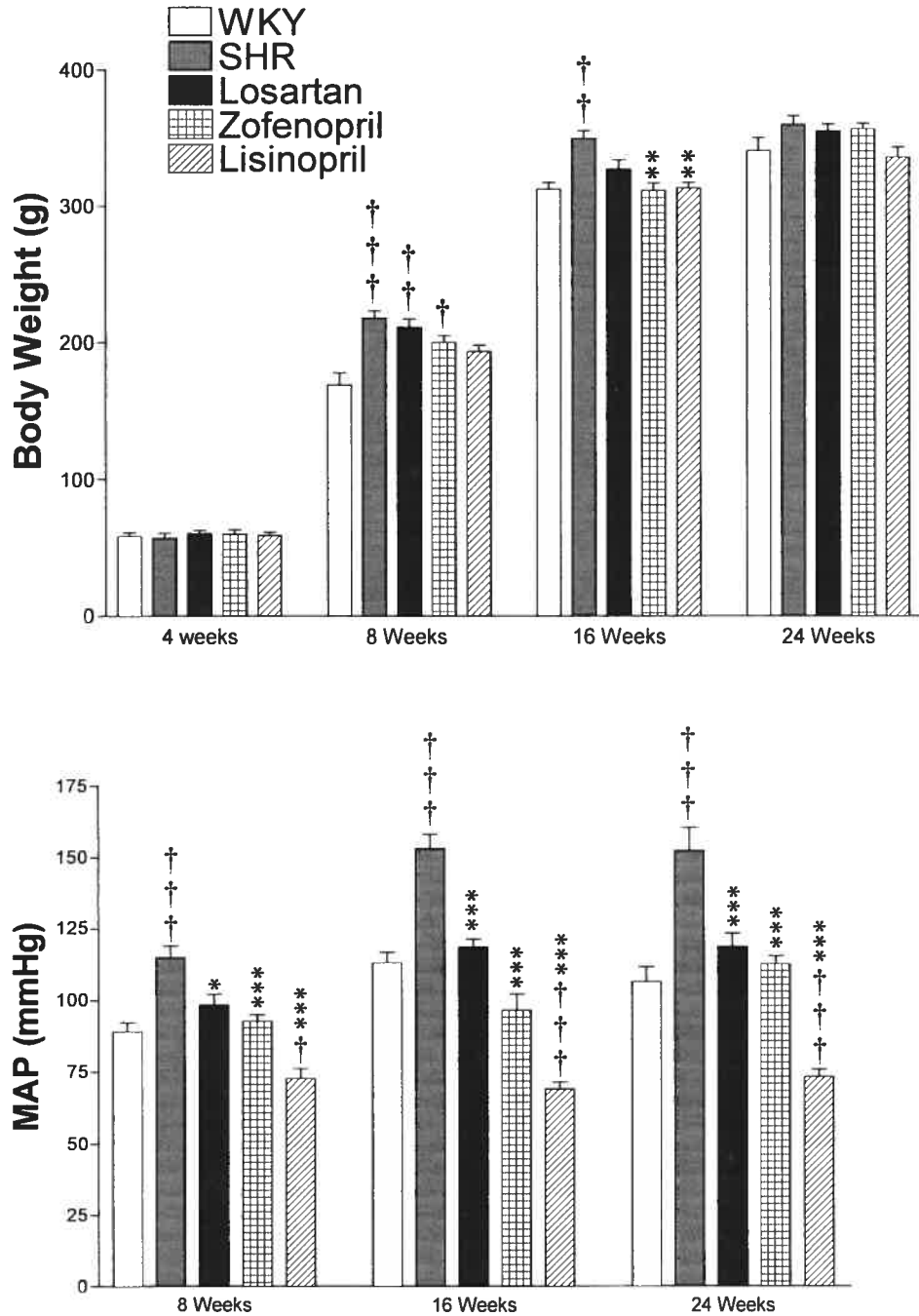


Figure 3: Autoradiographic distribution of ^{125}I -HPP-desArg10-HOE 140 binding sites in the thoracic spinal cord of 8-, 16-, and 24-wk-old WKY (W), SHR without treatment (S), and SHR treated with losartan (L), zofenopril (Z), or lisinopril (Li).

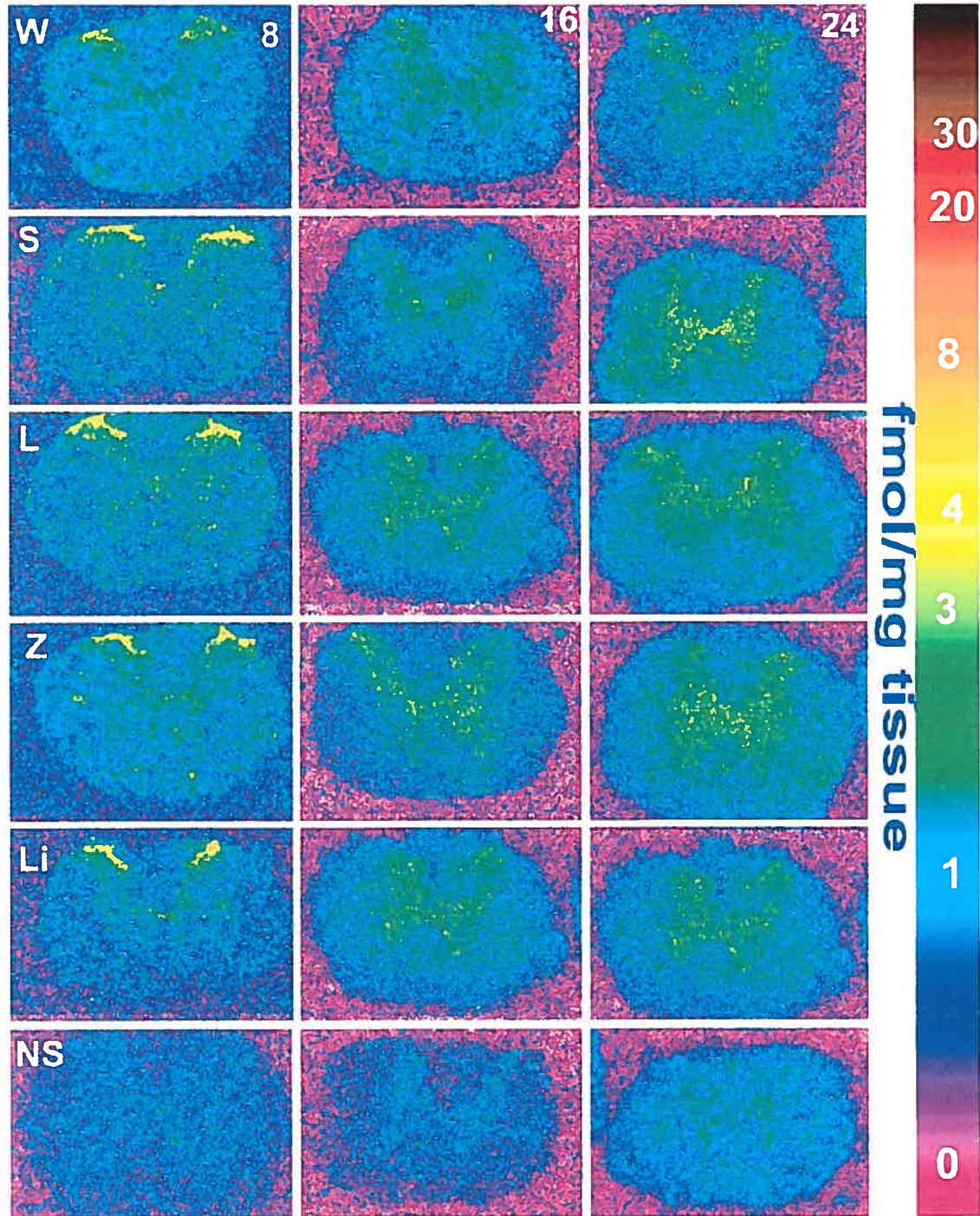


Figure 4: Quantification of specific B₁ receptor binding sites in the various laminae of the thoracic spinal cord of WKY and SHR at the age of 8 wk (4 wk of treatment).

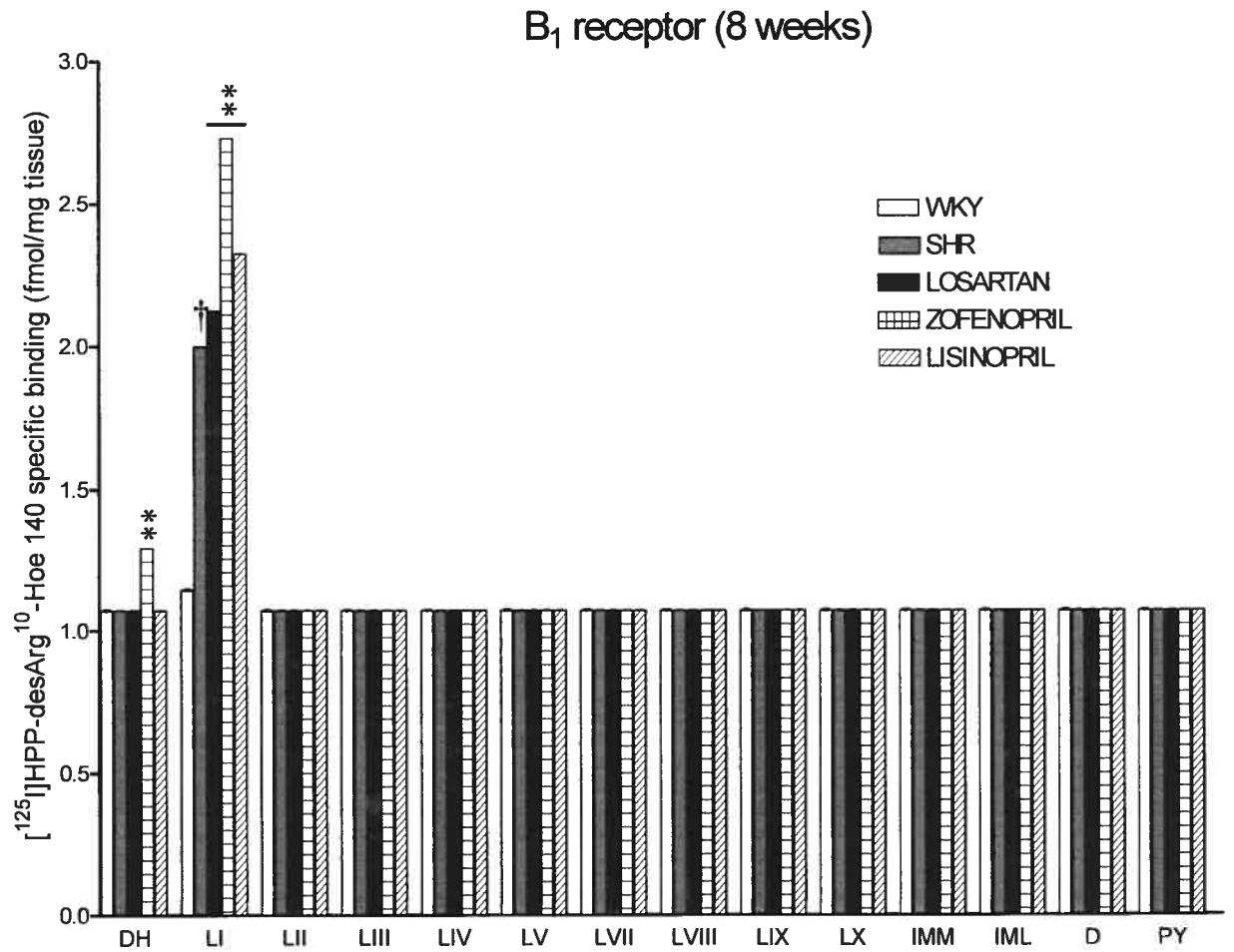


Figure 5: Autoradiographic distribution of ^{125}I -HPP-HOE 140 binding sites in the thoracic spinal cord of 8-, 16-, and 24-wk-old WKY (W), SHR without treatment (S), and SHR treated with losartan (L), zofenopril (Z), or lisinopril (Li).

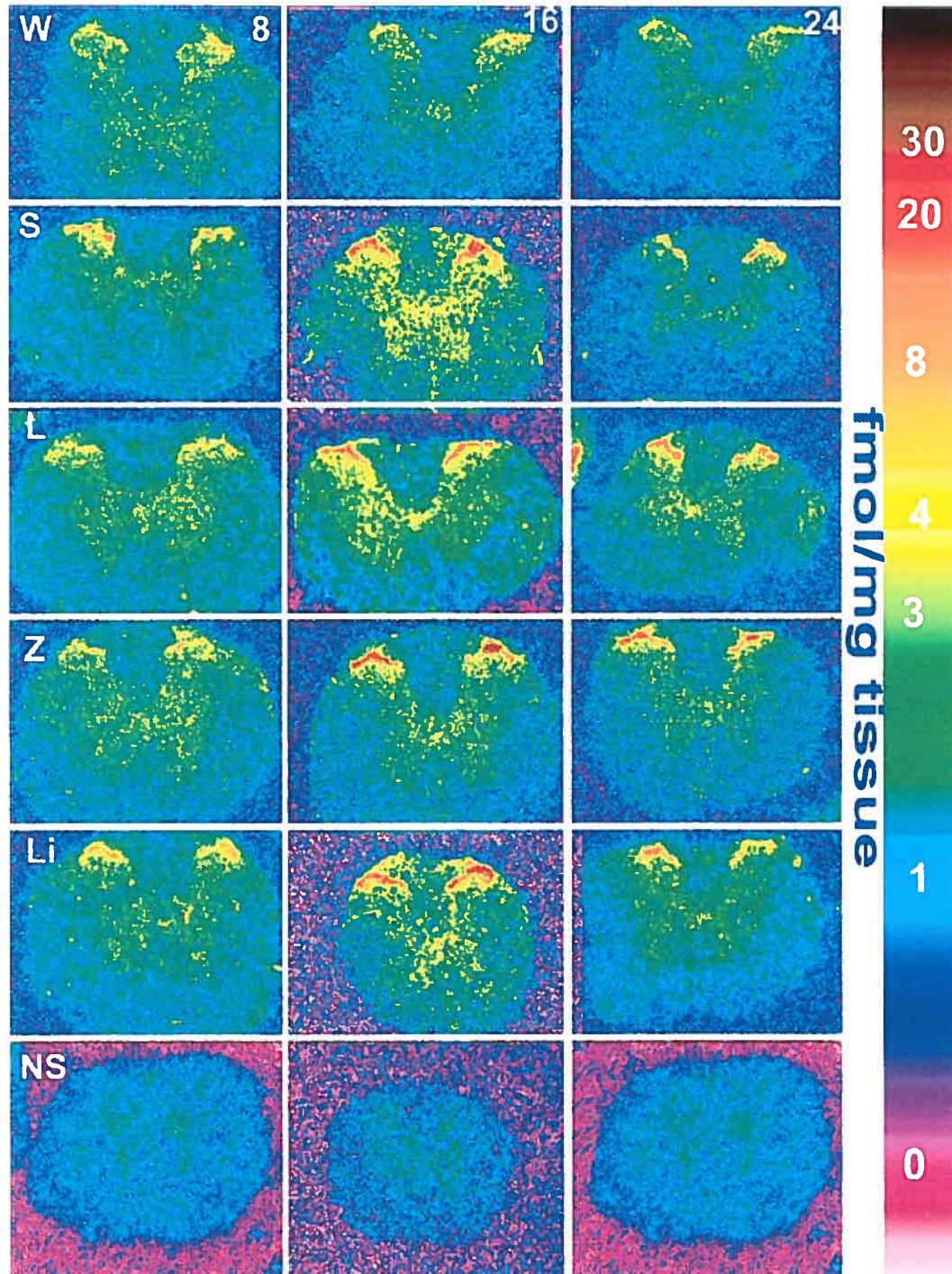


Figure 6: Quantification of specific B₂ receptor binding sites in the superficial laminae (LI and LII) of the thoracic spinal cord of WKY and SHR at the age of 8, 16, and 24 wk (4, 12, 20 wk of treatment, respectively).

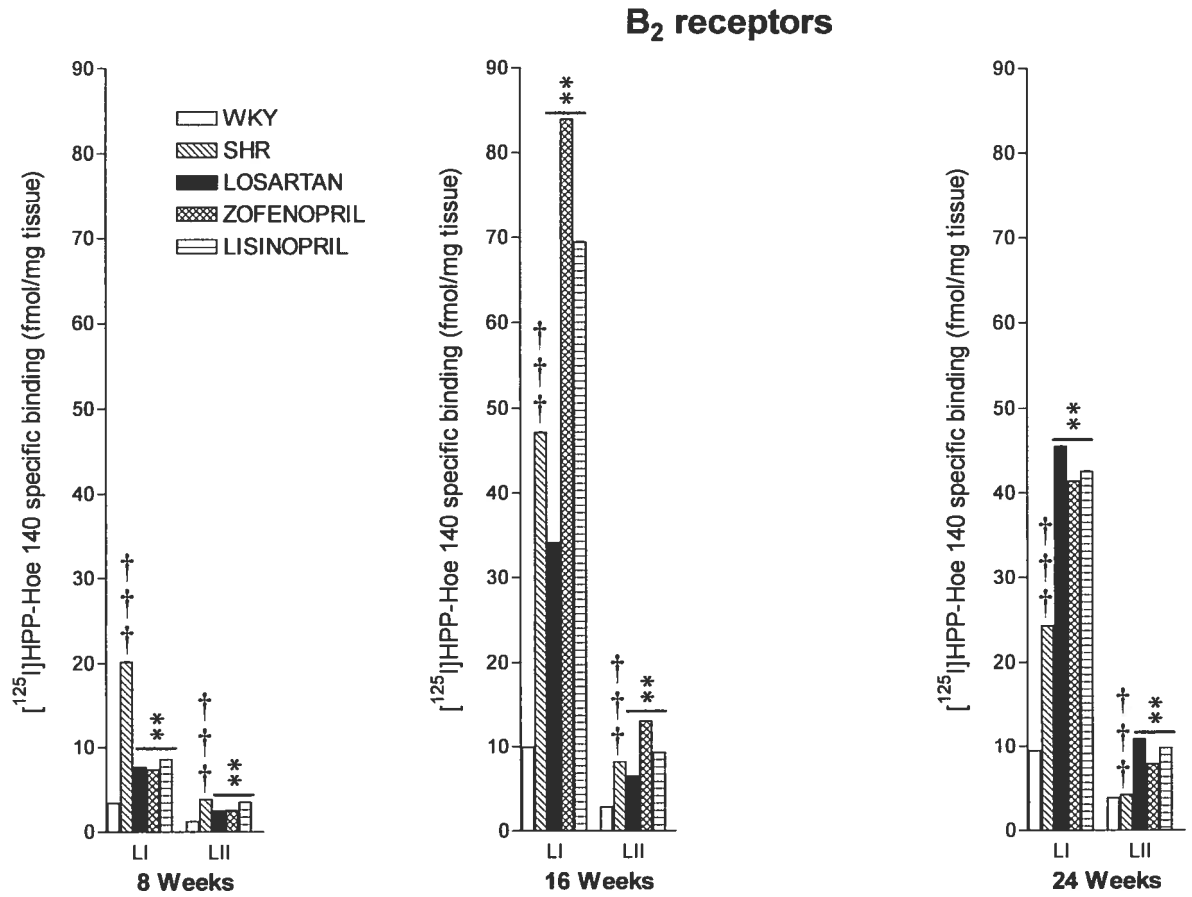


Table 1: Densities of specific B₂ receptor binding sites in various thoracic spinal cord laminae in WKY and SHR.

| | (8 weeks) | | (16 weeks) | | (24 weeks) | |
|-------|---------------|----------------|--------------|----------------|---------------|----------------|
| | WKY | SHR | WKY | SHR | WKY | SHR |
| LIV | 1.07 ± 0.007 | 1.46 ± 0.009 † | 1.33 ± 0.010 | 1.76 ± 0.001 † | 1.51 ± 0.001 | 1.02 ± 0.001 † |
| LV | 1.07 ± 0.006 | 1.07 ± 0.007 | 0.52 ± 0.008 | 0.87 ± 0.009 † | 0.48 ± 0.007 | 0.49 ± 0.007 |
| LVII | 1.07 ± 0.0006 | 1.07 ± 0.003 | 0.33 ± 0.008 | 0.80 ± 0.009 † | 0.42 ± 0.007 | 0.85 ± 0.009 † |
| LVIII | 1.07 ± 0.005 | 1.07 ± 0.006 | 0.56 ± 0.009 | 1.03 ± 0.010 † | 0.55 ± 0.008 | 0.86 ± 0.008 † |
| LIX | 1.07 ± 0.005 | 1.07 ± 0.007 | 0.92 ± 0.010 | 1.04 ± 0.009 † | 0.33 ± 0.007 | 0.94 ± 0.008 † |
| LX | 1.07 ± 0.006 | 1.62 ± 0.009 † | 1.16 ± 0.011 | 3.09 ± 0.018 † | 1.28 ± 0.0011 | 2.16 ± 0.013 † |
| IMM | 1.07 ± 0.006 | 1.07 ± 0.006 | 0.55 ± 0.007 | 0.95 ± 0.009 † | 0.38 ± 0.006 | 0.73 ± 0.007 † |
| IML | 1.07 ± 0.005 | 1.07 ± 0.006 | 0.33 ± 0.008 | 0.63 ± 0.008 † | 0.71 ± 0.008 | 1.09 ± 0.008 † |
| D | 1.07 ± 0.006 | 1.07 ± 0.007 | 0.75 ± 0.010 | 1.20 ± 0.011 † | 0.47 ± 0.008 | 0.82 ± 0.008 † |
| PY | 1.07 ± 0.005 | 1.07 ± 0.006 | 0.33 ± 0.006 | 0.33 ± 0.007 | 0.33 ± 0.006 | 0.38 ± 0.006 † |

QUATRIÈME CHAPITRE: LE DIABÈTE DE TYPE I

Expression of kinin B₁ receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat

¹Brice Ongali, ¹Maria Martha Campos, ¹Mihai Petcu, ¹Donata Rodi, ¹Frank Cloutier, ²Jean-Guy Chabot, ³Gaetan Thibault and * ¹Réjean Couture

¹Departments of Physiology and ³Clinical Research Institute of Montreal, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7 and ²Department of Psychiatry, Douglas Hospital Research Centre, McGill University, Montréal, Québec, Canada H4H 1R3

Running title: kinin B₁ receptors in diabetes

This work was supported by a Grant-In-Aid from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-14379 to RC). M.M. Campos and D. Rodi were recipients of a Postdoctoral Fellowship from the Université de Montréal (GRSNA) and B. Ongali held a Studentship from the Republic of Gabon. The authors thank Dr J.P. Schanstra for supplying the rat B₁R plasmid used to generate the riboprobes.

* Address for correspondence:

Réjean Couture, PhD.
Université de Montréal
Pavillon Paul-G.-Desmarais
2960, Chemin de la Tour
Montréal, Québec, Canada
H3T 1J4
Tel.: 1-514-343-7060
Fax: 1-514-343-2111



ABSTRACT

Previous studies have reported cardiovascular and nociceptive responses after intrathecal injection of kinin B₁ receptor (B₁R) agonists in the model of streptozotocin (STZ)-diabetic rat (diabetic). The aim of this study was to measure the early up-regulation of B₁R binding sites and mRNA in the thoracic spinal cord of diabetic and control rats.

Data show significant increases of specific B₁R binding sites in the dorsal horn of diabetic rats 2 days (+315%), 7 days (+303%) and 21 days (+181%) after STZ treatment. Levels of mRNA were significantly increased (+68%) at 2 and 7 days but not at 21 days. These data bring the first molecular evidence for an early up-regulation of B₁R in the spinal cord of diabetic rat.

Keywords: Bradykinin, B₁ receptor, spinal cord, STZ, diabetes, autoradiography, *in situ* hybridization.

INTRODUCTION

Kinins have been proposed as neuromediators of neuronal pathways involved in the transmission of nociceptive information and autonomic control of arterial blood pressure [1]. Kinins act through the activation of two transmembrane G-protein coupled receptors (R) denoted as bradykinin (BK) B₁R and B₂R. Whereas B₂R is constitutive and mediates most of the biological effects of kinins, the B₁R has a low basal expression under normal physiological situation, yet it is induced and over expressed by tissue injury and the cytokine network [2,3]. The induction of B₁R involves the transcriptional nuclear factor kappa-B (NF-κB) and the MAP kinase pathway [4,5]. It is hypothesized that the B₁R is induced in diabetes through a NF-κB mechanism: NF-κB is activated by hyperglycemia [6,7]. Consistent with a putative role of B₁R in diabetes complications, B₁R are up regulated in several organs in diabetic rats where they mediate several biological actions, including paw oedema [8], leukocyte migration in the lung [9] dilatation of retinal microvessels [10] and inhibition of MAP-kinase activation in renal glomeruli [11]. Some of these events occurred within 4 days [9,10] and 3 weeks [11] after STZ treatment. Intrathecal injection of B₁R agonists evoked a biphasic nociceptive response [12] and increases of blood pressure and heart rate through sympathetic activation [13] 1 day and 3 weeks after STZ treatment, respectively, suggesting the presence of functional B₁R in the spinal cord of these animals. Finally, B₁R antagonists inhibit thermal hyperalgesia and the increased vascular permeability occurring in diabetic mice [14,15].

Using *in situ* hybridization and *in vitro* receptor auto-radiography, this study was undertaken to provide the missing molecularevidence that B₁R up-regulation in the thoracic spinal cord of STZ-diabetic rats 2, 7 and 21 days post-treatment.

METHODS

Male Wistar rats weighting 220-250g (n=24) were purchased from Charles River (St-Constant, Quebec, Canada). The care of animals and research protocols were in compliance with the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal care and approved by the Animal Care Committee of our University.

STZ-induced diabetes: Rats received a single dose of STZ (65 mg/Kg, i.p.) freshly dissolved in 0.05 M sodium citrate buffer, pH 4.5 (diabetic rats) or vehicle (control). Body weight and glucose concentration from nonfasting animals were measured in a blood sample obtained from the tail by pinprick, with a glucose oxidase-impregnated test strip and a reflectance meter (Accu-Check III, Boehringer Mannheim, Germany). Only rats with blood glucose > 20 mM were considered as diabetic.

Procedures for tissue preparation and autoradiography: Iodination of HPPdesArg¹⁰Hoe 140 (3-4 hydroxyphenyl-propionyl-desArg⁹-D-Arg[Hyp³,Thi⁵, D-Tic⁷,Oic⁸]-BK) and all procedures for autoradiography and tissue preparation were performed as previously described [16]. Rats were euthanized at 2, 7 and 21 days after STZ or vehicle treatment by asphyxia under respiratory CO₂ inhalation and subjected to dorsal laminectomy. A total of 920 segments of spinal cord (T9-T12) were used for autoradiography and in situ hybridization experiments.

Riboprobe design: A 326 bp cDNA fragment of the rat B₁ receptor (pSKratB₁) was subcloned into a BlueScript vector (pKS) (generous gift of Dr J.P. Schanstra) used as a template to generate [³⁵S]-uridine 5'-(thio)triphosphate ([³⁵S]UTP-S)-labeled transcripts in either orientation using a RNA transcription kit. Antisense rat B₁ receptor riboprobe was transcribed with T7 RNA polymerase from HindIII-digested template. Sense-strand control

riboprobe was generated from NotI-digested template with T3 RNA polymerase. Both antisense and sense riboprobes were labeled directly during the RNA polymerase reaction using [³⁵S]UTP-S (1,250 Ci/mmol, NEN, Boston, MA).

In Situ hybridization: The method used was similar to that described by Tong and coworkers [17]. Briefly, frozen sections of 20 μm were warmed to room temperature for 30 min and fixed with 2 % of paraformaldehyde in 2 x saline sodium citrate buffer (SSC, 0.15 M sodium chloride; 15 mM sodium citrate; pH 7.0) for 5 min, followed by 4 washes in 2 x SSC buffer. Sections were incubated in 0.25 % (v/v) acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine (pH 8.0) for 10 min at room temperature, dehydrated through graded alcohols and air-dried. Post-fixed sections were hybridized with 1 x 10⁷ cpm/ml [³⁵S]-UTP-labelled B₁ receptor riboprobes in hybridization buffer containing 50 % formamide, 4 x SSC, 1 x Dendhart's solution (0.02 % polyvinylpyrrolidone, 0.02 % Ficoll, 0.02 % BSA), 500 μg/ml denatured salmon sperm DNA, 250 μg/ml yeast tRNA, 10 % dextran sulfate and 50 mM dithiothreitol. The diluted probe was applied to sections on glass coverslips and hybridized overnight at 55°C in a humid chamber. At the end of the hybridization, the coverslips were removed and sections were washed in 4 x SSC containing 30 % formamide for 30 min at 55°C. Sections were then washed twice in 4 x SSC (30 min each, 55°C), treated with 10 μg/ml RNase (30 min, 37°C), washed in 0.5 x SSC for 2 h at 60°C and air dried. The sections were apposed next to Kodak BioMax MR films for 30 days, developed and analysed as previously described for in vitro autoradiography [16].

Statistical analysis of data: Data represent the means ± SEM of 4 animals per group and their statistical analysis was performed with the Graph-Pad Prism® computer program. The statistical significance was determined with a Student's t-test for unpaired samples. Only P values < 0.05 were considered to be statistically significant.

RESULTS

Body weight and blood glucose before sacrifice: At the onset of the treatment, no statistical differences were found between control and diabetic rats for body weight (230 ± 10 vs 228 ± 3 g) and blood glucose (< 6.0 mM). As depicted in Figure 1, significant reduction of body weight occurred in STZ at 2 and 21 days, while blood glucose was markedly higher (close to 30 mM) in diabetic rats from 2 to 21 days post-treatment.

Distribution and density of B₁R binding sites: [¹²⁵I]-desArg¹⁰HPP-Hoe 140 showed weak and diffused B₁R binding sites all over the grey matter of the spinal cord in vehicle-treated rats (Fig. 2). Densities measured in dorsal horn (laminae I-III) ranged from 0.69 ± 0.19 to 0.97 ± 0.17 fmol/mg tissue from 2 to 21 days (Fig. 2). When compared to vehicle-treated rats, B₁R binding sites were more striking in the dorsal horn of diabetic rats; densities were significantly increased at 2 (+315%; $P < 0.01$), 7 (+303%; $P < 0.001$) and 21 (+181%; $P < 0.05$) days (Fig. 2).

Distribution and density of B1R mRNA: While a specific signal was observed with the [³⁵S]UTP-labeled antisense riboprobe, the sense control probe gave little or no hybridization, revealing the specificity of the observed signal (Fig. 3). The level of B1R mRNA transcripts 7 in the spinal cord of vehicle-treated rats was very weak, yet the labelling was more abundant in the dorsal horn where specific densities ranged from 17.3 ± 1.5 to 18.3 ± 5.3 nCi/g (Fig. 3). In diabetic rats, B₁R mRNA levels were significantly increased (+68%, $p < 0.05$) at 2 and 7 days but not at 21 days post injection in the dorsal horn (Fig. 3).

DISCUSSION

The main finding of this study is the molecular and anatomical evidence that the B₁R show early induction and over-expression in the spinal cord of diabetic rats from 2 to 7 days post-treatment. The return of the mRNA level to control values at 21 days post-treatment in diabetic rats even though the density of B₁R binding remained increased may be due to a decreased stability or increased turnover of the mRNA. Intrathecal injection of B₁R agonists elicited increases in blood pressure and heart rate in this model of diabetic rat at 21 days [13] and a transient hyperalgesic response in the tail-flick test that occurred as early as 1 day after the induction of severe hyperglycaemia, and remained quiet stable between 1 and 21 days [12], which is consistent with the sustained up regulation of B₁R binding sites during that period. These effects were mediated by the release of prostaglandins and other mediators, including substance P and nitric oxide. The distribution of B₁R is widespread all over the grey matter, overlapping the intermediolateral and dorsal horns and lamina X thought to be implicated in cardiovascular regulation and nociception [1].

Low but detectable densities of specific binding sites and mRNA transcripts were measured in most laminae of control rats, suggesting the presence of a basal expression of B₁R in the spinal cord of Wistar rats. This finding is in agreement with the basal B₁R expression (mRNA) and immunohistochemical detection of the B₁R in rat and human spinal cord dorsal horn [18,19]. The significance of these receptors is however questionable because the stimulation of this basal population of B₁R with intrathecal B₁R agonists had no effect on thermonociception, blood pressure and heart rate or behavioural activity in awake naïve rats [12,13].

Although the mechanism of the up-regulation of B₁R in the spinal cord of diabetic rat remains to be confirmed, hyperglycaemia is thought to be the main contributing factor. Indeed, this was evidenced for the up-regulation of neutrophil migration in the pleural cavity of rats treated

with STZ [9]. Hyperglycaemia can activate NF- κ B [6,7] which is known to induce B₁R in various paradigms [4, 6, 12].

CONCLUSION

This study provides the first anatomical and molecular evidence that early in diabetes the spinal cord begins to over-express B₁R. A putative role for these receptors is suggested in spinal autonomic control of blood pressure and nociception. This model appears therefore suitable for studying the function and regulation of B₁R in the central nervous system and for determining the potency of novel centrally acting antagonists.

REFERENCES

1. Couture R and Lindsey CJ. Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. In Handbook of Chemical Neuroanatomy, Peptide Receptors. Quirion R, Björklund A, Hökfelt Th (editors). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, Part 1, vol 16, 2000, pp. 241-300.
2. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 1998; 50:357-86.
3. deBlois D, Horlick RA. Endotoxin sensitization to kinin B1 receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects. *Br J Pharmacol* 2001; 132:327-35.
4. Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, et al. The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1 receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 1998; 101:2080-91.
5. Phagoo SB, Poole S, Leeb-Lundberg LM. 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* 1999; 56:325-33.
6. Couture R, Girolami JP. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. Review. *Eur J Pharmacol* (In press, 2004).
7. Yerneni KK, Bai W, Khan BV, Medford RM, Natarajan R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 1999; 48: 855-64.

8. Campos MM, Cabrini DA, Cardozo AH, Rae GA, Toro JH et al., Changes in paw oedema triggered via bradykinin B1 and B2 receptors in streptozotocin-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol* 2001; 416: 169-177.
9. Vianna RM, Ongali B, Regoli D, Calixto JB, Couture R. Up-regulation of kinin B1 receptor in the lung of streptozotocin-diabetic rat: autoradiographic and functional evidence. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 13-22.
10. Abdouh M, Khanjari A, Abdelazziz N, Ongali B, Couture R et al., Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of streptozotocin-diabetic rat. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 33-40.
11. Mage M, Pécher C, Neau E, Cellier E, Dos Reiss ML et al., Induction of B1 receptors in streptozotocin diabetic rats: possible involvement in the control of hyperglycemia-induced glomerular Erk 1 and 2 phosphorylation. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 328-333.
12. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2001; 429: 161-76.
13. Cloutier F, Couture R. Pharmacological characterization of the cardiovascular responses elicited by kinin B1 and B2 receptor agonists in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 375-85.
14. Gabra BH, Sirois P. Kinin B1 receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice. *Neuropeptides* 2003; 37: 36-44.
15. Simard B, Gabra BH, Sirois P. Inhibitory effect of a novel bradykinin B1 receptor antagonist, R-954, on enhanced vascular permeability in type 1 diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 1203-1207.
16. Ongali B, De Sousa Buck H, Cloutier F, Legault F, Regoli D et al., Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord. *Am J Physiol Heart Circ Physio* 2003; 284: H1949-1958.

17. Tong Y, Chabot JG, Shen SH, O'Dowd BF, George SR, Quirion R. Ontogenic profile of the expression of the mu opioid receptor gene in the rat telencephalon and diencephalon: an in situ hybridization study. *J Chem Neuroanat* 2000; 18:209-222.
18. Wotherspoon G, Winter J. Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neurosci Lett* 2000; 294: 175-178.
19. Ma QP, Heavens R. Basal expression of bradykinin B1 receptor in the spinal cord in humans and rats. *NeuroReport* 2001; 12: 2311-2314.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Body weight (upper panel) and blood glucose concentration (lower panel) of control (Ctrl) and Diabetic rats. Student's t-test comparison to Ctrl * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

Figure 2: Autoradiographic distribution (a) and densities (b) of B_1R binding sites in the spinal cord of control (Ctrl) and Diabetic rats. Note the appreciable level of total B_1R binding sites in STZ at 7 days (yellow) post-treatment. The non-specific binding (NS) was obtained in the presence of $1\mu\text{M}$ of desArg10HPP-Hoe 140. Student's t-test comparison to Ctrl * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 3: Autoradiograms of B_1R mRNA transcripts distribution (a) and quantification (b) in spinal cord of control (Ctrl) and Diabetic rats. The in situ hybridization signal related to the expression of the B_1R receptor gene was seen all over the gray matter in Diabetic rats compared to Ctrl animals. Highest levels of B_1R receptor mRNA (dark field) were seen in diabetic rats at 2 and 7 days but not at 21 days post-injection. Note the lack of hybridization signal at the level of the gray matter in Diabetic animals when using the sense probe to demonstrate specificity. Student's t-test comparisons to Ctrl * $P < 0.05$.

Figure 1

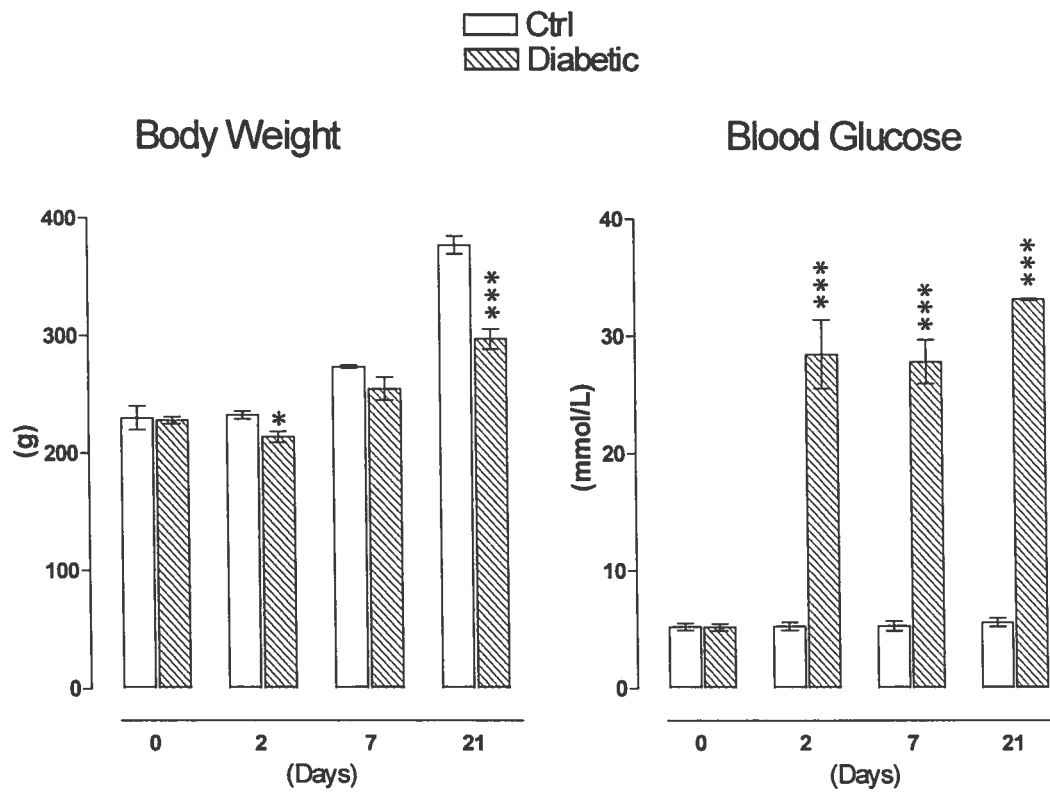


Figure 2

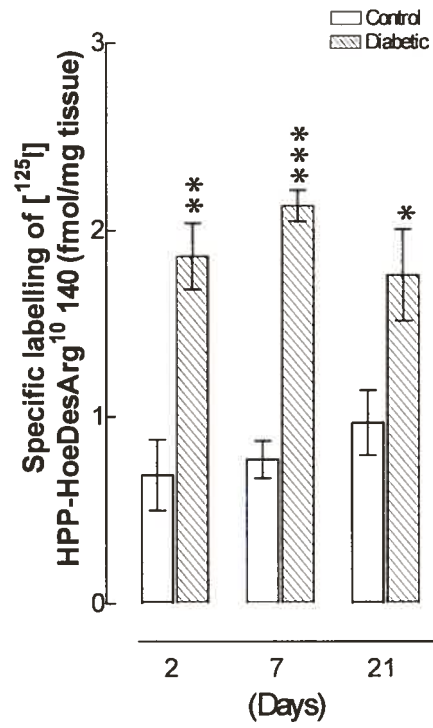
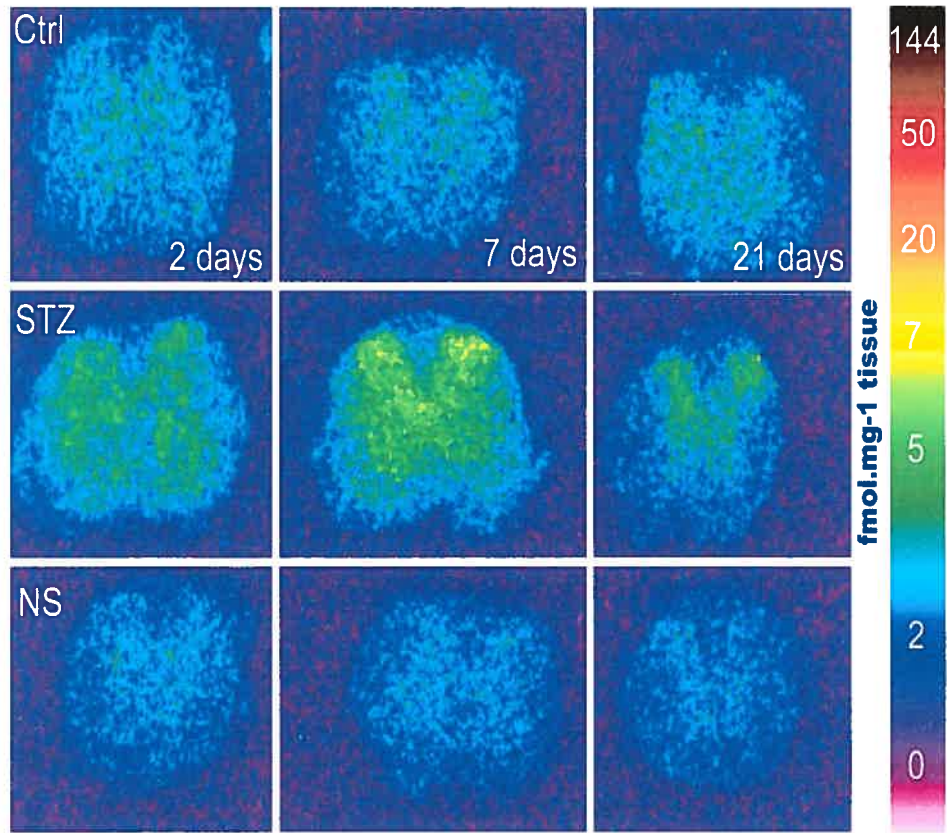
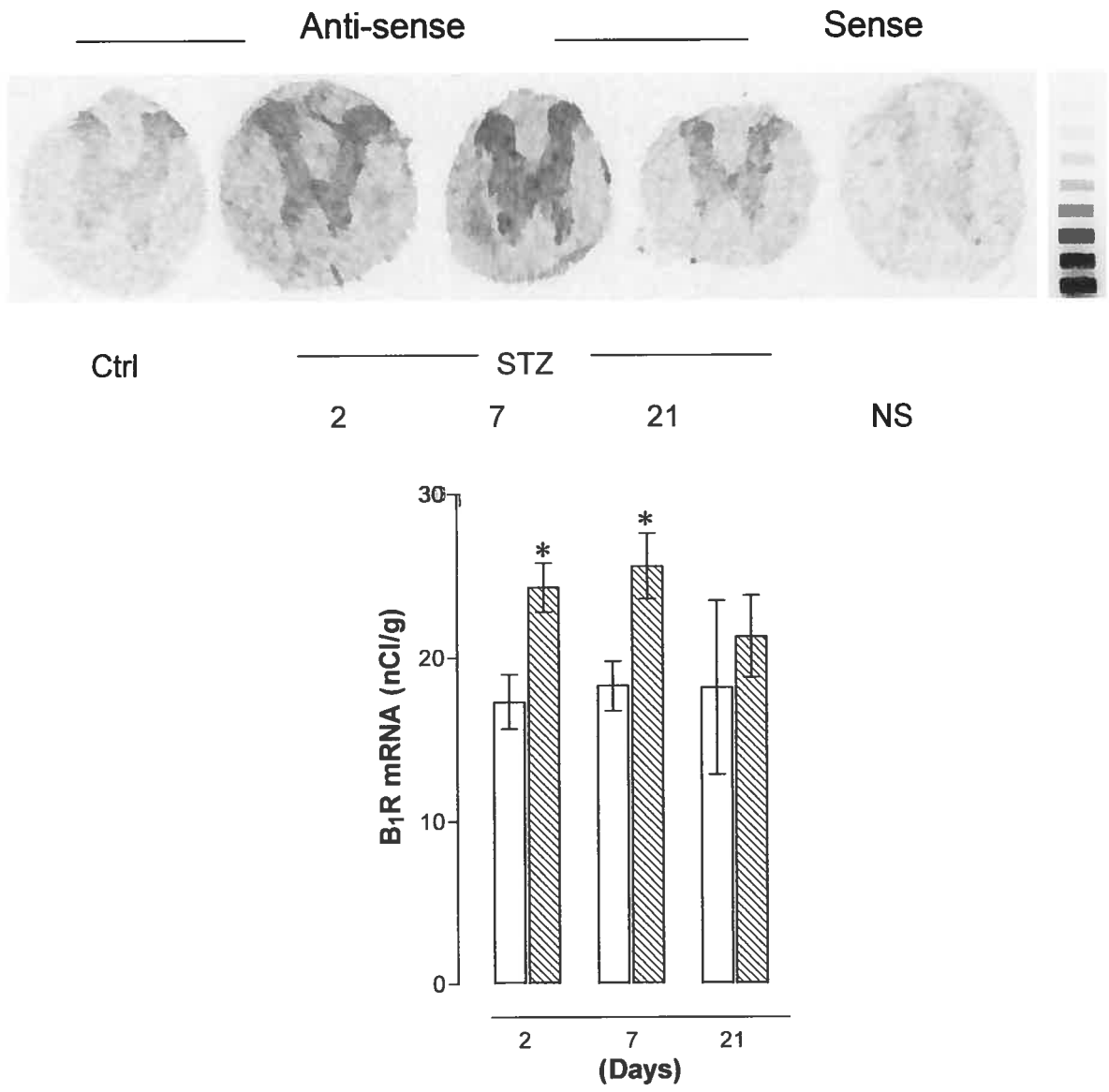


Figure 3



CINQUIÈME CHAPITRE : DISCUSSION GÉNÉRALE

1.0. Considérations méthodologiques

1.1. Choix méthodologiques

Une approche méthodologique permettant l'appréciation des changements qualitatifs et quantitatifs observables étant nécessaire pour atteindre nos objectifs, nous avons choisi la radioliation sur coupes histologiques conjuguée à l'autoradiographie quantitative et à l'hybridation *in situ*, dans l'étude sur le diabète (voir chapitre 3). Le choix de l'autoradiographie quantitative nous apparaît très approprié pour nos études dans la mesure où cette technique est excellente pour la localisation macroscopique des sites de liaison. Elle constitue une méthode de choix pour étudier la distribution différentielle d'une variété de récepteurs. Déjà largement utilisée en neuroanatomie, l'autoradiographie a permis la construction complète de cartes de haute résolution de distribution de récepteurs et d'examiner la relation entre des pathologies cellulaires spécifiques et les changements de la densité des récepteurs dans des maladies neurologiques (Leslie et Altar, 1988). Aussi, même si certaines techniques comme l'immunohistochimie couplée à la microscopie électronique ou la fluorescence couplée à la microscopie confocale permettent d'extraire des informations qualitatives d'une résolution élevée, elle restent semi quantitatives et ne peuvent pas remplacer l'autoradiographie; sinon simplement compléter les limitations de cette dernière, dont les plus importantes sont la pauvre résolution au niveau cellulaire et la difficulté de la combiner avec d'autres méthodes qui requièrent la fixation histologique (Chabot et al., 1996). Dans la majorité des cas, le recours à l'hybridation *in situ* ou à l'immunohistochimie est suffisant pour combler ces limitations (Chabot et al., 1996).

1.2. Radioliation sur coupes histologiques

1.2.1. L'autoradiographie quantitative

L'autoradiographie est une technique qui permet de marquer, à l'aide d'un isotope radioactif (souvent du tritium ou l'iode 125), un médicament, un gène, une protéine, un peptide ou un ligand. Elle permet notamment de suivre le cheminement d'un médicament dans les tissus, d'identifier des gènes ou de visualiser la distribution des récepteurs sur des membranes.

De ce fait, l'autoradiographie est une technique à la fois qualitative et quantitative.

Sur le plan expérimental, il s'agit d'incuber des coupes histologiques en présence d'un ligand marqué à un isotope radioactif (liaison totale) ou en présence du même ligand non marqué à des concentrations 1000 fois supérieures (liaison non spécifique). Les sites d'intérêts (sites spécifiques) sont déduits par soustraction digitale ou numérique entre les liaisons totales et non spécifiques sur des coupes adjacentes. La révélation de l'autoradiographie se fait par exposition des coupes sous un film en présence d'une échelle de valeurs concomitantes à l'isotope utilisé. Chaque isotope utilisé en autoradiographie dispose des caractéristiques propres qui lui confèrent des avantages bien particuliers.

En effet, alors que le marquage au tritium consiste à remplacer un hydrogène du ligand par un hydrogène radioactif, le marquage à l'iode requiert la fixation d'une molécule d'iode radioactive au ligand, particulièrement sur un acide aminé aromatique libre.

L'avantage des ligands marqués au tritium est celui de mimer parfaitement le comportement des ligands endogènes contrairement aux ligands iodés qui peuvent causer des contraintes stériques et modifier les propriétés pharmacologiques des ligands endogènes.

Par contre, les ligands marqués au tritium disposent souvent d'une faible activité spécifique, ce qui se traduit par des périodes d'exposition de très longue durée (2 à 3 mois) contrairement aux ligands iodés qui raccourcissent considérablement ce temps à moins de cinq jours.

D'autre part, les ligands iodés se dégradent très vite (perte de radioactivité dans les trois semaines suivant l'iodation, auto-dégradation) limitant leur utilisation à moyen terme, alors que les ligands marqués au tritium ont une demi-vie de 65 ans et ne se dégradent que par perte d'activité (Kuhar, 1987; Kuhar et De Souza, 1989).

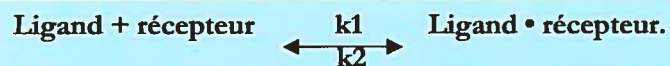
Enfin, l'analyse des résultats est faite à l'aide d'un système d'analyse d'image (MCID, Imaging research, Ontario, Canada) disposant d'une de capture Matrox de haute résolution et muni d'une caméra vidéo analogique (Sierra Scientific Solid state video camera MS-4030 pixel counts: 610 (H) x 492 (V)).

1.2.1.1. Principes de l'autoradiographie quantitative

L'autoradiographie est une méthode biochimique qui est régie par plusieurs propriétés pharmacologiques autour de la relation récepteur – ligand.

En effet, peu importe le type de ligand utilisé, ce dernier doit observer un certain nombre de propriétés pharmacologiques de base dont les plus importantes sont:

- L'obéissance à la loi d'action de masse



Kd (constante de dissociation) = [Ligand] [Récepteur] / [Ligand•Récepteur]. Dans les conditions optimales, plus de 80% des sites sont liés quand la concentration du ligand choisi pour la liaison totale est de 4 fois la valeur du Kd

- L'accessibilité du ligand à tous les récepteurs
- La liaison du ligand ne doit pas altérer le récepteur ou modifier son affinité
- La liaison doit être saturable et réversible

Autrement dit, le ligand marqué doit être capable de se lier librement à tous les récepteurs d'intérêt et de s'en détacher sans changer le comportement du récepteur (Mantyh, 1988; Ouhtit et al., 1997). Cela permet de comprendre pourquoi l'utilisation de ligands antagonistes est très

conseillée, surtout lorsqu'on se donne l'objectif de quantifier les récepteurs, même si les ligands agonistes fournissent des marquages qualitatifs intéressants.

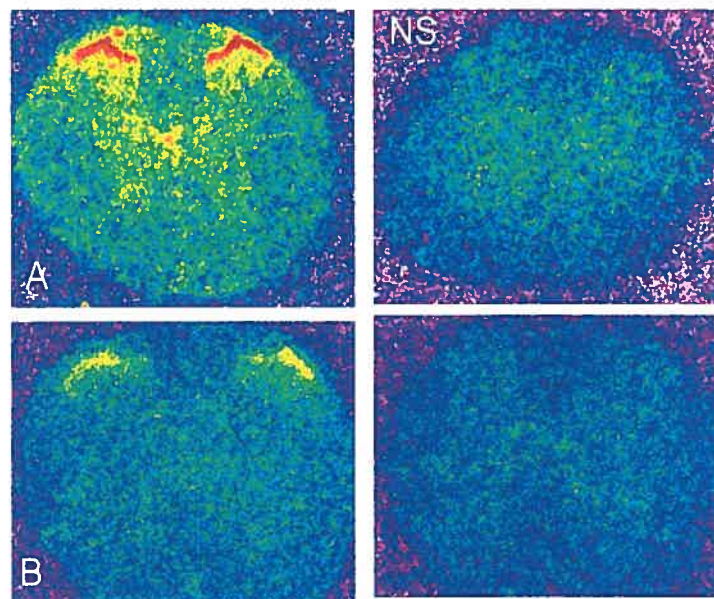
En effet, les agonistes induisent des changements physiologiques au niveau de la cinétique des récepteurs. Entre autres, ils sont capables d'induire l'internalisation des récepteurs, changeant ainsi le nombre et la distribution membranaire à l'équilibre. Ce phénomène pourrait expliquer certaines divergences dans la littérature quant aux altérations possibles de la densité des récepteurs B₂ chez le rat SHR.

En effet, une étude utilisant l'agoniste [¹²⁵I]Tyr⁰BK (Privitera et al., 2003) comme radioligand n'a trouvé aucune différence entre les rats SHR et WKY dans la région de la médulla oblongata incluant le noyau du tractus solitaire (NTS), le noyau moteur dorsal du nerf vague (X), l'area postrema (AP) et le noyau trijumeau alors que l'étude utilisant l'antagoniste [¹²⁵I]HPP-Hoe 140 (Cloutier et al., 2004) trouve une augmentation des récepteurs B₂ dans les mêmes régions chez le rat SHR. Ce type de marquage, observé très tôt dans nos études pilotes (figure 13), nous a conduits à adopter le ligand antagoniste B₂ [¹²⁵I]HPP-Hoe 140 déjà utilisé chez le mouton (Murone et al., 1996; 1997) et le rat (Couture et Lindsey 2000) à l'instar du ligand agoniste [¹²⁵I]Tyr⁸BK, jadis exploité dans notre laboratoire chez le rat (Lopes et al., 1995) et le cobaye (Lopes et al., 1993). Ce remplacement approprié nous a permis de disposer d'un excellent outil de travail pour étudier les récepteurs B₂ dans de meilleures conditions expérimentales. Car l'agoniste [¹²⁵I]Tyr⁸BK (280pM; 500Ci/mmol) sous estime le nombre des récepteurs B₂ (voir figure 13) en plus de se lier aux peptidases. Son exposition requiert une période d'au moins 15 jours, contrairement à 2 jours pour l'antagoniste [¹²⁵I]HPP-Hoe 140 (200 pM; 1212 Ci/mmol) qui possède une plus grande activité spécifique et une plus grande stabilité métabolique.

De plus, le groupe HPP (3-4 hydroxyphenyl-propionyl-D-Arg) qui permet d'attacher l'iode radioactif au ligand sans altérer ses propriétés pharmacologiques nous a permis de développer un radioligand pour le récepteur B₁ ([¹²⁵I]HPP-desArg¹⁰Hoe 140) à partir de l'antagoniste

sélectif des Arg¹⁰Hoe 140 (Wirth et al., 1991). Par contre, nos expériences pilotes ont montré qu'à des concentrations de l'ordre du nano molaire, HPP-desArg¹⁰Hoe 140 avait une légère affinité pour le récepteur B₂. Pour prévenir ce problème de sélectivité dans nos expériences, nous protégeons les sites B₂ en y ajoutant une concentration équimolaire du ligand HPP-Hoe 140 non marqué dans le milieu d'incubation.

Figure 13: Récepteurs B₂ marqués avec [¹²⁵I]HPP-Hoe 140 (A) et [¹²⁵I]Tyr⁸BK (B)



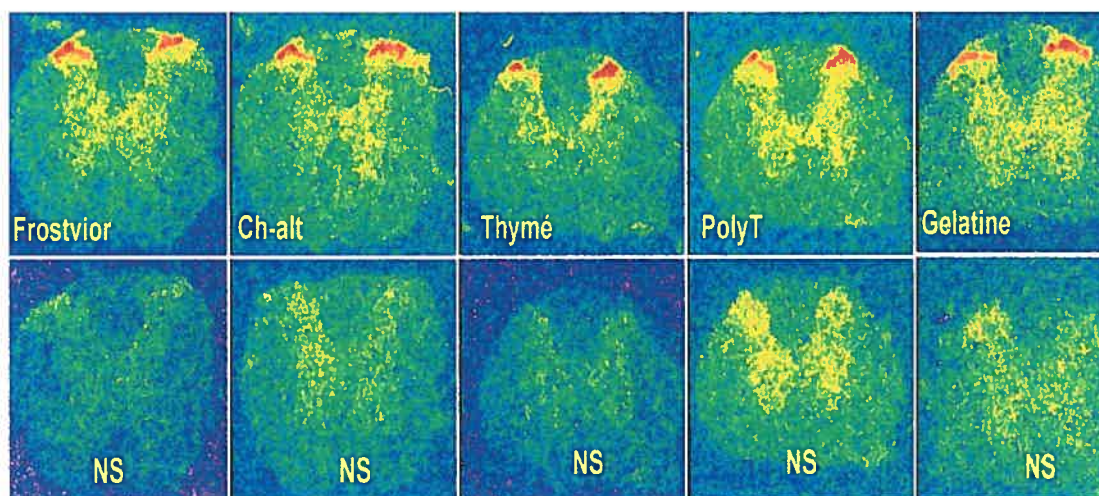
Le marquage avec 280 pM de [¹²⁵I]Tyr⁸BK (B) obtenu après une exposition de 21 jours est moins intense et plus limité dans les cornes dorsales (LI-LIII) de la moelle épinière thoracique (T9-T12) du rat Wistar (8 semaines d'âge) par rapport au marquage avec 200 pM de [¹²⁵I]HPP-Hoe 140 (A) obtenu après une exposition de 2 jours. NS: non spécifique

En dehors du choix des ligands radioactifs, les accessoires et le milieu d'incubation utilisés en autoradiographie sont aussi déterminants pour éviter des résultats erronés.

À cet effet, certains gels et/ou colorants utilisés pour recouvrir les lames histologiques sur lesquelles les coupes de tissus sont déposées peuvent interférer avec le radio-isotope utilisé et

entraîner des marquages non spécifiques plus élevés. Ainsi, sur la base d'expériences pilotes (voir figure 14), les lames colorfrost/plus bande bleue de Fisher ont été adoptées pour nos travaux.

Figure 14: Sélection de lames pour l'autoradiographie chez le rat.



Les liaisons totales (rangée du haut) sur les récepteurs B₂ dans les cornes dorsales (LI-LIII) de la moelle épinière thoracique (T9-T12) du rat SHR de 16 semaines d'âge obtenues avec une concentration de [¹²⁵I]HPP-Hoe 140 au dessus du B_{max} (300 pM) et les liaisons NS (rangée du bas) obtenues en présence de 1 µM de HPP-Hoe 140 montrent que les lames commerciales Frostvior (Fisher) et Thymé n'augmentent pas les sites de liaison NS du ligand [¹²⁵I]HPP-Hoe 140.

En effet, une observation attentive montre qu'en dehors des lames Frostvior et Thymé, le ligand iodé n'a pas été déplacé par le ligand froid, suggérant un attachement du ligand [¹²⁵I]HPP-Hoe 140 au verre sur les autres lames. Une telle situation amplifie les liaisons NS et permet d'exclure ce type de lames qui interfère avec le ligand radioactif.

Des résultats similaires ont été obtenus pour le ligand B₁ [¹²⁵I]HPP-desArg¹⁰Hoe 140 (non présentés).

En ce qui concerne les conditions expérimentales, des coupes de moelle épinière de rats diabétiques traités à la STZ ont été incubées dans du tampon PIPES en présence ou non d'un cocktail déjà établi dans notre laboratoire (Lopes et al., 1993; 1995). Ce cocktail d'inhibiteurs des peptidases contient entre autres, le donneur et accepteur d'électrons, 1,10 phénantroline (Zheng et al., 2003), qui prévient les réactions de contact avec le verre; le captopril (inhibiteur de la kininase II) qui prévient la dégradation des radio-ligands par la kininase II; la bacitracine, un antibiotique qui prévient la contamination bactérienne du milieu d'incubation et l'induction du récepteur B₁ par les toxines bactérienne; le dithiothréitol qui sert à casser les ponts disulfures entre les protéines et qui empêche la formation de liaisons covalentes par la rupture des interactions entre molécules et le maintien des chaînes polypeptidiques libres et individualisées; l'albumine sérique de bovin (BSA) qui empêche les peptides d'adhérer au verre et aux protéines. Les différentes conditions expérimentales sont regroupées dans le tableau 2.

Tableau 2: Conditions expérimentales pour l'autoradiographie des récepteurs des kinines.

| Conditions | A | B | C | D | E | F |
|--|---|---|---|---|---|---|
| PIPES | X | | X | | | |
| PIPES+Cocktail | | X | | X | X | X |
| En présence de | | | | | | |
| Aprotinine : 1µM (Nolly et al., 1993) | | | X | X | | X |
| MERGEPTA : 10µM (Nsa Allogho et al., 1998) | | | X | | X | X |

On notera que l'aprotinine est un inhibiteur de protéases à sérine. Il inhibe la kallibréine, la chemotrypsine, la plasmine et les activateurs du plasminogène. Il prévient la production des kinines endogènes. Le MERGEPTA ou DL-2- mercaptométhyl-3-guanidino-ethylthiopropanoic acid (en langue anglaise) est un inhibiteur de la kininase I. Il prévient la transformation des kinines en desArg⁹-kinines (Majima et al., 1992).

Les résultats de ces tests pilotes (figure 15 et 16) montrent qu'en absence du cocktail (conditions A et C), la densité de liaison des récepteurs B_1 et B_2 est très intense dans toute la matière grise; aussi bien pour la liaison totale que NS. Cette augmentation est plus importante pour les récepteurs B_2 en présence de MERGEPTA et d'aprotinine (condition C), alors que pour les récepteurs B_1 , seuls les marquages NS restent élevés (figure 15).

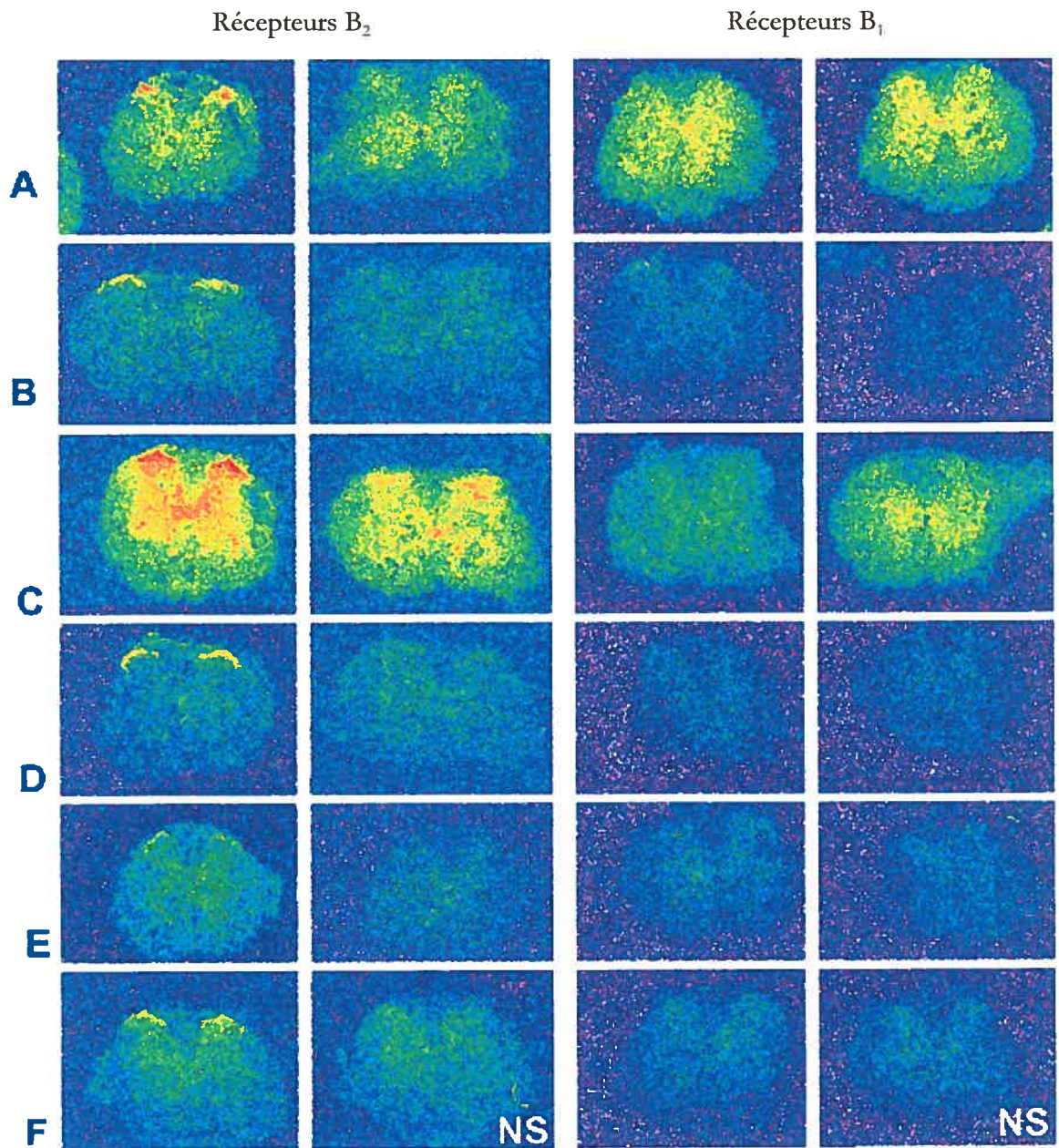
De même, l'ajout de MERGEPTA et/ou d'aprotinine dans les milieux d'incubation contenant le cocktail (conditions D, E et F) perturbe les liaisons totales et NS sur les sites de liaison B_1 . Pour le récepteur B_2 , il semble que les meilleures conditions soient B, D, E, F (PIPES + Cocktail).

Donc l'ajout d'aprotinine ou de MERGEPTA a peu d'influence. Mais appliquées au récepteur B_1 , toutes ces conditions sauf la condition B, montrent des limites. En effet ces conditions ont tendance à sous estimer les densités des récepteurs B_1 (voir figures 15 et 16).

D'où le choix de la condition expérimentale B (capable de procurer des résultats non biaisés autant pour le B_1 que pour le pour B_2) pour toutes nos expériences.

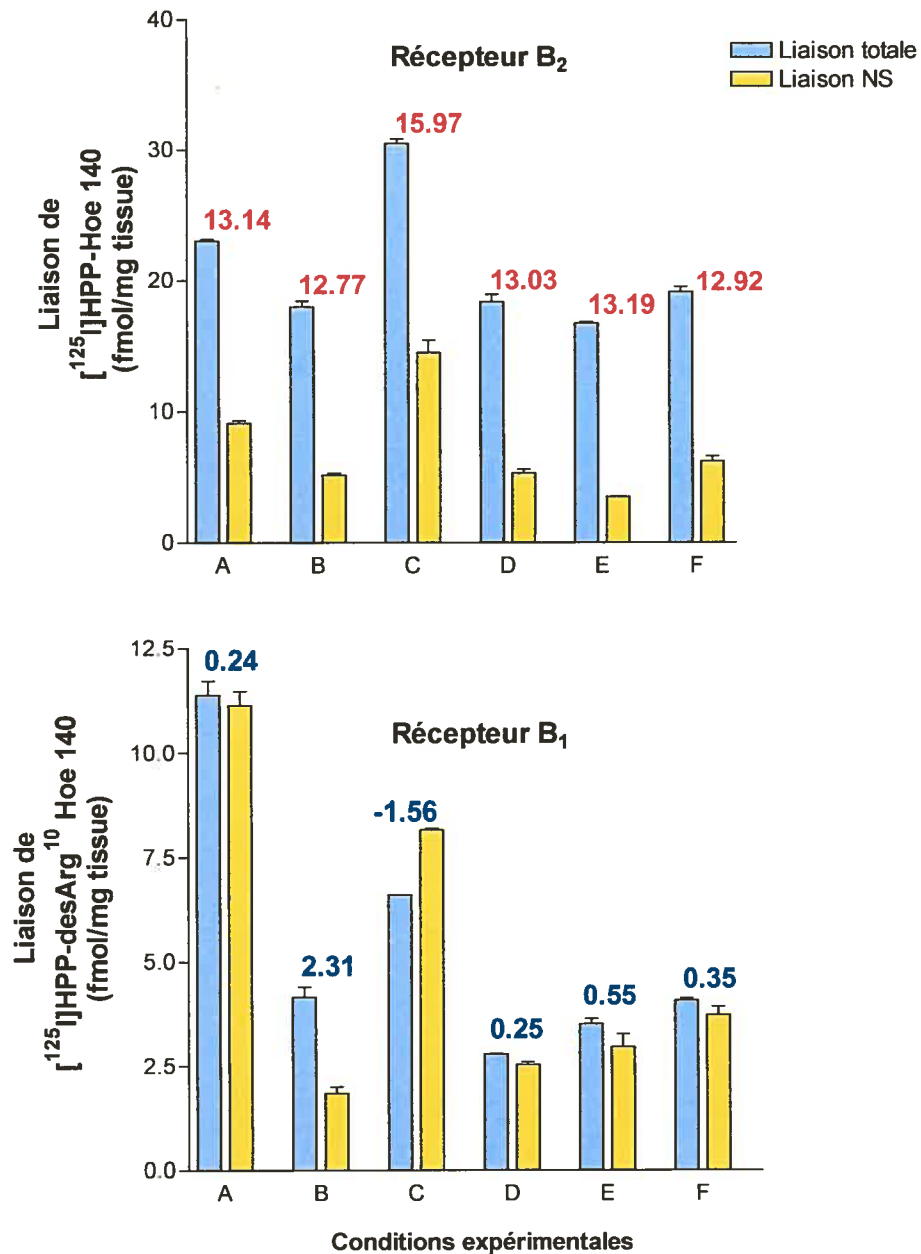
Ces études pilotes ont permis d'étendre la condition expérimentale mise au point dans notre laboratoire (Lopes et al., 1993; 1995) pour le radioligand Tyr⁸BK (récepteur B_2) aux radioligands [¹²⁵I]HPP-Hoe 140 (récepteur B_2) et [¹²⁵I]HPP-desArg¹⁰Hoe 140 (récepteur B_1) également mis au point par notre équipe.

Figure 15 : Distribution des récepteurs B_1 et B_2 dans diverses conditions expérimentales chez le rat diabétique STZ, 7 jours post traitement.



Seule la condition expérimentale B assure des résultats autoradiographiques optimaux pour le marquage des deux récepteurs des kinines dans la moelle épinière thoracique (T9-T12).

Figure 16: Densité des liaisons spécifiques des récepteurs B₁ et B₂ dans diverses conditions expérimentales chez le rat diabétique STZ.



Les chiffres en bordeaux (récepteurs B₂) et en bleu (récepteurs B₁) représentent les densités spécifiques dans les cornes dorsales (LI-LIII).

1.2.1.2. L'hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* sert à détecter l'expression tissulaire de l'ARNm (Ouhtit et al., 1997). Les avantages de l'hybridation *in situ* sont d'une part, de permettre la quantification des ARNm révélés sur un film photographique et, d'autre part, grâce à sa sensibilité, de permettre la détection d'ARNm faiblement exprimé avec la possibilité d'obtenir des signaux au niveau cellulaire si la révélation est faite par émulsion nucléaire liquide.

Les principes de la technique sont analogues à ceux de l'autoradiographie. Elle est basée sur l'hybridation spécifique d'une sonde (ribosonde de plusieurs centaines de nucléotides ou oligonucléotide de synthèse de quelques dizaines de nucléotides) avec sa cible complémentaire d'ARNm sur une coupe de tissu frais ou fixé.

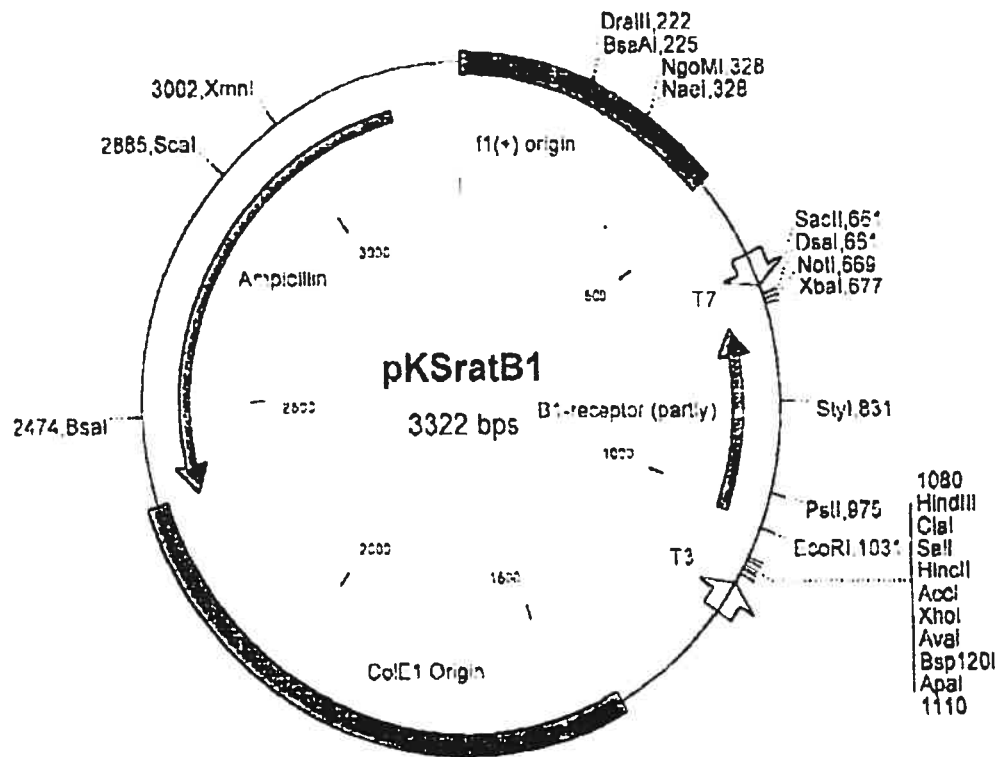
La sonde d'hybridation est marquée avec un isotope radioactif (^{35}S ou ^{32}P en général). La révélation de l'hybridation *in situ* se fait également par exposition des coupes sous un film ou par trempage dans une émulsion radiosensible liquide (pour plus de détails, voir Wisden et Morris, 1994).

Ainsi, seuls les brins d'ARNm complémentaires (anti-sens) seront révélés du fait des appariements formés, alors que les brins non complémentaires (sens) ne s'hybrident pas et seront lavés (non spécifique).

Les plasmides (voir carte à la figure 17) nous ont été gracieusement fournis par le Dr J. P. Schanstra, INSERM U 388, Toulouse, France (équipe du Dr Girolami).

Ces plasmides ont été insérés dans un vecteur pBluescript SK (Stratagene). La taille du B_1 avec "polylinker" incluant ses enzymes de restriction est de 450 paire de base (bp). Le vrai B_1 a 326 bp. La ribosonde antisens a été produite par digestion de l'enzyme de restriction Hind III et obtenue en utilisant la polymérase T7 RNA. Sa ribosonde sens est obtenue par digestion enzymatique au site de restriction Not I, en utilisant la T3 polymérase.

Figure 17 : Plasmide du récepteur B₁ chez le rat



2. 0. Les récepteurs des kinines en physiopathologie centrale

2.1. L'épilepsie temporelle

Le phénomène de kindling (embrasement) a été découvert accidentellement par le Dr Graham Goddard en 1967, alors qu'il étudiait le processus d'apprentissage chez le rat.

En effet, une partie des études incluait la stimulation électrique du cerveau de rats à très faible intensité (sub-luminale), si faible qu'il a été surpris d'observer qu'après deux semaines de traitement, les rats convulsaient quand la stimulation était appliquée. Ces convulsions devenaient de plus en plus fréquentes et indépendantes de la stimulation. Le cerveau des rats devenait sensibilisé à la stimulation électrique. Ils pouvaient faire des convulsions à la stimulation, même un mois plus tard. C'est ainsi qu'il fut découvert que l'excitation électrique

locale et répétée des neurones corticaux pouvait induire une activité anormale qui persistait après l'excitation (« kindling », embrasement). Plus tard, il fut montré que l'aptitude à générer des décharges extrêmes peut s'étendre à des neurones aux alentours de la région originale, mais aussi à distance, vers des neurones en connexions synaptiques avec le foyer initial. De telles stimulations dépolarisent de manière prolongée les neurones et induisent des modifications physiologiques durables qui les rendent plus facilement excitables par la suite (dépolarisation partielle rémanente) (Racine 1975; Racine et al. 1975 a-c).

L'application de substances chimiques peut également produire des foyers expérimentaux, temporaires ou permanents, en bloquant le fonctionnement des synapses inhibitrices (strychnine), en perturbant localement le métabolisme (pénicilline) ou en modifiant de manière permanente la structure des tissus (alumine) (Cambier et Dairou, 1975).

Ainsi, divers procédés expérimentaux utilisés chez l'animal permettent de modifier de manière durable le comportement des neurones sains en leur conférant un caractère épileptique.

De même, contrairement aux concepts plus anciens qui faisaient nécessairement intervenir les structures enfouies tels que les noyaux gris centraux comme point de départ des crises, le cortex serait nécessaire et suffisant pour générer une crise, même généralisée (par exemple, en tirant profit des nombreux relais cortico-thalamiques pour propager la crise à l'ensemble du cortex) (Bancaud, 1976; Bancaud et al., 1976; Loiseau et al., 1984; Cain et al., 1992; Noebels 2003). Ceci dit, il est extrêmement difficile d'identifier le foyer ou la zone épileptogène (ZE) (Bancaud, 1976).

En clinique, on peut admettre chez le même sujet, et lors de crises différentes, une topographie variable de la ZE dans le temps. Pour illustrer ce propos, Bancaud (1976) affirme que *«La définition même d'une zone épileptogène est difficile à donner et ne saurait se confondre avec une perturbation lésionnelle qui en est pourtant le facteur causal, en tout cas déterminant, le médiateur essentiel étant sans doute biochimique»*.

Ainsi, pour notre modèle expérimental, une électrode a été implantée dans l'amygdale afin de disposer d'une ZE bien définie, offrant un meilleur traçage des foyers épileptiformes.

Evidemment, la chirurgie et l'implantation de l'électrode peuvent constituer des éléments favorisant l'apparition des cytokines pro-inflammatoires et donc inciter l'apparition des récepteurs B₁ des kinines (Marceau et al., 1998). Mais étant donné que les animaux témoins (électrodes non stimulées) ne présentent pas les changements qui sont observés chez le rat kindling, il semble donc probable que les changements observés sont dus aux stimulations électriques sub-luminales appliquées et non aux chirurgies effectuées. Et ce, en accord avec l'équipe de Racine qui montre que chez l'animal, le phénomène d'embrassement expérimental (kindling) produit un foyer artificiel, qui très vite permet la propagation de l'activité épileptique vers des structures dites «secondaires» qui deviennent alors le siège, elles aussi, d'activités épileptiques (Racine et al. 1975). Dans le SNC, 100% des récepteurs B₂ sont situés sur les neurones et non sur les vaisseaux sanguins ou les astrocytes (Chen et al., 2000). La chute des récepteurs B₂ dans certains noyaux du cerveau, comme c'est le cas chez le rat kindling interpelle quant aux conséquences fonctionnelles d'une telle situation, surtout dans les régions de l'amygdale liées à la stimulation électrique. Cette diminution des récepteurs B₂ ne peut être associée à une quelconque dégénérescence neuronale dans la mesure où la diminution des récepteurs B₂ est le plus souvent associée à une augmentation des récepteurs B₁, surtout dans les régions concernées.

De plus, en dehors du modèle kainate, aucune donnée de la littérature n'associe le modèle d'épilepsie par kindling à une dégénérescence neuronale massive (Tuunanen et Pitkanen, 2000; McIntyre et al., 2002). On pourrait penser à une situation de présence accrue de BK dans le LCR qui causerait la diminution des récepteurs B₂ par internalisation. Un excès de BK peut entraîner une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique via la stimulation des récepteurs B₂ (Zausinger et al., 2002), ce qui augmenterait la pression

intracrânienne (Schulz et al., 2000) et favoriserait les dommages neuronaux (Francel 1992; Parpura et al., 1994; Walker et al., 1995) comme c'est le cas durant un traumatisme crânien ou à la suite de l'ischémie cérébrale où l'on observe des taux élevés de BK extracellulaire (Kamiya et al., 1993). Toutefois, cette piste ne peut être soutenue dans la mesure où une telle situation favoriserait une dégénérescence neuronale que ne soutiennent pas les données antérieures de la littérature (Tuunanen et Pitkanen, 2000; McIntyre et al., 2002).

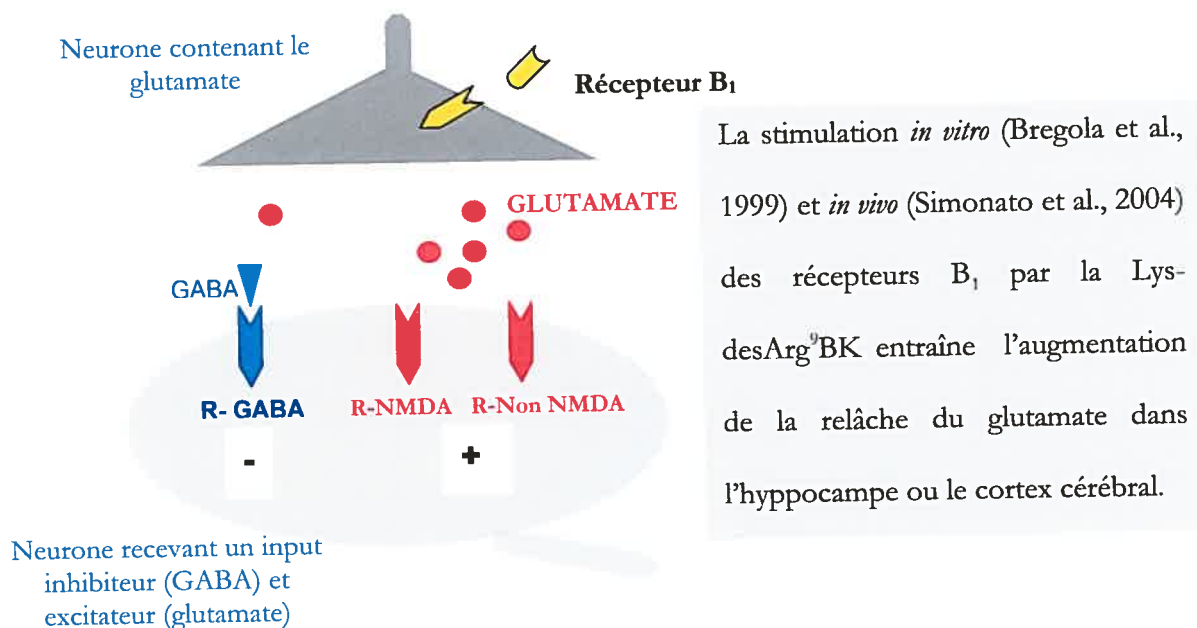
Ainsi, la baisse des récepteurs B₂ observée dans notre étude serait plutôt associée à une autorégulation des récepteurs B₁ et B₂ (Phagoo et al., 1999; Duka et al., 2001), un phénomène déjà rapporté dans le modèle de l'œdème de la patte chez le rat (Campos et al., 1996, 2001). Cela suggère que dans des conditions pathologiques, les récepteurs des kinines sont capables de changements plastiques, même si la hausse des récepteurs B₁ ou la baisse des récepteurs B₂ ne semble pas requérir leur présence réciproque dans l'aire concernée pour se produire. Cette plasticité devient donc un élément important dans la distribution et la régulation des récepteurs centraux des kinines. Elle serait de nature à favoriser les récepteurs d'intérêt durant la situation qui prévaut. Ce qui justifierait pourquoi dans les conditions physiologiques normales, les récepteurs B₁ sont très peu exprimés au détriment des récepteurs B₂. Dans le modèle du rat kindling, de nombreuses données montrent l'altération de plusieurs systèmes effecteurs (Albensi 2001; Allan et Rothwell 2002; Yaari et Beck, 2002) et la présence des cytokines pro inflammatoires telles l'IL-1 β , l'IL-1 α , le TNF- α (Jankowsky et Patterson, 2001; Albensi, 2001; Shandra et al., 2002), connues pour leur capacité à induire le récepteur B₁ via le facteur de transcription NF- κ B (Marceau et al., 1998). Ces cytokines ont été associées à la pathogenèse des convulsions dans le modèle de l'épilepsie temporale chez le rat (Albensi, 2001; Allan et Rothwell, 2002; Yaari et Beck, 2002; Shandra et al., 2002), lesquelles sont prévenues par l'administration du "naturally occurring IL-1 receptor antagonist" ou antagoniste naturel au récepteur de l'interleukine-1 (IL-1 RA) (Vezzani et al., 2000).

Contrairement aux changements observés dans certains noyaux du cerveau des animaux kindling (surtout les noyaux associés à l'amygdale), aucun changement n'est observé dans la moelle épinière ni dans le cervelet. Cette observation suggère des changements localisés dus à une production localisée des cytokines et ne supporte pas l'idée d'une situation inflammatoire invasive et généralisée du système nerveux central avec une invasion des neutrophiles, lesquels expriment les récepteurs B₁ (Vianna et al., 2003).

De plus, une telle situation inflammatoire ne saurait expliquer la baisse des récepteurs B₂, suggérant que les phénomènes observés dans notre étude se produisent au niveau neuronal. Cette hypothèse supporte l'augmentation de la relâche tissulaire *in vitro* (Bregola et al., 1999) et *in vivo* (Simonato et al., 2004) du glutamate (un neurotransmetteur qui n'est pas produit par les cellules sanguines ou les cellules endothéliales), en présence de l'agoniste B₁, Lys-desArg⁹BK, dans le cortex ou l'hippocampe chez le rat kindling. Ces derniers résultats suggèrent une localisation pré-synaptique des récepteurs B₁ sur des neurones glutamatergiques (figure 18), renforçant ainsi l'idée associant l'épilepsie à la rupture de la balance entre le système exciteur (glutamatergique) et inhibiteur (GABAergique) (Musshoff et al., 2000).

Ainsi, nos données, qui sont soutenues par une étude récente sur des tranches d'hippocampe dans un modèle d'épilepsie temporelle à la pilocarpine chez le rat Wistar (Argañaraz et al., 2004), ouvrent un nouveau champ thérapeutique possible pour les antagonistes B₁ (Rodi et al., 2004), en plus d'offrir à la recherche un excellent modèle expérimental pour étudier les récepteurs B₁ dans le SNC.

Figure 18: Schéma hypothétique de la présence présynaptique des récepteurs B_1 sur les neurones glutamatergiques dans le modèle kindling.



2.1.1. Perspectives

La présence des récepteurs B_1 sur les terminaisons glutamatergiques suppose une modulation de ce système par les kinines et offre une excellente cible thérapeutique. Ainsi, pour évaluer cette hypothèse, il serait opportun de conduire un certain nombre d'études.

- 1- Procéder à des expériences en double marquage (immunofluorescence ou immuno-argent) des récepteurs B_1 et B_2 et des neurones glutamatergiques, afin de vérifier cette situation présynaptique hypothétique des récepteurs des kinines.
- 2- Reproduire le modèle kindling chez les souris génétiquement invalidées pour les gènes des récepteurs B_1 ou B_2 et déterminer si l'absence de l'un ou l'autre des deux récepteurs est capable de prévenir les convulsions. Puis procéder également à l'étude en autoradiographie pour confirmer les changements au niveau des sites de liaison.

- 3- Procéder à des traitements pharmacologiques en prévention ou en curatif avec des antagonistes B₁ et/ou B₂ non peptidiques pour tester la capacité de ces drogues à prévenir l'épilepsie.
- 4- Étudier par autoradiographie quantitative les récepteurs B₁ et B₂ des kinines dans le cerveau de donneurs épileptiques ou sur des foyers épileptiques prélevés chez des patients atteints de cette maladie.
- 5- Étudier par autoradiographie quantitative les récepteurs B₁ et B₂ des kinines dans le système nerveux central des rats épileptiques dans le modèle kainate pour fin de comparaison.

2.2.0. L'hypertension artérielle

a- Le rat SHR comme modèle d'étude de l'hypertension essentielle chez l'homme

C'est à partir d'un élevage de rats Wistar Kyoto (WKY) non-consanguins que Okamoto a sélectionné en 1963 le premier rat présentant une hypertension spontanée. Ce dernier fut croisé à une femelle ayant une pression sanguine élevée, puis des croisements consanguins entre frères et sœurs permirent la sélection d'un élevage de rats spontanément hypertendus ou SHR (Okamoto, 1969).

L'hypertension dite spontanée chez ces animaux comporte trois phases après la naissance: (i) 3-4 semaines (stade de pré-hypertension), (ii) 7-8 semaines (début de l'hypertension), et (iii) 12-13 semaines (hypertension établie).

En dépit des critiques soulevées à l'égard de l'hétérogénéité retrouvée dans les colonies SHR (Samani et al., 1989; Kurtz et al., 1989; Nabika et al., 1991), de l'utilisation inadéquate du rat WKY comme témoin (Rapp, 1987) ou encore de la remise en question du rat SHR comme modèle animal pour l'hypertension essentielle chez l'humain (McGiff et Quilley, 1981), ce modèle demeure valable (Zicha et Kunes, 1999) et met en cause à la fois des facteurs génétiques et environnementaux qui sont semblables à la situation humaine (Zicha et Kunes,

1999). De plus, du fait de son origine génétique commune avec le rat SHR, la souche WKY a souvent été utilisée comme témoin normotendu pour justement mettre en évidence la dimension phénotypique (génotype + environnement) du modèle.

b- Hypersensibilité à la BK centrale chez le rat SHR

L'injection de la BK dans les ventricules latéraux (Buñag et al., 1981; Lindsey et al., 1988), le quatrième ventricule (Lindsey et al., 1988; Martins et al., 1991), la médulla ventrolatérale rostrale (Privitera et al., 1994) ou la moelle épinière thoracique (Cloutier et al., 2002) produit un effet presseur plus élevé chez le rat SHR que chez le WKY ou le rat Wistar normal.

De hauts niveaux de kininogène et une activité élevée de la kallibréine ont été observés dans le LCR des rats SHR âgés, chez qui le contenu en kinines et l'activité de la kininase II sont augmentés dans plusieurs régions du cerveau (Mendelsohn et al., 1980; Israel et Saavedra, 1987; Khan et al., 1995), particulièrement celles impliquées dans le contrôle cardiovasculaire. Cette situation biochimique suggère l'hypothèse d'un turnover élevé des éléments du système kallibréine-kinines favorisant une dégradation accrue de la BK en métabolites inactifs et la possibilité d'une quantité résiduelle qui, rapidement convertie en desArg⁹BK, agirait sur le récepteur B₁ pour produire l'hypersensibilité observée. Pour que cette hypothèse ait du sens, il faut d'une part que le récepteur B₁ soit surexprimé dans le système nerveux central (vu que ce récepteur est normalement absent ou faiblement exprimé) et d'autre part, que la kininase I soit exprimée ou surexprimée dans le système nerveux central du rat SHR, vu que l'on ne trouve pas de kininase I dans le LCR du rat normal (Pesquero et al., 1992; Décarie et al., 1996).

Or, les données pharmacologiques sur le récepteur B₁ dans le cerveau des rats SHR sont controversées et ne supportent pas l'hypersensibilité centrale via la desArg⁹BK. Certaines études rapportent respectivement des effets presseurs et anti-hypertenseurs à l'injection i.c.v. d'agonistes et d'antagonistes sélectifs pour le récepteur B₁ (Alvarez et al., 1992; Emanuelli et al.,

1999). Dans le même ordre d'idées il a été rapporté que l'injection i.c.v. d'oligonucléotides anti-sens dirigés contre l'ARNm codant pour le récepteur B₁ produit une profonde réduction de la pression sanguine pour plus de 48 heures chez le SHR (Emanuelli et al., 1999).

À l'opposé de ces résultats, d'autres études ont plutôt montré que les agonistes et les antagonistes B₁ sont inactifs lorsque injectés centralement (i.t. et i.c.v.) chez le rat SHR (Martins et al., 1991; Cloutier et al., 2002; 2004).

Aussi, même si des taux élevés d'ARNm des récepteurs B₁ ont été observés dans la phase établie de l'hypertension artérielle chez le rat SHR (Qadri et al., 2002, 2003), nos études ne soutiennent pas une surexpression des récepteurs B₁ dans la moelle épinière et le cerveau de ces rats. En effet, les sites de liaison pour les récepteurs B₁ ne sont observés que chez les jeunes rats SHR, avant l'apparition de l'hypertension artérielle, puis ils diminuent et deviennent faiblement exprimés tant dans les centres cardiovasculaires centraux (Cloutier et al., 2004) que dans la moelle épinière (Cloutier et al., 2002). Cette distribution réceptorielle qui est influencée par l'âge de l'animal, est en accord avec l'absence d'effets observés après l'administration centrale d'agonistes et d'antagonistes B₁ chez le rat SHR (Martins et al., 1991; Cloutier et al., 2002; 2004). De plus, notons que l'hypersensibilité à la BK centrale chez le rat SHR est observée aussi bien chez les jeunes rats (phase de pré-hypertension) où le récepteur B₁ est observé que chez les rats en phase d'hypertension établie (Cloutier et al., 2004).

Or une telle situation suggère la présence maintenue de récepteurs actifs, capables de produire cette hypersensibilité peu importe l'âge des rats SHR; ce qui n'est pas le cas pour le récepteur B₁. En revanche, des taux élevés d'ARNm du récepteur B₂ ont été mesurés dans l'hypothalamus (un site important dans l'homéostasie cardiovasculaire) chez le rat SHR dans toutes les phases de l'hypertension artérielle (Qadri et al., 2002; 2003).

De plus, l'hypersensibilité à la BK i.c.v. et i.t. notée chez le rat âgé SHR (Qadri et al., 1999; Cloutier et al., 2002; 2004), bloquée par des antagonistes du récepteur B₂, est corrélée avec une

augmentation des sites de liaison des récepteurs B₂ dans la moelle épinière (Cloutier et al., 2002) et dans les centres cardiovasculaires médullaires (Cloutier et al., 2004) du rat SHR. Une surexpression des sites de liaison B₂ a été également montrée dans les noyaux médullaires impliqués dans le contrôle cardiovasculaire chez des donneurs hypertendus (Buck et al., 2002). Ainsi, l'hypersensibilité centrale à la BK chez le rat SHR semble dériver de la surexpression des récepteurs B₂ dans les centres cardiovasculaires centraux. Cette surexpression des récepteurs B₂ pourrait résulter d'une carence de la BK endogène du fait de l'activité élevée de la kininase II chez le SHR (Mendelshon et al., 1980). Cette surexpression des récepteurs B₂ serait de ce fait un mécanisme compensatoire qui permettrait aux rats SHR de combler son déficit central en BK endogène.

c- Rôle des récepteurs centraux des kinines dans l'hypertension artérielle

Etant donné la non participation des récepteurs B₁ dans les effets cardiovasculaires des kinines centrales chez le SHR (Martins et al., 1991; Cloutier et al., 2002; 2004) d'une part, et d'autre part, le fait que le blocage des récepteurs B₂ à l'aide de traitements aigus et chroniques avec des antagonistes B₂ injectés centralement ne parvienne pas à altérer la pression sanguine systémique chez le rat SHR, il est suggéré que les kinines endogènes ne sont pas impliquées dans la maintien de l'hypertension artérielle (Madeddu et al., 1994; Lindsey et al., 1988; Martins et al., 1991).

De plus, nos résultats montrent que les niveaux élevés des récepteurs B₂ subsistent et augmentent en dépit des traitements antihypertenseurs; lesquels corrigent parfaitement la pression artérielle ou entraîne une hypotension (cas du lisinopril) chez le rat SHR. Ces données suggèrent que l'hypersensibilité de la BK et l'augmentation des récepteurs B₂ chez les rats SHR sont des phénomènes qui ne sont pas secondaires à l'hypertension et qui pourraient refléter un trait génétique.

d-Effet des IEC sur les récepteurs des kinines centrales

Il est plausible que les IEC et le losartan passent la barrière hémato-encéphalique et modulent l'expression des récepteurs centraux des kinines. Le traitement chronique avec les IEC cause notamment la surexpression des récepteurs B₂ dans la moelle épinière du rat SHR, alors qu'en périphérie ces drogues sont connues pour entraîner la surexpression des récepteurs B₁ vasculaires et rénaux chez le rat SHR, WKY ainsi que chez la souris KOB₂ (Marin Castaño et al., 2002; Duguay et al., 2004). Le taux d'ARNm des récepteurs B₂ n'est toutefois pas affecté par les IEC dans les vaisseaux et les reins du rat normal (Marin Castaño et al., 2002). Bien qu'en périphérie, le récepteur B₁ participe aux effets hypotenseurs des IEC chez le rat (Marin Castaño et al., 2002; Bascands et al., 2003) et l'homme (Ignjatovic et al., 2002), cette possibilité au niveau central est peu probable.

Ainsi, la régulation centrale des récepteurs des kinines par les IEC semble différente par rapport à leur régulation en périphérie. La surexpression des récepteurs B₁ par les IEC dans la moelle épinière du jeune rat SHR telle que nous l'avons observée est un phénomène intéressant qui s'inscrit dans un contentieux.

En effet, la surexpression des récepteurs B₁ observée dans les vaisseaux de lapin après un traitement aigu de 18 heures aux IEC (Nwator et Whalley, 1989) n'a pas été confirmée après 48 heures de traitement (Marceau et al., 1999). Nos résultats montrent qu'un traitement chronique de 4 semaines induit le récepteur B₁ dans la moelle épinière alors que les traitements plus courts ou de plus longue durée ne montrent aucun effet en accord avec les résultats sur l'aorte du rat SHR (Dugay et al., 2004). Ainsi, l'induction des récepteurs B₁ par les IEC est un processus controversé qui pourrait dépendre de l'espèce et de la durée du traitement.

e- Mécanisme d'action des IEC sur les récepteurs des kinines

Même si l'on sait que les IEC augmentent le nombre de récepteurs B_1 en périphérie, le mécanisme de ce phénomène reste inconnu et les avis à ce sujet sont partagés (Minshall et al., 1997; Marcic et al., 1999; Gobeil et al., 2002; Tom et al., 2003).

En effet, alors que certains auteurs évoquent la stimulation directe du récepteur B_1 par les IEC (Ignjatovic et al., 2002), d'autres ne parviennent pas à ces résultats (Fortin et al., 2003). En ce qui concerne le récepteur B_2 , il a été suggéré qu'en présence des IEC, les effets de la BK sont potentialisés par l'induction de la formation d'interactions heterologues complexes « cross-talk » entre l'EC et le récepteur B_2 (Marcic et al., 1999). En effet, même si les IEC n'agissent pas directement sur les récepteurs B_2 (Erdos et Marcic, 2001), ils peuvent interférer avec les mécanismes de séquestration et d'internalisation des récepteurs B_2 dans les cellules CHO (cellules d'ovaire de hamster Chinois) et dans des tissus isolés (Minshall et al., 1997; Tom et al., 2003). Aussi l'induction de cross-talk ou la formation d'hétéro-dimères stables entre les récepteurs B_2 et AT1 pourrait altérer le potentiel d'internalisation du récepteur B_2 (Abdalla et al., 2000) ou sa re-sensibilisation à son agoniste (Tschope et al., 1997).

Par contre, d'autres études entreprises avec des analogues de la BK, résistants à l'EC, n'ont pas permis de confirmer la potentialisation de la BK et/ou la re-sensibilisation des récepteurs B_2 indépendamment de l'hydrolyse du peptide dans des modèles physiologiques (Dendorfer et al., 2001; Gobeil et al., 2002; Tom et al., 2002).

f. Plasticité des récepteurs centraux des kinines chez le rat SHR

Le jeune rat SHR (8 semaines) montre une forte expression du récepteur B_1 qui diminue avec l'âge alors que la densité du récepteur B_2 augmente avec l'âge, montrant l'influence de l'âge sur la densité des récepteurs B_1 et B_2 de manière opposée.

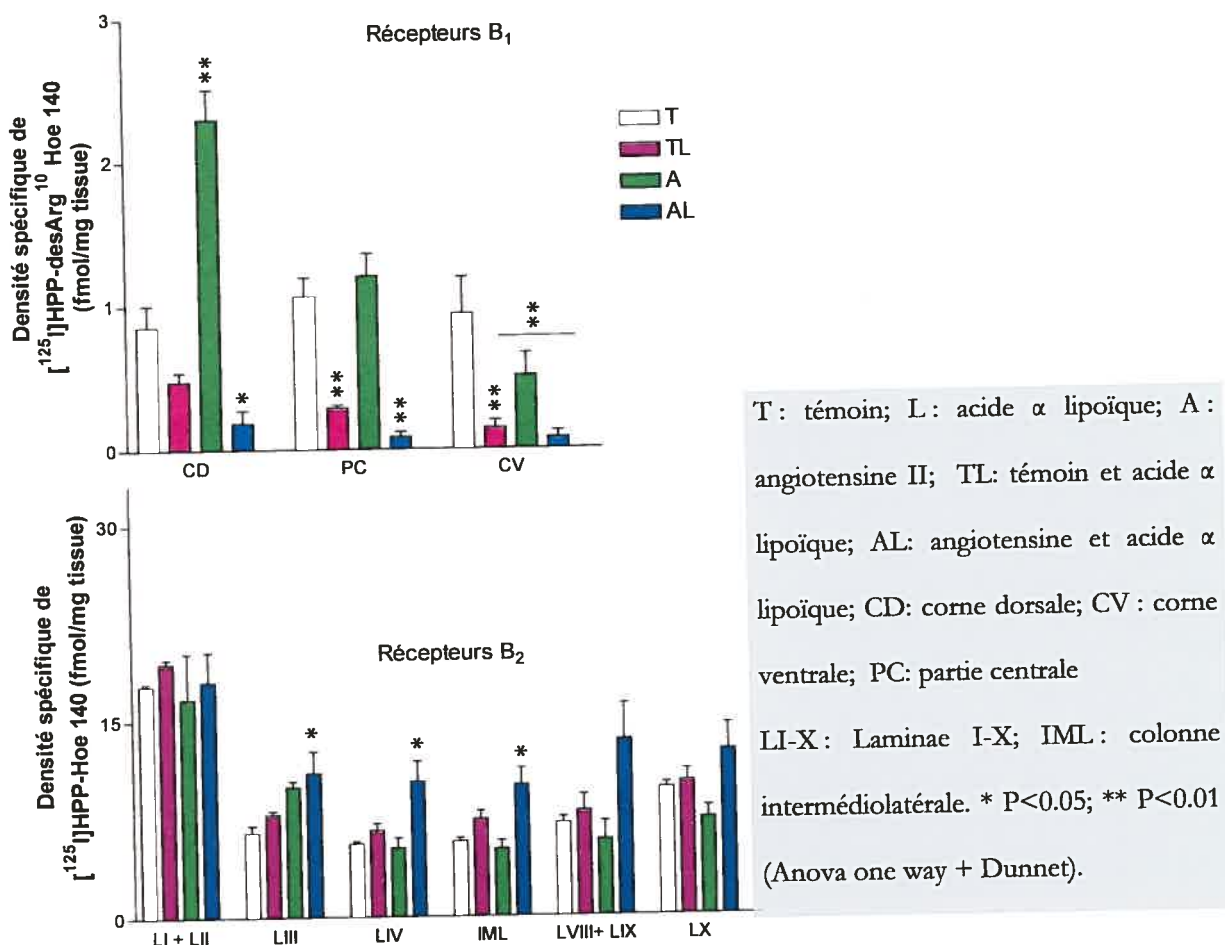
De même, le traitement chronique avec les IEC montre également une régulation réciproque des récepteurs des kinines, suggérant l'existence d'une plasticité des récepteurs B_1 et B_2 des

kinines en fonction de l'âge, de la durée des traitements aux antihypertenseurs et/ou de l'état pathologique comme nous l'avons précédemment évoqué dans le cas du rat kindling.

Afin d'élargir la question de la plasticité centrale des récepteurs B_1 et B_2 , nous avons récemment conduit une étude en autoradiographie dans un modèle induit d'hypertension artérielle produit par une infusion à l'angiotensine II (200ng/kg/j) à l'aide d'une pompe osmotique pendant deux semaines chez le rat Sprague-Dawley sous un traitement chronique ou non de quatre semaines avec de l'acide alpha lipoïque (1000 mg/kg de nourriture), un puissant anti-oxydant. Les résultats de cette étude (voir figure 19) montrent que l'infusion chronique d'angiotensine II chez les rats non traités à l'acide alpha lipoïque augmente significativement la pression systolique (Petcu et al., 2004a) et l'expression des récepteurs B_1 dans la moelle épinière, alors qu'aucun effet sur le récepteur B_2 n'est noté. Par contre, l'acide alpha lipoïque parvient à normaliser la pression systolique (Petcu et al., 2004a) et prévient l'augmentation du récepteur B_1 dans la moelle épinière tout en augmentant l'expression du récepteur B_2 (figure 19). Ces données suggèrent que l'augmentation du récepteur B_1 dans la moelle épinière des rats traités à l'angiotensine II est secondaire au stress oxydatif et/ou à l'hypertension artérielle. Les résultats montrent également une relation opposée entre l'expression des récepteurs B_1 et B_2 après le traitement à l'acide α -lipoïque, suggérant que l'hypertension artérielle et/ou le stress oxydatif ont une influence opposée sur ces deux récepteurs. Ainsi, l'expression des récepteurs des kinines dans la moelle épinière semble être modulée à la fois par des facteurs génétiques comme dans le cas du SHR, par l'hypertension artérielle et le stress oxydatif.

Sur la base des résultats obtenus chez le rat SHR, il serait tentant d'avancer l'hypothèse selon laquelle le stress oxydatif plutôt que l'hypertension artérielle est responsable de l'augmentation du récepteur B_1 et d'inhibition du récepteur B_2 dans le modèle à l'angiotensine.

Figure 19: Distribution des récepteurs B₁ et B₂ chez le rat traité à l'angiotensine II



2.2.1. Perspectives

- 1- Même si l'hypersensibilité centrale à la BK ne semble pas être liée à l'hypertension, le fait qu'elle soit liée à la surexpression des récepteurs B₂ qui augmentent davantage au cours des traitements antihypertenseurs soulève la question des conséquences de cette augmentation. Aussi, il serait intéressant de savoir si l'augmentation des récepteurs B₂ par les IEC augmente également la sensibilité des rats SHR à l'injection centrale de la BK.
- 2- L'augmentation des récepteurs B₁ dans la moelle épinière des rats SHR et WKY de 8 semaines d'âge est un phénomène intrigant qui soulève plusieurs questions sur le rôle de ces récepteurs en phase pré-hypertensive. Aussi, conduire des études en autoradiographie chez des

animaux SHR et WKY de l'embryon à l'âge adulte permettrait de comprendre si ces récepteurs sont liés ou non à la pathogenèse depuis le bas âge ou s'ils apparaissent seulement dans une fenêtre de temps limitée, avant l'installation de la pathologie. Le stress oxydatif pourrait également être mesuré et l'utilisation d'un agent anti-oxydant (acide α -lipoïque) chez ces rats permettrait de mieux comprendre la contribution du stress oxydatif.

3- Même si la surexpression des récepteurs B₂ dans la moelle épinière du rat SHR n'est pas secondaire à l'hypertension, aucune donnée ne montre si en contrepartie, cette surexpression ne participe pas à l'induction de l'hypertension chez le rat SHR. Cette question peut être adressée par un traitement chronique des rats SHR de 4 semaines à 16 semaines d'âge avec des antagonistes B₁ et/ou B₂ non peptidiques pour mesurer l'impact de ces traitements sur la pression artérielle. Cette étude pourrait être étendue à d'autres modèles d'hypertension artérielle (rats DOCA-sel et Wistar infusés à l'angiotensine II).

2.3.0. Le diabète de type 1

Le diabète mellitus insulino-dépendant (type 1) est une maladie inflammatoire auto-immune caractérisée par la destruction spécifique des cellules β des îlots de langerhans productrices d'insuline. Elle est associée à une hyperglycémie chronique et à la surproduction des cytokines tels IL-1 β et TNF- α (Hussain et al., 1996; Rabinovitch, 1998; Rabinovitch et Suarez-Pinzon, 1998). Ces cytokines causent l'induction des récepteurs B₁ via le facteur NF-kB (Marceau et al., 1998; Shanstra et al., 1998).

a- La destruction des cellules β de langerhans et modèle à la STZ

Une dichotomie fonctionnelle et phénotypique au sein des cellules T helper CD4⁺ a été mise en évidence en 1986 (Mosmann et al., 1986) sur des lignées cellulaires T clonées. La première

sous population, appelée Th1, est capable de produire les interleukines IL-2, IL-3, l'interféron Gama ($IFN\gamma$) et lymphotoxine, en plus d'être responsable des réactions d'hypersensibilité retardée, de l'activation des macrophages, de la destruction de cellules lymphomateuses B. Elle est ainsi plus impliquée dans les réactions de défense contre les pathogènes intracellulaires.

La seconde sous population, appelée Th2, se caractérise par la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10. Elle est impliquée dans l'aide à la production d'anticorps par les cellules B, dans les réactions d'hypersensibilité immédiate par les IgE, et de manière générale dans les réactions de défense contre les pathogènes extracellulaires. La réponse immune pathogénique est ainsi régulée par le sous type des cellules cytotoxiques Th1 alors que la réponse protectrice est régulée par le sous type Th2 (Bach, 1994). Th1 et Th2 sont caractérisés par leurs produits de sécrétion en cytokines (Singh et Rabinovitch, 1993). Tel que mentionné, les cytokines Th1 activent la réponse immune cellulaire alors que les Th2 sont plus efficaces dans l'activation des réponses immunes hormonales. Les réponses Th1 et Th2 sont autocontrôlées, chacune inhibant l'autre (Mosmann et Coffman, 1989; Powrie et Coffman, 1993). C'est la rupture de cet équilibre qui serait responsable de la destruction de la cellule β .

En effet, certaines protéines de la cellule β agissent comme des auto-antigènes ($A\beta$) qui vont sensibiliser des cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages, et les cellules dendritiques (CPA). Subséquemment se forme un complexe entre ces cellules et le complexe d'histocompatibilité de classe II (CMH II). De ce complexe, va naître plusieurs signaux dont l'IL-12, qui va se charger d'activer les cellules T CD4+, en prédominance les cellules de l'immunité cellulaire. C'est-à-dire les Th1. Les Th1, activés par l'antigène, produisent les cytokines IL-2, et $IFN\gamma$ qui vont inhiber la production des interleukines IL-4 et IL-10 par les Th2, en plus d'activer les macrophages et les cellules cytotoxiques T CD8+. Ces cellules vont à leur tour se charger de détruire les cellules β de Langerhans par un ou deux types de mécanismes incluant: (i) des interactions directes antigènes–cellules T spécifiques; (ii) des

interaction non spécifiques des médiateurs inflammatoires comme les radicaux libres/oxydants (O_2^* et H_2O_2 , NO^*) et les cytokines IL-1, $INF\gamma$, $TNF\alpha$, $TNF\beta$ (Reimers, 1998 ; Rabinovitch et Suarez-Pinzon, 1998; Ho et Bray, 1999). Parmi toutes, $NF\gamma$ semble être le plus redoutable (Herold et al., 1996). L'augmentation de la concentration locale de l'IL-1 est potentialisée par $TNF\alpha$ et l' $INF\gamma$ (Rabinovitch et Suarez-Pinzon, 1998).

b- L'hyperglycémie et le récepteur B_1 dans la moelle épinière

Cela étant, l'hypothèse de la production des cytokines durant le déclenchement de la maladie induite par l'action inflammatoire de la STZ sur les cellules β des îlots de langerhans (Lukic et al., 1998) et l'activation de NF-kB par l'hyperglycémie et le stress oxydatif (Yerneni et al., 1999) représentent les facteurs putatifs connus pour induire le récepteur B_1 (Marceau et al., 1998).

Le rat et la souris traités à la streptozotocine (STZ, un antibiotique qui détruit spécifiquement les îlots de langerhans), constituent d'excellents modèles qui miment le diabète de type 1 chez l'humain. De nombreuses études ont signalé la surexpression des récepteurs B_1 dans plusieurs tissus périphériques chez le rat diabétique STZ, incluant les poumons (Vianna et al., 2003), la rétine (Abdouh et al., 2003) et la patte (Campos et al., 2001; 2002). Des données pharmacologiques montrant une augmentation de la pression artérielle (Cloutier et Couture, 2000) et une hyperalgésie (Couture et al., 2001) à la suite de l'administration intrathécale de l'agoniste B_1 , desArg⁹BK, chez le rat STZ (et non chez le rat témoin) ont suggéré l'induction et la surexpression des récepteurs B_1 dans la moelle épinière du rat STZ. Ces effets cardiovasculaires seraient tributaires de l'activation du système sympathique par un mécanisme qui implique les prostaglandines (Cloutier et Couture 2000), alors que les effets nociceptifs seraient associés à la relâche de la substance P par les fibres sensorielles (Couture et al., 2001). Nos résultats en autoradiographie et en hybridation *in situ* confirment l'existence et la

surexpression des récepteurs B₁ dans la moelle épinière du rat diabétique-STZ, en accord avec les études fonctionnelles.

Cependant, on remarque que les récepteurs B₁ restent surexprimés chez le rat STZ au cours des trois premières semaines de la maladie alors que son ARNm tend à diminuer 21 jours après l'administration de la STZ. Ceci suggère un recyclage rapide des récepteurs B₁ qui semble être influencé par la durée de la pathologie. Toutefois, étant donné qu'en périphérie l'administration des antagonistes B₁ procure des effets bénéfiques sur la perméabilité vasculaire (Simard et al., 2002), la glycémie et les fonctions rénales chez la souris STZ (Zuccollo et al., 1996; 1999) et que l'administration centrale des antagonistes B₁ inhibe l'hyperalgésie chez le rat STZ (Couture et al., 2001), on peut suggérer un rôle préjudiciable pour les récepteurs B₁ chez le rat STZ. Cette hypothèse suggère donc que la présence du récepteur B₁ dans la moelle épinière du rat diabétique offre une cible thérapeutique prometteuse pour les complications diabétiques, vu que son activation entraîne des effets cardiovasculaires et nociceptifs (Cloutier et Couture 2000; Couture et al., 2001). La présence et la surexpression de ces récepteurs au niveau de la moelle épinière et des tissus périphériques valide le modèle du rat traité à la STZ pour l'étude des récepteurs B₁ tant en périphérie qu'en central.

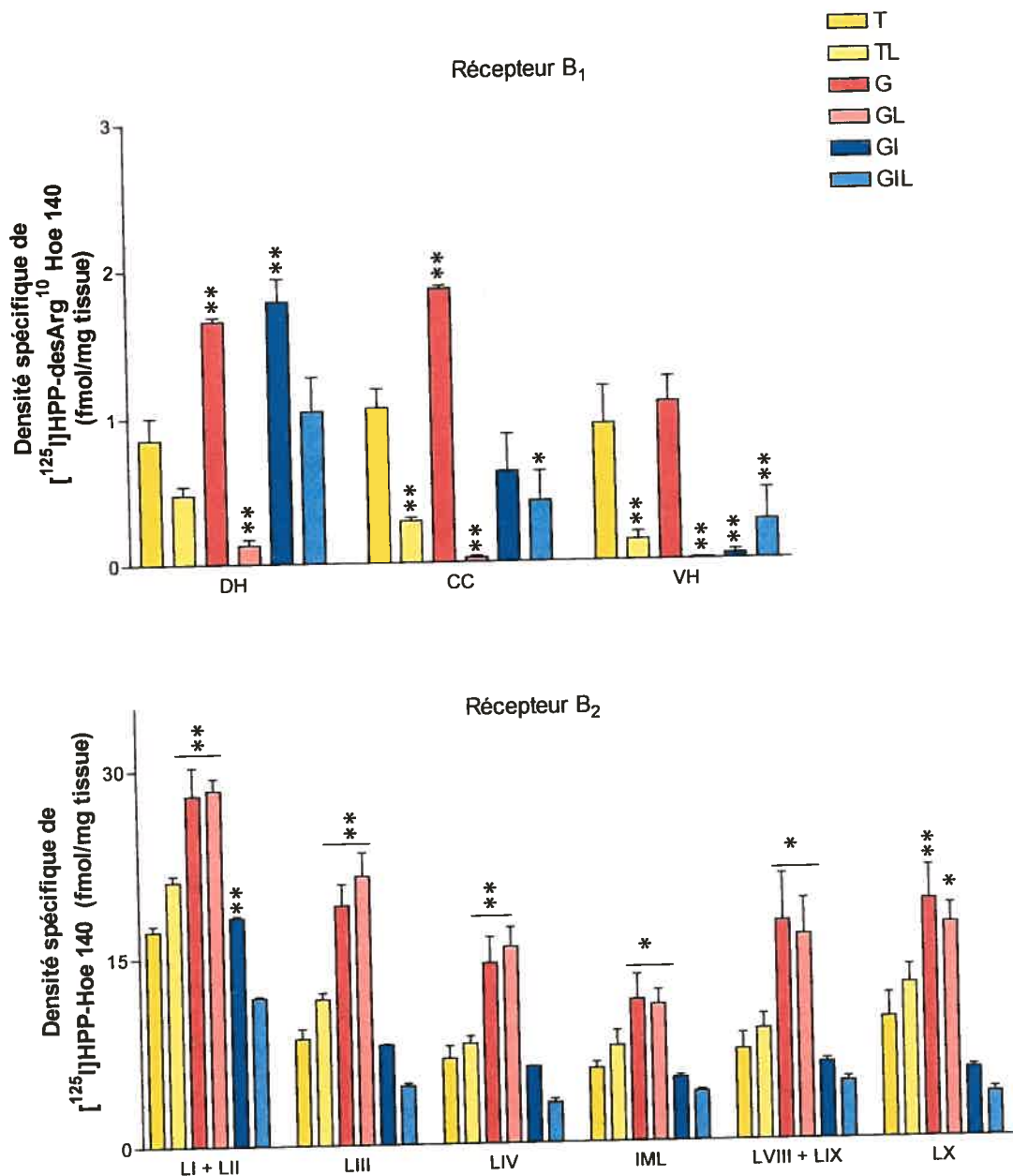
Ceci étant, il devient important de comprendre le ou les facteurs déclencheurs de ces récepteurs au niveau central où ils peuvent être impliqués dans des complications diabétiques, notamment les neuropathies (Petcu et al., 2004b).

Le premier suspect, reste bien entendu l'hyperglycémie que nous avons investiguée dans une étude récente en autoradiographie sur la moelle épinière des rats Sprague Dawley ayant reçu un traitement de quatre semaines avec du glucose (10% dans l'eau à boire) en présence ou pas d'acide alpha lipoïque (1000 mg/kg de nourriture) et/ou d'insuline (9 mU/kg/j avec une pompe osmotique). Les rats traités au glucose (G) et glucose-insuline (GI) finissent par développer une résistance à l'insuline et font office de modèle de diabète de type 2. Des rats

Sprague Dawley avec une diète normale (T) et traités ou non à l'acide alpha lipoïque (TL) ont servi de témoins. Les résultats de cette étude montrent qu'après les quatre semaines de traitement, les deux groupes de rats traités avec le glucose présentent une augmentation de la glycémie, de l'insulinémie, de la pression artérielle, de l'index de résistance à l'insuline et aussi de la densité du récepteur B₁ dans la corne dorsale de la moelle épinière. Tous ces effets sont prévenus ou atténués par le traitement à l'acide alpha lipoïque (Midaoui et al., 2004).

Il est intéressant de noter que le récepteur B₂ augmente dans la majorité des laminae dans le groupe traité au glucose, mais pas dans le groupe traité au glucose avec l'insuline, suggérant une interaction entre l'insuline et le récepteur B₂. Par contre, l'augmentation du récepteur B₂ dans le groupe glucose reste inaffectée par l'acide alpha lipoïque (GL) suggérant également que l'augmentation du récepteur B₂ n'est pas reliée à un processus oxydatif.

Figure 20: Distribution des récepteurs des kinines dans deux modèles de résistance à l'insuline chez le rat



T : témoin; G : glucose; L : acide alpha lipoïque. GI : glucose,insuline; GIL : glucose, insuline, acide alpha lipoïque; DH : corne dorsale; VH : corne ventrale; LI-X : Laminae I-X; IML : colonne intermédiaire latérale. * P<0.05; **, P<0.01 (Anova one way + Dunnet)

Ces résultats (voir figure 20) montrent clairement que la surexpression du récepteur B₁ dans les deux modèles de résistance à l'insuline (glucose, glucose et insuline) comme dans le diabète de

type 1 est secondaire à l'hyperglycémie et non à une déficience en insuline, suggérant ainsi un lien entre l'induction du récepteur B_1 et l'hyperglycémie. Les résultats avec l'acide alpha lipoïque suggèrent que le stress oxydatif et la production de l'anion super oxyde, que l'on sait relier à la résistance à l'insuline, sont également associés à l'induction centrale du récepteur B_1 . On peut donc exclure l'implication directe de la STZ sur la moelle épinière dans l'induction du récepteur B_1 , 3 semaines après l'injection de la STZ sur la base de deux arguments: (1) la STZ est sélectivement toxique pour les cellules β pancréatiques où il cause l'inflammation associée aux cytokines (Tomlinson et al., 1992; Lukic et al., 1998) (2) la STZ est sujette à une dégradation métabolique rapide dans le foie. Sa demi-vie sérique est de 15 min alors que sa clairance rénale est de 70% à l'intérieur des 6 premières heures (Like & Rossini, 1976; Karunanayake et al., 1976).

De plus, il a été montré que l'administration ICV de la STZ chez le rat, ne produit pas l'hyperglycémie, mais entraîne des déficits cognitifs, du stress oxydatif et une déplétion du métabolisme du glucose dans le cerveau (par un mécanisme inconnu) (Sharma et Gupta, 2002).

2.3.1. Perspectives

La présence du récepteur B_1 dans la moelle épinière du rat diabétique-STZ pourrait servir d'indicateur suggérant que le SNC est aussi bien exposé aux hyperglycémies que les organes périphériques. D'où l'importance d'approfondir les connaissances sur cette apparition du récepteur B_1 dans la moelle épinière du rat diabétique-STZ.

1- Mesurer le stress oxydatif dans la moelle épinière des rats diabétiques-STZ ainsi que dans les deux modèles de résistance à l'insuline avant et après l'induction du diabète, en présence ou non d'antioxydant en traitement préventif.

2- Traiter les rats diabétiques de types 1 et 2 avec des antagonistes non peptidiques B_1 et/ou B_2 et évaluer l'impact de ces traitements sur la glycémie, l'insulinémie et sur la densité des récepteurs B_1 et B_2 des kinines dans la moelle épinière et le cerveau.

3- L'activation d'un récepteur couplé à la protéine G par son ligand entraîne la transduction d'un message à l'intérieur de la cellule par un mécanisme faisant intervenir les protéines-G hétérotrimériques ($G\alpha$, $G\beta\gamma$) liant, suivant leur état d'activation, les nucléotides guanyliques GDP ou GTP (pour revues, Bockaert et Pin, 1998; Sarret, 2000). Ainsi, la liaison d'un ligand à son récepteur entraîne, par le jeu de modifications de conformation, la catalyse de l'échange de la molécule de GDP (état inactif) en GTP (état actif) au niveau du site nucléotidique de la sous unité $G\alpha$. La liaison du GTP au site actif de la sous unité $G\alpha$ induit la dissociation de $G\alpha$ et de $G\beta\gamma$. L'hydrolyse du GTP en GDP au niveau du site actif de la sous unité $G\alpha$ par une GTPase intrinsèque stimulée par des protéines RGS (Regulator of G-protein Signaling) permet le découplage de la sous unité $G\alpha$ des effecteurs. L'hétéro trimère $G\alpha$ - $G\beta\gamma$ se forme à nouveau et permet le retour à l'état inactif initial. Ceci étant, l'état de couplage peut être mesuré en autoradiographie en utilisant du GTP marqué au soufre 34 ($GTP\gamma S$).

En effet, en présence de son agoniste, la sous-unité $G\alpha$ activée va se détacher de la sous-unité $G\beta\gamma$ et lier le GTP marqué. Vu que ce dernier est couplé à une sous unité γ , la liaison à la sous-unité active $G\alpha$ va maintenir un état de couplage virtuel, montrant le nombre de sites qui s'activent en présence de l'agoniste. Ainsi, la localisation cellulaire des récepteurs B_1 et B_2 par immunohistochimie dans la moelle épinière et le cerveau du rat STZ de 7, 14 et 21 jours post-traitement couplé à l'autoradiographie du $GTP\gamma S$ permettrait d'évaluer le couplage des récepteurs B_1 et B_2 dans les conditions pathologiques et d'identifier la localisation cellulaire de ces récepteurs.

4- Évaluer les paramètres cardiovasculaires par injection intrathécale de la BK ou de la desArg⁹BK dans les modèles de rats diabétiques de type 2.

3.0. Conclusions

Les travaux de cette thèse sont pionniers dans le vaste et complexe domaine des kinines en physiopathologie centrale.

Au cours de cette étude, nous avons développé un nouveau ligand pour l'autoradiographie des récepteurs B₁ ($[^{125}\text{I}]\text{HPP-desArg}^{10}$ Hoe 140), consolidé les bases méthodologiques en autoradiographie quantitative pour le récepteur B₂ et mis au point les bases méthodologiques pour étudier l'ARNm du récepteur B₁ en hybridation *in situ*.

Bien que plusieurs questions demandent à être approfondies, les résultats obtenus ont non seulement jeté des bases de compréhension pour certains contentieux, notamment sur la régulation des récepteurs des kinines par les IEC, mais en plus, ils ont ouvert des avenues pour la suite de la quête d'informations additionnelles sur ces récepteurs. Entre autres, nos travaux ont fourni la première cartographie des récepteurs B₁ et B₂ dans le cerveau du rat. Ce qui constitue un atout majeur dans la mesure où cet animal est très souvent sollicité dans le milieu de la recherche. Une cartographie complète des récepteurs B₁ et B₂ dans le cerveau de souris (non encore publié) constitue un complément dans ce même ordre d'idées. De plus, nous avons montré la grande plasticité des récepteurs des kinines en fonction de l'âge, des traitements antihypertenseurs ou de la situation physiopathologique. Ces changements seraient de nature à favoriser l'expression des récepteurs d'intérêt en fonction de la situation qui prévaut. Ainsi, l'on peut comprendre la prédominance centrale des récepteurs B₂ dans les conditions physiologiques normales et des récepteurs B₁ en conditions pathologiques.

Toutefois, on notera que les changements arborés par ces récepteurs ne sont pas tous bénéfiques. La situation la plus dommageable reste celle qui associe l'augmentation des récepteurs B₁ et la diminution marquée des récepteurs B₂ (cas de l'épilepsie temporale).

Ainsi, la distribution étendue des récepteurs B_1 et B_2 centraux ainsi que leur plasticité sont autant d'éléments qui font des kinines d'excellentes cibles thérapeutiques dans le traitement des maladies neurologiques et cardiovasculaires.

RÉFÉRENCES

1. **Abadir PM, Carey RM, Siragy HM.** Angiotensin AT2 receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B2-receptor-null mice. *Hypertension.* 42: 600-604, 2003.
2. **AbdAlla S, Lothar H, Quitterer U.** AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature.* 407: 94-98, 2000.
3. **AbdAlla S, Zaki E, Lothar H, Quitterer U.** Involvement of the amino terminus of the B(2) receptor in agonist-induced receptor dimerization. *J. Biol. Chem.* 274: 26079-26084, 1999.
4. **Abdoun M, Khanjari A, Abdelazziz N, Ongali B, Couture R, Hassessian HM.** Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *Br. J. Pharmacol.* 140:33-40, 2003.
5. **Abelous JE, Bardier E.** Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *C.R. Seances Soc Biol.* 66: 511, 1909.
6. **Acharya KR, Sturrock ED, Riordan JF, Ehlers MR.** Ace revisited: a new target for structure-based drug design. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2: 891-902, 2003.
7. **Agata J, Miao RQ, Yayama K, Chao L, Chao J.** Bradykinin B(1) receptor mediates inhibition of neointima formation in rat artery after balloon angioplasty. *Hypertension* 36: 364-370, 2000.
8. **Albensi BC.** Potential roles for tumor necrosis factor and nuclear factor-kappaB in seizure activity. *J. Neurosci. Res.* 66: 151-154, 2001.
9. **Alfie ME, Sigmon DH, Pomposiello SI, Carretero OA.** Effect of high salt intake in mutant mice lacking bradykinin-B2 receptors. *Hypertension* 29: 483-487, 1997.

10. **Alfie ME, Yang XP, Hess F, Carretero OA.** Salt-sensitive hypertension in bradykinin B2 receptor knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224: 625-630, 1996.
11. **Allan SM, Rothwell NJ.** Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.* 2: 734-744, 2001.
12. **Alvarez AL, Delorenzi A, Santajuliana D, Finkielman S, Nahmod VE, Pirola CJ.** Central bradykininergic system in normotensive and hypertensive rats. *Clin Sci (Lond).* 82: 513-519, 1992.
13. **Amiri F, Venema VJ, Wang X, Ju H, Venema RC, Marrero MB.** Hyperglycemia enhances angiotensin II-induced JAK/STAT signaling in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 274: 32382-32386, 1999.
14. **Andrade SO, Rocha e Silva M.** Purification of bradykinin by ion exchange chromatography. *Biochem J.* 64: 701-705, 1956.
15. **Angel J, Audubert F, Bismuth G, Fournier C.** IL-1 beta amplifies bradykinin-induced prostaglandin E2 production via a phospholipase D-linked mechanism. *J. Immunol.* 152: 5032-5040, 1994.
16. **Angers M, Drouin R, Bachvarova M, Paradis I, Marceau F, Bachvarov DR.** In vivo protein-DNA interactions at the kinin B(1) receptor gene promoter: no modification on interleukin-1 beta or lipopolysaccharide induction. *J. Cell Biochem.* 78: 278-296, 2000.
17. **Ardaillou R.** Angiotensin II receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: S30-S39, 1999.
18. **Argañaraz GA, Silva JA Jr, Perosa SR, Pessoa LG, Carvalho FF, Bascands JL, Bader M, da Silva Trindade E, Amado D, Cavalheiro EA, Pesquero JB, da Graca Naffah-Mazzacoratti M.** The synthesis and distribution of the kinin B1 and

- B2 receptors are modified in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res.* 1006: 114-125, 2004.
19. **Atkinson MA, Maclaren NK.** The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 331: 1428-1436, 1994.
 20. **Audet R, Rioux F, Drapeau G & Marceau F.** Cardiovascular effects of Sar-[D-Phe⁸]des-Arg⁹-bradykinin, a metabolically protected agonist of B1 receptor for kinins, in the anesthetized rabbit pretreated with a sublethal dose of bacterial lipopolysaccharide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280: 6-15, 1997.
 21. **Austin CE, Faussner A, Robinson HE, Chakravarty S, Kyle DJ, Bathon JM, Proud D.** Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. *J. Biol. Chem.* 272:11420-11425, 1997.
 22. **Bach JF.** Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr. Rev.* 15:516-542, 1994.
 23. **Bachvarov DR, Hess JF, Menke JG, Larrivee JF, Marceau F.** Structure and genomic organization of the human B₁ receptor gene for kinins (BDKRB1). *Genomics* 33: 374-381, 1996.
 24. **Bachvarov DR, Houle S, Bachvarova M, Bouthillier J, Adam A, Marceau F.** Bradykinin B(2) receptor endocytosis, recycling, and down-regulation assessed using green fluorescent protein conjugates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297: 19-26, 2001.
 25. **Bachvarov DR, Hess JF, Menke JG, Larrivee JF, Marceau F.** Structure and genomic organization of the human B1 receptor gene for kinins (BDKRB1). *Genomics.* 33: 374-381, 1996.
 26. **Baldwin AS Jr.** The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14: 649-683, 1996.

27. **Bancaud J, Talairach J, Geier S, Bonis A, Trottier S, Manrique M.** [Behavioral manifestations induced by electric stimulation of the anterior cingulate gyrus in man] *Rev. Neurol. (Paris)*. 132: 705-724, 1976.
28. **Banno Y, Fujita H, Ono Y, Nakashima S, Ito Y, Kuzumaki N, Nozawa Y.** Differential phospholipase D activation by bradykinin and sphingosine 1-phosphate in NIH 3T3 fibroblasts overexpressing gelsolin. *J. Biol. Chem.* 274: 27385-27391, 1999.
29. **Barabe J, Marceau F, Theriault B, Drouin JN, Regoli D.** Cardiovascular actions of kinins in the rabbit. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57: 78-91, 1979.
30. **Barabe J, Park WK, Regoli D.** Application of drug receptor theories to the analysis of the myotropic effects of bradykinin. *Can J Physiol Pharmacol.* 53: 345-53, 1975.
31. **Bascands JL, Schanstra JP, Couture R, Girolami JP.** Bradykinin receptors: towards new pathophysiological roles. *Med. Sci. (Paris)*. 19: 1093-1100, 2003.
32. **Beaubien G, Rosinski-Chupin I, Mattei MG, Mbikay M, Chretien M, Seidah NG.** Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry* 30: 1628-1635, 1991.
33. **Beckman JS, Koppenol WH.** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271: C1424-C1437, 1996.
34. **Belhassen L, Feron O, Kaye DM, Michel T, Kelly RA.** Regulation by cAMP of post-translational processing and subcellular targeting of endothelial nitric-oxide synthase (type 3) in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 11198-11204, 1997.
35. **Belichard P, Loillier B, Paquet JL, Luccarini JM, Pruneau D.** Haemodynamic and cardiac effects of kinin B1 and B2 receptor stimulation in conscious instrumented dogs. *Br. J. Pharmacol.* 117: 1565-1571, 1996.

36. **Ben Nasr A, Herwald H, Sjobring U, Renne T, Muller-Esterl W, Bjorck L.** Absorption of kininogen from human plasma by *Streptococcus pyogenes* is followed by the release of bradykinin. *Biochem J.* 326:657-660, 1997.
37. **Benetos A, Levy BI, Lacolley P, Taillard F, Duriez M, Safar ME.** Role of angiotensin II and bradykinin on aortic collagen following converting enzyme inhibition in spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 17: 3196-3201, 1997.
38. **Bernard C, Cossart R, Hirsch JC, Esclapez M, Ben-Ari Y.** What is GABAergic inhibition? How is it modified in epilepsy? *Epilepsia.* 41: S90-S95, 2000.
39. **Bernstein KE.** Two ACEs and a heart. *Nature.* 417: 799-802, 2002.
40. **Benbow U, Brinckerhoff CE.** The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol.* 15: 519-26, 1997.
41. **Bhoola KD.** Translocation of the neutrophil kinin moiety and changes in the regulation of kinin receptors in inflammation. *Immunopharmacology.* 33: 247-256, 1996.
42. **Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K.** Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* 44: 1-80, 1992.
43. **Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP.** AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res.* 37: 586-600, 1998.
44. **Blais C Jr, Drapeau G, Raymond P, Lamontagne D, Gervais N, Venneman I, Adam A.** Contribution of angiotensin-converting enzyme to the cardiac metabolism of bradykinin: an interspecies study. *Am. J. Physiol.* 273:H2263-H2271, 1997.

45. **Blaukat A, Alla SA, Lohse MJ, Muller-Esterl W.** Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 271: 32366-32374, 1996.
46. **Bockaert J, Pin JP.** [Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success] *C. R. Acad. Sci. III.* 321: 529-551, 1998.
47. **Boissonnas RA, Guttman S Jaquenoud PA.** Synthèse de la L-arginyl-L-prolyl-L-prolyl-L-glycyl-L-phenylalanyl-L-Seryl-L-prolyl L-L-phenylalanyl-arginine, un nonapeptide présentant les propriétés de la bradykinine. *Helv. Chim. Acta.* 43: 1349-1355, 1960.
48. **Borlongan CV, Emerich DF.** Facilitation of drug entry into the CNS via transient permeation of blood brain barrier: laboratory and preliminary clinical evidence from bradykinin receptor agonist, *Cereport. Brain Res. Bull.* 60: 297-306, 2003.
49. **Boulanger E, Dequiedt P, Wautier JL.** [Advanced glycosylation end products (AGE): new toxins?] *Nephrologie.*;23: 351-359, 2002.
50. **Boulanger E, Wautier MP, Wautier JL, Boval B, Panis Y, Wernert N, Danze PM, Dequiedt P.** AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney Int.* 61: 148-156, 2002.
51. **Bothwell MA, Wilson WH, Shooter EM.** The relationship between glandular kallikrein and growth factor-processing proteases of mouse submaxillary gland. *J. Biol. Chem.* 1979 254: 7287-7294, 1979.
52. **Braun A, Maier E, Kammerer S, Muller B, Roscher AA.** A novel sequence polymorphism in the promoter region of the human B2-bradykinin receptor gene. *Hum. Genet.* 97: 688-689, 1996.

53. **Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Feletou M, Godecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I, Busse R.** An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 9747-9752, 2000.
54. **Bregola G, Varani K, Gessi S, Beani L, Bianchi C, Borea PA, Regoli D, Simonato M.** Changes in hippocampal and cortical B1 bradykinin receptor biological activity in two experimental models of epilepsy. *Neuroscience.* 92: 1043-1049, 1999.
55. **Brodsky SV, Morrishow AM, Dharia N, Gross SS, Goligorsky MS.** Glucose scavenging of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 280: F480-F486, 2001.
56. **Brosnihan KB.** Effect of the angiotensin-(1-7) peptide on nitric oxide release. *Am. J. Cardiol.* 82:17S-19S, 1998.
57. **Brownlee M, Vlassara H, Cerami A.** Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med.* 101: 527-537, 1984.
58. **Bucala R, Tracey KJ, Cerami A.** Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest.* 87: 432-438, 1991.
59. **Buccafusco JJ, Serra M.** Role of cholinergic neurons in the cardiovascular responses evoked by central injection of bradykinin or angiotensin II in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.* 113: 43-51, 1985.
60. **Buck de Sousa H, Ongali B, Thibault G, Lindsey CJ, Couture R.** Autoradiographic detection of kinin receptors in the human medulla of control, hypertensive, and diabetic donors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80: 249-257, 2002.

61. **Buñag RD, Riley E, Takeda K.** Concurrent hyperglycemic and pressor effects of median forebrain bundle stimulation in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 166: 576-582, 1981.
62. **Buñag RD, Takahashi H.** Exaggerated sympathetic responses to bradykinin in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 3: 433-440, 1981.
63. **Burch RM, Axelrod J.** Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 6374-6378, 1987.
64. **Burger D, Schleuning WD, Schapira M.** Human plasma prekallikrein. Immunoaffinity purification and activation to alpha- and beta-kallikrein. *J. Biol. Chem.* 261: 324-327, 1986.
65. **Busse R, Fleming I.** Molecular responses of endothelial tissue to kinins. *Diabetes.* 45: S8-S13, 1996.
66. **Butler R, Morris AD, Burchell B, Struthers AD.** DD angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelial dysfunction in normal humans. *Hypertension* 33: 1164-8, 1999.
67. **Cain DP, Boon F, Hargreaves EL.** Evidence for different neurochemical contributions to long-term potentiation and to kindling and kindling-induced potentiation: role of NMDA and urethane-sensitive mechanisms. *Exp. Neurol.* 116: 330-338, 1992.
68. **Caldeira JC, Franci CR, Pela IR.** Bilateral lesion of hypothalamic paraventricular nucleus abolishes fever induced by endotoxin and bradykinin in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 856: 294-297, 1998.
69. **Calixto JB, Cabrini DA, Ferreira J, Campos MM.** Kinins in pain and inflammation. *Pain.* 87: 1-5, 2000.

70. **Cambier J, Dairou R.** [Myoclonic encephalopathy due to ingestion of insoluble salts of bismuth] *Arch Fr Mal App Dig.* 64: 5-9, 1975.
71. **Campbell DJ, Duncan AM, Kladis A.** Angiotensin-converting enzyme inhibition modifies angiotensin but not kinin peptide levels in human atrial tissue. *Hypertension* 34: 171-175, 1999a.
72. **Campbell DJ, Kelly DJ, Wilkinson-Berka JL, Cooper ME, Skinner SL.** Increased bradykinin and "normal" angiotensin peptide levels in diabetic Sprague-Dawley and transgenic (mRen-2)²⁷ rats. *Kidney Int.* 56: 211-221, 1999b.
73. **Campbell DJ, Kladis A, Briscoe TA, Zhuo J.** Type 2 bradykinin-receptor antagonism does not modify kinin or angiotensin peptide levels. *Hypertension* 33: 1233-1236, 1999c.
74. **Campbell DJ, Duncan AM, Kladis A, Harrap SB.** Increased levels of bradykinin and its metabolites in tissues of young spontaneously hypertensive rats. *J Hypertension* 13: 739-746, 1995.
75. **Campos MM, de Souza GE, Ricci ND, Pesquero JL, Teixeira MM, Calixto JB.** The role of migrating leukocytes in IL-1 beta-induced up-regulation of kinin B(1) receptors in rats. *Br. J. Pharmacol.* 135: 1107-1114, 2002.
76. **Campos MM, Cabrini DA, Cardozo AH, Rae GA, Toro JH, Calixto JB.** Changes in paw oedema triggered via bradykinin B(1) and B(2) receptors in streptozotocin-diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 416: 169-177, 2001.
77. **Campos MM, Souza GE, Calixto JB.** In vivo B₁ kinin-receptor up regulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. *Br. J. Pharmacol.* 127: 1851-1859, 1999.

78. **Campos MM, Souza GE, Calixto JB.** Upregulation of B1 receptor mediating des-Arg⁹-BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. *Br. J. Pharmacol.* 117: 793-798, 1996.
79. **Carey RM, Jin X, Wang Z, Siragy HM.** Nitric oxide: a physiological mediator of the type 2 (AT₂) angiotensin receptor. *Acta. Physiol. Scand.* 168: 65-71, 2000.
80. **Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM.** Update: role of the angiotensin type-2 (AT₂) receptor in blood pressure regulation. *Curr Hypertens Rep.* 2:198-201, 2000.
81. **Cervenka L, Maly J, Karasova L, Simova M, Vitko S, Hellerova S, Heller J, El-Dahr SS.** Angiotensin II-induced hypertension in bradykinin B₂ receptor knockout mice. *Hypertension* 37: 967-973, 2001.
82. **Chabot JG, Kar S, Quirion R.** Autoradiographical and immunohistochemical analysis of receptor localization in the central nervous system. *Histochem J.* 28: 729-745, 1996.
83. **Chai KX, Ni A, Wang D, Ward DC, Chao J, Chao L.** Genomic DNA sequence, expression, and chromosomal localization of the human B₁ bradykinin receptor gene BDKRB1. *Genomics* 31: 51-57, 1996.
84. **Chao J, Chao L, Swain CC, Tsai J, Margolius HS.** Tissue kallikrein in rat brain and pituitary: regional distribution and estrogen induction in the anterior pituitary. *Endocrinology.* 120: 475-482, 1987.
85. **Chen EY, Emerich DF, Bartus RT, Kordower JH.** B₂ bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol.* 427: 1-18, 2000.
86. **Chen LM, Ma J, Liang YM, Chao L, Chao J.** Tissue kallikrein-binding protein reduces blood pressure in transgenic mice. *J Biol Chem.* 271: 27590-27594, 1996.

87. **Chen X, Orfanos SE, Ryan JW, Chung AY, Hess DC, Catravas JD.** Species variation in pulmonary endothelial aminopeptidase P activity. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 1301-1307, 1991.
88. **Cholewinski AJ, Stevens G, McDermott AM, Wilkin GP.** Identification of B2 bradykinin binding sites on cultured cortical astrocytes. *J. Neurochem.* 57: 1456-1458, 1991.
89. **Christopher J, Velarde V, Zhang D, Mayfield D, Mayfield RK & Jaffa AA.** Regulation of B(2)-kinin receptors by glucose in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 280: H1537-H1546, 2001.
90. **Chung DW, Fujikawa K, McMullen BA, Davie EW.** Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats. *Biochemistry* 25: 2410-2417, 1986.
91. **Chiu AT, McCall DE, Ardecky RJ, Duncia JV, Nguyen TT, Timmermans PB.** Angiotensin II receptor subtypes and their selective nonpeptide ligands. *Receptor.* 1:33-40, 1990.
92. **Clements JA.** The molecular biology of the kallikreins and their roles in inflammation. In: *The kinin system.* Editors: Farmer SG. Academic press, San Diego, California, United States of America, 5: 71-97, 1997.
93. **Cloutier F, Couture R.** Pharmacological characterization of the cardiovascular responses elicited by kinin B(1) and B(2) receptor agonists in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 130: 375-385, 2000.
94. **Cloutier F, Ongali B, Campos MM, Thibault G, Neugebauer W, Couture R.** Correlation between brain bradykinin receptor binding sites and cardiovascular function in young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 142: 285-296, 2004.

95. **Cloutier F, de Sousa Buck H, Ongali B, Couture R.** Pharmacologic and autoradiographic evidence for an up-regulation of kinin B(2) receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 135: 1641-1654, 2002.
96. **Coelho MM, Oliveira CR, Pajolla GP, Calixto JB, Pela IR.** Central involvement of kinin B1 and B2 receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats. *Br. J. Pharmacol.* 121: 296-302, 1997.
97. **Cole TJ & Schreiber G.** The structure and expression of the genes for T-kininogen in the rat. *Agents Actions Suppl.* 38: 292-299, 1992.
98. **Colman RW, Pixley RA, Sainz IM, Song JS, Isordia-Salas I, Muhamed SN, Powell JA, Mousa SA.** Inhibition of angiogenesis by antibody blocking the action of proangiogenic high molecular-weight-kininogen. *J. Thromb. Haemost.* 1: 164-170, 2003.
99. **Colman RW, Jameson BA, Lin Y, Johnson D and Mousa SA.** Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostat) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. *Blood* 95: 543-550, 2000.
100. **Colman RW and Schmaier AH.** Contact system: A vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 90: 3819-3843, 1997.
101. **Corrêa FM, Graeff FG.** Central site of the hypertensive action of bradykinin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 192: 670-676, 1975.
102. **Corrêa FM, Graeff FG.** Central mechanisms of the hypertensive action of intraventricular bradykinin in the unanaesthetized rat. *Neuropharmacology.* 13: 65-75, 1974.
103. **Corrêa FM, Plunkett LM, Saavedra JM, Hichens M.** Quantitative autoradiographic determination of angiotensin-converting enzyme (kininase II) binding

- in individual rat brain nuclei with ^{125}I -351A, a specific enzyme inhibitor. *Brain Res.* 347: 192-195, 1985.
104. **Correa FM, Innis RB, Uhl GR, Snyder SH.** Bradykinin-like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 76: 1489-1493, 1979.
105. **Couture, R. & Girolami, JP.** Putative roles of kinin in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur. J. Pharmacol,* 500: 467-485, 2004.
106. **Couture, R., Harrison, M., Vianna R.M. & Cloutier, F.** Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol,* 429: 161-176, 2001.
107. **Couture R. & Lindsey CJ.** Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neural pathways and physiological functions. In: Quirion, R., Björklund, A., Hökfelt, T. (Eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Peptide Receptors, Part 1*, vol. 16, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands. 241-300, 2000.
108. **Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE, Oliveira-dos-Santos AJ, da Costa J, Zhang L, Pei Y, Scholey J, Ferrario CM, Manoukian AS, Chappell MC, Backx PH, Yagil Y, Penninger JM.** Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature.* 417:822-828, 2002.
109. **Cushman DW, Wang FL, Fung WC, Grover GJ, Harvey CM, Scalese RJ, Mitch SL, and DeForrest JM.** Comparisons in vitro, ex vivo, and in vivo of the actions of seven structurally diverse inhibitors of angiotensin converting enzyme (ACE). *Br. J. Clin. Pharmacol.* 28: 115S-131S, 1989.
110. **Cushman DW, Cheung HS.** Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim. Biophys. Acta.* 250: 261-165, 1971.

111. **Damas J, Bourdon V, Lefebvre PJ.** Insulin sensitivity, clearance and release in kininogen-deficient rats. *Exp Physiol.* 84: 549-557, 1999.
112. **Damas J, Delree P, Bourdon V.** Distribution of immunoreactive T-kininogen in rat nervous tissues. *Brain Res.* 569: 63-70, 1992.
113. **Das M, Soffer RL.** Pulmonary angiotensin-converting enzyme antienzyme antibody. *Biochemistry.* 15: 5088-5094, 1976.
114. **deBlois D, Orlov SN, Hamet P.** Apoptosis in cardiovascular remodeling--effect of medication. *Cardiovasc Drugs Ther.* 15: 539-545, 2001.
115. **de Bock F, Domand J, Rondouin G.** Release of TNF alpha in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage. *Neuroreport.* 7: 1125-1129, 1996
116. **Decarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, Adam A.** Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK. Influence of enalaprilat. *Am J Physiol* 270: H1340-H1347, 1996.
117. **Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang HZ, Skidgel RA, Erdos EG.** N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension.* 31: 912-97, 1998.
118. **Defendini R, Zimmerman EA, Weare JA, Alhenc-Gelas F, Erdos EG.** Angiotensin-converting enzyme in epithelial and neuroepithelial cells. *Neuroendocrinology.* 37: 32-40, 1983.
119. **Dendorfer A, Reibetamann S, Wolfrum S, Raasch W, Dominiak P.** Potentiation of kinin analogues by ramiprilat is exclusively related to their degradation. *Hypertension.* 38: 142-146, 2001.

120. **Dendorfer A, Wolfrum S, Wagemann M, Qadri F, Dominiak P.** Pathways of bradykinin degradation in blood and plasma of normotensive and hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280: H2182-H2188, 2001.
121. **Dendorfer A, Wolfrum S, Schafer U, Stewart JM, Inamura N, Dominiak P.** Potentiation of the vascular response to kinins by inhibition of myocardial kininases. *Hypertension* 35: 32-7, 2000.
122. **Deperthes D, Marceau F, Frenette G, Lazure C, Tremblay RR, Dube JY.** Human kallikrein hK2 has low kininogenase activity while prostate-specific antigen (hK3) has none. *Biochim. Biophys. Acta.* 1343:102-106, 1997.
123. **DeWitt BJ, Cheng DY, Kadowitz PJ.** des-Arg⁹-bradykinin produces tone-dependent kinin B1 receptor-mediated responses in the pulmonary vascular bed. *Circ. Res.* 75: 1064-72, 1994.
124. **Dietze G, Wicklmayr M.** [Effect of bradykinin on muscular glucose uptake in man (author's transl)] *Klin Wochenschr.* 55: 357-358, 1977.
125. **Di Mario U, Morano S, Valle E, Pozzessere G.** Electrophysiological alterations of the central nervous system in diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev.* 11: 259-277, 1995.
126. **Ding-Zhou L, Margail I, Palmier B, Pruneau D, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C.** LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces ischemic brain injury in a murine model of transient focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol.* 139: 1539-1547, 2003.
127. **Dixon BS, Sharma RV, Dickerson T, Fortune J.** Bradykinin and angiotensin II: activation of protein kinase C in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 266: C1406-C1420, 1994.

128. **Diz DI.** Bradykinin and related peptides in central control of the cardiovascular system. *Peptides*. 6: 57-64, 1985.
129. **Diz DI, Jacobowitz DM.** Cardiovascular effects of discrete intrahypothalamic and preoptic injections of bradykinin. *Brain Res. Bull.* 12: 409-417, 1984
130. **Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S.** A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ. Res.* 87:E1-9, 2000.
131. **Douillet CD, Velarde V, Christopher JT, Mayfield RK, Trojanowska ME, Jaffa AA.** Mechanisms by which bradykinin promotes fibrosis in vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta and MAPK. *Am J Physiol Heart. Circ. Physiol.* 279: H2829-H2837, 2000.
132. **Dray A, Urban L, Dickenson A.** Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 190-197, 1994.
133. **Dray A, Perkins M.** Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* 16: 99-104, 1993.
134. **Drexler H, Kurz S, Jeserich M, Munzel T, Hornig B.** Effect of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function in patients with chronic heart failure. *Am. J. Cardiol.* 76: 13E-18E, 1995.
135. **Drummond GR, Cocks TM.** Endothelium-dependent relaxations mediated by inducible B1 and constitutive B2 kinin receptors in the bovine isolated coronary artery. *Br. J. Pharmacol.* 116: 2473-2481, 1995.
136. **Duguay D, Sarkissian SD, Kouz R, Ongali B, Couture R, deBlois D.** Kinin B2 receptor is not involved in enalapril-induced apoptosis and regression of

- hypertrophy in spontaneously hypertensive rat aorta: possible role of B1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 141: 728-736, 2004.
137. **Duka I, Duka A, Kintsurashvili E, Johns C, Gavras I, Gavras H.** Mechanisms mediating the vasoactive effects of the B1 receptors of bradykinin. *Hypertension.* 42: 1021-1025, 2003.
138. **Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, Gavras H.** Vasoactive potential of the b(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circ. Res.* 88: 275-281, 2001.
139. **Elliot DF, Lewis GP, Horton EW.** The isolation of bradykinin. A plasma kinin from ox blood. *Biochem. J.* 74: 15P, 1959.
140. **Elrod K, Okamoto H, Greenbaum LM, Buccafusco JJ.** Inactivation of kallikrein and kininases and stabilization of whole rat brain kinin levels following focused microwave irradiation. *Neurochem. Res.* 11: 1463-1471, 1986.
141. **Emanuelli C, Minasi A, Zacheo A, Chao J, Chao L, Salis MB, Straino S, Tozzi MG, Smith R,** Gaspa L, Bianchini G, Stillo F, Capogrossi MC, Madeddu P. Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation.* 103: 125-132, 2001.
142. **Emanuelli C, Chao J, Regoli D, Chao L, Ni A, Madeddu P.** The bradykinin B1 receptor and the central regulation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* 126: 1769-1776, 1999.
143. **Emanuelli C, Fink E, Milia AF, Salis MB, Conti M, Demontis MP, Madeddu P.** Enhanced blood pressure sensitivity to deoxycorticosterone in mice with disruption of bradykinin B2 receptor gene. *Hypertension.* 31:1278-1283, 1998.

144. **Emanuelli C, Madeddu P.** Effect of early blockade of bradykinin B₂-receptors on the blood pressure phenotype of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol. Res.* 35: 522-526, 1997.
145. **Erdos EG, Marcic BM.** Kinins, receptors, kininases and inhibitors--where did they lead us? *Biol. Chem.* 382: 43-47, 2001.
146. **Erdos EG.** Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension.* 16:363-370, 1990(a).
147. **Erdos EG.** Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*;15: S20-S24, 1990(b).
148. **Erdos EG, Yang HY.** An enzyme in microsomal fraction of kidney that inactivates bradykinin. *Life Sci.* 6: 569-574, 1967.
149. **Etgen GJ Jr, Wilson CM, Jensen J, Cushman SW, Ivy JL.** Glucose transport and cell surface GLUT-4 protein in skeletal muscle of the obese Zucker rat. *Am. J. Physiol.* 271: E294-E301, 1996.
150. **Evans BA, Yun ZX, Close JA, Tregear GW, Kitamura N, Nakanishi S, Callen DF, Baker E, Hyland VJ, Sutherland GR et al.** Structure and chromosomal localization of the human renal kallikrein gene. *Biochemistry* 27: 3124-3129, 1988.
151. **Farmer SG, Burch RM.** Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 511-536, 1992.
152. **Faussner A, Bathon JM, Proud D.** Comparison of the responses of B₁ and B₂ kinin receptors to agonist stimulation. *Immunopharmacology* 45: 13-20, 1999.
153. **Faussner A, Proud D, Towns M, Bathon JM.** 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: 2617-2623, 1998.

154. **Ferrario CM, Iyer SN.** Angiotensin-(1-7): a bioactive fragment of the renin-angiotensin system. *Regul. Pept.* 78: 13-18, 1998.
155. **Ferreira J, Campos MM, Araujo R, Bader M, Pesquero JB, Calixto JB.** The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. *Neuropharmacology.* 43: 1188-1897, 2002.
156. **Fior DR, Martins DT, Lindsey CJ.** Localization of central pressor action of bradykinin in medulla oblongata. *Am. J. Physiol.* 265: H1000-H1006, 1993.
157. **Fisher CA, Schmaier AH, Addonizio VP, Colman RW.** Assay of prekallikrein in human plasma: comparison of amidolytic, esterolytic, coagulation, and immunochemical assays. *Blood* 59: 963-70, 1982.
158. **Fortin JP, Gobeil F Jr, Adam A, Regoli D, Marceau F.** Do angiotensin-converting enzyme inhibitors directly stimulate the kinin B1receptor? *Am. J Physiol Heart Circ Physiol.* 285: H277-H282, 2003.
159. **Fox A, Wotherspoon G, McNair K, Hudson L, Patel S, Gentry C, Winter J.** Regulation and function of spinal and peripheral neuronal B1 bradykinin receptors in inflammatory mechanical hyperalgesia. *Pain.* 104: 683-691, 2003.
160. **Francel PC.** Bradykinin and neuronal injury. *Neurotrauma.* 9: S27-S45, 1992.
161. **Francel PC, Miller RJ, Dawson G.** Modulation of bradykinin-induced inositol trisphosphate release in a novel neuroblastoma x dorsal root ganglion sensory neuron cell line (F-11). *J. Neurochem.* 48: 1632-1639, 1987.
162. **Frey EK.** Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit. *Arch. Klin. Chir.* 142: 663-669, 1926.
163. **Frey EK and Kraut H.** Ein neues Kreislaufhormon und seine wirkung. *Arch. Exp. Pathol. Pharmakol.* 133: 1-5, 1928.

164. **Fujiwara Y, Mantione CR, Yamamura HI.** Identification of B2 bradykinin binding sites in guinea-pig brain. *Eur. J. Pharmacol.* 147: 487-488, 1988.
165. **Fujiwara Y, Mantione CR, Vavrek RJ, Stewart JM, Yamamura HI.** Characterization of [3H]bradykinin binding sites in guinea-pig central nervous system: possible existence of B2 subtypes. *Life Sci.* 44: 1645-1653, 1989.
166. **Gabra BH, Sirois P.** Kinin B1 receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice. *Neuropeptides.* 37: 36-44, 2003.
167. **Gabra BH, Couture R, Sirois P.** Dualité fonctionnelle des récepteurs des kinines en physiopathologie. *Med. Sci.* 19: 1101-1110, 2003.
168. **Gafford JT, Skidgel RA, Erdös EG, Hersh LB.** Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. *Biochemistry* 22: 3265-3271, 1983.
169. **Gainer JV, Brown NJ, Bachvarova M, Bastien L, Maltais I, Marceau F, Bachvarov DR.** Altered frequency of a promoter polymorphism of the kinin B2 receptor gene in hypertensive African-Americans. *Am. J. Hypertens.* 13: 1268-1273, 2000.
170. **Galizzi JP, Bodinier MC, Chapelain B, Ly SM, Coussy L, Giraud S, Neliat G, Jean T.** Up-regulation of [3H]-des-Arg10-kallidin binding to the bradykinin B₁ receptor by interleukin-1 beta in isolated smooth muscle cells: correlation with B₁ agonist-induced PGI₂ production. *Br. J. Pharmacol.* 113: 389-394, 1994.
171. **Gallagher AM, Yu H, Printz MP.** Bradykinin-induced reductions in collagen gene expression involve prostacyclin. *Hypertension* 32: 84-88, 1998.
172. **Geier S, Bancaud J, Talairach J, Bonis A, Enjelvin M, Hossard-Bouchaud H.** [Automatisms during frontal lobe epileptic seizures] *Brain.* 99: 447-458, 1976.

173. **Gerken VM, Santos RA.** Centrally infused bradykinin increases baroreceptor reflex sensitivity. *Hypertension*. 19: II176-II181, 1992.
174. **Gilcrease MZ, Hoover RL.** Activated human monocytes exhibit receptor-mediated adhesion to a non-enzymatically glycosylated protein substrate. *Diabetologia*. 33: 329-33, 1990.
175. **Gill JR Jr, Melmon KL, Gillespie L Jr, Bartter FC.** Bradykinin and renal function in normal man: effects of adrenergic blockade. *Am. J. Physiol.* 209: 844-8, 1965.
176. **Gobeil F Jr, Halle S, Blais PA, Regoli D.** Studies on the angiotensin-converting enzyme and the kinin B2 receptor in the rabbit jugular vein: modulation of contractile response to bradykinin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80: 153-163, 2002.
177. **Goold RD, diSibio GL, Xu H, Lang DB, Dadgar J, Magrane GG, Dugaiczky A, Smith KA, Cox DR, Masters SB, et al.** The development of sequence-tagged sites for human chromosome 4. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1271-1288, 1993.
178. **Gorelik G, Carbini LA, Scicli AG.** Angiotensin 1-7 induces bradykinin-mediated relaxation in porcine coronary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 403-410, 1998.
179. **Granness A, Hanke S, Boehmer FD, Presek P, Liebmann C.** Protein-tyrosine-phosphatase-mediated epidermal growth factor (EGF) receptor transinactivation and EGF receptor-independent stimulation of mitogen-activated protein kinase by bradykinin in A431 cells. *Biochem. J.* 347: 441-447, 2000.
180. **Greene EL, Velarde V, Jaffa AA.** Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and cfos induction in vascular cells. *Hypertension* 35: 942-947, 2000.

181. **Guan Z, Buckman SY, Pentland AP, Templeton DJ, Morrison AR.** Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 12901-12908, 1998.
182. **Guan Z, Buckman SY, Springer LD, Morrison AR.** Regulation of cyclooxygenase-2 by the activated p38 MAPK signaling pathway. *Adv. Exp. Med. Biol.* 469: 9-15, 1999.
183. **Gutowski S, Smrcka A, Nowak L, Wu DG, Simon M, Sternweis PC.** Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotidebinding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones. *J. Biol. Chem.* 266: 20519-20524, 1991.
184. **Habermann E.** Über pH-bedingte Modifikationen des kininliefernden α -globulins (Kininogen) aus Rinderserum und das Molekulargewicht von Kininogen I. *Biochem. Z.* 337: 440-448, 1963.
185. **Haddad EB, Fox AJ, Rousell J, Burgess G, McIntyre P, Barnes PJ, Chung KF.** Post-transcriptional regulation of bradykinin B1 and B2 receptor gene expression in human lung fibroblasts by tumor necrosis factor-alpha: modulation by dexamethasone. *Mol. Pharmacol.* 57: 1123-31, 2000.
186. **Haithcock D, Jiao H, Cui XL, Hopfer U, Douglas JG.** Renal proximal tubular AT2 receptor: signaling and transport. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: S69-S74, 1999.
187. **Hall JM.** Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.* 56:131-90, 1992.
188. **Hall JM, Morton IK.** Bradykinin B2 receptor evoked K⁺ permeability increase mediates relaxation in the rat duodenum. *Eur. J. Pharmacol.* 193: 231-238, 1991.

189. **Haring HU, Tippmer S, Kellerer M, Mosthaf L, Kroder G, Bossenmaier B, Berti L.** Modulation of insulin receptor signaling. Potential mechanisms of a cross talk between bradykinin and the insulin receptor. *Diabetes*. 45: S115-S119, 1996.
190. **Harvey TJ, Hooper JD, Myers SA, Stephenson SA, Ashworth LK, Clements JA.** Tissue-specific expression patterns and fine mapping of the human kallikrein (KLK) locus on proximal 19q13.4. *J. Biol. Chem.* 275: 37397-37406, 2000.
191. **Hecquet C, Tan F, Marcic BM, Erdos EG.** Human bradykinin B(2) receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. *Mol. Pharmacol.* 58: 828-836, 2000.
192. **Henriksen EJ, Jacob S, Fogt DL, Dietze GJ.** Effect of chronic bradykinin administration on insulin action in an animal model of insulin resistance. *Am. J. Physiol.* 275: R40-R45, 1998.
193. **Henriksen EJ, Jacob S.** Effects of captopril on glucose transport activity in skeletal muscle of obese Zucker rats. *Metabolism*. 44: 267-272, 1995.
194. **Hermann K, Kimura B, Phillips MI.** Isolation and purification of angiotensin II using affinity and high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 159: 295-302, 1986.
195. **Hernandez-Hernandez R, Sosa-Canache B, Velasco M, Armas-Hernandez MJ, Armas-Padilla MC, Cammarata R.** Angiotensin II receptor antagonists role in arterial hypertension. *J Hum Hypertens*. 16 : S93-S99, 2002.
196. **Herold KC, Vezys V, Sun Q, Viktora D, Seung E, Reiner S, Brown DR.** Regulation of cytokine production during development of autoimmune diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin. *J. Immunol.* 156: 3521-3527, 1996.

197. **Hess JF, Hey PJ, Chen TB, O'Brien J, Omalley SS, Pettibone DJ & Chang RS.** Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B1 and B2 bradykinin receptors. *Biol. Chem.* 382: 123-129, 2001.
198. **Hess JF, Derrick AW, MacNeil T, Borkowski JA.** The agonist selectivity of a mouse B₁ bradykinin receptor differs from human and rabbit B₁ receptors. *Immunopharmacology.* 33: 1-8, 1996.
199. **Hess JF, Borkowski JA, Stonesifer GY, MacNeil T, Strader CD & Ransom RW.** Cloning and pharmacological characterization of bradykinin receptors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27: 1725-1731, 1994.
200. **Hess JF, Borkowski JA, Young GS, Strader CD, Ransom RW.** Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 260-268, 1992
201. **Hermann A, Arnhold M, Kresse H, Neth P, Fink E.** Expression of plasma prekallikrein mRNA in human nonhepatic tissues and cell lineages suggests special local functions of the enzyme. *Biol. Chem.* 380: 1097-1102, 1999.
202. **Hilgenfeldt U, Puschner T, Riester U, Finsterle J, Hilgenfeldt J, Ritz E.** Low-salt diet downregulates plasma but not tissue kallikrein-kinin system. *Am. J. Physiol.* 275: F88-F93, 1998.
203. **Hilton G.** Pharmacologic management of seizure disorders. *Clin Excell Nurse Pract.* 2: 133-139, 1998.
204. **Ho E, Bray TM.** Antioxidants, NFkappaB activation, and diabetogenesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222: 205-213, 1999.
205. **Hosli E, Hosli L.** Autoradiographic localization of binding sites for neuropeptide Y and bradykinin on astrocytes. *Neuroreport.* 4: 159-162, 1993.

206. **Howl J, Payne SJ.** Bradykinin receptors as a therapeutic target. *Expert Opin. Ther. Targets.* 7: 277-285, 2003.
207. **Houle S, Landry M, Audet R, Bouthillier J, Bachvarov DR, Marceau F.** Effect of allelic polymorphism of the B(1) and B(2) receptor genes on the contractile responses of the human umbilical vein to kinins. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 294: 45-51, 2000.
208. **Hu DE & Fan TP.** [Leu⁸]des-Arg⁹-bradykinin inhibits the angiogenic effect of bradykinin and interleukin -1 in rats. *Br J Pharmacol.* 109: 14-17, 1993.
209. **Huang CD, Tliba O, Panettieri RA Jr, Amrani Y.** Bradykinin induces interleukin-6 production in human airway smooth muscle cells: modulation by Th2 cytokines and dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 28:330-338, 2003.
210. **Hummerich W, Feltkamp H, Konrads A, Ahlmann P, Bornhofen H.** Renin-activation by kallikrein: evidence for alkaline-activation of plasma renin. *Eur J. Clin. Invest.* 9: 447-449, 1979.
211. **Hussain MJ, Peakman M, Gallati H, Lo SS, Hawa M, Viberti GC, Watkins PJ, Leslie RD, Vergani D.** Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia.* 39: 60-66, 1996.
212. **Ignjatovic T, Tan F, Brovkovich V, Skidgel RA, Erdos EG.** Activation of bradykinin B1 receptor by ACE inhibitors. *Int. Immunopharmacol.* 2: 1787-1793, 2002.
213. **Inagami T, Kambayashi Y, Ichiki T, Tsuzuki S, Eguchi S, Yamakawa T.** Angiotensin receptors: molecular biology and signalling. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26: 544-549, 1999.

214. **Innis RB, Manning DC, Stewart JM, Snyder SH.** [3H]Bradykinin receptor binding in mammalian tissue membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 78: 2630-2634, 1981.
215. **Israel A, Saavedra JM.** High angiotensin converting enzyme (kininase II) activity in the cerebrospinal fluid of spontaneously hypertensive adult rats. *J Hypertens.* 5: 355-357, 1987.
216. **Iwadate H, Kudo M, Kizuki K.** Expression of tissue kallikrein mRNA in developing rat brains. *Can J Physiol Pharmacol.* 80: 245-248, 2002.
217. **Jacob RJ, Fan X, Evans ML, Dziura J, Sherwin RS.** Brain glucose levels are elevated in chronically hyperglycemic diabetic rats: no evidence for protective adaptation by the blood brain barrier. *Metabolism.* 51: 1522-1524, 2002.
218. **Jaffa AA, Pratt J, Ashford A, Bailey GS.** Studies of the effects of insulin, bradykinin, and captopril on blood glucose levels of alloxan-diabetic rats. *Adv. Exp. Med. Biol.* 198 Pt B: 373-378, 1986.
219. **Jankowsky JL, Patterson PH.** The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog. Neurobiol.* 63:125-149, 2001.
220. **Jauch KW, Gunther B, Rett K, Hartl W, Wicklmayr M, Dietze G, Fink E, Georgieff M, Neumeier D.** Dose-dependent effects of bradykinin infusion in postoperative patients. *Adv. Exp. Med. Biol.* 247: 603-608, 1989.
221. **Jin L, Chao L, Chao J.** Potassium supplement upregulates the expression of renal kallikrein and bradykinin B2 receptor in SHR. *Am. J. Physiol.* 276: F476-F484, 1999.
222. **Jin XH, Wang ZQ, Siragy HM, Guerrant RL, Carey RM.** Regulation of jejunal sodium and water absorption by angiotensin subtype receptors. *Am. J. Physiol.* 275: R515-R523, 1998.

223. **Ju H, Venema VJ, Liang H, Harris MB, Zou R, Venema RC.** Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochem. J.* 351: 257-264, 2000.
224. **Julius D, Basbaum AI.** Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 413: 203-210, 2001.
225. **Kamei M, Yoneda Y, Suzuki H.** Endothelial factors involved in the bradykinin-induced relaxation of the guinea-pig aorta. *J. Smooth Muscle Res.* 36: 127-135, 2000.
226. **Kamiya T, Katayama Y, Kashiwagi F, Terashi A.** The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke.* 24: 571-576, 1993.
227. **Kammerer S, Braun A, Arnold N, Roscher AA.** The human bradykinin B2 receptor gene: full length cDNA, genomic organization and identification of the regulatory region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211: 226-233, 1995.
228. **Kaplanski J, Asa I, Artru AA, Azez A, Ivashkova Y, Rudich Z, Pruneau D, Shapira Y.** LF 16-0687 Ms, a new bradykinin B₂ receptor antagonist, decreases ex vivo brain tissue prostaglandin E2 synthesis after closed head trauma in rats. *Resuscitation.* 56: 207-213, 2003.
229. **Karunanayake EH, Hearse DJ, Mellows G.** Streptozotocin: its excretion and metabolism in the rat. *Diabetologia.* 12: 483-488, 1976.
230. **Kariya K, Yamauchi A.** Relationship between hypertensive response and brain kinin level in the rat injected intraventricularly with glandular kallikrein. *Jpn. J. Pharmacol.* 43: 129-132, 1987.
231. **Kariya K, Yamauchi A, Hattori S, Tsuda Y, Okada Y.** The disappearance rate of intraventricular bradykinin in the brain of the conscious rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 107: 1461-1466, 1982.

232. **Kariya K, Kawauchi R, Okamoto H.** Regional distribution of kininase in rat brain. *J Neurochem.* 36: 2086-2088, 1981.
233. **Katori M, Majima M, Hayashi I, Fujita T, Yamanaka M.** Role of the renal kallikrein-kinin system in the development of salt-sensitive hypertension. *Biol Chem.* 382: 61-64, 2001.
234. **Khan IM, Miller DH, Strickland J, Margolius HS, Privitera PJ.** Brain kallikrein-kinin system abnormalities in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 25: 524-530, 1995.
235. **Khan IM, Yamaji I, Miller DH, Margolius HS, Privitera PJ.** Cerebrospinal fluid kallikrein in spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens.* 11: 1039-1045, 1993.
236. **Kim WS, Nakayama K, Murakami K.** The presence of two types of prorenin converting enzymes in the mouse submandibular gland. *FEBS Lett.* 293: 142-144, 1991.
237. **King MJ, Pugazhenti S, Khandelwal RL, Sharma RK.** Membrane-associated N-myristoyltransferase activity is reduced in obese (*fa/fa*) Zucker rat liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 196: 665-670, 1993.
238. **Kintsurashvili E, Duka I, Gavras I, Johns C, Farmakiotis D, Gavras H.** Effects of ANG II on bradykinin receptor gene expression in cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 281: H1778-H183, 2001.
239. **Kishi K, Muromoto N, Nakaya Y, Miyata I, Hagi A, Hayashi H, Ebina Y.** Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. *Diabetes.* 47: 550-558. Erratum in: *Diabetes* 47:1170, 1998

240. **Kitamura N, Kitagawa H, Fukushima D, Takagaki Y, Miyata T, Nakanishi S.** Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J. Biol. Chem.* 260: 8610-8617, 1985.
241. **Kizuki K, Suzuki T, Kudo M, Noguchi T.** Immunohistochemical demonstration of tissue kallikrein in the neurons of rat brain. *Brain Res.* 634: 305-309, 1994.
242. **Kondo K, Okuno T, Saruta T, Kato E.** Effects of intracerebroventricular administration of prostaglandins I₂, E₂, F₂ alpha and indomethacin on blood pressure in the rat. *Prostaglandins.* 17: 769-774, 1979.
243. **Kozik A, Moore RB, Potempa J, Imamura T, Rapala-Kozik M, Travis J.** A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites. Diverse effects of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikreins on native and oxidized kininogens. *J. Biol. Chem.* 273: 33224-33229, 1998.
244. **Kozlowski MR, Rosser MP, Hall E.** Identification of 3H-bradykinin binding sites in PC-12 cells and brain. *Neuropeptides.* 12: 207-211, 1988.
245. **Kraut H, Frey EK, Werle E.** Über die Inaktivierung des Kallikreins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 192: 1-21, 1930.
246. **Kudoh A, Dietze GJ, Rabito SF.** Insulin enhances the bradykinin response in L8 rat skeletal myoblasts. *Diabetes.* 49: 190-194, 2000.
247. **Kuhar MJ, Lloyd DG, Appel N, Loats HL.** Imaging receptors by autoradiography: computer-assisted approaches. *J. Chem. Neuroanat.* 4: 319-327, 1991.
248. **Kuhar MJ, Desouza EB.** "Autoradiographic imaging: Localization of binding sites other than neurotransmitter receptors." *Visualizations of Brain Functions* 57 – 66, 1989.

249. **Kuhar MJ, Unnerstall JR.** In vitro labeling receptor autoradiography: loss of label during ethanol dehydration and preparative procedures. *Brain Res.* 244: 178-181, 1982.
250. **Kuhhar MJ.** "Recent progress receptor mapping – which neurons contain the receptors." *Trends in Neurosciences* 10: 308 - 310, 1987.
251. **Kurtz TW, Montano M, Chan L, Kabra P.** Molecular evidence of genetic heterogeneity in Wistar-Kyoto rats: implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 13: 188-192, 1989.
252. **Laneuville O, Reader TA, Couture R.** Intrathecal bradykinin acts presynaptically on spinal noradrenergic terminals to produce antinociception in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 159: 273-283, 1989.
253. **Laneuville O, Couture R.** Bradykinin analogue blocks bradykinin-induced inhibition of a spinal nociceptive reflex in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 137: 281-285, 1987.
254. **Lamb ME, De Weerd WF, Leeb-Lundberg LM.** Agonist-promoted trafficking of human bradykinin receptors: arrestin- and dynamin-independent sequestration of the B2 receptor and bradykinin in HEK293 cells. *Biochem. J.* 355: 741-750, 2001.
255. **Larrivee JF, Bachvarov DR, Houle F, Landry J, Huot J, Marceau F.** Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J. Immunol.* 160:1419-1426, 1998.
256. **Lee SD, Lee BD, Kim Y, Suh PG, Ryu SH.** Bradykinin activates phospholipase D2 via protein kinase cdelta in PC12 cells. *Neurosci Lett* 294: 130-132, 2000.
257. **Lees GV, Jones EG, McNamara J.** Epilepsy. *Neurobiol Dis.* 7: 549-551, 2000.
258. **Leslie M. et Altar CA.** Receptor localization ligand Autoradiography, Alan R.Liss, Inc. New York (1988)

259. **Levesque L, Harvey N, Riourx F, Drapeau G. & Marceau F.** Development of a binding assay for the B₁ receptors for kinins. *Immunopharmacology*, 29: 141-147, 1995.
260. **Levine GH, Maglio JJ, Horwitz J.** Differential effects of ethanol on signal transduction. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 24: 93-101, 2000.
261. **Levy D, Zochodne DW.** Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. *Pain.* 86: 265-271, 2000.
262. **Levy SB, Lilley JJ, Frigon RP, Stone RA.** Urinary kallikrein and plasma renin activity as determinants of renal blood flow. The influence of race and dietary sodium intake. *J Clin Invest.* 60: 129-138, 1977.
263. **Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD.** The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N. Engl. J. Med.* 329: 1456-1462, 1993. Erratum in: *N. Engl. J. Med.* 330: 152, 1993
264. **Lewis RE, Childers SR, Phillips MI.** [¹²⁵I]Tyr-bradykinin binding in primary rat brain cultures. *Brain Res.* 346: 263-272, 1985.
265. **Lewis RE, Phillips MI.** Localization of the central pressor action of bradykinin to the cerebral third ventricle. *Am. J. Physiol.* 247: R63-R68, 1984.
266. **Li Z, Tyor WR, Xu J, Chao J, Hogan EL.** Immunohistochemical localization of kininogen in rat spinal cord and brain. *Exp Neurol.* 159: 528-537, 1999.
267. **Liang H, Venema V J, Wang X, Ju H, Venema R C, Marrero MB.** Regulation of angiotensin II-induced phosphorylation of STAT3 in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 274: 19846-19851, 1999.

268. **Liao JK, Homcy CJ.** The G proteins of the G alpha i and G alpha q family couple the bradykinin receptor to the release of endothelium-derived relaxing factor. *J Clin Invest* 92: 2168-2172, 1993.
269. **Like AA., Rossini AA.** Streptozotocine-induced pancreatic insulinitis: New model of diabete mellitus, *Science*, 193: 415-417, 1976.
270. **Lindsey CJ, Fujita K, Martins TO.** The central pressor effect of bradykinin in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension*. 11: I126-I129, 1988.
271. **Lindsey CJ, Nakaie CR, Martins DT.** Central nervous system kinin receptors and the hypertensive response mediated by bradykinin. *Br. J. Pharmacol.* 97: 763-768, 1989.
272. **Lindsey CJ, Buck HS, Fior-Chadi DR, Lapa RC.** Pressor effect mediated by bradykinin in the paratrigeminal nucleus of the rat. *J. Physiol.* 502: 119-129, 1997.
273. **Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Scholkens BA.** Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 47: 25-49, 1995.
274. **Liona I, Vavrek R, Stewart J, Huidobro-Toro JP.** Identification of pre- and postsynaptic bradykinin receptor sites in the vas deferens: evidence for different structural prerequisites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 608-614, 1987.
275. **Loiseau J, Loiseau P, Guyot M, Duche B, Dartigues JF, Aublet B.** Survey of seizure disorders in the French southwest. I. Incidence of epileptic syndromes. *Epilepsia.* 31: 391-396, 1990.
276. **Lopes P, Couture R.** Localization of bradykinin-like immunoreactivity in the rat spinal cord: effects of capsaicin, melittin, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience.* 78: 481-497, 1997.

277. **Lopes P, Kar S, Chretien L, Regoli D, Quirion R, Couture R.** Quantitative autoradiographic localization of [¹²⁵I-Tyr⁸]bradykinin receptor binding sites in the rat spinal cord: effects of neonatal capsaicin, noradrenergic deafferentation, dorsal rhizotomy and peripheral axotomy. *Neuroscience*. 68: 867-881, 1995.
278. **Lopes P, Kar S, Tousignant C, Regoli D, Quirion R, Couture R.** Autoradiographic localization of [¹²⁵I-Tyr⁸]-bradykinin receptor binding sites in the guinea pig spinal cord. *Synapse*. 15: 48-57, 1993 a.
279. **Lopes P, Regoli D, Couture R.** Cardiovascular effects of intrathecally administered bradykinin in the rat: characterization of receptors with antagonists. *Br J Pharmacol*. 110: 1369-1374, 1993 b.
280. **Lopes P, Couture R.** Cardiovascular responses elicited by intrathecal kinins in the conscious rat. *Eur. J. Pharmacol*. 210: 137-47, 1992.
281. **Lortie M, Regoli D, Rhaleb NE, Plante GE.** The role of B₁- and B₂-kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin. *Am. J. Physiol*. 262: R72-R76, 1992.
282. **Lukic ML, Stosic-Grujicic S, Shahin A.** Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev. Immunol*. 6: 119-128, 1998.
283. **Lung CC, Chan EK, Zuraw BL.** Analysis of an exon 1 polymorphism of the B2 bradykinin receptor gene and its transcript in normal subjects and patients with C1 inhibitor deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol*. 99: 134-46, 1997.
284. **Ma QP.** The expression of bradykinin B(1) receptors on primary sensory neurones that give rise to small caliber sciatic nerve fibres in rats. *Neuroscience*. 107: 665-673, 2001.

285. **Ma JX, Wang DZ, Ward DC, Chen L, Dessai T, Chao J, Chao L.** Structure and chromosomal localization of the gene (BDKRB2) encoding human bradykinin B₂ receptor. *Genomics* 23: 362-369, 1994.
286. **Ma QP, Heavens R.** Basal expression of bradykinin B(1) receptor in the spinal cord in humans and rats. *Neuroreport*. 12: 2311-2314, 2001.
287. **Ma QP, Hill R, Sirinathsinghji D.** Basal expression of bradykinin B1 receptor in peripheral sensory ganglia in the rat. *Neuroreport*. 11: 4003-4005, 2000.
288. **MacNeil T, Bierilo KK, Menke JG, Hess JF.** Cloning and pharmacological characterization of a rabbit bradykinin B1 receptor. *Biochim. Biophys. Acta*. 1264: 223-228, 1995.
289. **Madeddu P, Glorioso N, Varoni MV, Demontis MP, Fattaccio MC, Anania V.** Cardiovascular effects of brain kinin receptor blockade in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 23:I189-I192, 1994.
290. **Mage M, Pecher C, Neau E, Cellier E, Dos Reiss ML, Schanstra JP, Couture R, Bascands JL, Girolami JP.** Induction of B1 receptors in streptozotocin diabetic rats: possible involvement in the control of hyperglycemia-induced glomerular Erk 1 and 2 phosphorylation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80: 328-333, 2002.
291. **Mahabeer R, Naidoo S, Raidoo DM.** Detection of tissue kallikrein and kinin B1 and B2 receptor mRNAs in human brain by in situ RT-PCR. *Metab Brain Dis*. 15: 325-335, 2000.
292. **Majima M, Hayashi I, Inamura N, Fujita T, Ogino M.** A nonpeptide mimic of bradykinin blunts the development of hypertension in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 35: 437-442, 2000.

293. **Majima M, Yoshida O, Mihara H, Muto T, Mizogami S, Kuribayashi Y, Katori M, Oh-ishi S.** High sensitivity to salt in kininogen-deficient brown Norway Katholiek rats. *Hypertension* 22: 705-714, 1993.
294. **Majima M, Jin HY, Katori M, Sunahara N.** Increase in the kinin levels in the bronchial washings after intravenous injection of leukotriene C4 in guinea pigs. *Agents Actions* 38: 467-474, 1992.
295. **Mandle RJ, Colman RW, Kaplan AP.** Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73:4179-4183, 1976.
296. **Marceau F, Bachvarov DR.** Kinin receptors. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 16: 385-401, 1998
297. **Marceau F, Adam A, Houle S, Bouthillier J, Bachvarova M & Bachvarov DR.** Ligand-mediated regulation of kinin receptors in the rabbit. *Biol Chem*, 382: 131-133, 2001.
298. **Marceau F, Larrivee JF, Bouthillier J, Bachvarova M, Houle S, Bachvarov DR.** Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B1 and B2 receptor expression in the rabbit. *Am. J. Physiol.* 277: R1568-1578, 1999.
299. **Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR.** The B₁ receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* 50: 357-386, 1998.
300. **Marcic B, Deddish PA, Jackman HL, Erdös EG.** Enhancement of bradykinin and resensitization of its B2 receptor. *Hypertension* 33: 835-843, 1999.
301. **Margolius.** Kallikreins and kinins: Some unanswered questions about system characteristics and roles in human disease. *Hypertension* 26: 221-229, 1995.

302. **Margolius HS, Horwitz D, Geller RG, Alexander RW, Gill JR Jr, Pisano JJ, Keiser HR.** Urinary kallikrein excretion in normal man. Relationships to sodium intake and sodium-retaining steroids. *Circ Res.* 35: 812-819, 1974a.
303. **Margolius HS, Horwitz D, Pisano JJ, Keiser HR.** Sodium, water and kallikrein excretion in man. *Acta Physiol. Lat. Am.* 24: 464-468, 1974b.
304. **Margolius HS, Horwitz D, Pisano JJ, Keiser HR.** Urinary kallikrein excretion in hypertensive man. Relationships to sodium intake and sodium-retaining steroids. *Circ Res.* 35: 820-825, 1974c.
305. **Margolius HS, Geller RG, De Jong W, Pisano JJ, Sjoerdsma A.** Urinary kallikrein excretion in hypertension. *Circ Res.* 31: S125-S131, 1972.
306. **Marin-Castaño ME, Schanstra JP, Neau E, Praddaude F, Pecher C, Ader JL, Girolami JP, Bascands JL.** Induction of functional bradykinin b(1)- receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation.* 105: 627-632, 2002.
307. **Marin-Castaño ME, Schanstra JP, Praddaude F, Pesquero JB, Ader JL, Girolami JP, Bascands JL.** Differential induction of functional B1-bradykinin receptors along the rat nephron in endotoxin induced inflammation. *Kidney Int.* 54: 1888-1898, 1998.
308. **Marks-Konczalik J, Chu SC, Moss J.** Cytokine-mediated transcriptional induction of the human inducible nitric oxide synthase gene requires both activator protein 1 and nuclear factor kappaB-binding sites. *J. Biol. Chem.* 273: 22201-22208, 1998.
309. **Marks PW, Kruskal BA, Maxfield FR.** Simultaneous addition of EGF prolongs the increase in cytosolic free calcium seen in response to bradykinin in NRK-49F cells. *J. Cell Physiol.* 136: 519-525, 1988.

310. **Marrero MB, Venema VJ, Ju H, He H, Liang H, Caldwell RB, Venema RC.** Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors. *Biochem. J.* 343: 335-340, 1999.
311. **Martins DT, Fior DR, Nakaie CR, Lindsey CJ.** Kinin receptors of the central nervous system of spontaneously hypertensive rats related to the pressor response to bradykinin. *Br. J. Pharmacol.* 103: 1851-1856, 1991.
312. **Matoba S, Tatsumi T, Keira N, Kawahara A, Akashi K, Kobara M, Asayama J, Nakagawa M.** Cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition against hypoxia/reoxygenation injury in cultured rat cardiac myocytes. *Circulation* 99: 817-822, 1999.
313. **Mattera R, Hayek S, Summers BA, Grove DL.** Agonist-specific alterations in receptor-phospholipase coupling following inactivation of Gi2alpha gene. *Biochem. J.* 332: 263-271, 1998.
314. **McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Obernolte R, Bach C, Zuppan P, Fujisaki J, Aldrich RW, Jarnagin K.** Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 7724-7728, 1991.
315. **McGiff JC, Quilley CP.** The rat with spontaneous genetic hypertension is not a suitable model of human essential hypertension. *Circ Res.* 48: 455-464, 1981.
316. **McGiff JC, Itskovitz HD, Terragno A, Wong PY.** Modulation and mediation of the action of the renal kallikrein-kinin system by prostaglandins. *Fed Proc.* 35: 175-180, 1976.
317. **McIntyre DC, Poulter MO, Gilby K.** Kindling: some old and some new. *Epilepsy Res.* 50: 79-92, 2002.

318. **McLean PG, Perretti M, Ahluwalia A.** Inducible expression of the kinin B1 receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg⁹bradykinin-induced coronary vasodilation. *Br. J. Pharmacol.* 128: 275-282, 1999.
319. **McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW.** Location of the disulfide bonds in human plasma prekallikrein: the presence of four novel apple domains in the amino-terminal portion of the molecule. *Biochemistry* 30: 2050-2056, 1991.
320. **McMahon SB, Priestley JV.** Peripheral neuropathies and neurotrophic factors: animal models and clinical perspectives. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5: 616-624, 1995.
321. **Meacci E, Donati C, Cencetti F, Romiti E, Farnararo M, Bruni P.** Receptor-activated phospholipase D is present in caveolin-3-enriched light membranes of C2C12 myotubes. *FEBS Lett.* 473: 10-14, 2000.
322. **Meini S, Lecci A, Cucchi P, Catalioto RM, Criscuoli M, Maggi CA.** Inflammation modifies the role of cyclooxygenases in the contractile responses of the rat detrusor smooth muscle to kinin agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 287: 137-143, 1998.
323. **Mendelsohn FA, Chai SY, Dunbar M.** In vitro autoradiographic localization of angiotensin-converting enzyme in rat brain using ¹²⁵I-labelled MK351A. *J. Hypertens.* 2: S41-S44, 1984.
324. **Mendelsohn FA, Hutchinson JS, Csicsmann J.** Angiotensin converting enzyme in the brain of spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 7: 551-554, 1980.
325. **Meneton P, Bloch-Faure M, Hagege AA, Ruetten H, Huang W, Bergaya S, Ceiler D, Gehring D, Martins I, Salmon G, Boulanger CM, Nussberger J, Crozatier B, Gasc J-M, Heudes D, Bruneval P, Doetschman T, Ménard J,**

- Alhenc-Gelas F.** Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 98: 2634-2639, 2001.
326. **Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess JF.** Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 21583-21586, 1994.
327. **Midaoui AE, Ongali B, Petcu M, Rodi D, de Champlain J. and Couture, R.** Induction of kinin B₁ receptors in two rat models of insulin resistance: effect of alpha-lipoic acid. *Hypertension. Peptide* (2004) (en préparation)
328. **Millan MJ.** The induction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.* 57: 1-164, 1999.
329. **Milton AS, Wendlandt S.** A possible role for prostaglandin E1 as a modulator for temperature regulation in the central nervous system of the cat. *J. Physiol.* 207: 76P-77P, 1970.
330. **Minshall RD, Nakamura F, Becker RP, Rabito SF.** Characterization of bradykinin B2 receptors in adult myocardium and neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* 76: 773-780, 1995.
331. **Minshall RD, Tan F, Nakamura F, Rabito SF, Becker RP, Marcic B, Erdos EG.** Potentiation of the actions of bradykinin by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. The role of expressed human bradykinin B2 receptors and angiotensin I-converting enzyme in CHO cells. *Circ. Res.* 81: 848-856. Erratum in *Circ. Res.* 82: 137, 1998.
332. **Miyamoto A, Laufs U, Pardo C, Liao JK.** Modulation of bradykinin receptor ligand binding affinity and its coupled G-proteins by nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 272: 19601-19608, 1997.

333. **Mombouli JV, Vanhoutte PM.** Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 679-705, 1995.
334. **Monisha S, Gupta YK.** Chronic treatment with trans resveratrol prevents intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Life sciences* . 71: 2489-2498, 2002.
335. **Mooradian AD.** Central nervous system complications of diabetes mellitus--a perspective from the blood-brain barrier. *Brain Res Brain Res Rev.* 23: 210-218, 1997.
- Morris BJ, Catanzaro DF.** Biosynthesis of preprorenin and intracellular conversion of prorenin to renin. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 8: 441-445, 1981.
336. **Mosmann TR, Coffman RL.** TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145-173, 1989.
337. **Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL.** Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348-2357, 1986.
338. **Motta G, Rojkaer R, Hasan AA, Cines DB, Schmaier AH.** High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation. *Blood* 91: 516-528, 1998.
339. **Moura AS.** Bradykinin enhances membrane electrical activity of pancreatic beta cells in the presence of low glucose concentrations. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33: 1089-1092, 2000.
340. **Mukae S, Aoki S, Itoh S, Nishio K, Iwata T, Ueda H, Geshi E, Fuzimaki T, Katagiri T.** Promoter polymorphism of the beta2 bradykinin receptor gene is associated with essential hypertension. *Jpn. Circ. J.* 63: 759-762, 1999.

341. **Müller-Esterl W, Lottspeich F, Kellermann J, Henschen A.** On the evolution of mammalian kininogens. *Behring Inst. Mitt.* 79: 48-61, 1986.
342. **Murone C, Paxinos G, McKinley MJ, Oldfield BJ, Muller-Esterl W, Mendelsohn FA, Chai SY.** Distribution of bradykinin B2 receptors in sheep brain and spinal cord visualized by in vitro autoradiography. *J. Comp. Neurol.* 381: 203-218, 1997.
343. **Murone C, Perich RB, Schlawe I, Chai SY, Casley D, MacGregor DP, Müller-Esterl W, Mendelsohn FA.** Characterization and localization of bradykinin B2 receptors in the guinea-pig using a radioiodinated HOE140 analogue. *Eur. J. Pharmacol.* 306: 237-247, 1996.
344. **Murphey LJ, Gainer JV, Vaughan DE, Brown NJ.** Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism modulates the human in vivo metabolism of bradykinin. *Circulation* 102: 829-832, 2000.
345. **Nabika T, Nara Y, Ikeda K, Endo J, Yamori Y.** Genetic heterogeneity of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 18: 12-16, 1991.
346. **Naicker S, Naidoo S, Ramsaroop R, Moodley D, Bhoola K.** Tissue kallikrein and kinins in renal disease. *Immunopharmacology* 44: 183-192, 1999.
347. **Nakanishi S.** Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations, and regulation. *Physiol. Rev.* 67:1117-11142, 1987.
348. **Nakhostine N, Ribuo C, Lamontagne D, Nadeau R & Couture R.** Mediation by B1 and B2 receptors of vasodepressor responses to intravenously administered kinins in anaesthetized dogs. *Br. J. Pharmacol.* 110: 71-76, 1993.
349. **Neth P, Arnhold M, Nitschko H, Fink E.** The mRNAs of prekallikrein, factors XI and XII, and kininogen, components of the contact phase cascade are differentially

- expressed in multiple non-hepatic human tissues. *Thromb. Haemost.* 85: 1043-1047, 2001.
350. **Ni A, Chao L, Chao J.** Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B₁ receptor gene in inflammation. *J. Biol. Chem.* 273: 2784-2791, 1998a.
351. **Ni A, Chai KX, Chao L, Chao J.** Molecular cloning and expression of rat bradykinin B₁ receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1442: 177-185, 1998b.
352. **Nishimura K, Alhenc-Gelas F, White A, Erdos EG.** Activation of membrane-bound kallikrein and renin in the kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77: 4975-4978, 1980.
353. **Noebels JL.** The biology of epilepsy genes. *Annu Rev Neurosci.* 26: 599-625, 2003.
354. **Nolly H, Saed G, Carretero OA, Scicli G, Scicli AG.** Adrenal kallikrein. *Hypertension* 21: 911-5, 1993.
355. **Nsa Allogho S, Gobeil F, Perron SI, Hess JF & Regoli D.** Effects of kinins on isolated stomachs of control and transgenic knockout B₂ receptor mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 357: 191-196, 1998.
356. **Nwator IA, Whalley ET.** Angiotensin converting enzyme inhibitors and expression of des-Arg⁹-BK (kininB₁) receptors in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* 160: 125-132, 1989.
357. **Oh P, Schnitzer JE.** Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Mol. Biol. Cell.* 12: 685-698, 2001.
358. **Okamoto H & Greenbaum LM.** Isolation and structure of T-kinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112: 701-708, 1983.

359. **Okamoto K.** [Experimental hypertension, especially on spontaneously hypertensive rats] *Iryo.* 23: 293-305, 1969.
360. **Oudit GY, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM.** The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovasc. Med.* 13: 93-101, 2003.
361. **Ouhtit A, Ueda M, Nakazawa H, Ichihashi M, Dumaz N, Sarasin A, Yamasaki H.** Quantitative detection of ultraviolet-specific p53 mutations in normal skin from Japanese patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 6: 433-438, 1997.
362. **Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM.** Expression of the subtype 2 angiotensin (AT₂) receptor protein in rat kidney. *Hypertension.* 30:1238-1246, 1997.
363. **Palkhiwala SA, Frishman WH, Warshafsky S.** Bradykinin for the treatment of cardiovascular disease. *Heart Dis.* 3: 333-339, 2001.
364. **Pan ZK, Ye RD, Christiansen SC, Jagels MA, Bokoch GM, Zuraw BL.** Role of the Rho GTPase in bradykinin-stimulated nuclear factor-kappaB activation and IL-1beta gene expression in cultured human epithelial cells. *J. Immunol.* Mar. 160: 3038-3045, 1998.
365. **Panza JA, Garcia CE, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO 3rd.** Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation.* 91:1732-1738, 1995.
366. **Parenti A, Morbidelli L, Ledda F, Granger HJ, Ziche M.** The bradykinin/B₁ receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB J.* 15: 1487-1489, 2001.
367. **Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jefitnija K, Jefitnija S, Haydon PG.** Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature.* 369: 744-147, 1994.

368. **Patel KV, Schrey MP.** Inhibition of DNA synthesis and growth in human breast stromal cells by bradykinin: evidence for independent roles of B1 and B2 receptors in the respective control of cell growth and phospholipid hydrolysis. *Cancer Res.* 52: 334-40, 1992.
369. **Pela IR, Gardey-Levassort C, Lechat P, Rocha e Silva M.** Brain kinins and fever induced by bacterial pyrogens in rabbits. *J. Pharm. Pharmacol.* 27: 793-794, 1975.
370. **Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, Stella N, Magistretti PJ.** Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev. Neurosci.* 20: 291-299, 1998.
371. **Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, Lewin GR, Bader M.** Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 8140-8145, 2000.
372. **Pesquero JB, Lindsey CJ, Paiva AC, Ganten D, Bader M.** Transcriptional regulatory elements in the rat bradykinin B₂ receptor gene. *Immunopharmacology* 33: 36-41, 1996.
373. **Pesquero JB, Lindsey CJ, Zeh K, Paiva AC, Ganten D, Bader M.** Molecular structure and expression of rat bradykinin B2 receptor gene. Evidence for alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 269: 26920-26925, 1994.
374. **Pesquero JL, Araujo GW, Lima MP, Beraldo WT.** The tonin-kinin system. *Agents Actions* 36: S146-S151, 1992.
375. **Petcu M, Ongali B, Midaoui AE, Rodi D, de Champlain J and Couture R.** Effects of Alpha-lipoic acid on kinin B₁ and B₂ receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. *Peptide* (2004) (en préparation) a

376. **Petcu M, Ongali B, Thibault G, Couture R.** Upregulation of kinin B₁ and B₂ receptors in the spinal cord and dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain. Peptide (2004) (en préparation) b
377. **Phagoo SB, Reddi K, Anderson KD, Leeb-Lundberg LM, Warburton D.** Bradykinin B₁ receptor up-regulation by interleukin-1beta and B₁ agonist occurs through independent and synergistic intracellular signaling mechanisms in human lung fibroblasts. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298: 77-85, 2001.
378. **Phagoo SB, Yaqoob M, Herrera-Martinez E, McIntyre P, Jones C, Burgess GM.** Regulation of bradykinin receptor gene expression in human lung fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.* 397: 237-246, 2000.
379. **Phagoo SB, Poole S, Leeb-Lundberg LM.** 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: 325-333, 1999.
380. **Pham TM, Couture R.** Inhibitory action of (+/-)CP-96,345 on the cardiovascular responses to intrathecal substance P and neuropeptide K in the conscious freely moving rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 347: 34-41, 1993.
381. **Pieper GM, Dondlinger L.** Glucose elevations alter bradykinin-stimulated intracellular calcium accumulation in cultured endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 34: 169-178, 1997.
382. **Pirola CJ, Scheucher A, Balda MS, Dabsys SM, Finkielman S, Nahmod VE.** Serotonin mediates cardiovascular responses to acetylcholine, bradykinin, angiotensin II and norepinephrine in the lateral septal area of the rat brain. *Neuropharmacology.* 26: 561-566, 1987.
383. **Pistolese RA.** Epilepsy and seizure disorders: a review of literature relative to chiropractic care of children. *J Manipulative Physiol Ther.* 24: 199-205, 2001.

384. **Pizard A, Blaukat A, Muller-Esterl W, Alhenc-Gelas F, Rajerison RM.** Bradykinin-induced internalization of the human B2 receptor requires phosphorylation of three serine and two threonine residues at its carboxyl tail. *J. Biol. Chem.* Apr 30; 274:12738-12747, 1999.
385. **Pizard A, Marchetti J, Allegrini J, Alhenc-Gelas F, Rajerison RM.** Negative cooperativity in the human bradykinin B2 receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 1309-1915, 1998.
386. **Pollen DA, Trachtenberg MC.** Neuroglia: gliosis and focal epilepsy. *Science.* 167: 1252-1253, 1970.
387. **Powell SJ, Slynn G, Thomas C, Hopkins B, Briggs I, Graham A.** Human bradykinin B₂ receptor: nucleotide sequence analysis and assignment to chromosome 14. *Genomics* 15: 435-438, 1993.
388. **Powers CA, Nasjletti A.** A kininogenase resembling glandular kallikrein in the rat pituitary pars intermedia. *Endocrinology.* 112: 1194-1200, 1983.
389. **Powrie F, Coffman RL.** Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention. *Trends Pharmacol. Sci.* 14: 164-168, 1993.
390. **Prado GN, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke DF, Polgar P.** Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J. Cell. Physiol.* 193: 275-286, 2002.
391. **Prado GN, Mierke DF, LeBlanc T, Manseau M, Taylor L, Yu J, Zhang R, Pal-Ghosh R, Polgar P.** Role of hydroxyl containing residues in the intracellular region of rat bradykinin B(2) receptor in signal transduction, receptor internalization, and resensitization. *J. Cell. Biochem.* 83: 435-447, 2001.
392. **Prado GN, Mierke DF, Pellegrini M, Taylor L, Polgar P.** Motif mutation of bradykinin B2 receptor second intracellular loop and proximal C terminus is critical for

- signal transduction, internalization, and resensitization. *J Biol Chem.* 273(50):33548-33555, 1998.
393. **Prado GN, Taylor L, Polgar P.** Effects of intracellular tyrosine residue mutation and carboxyl terminus truncation on signal transduction and internalization of the rat bradykinin B2 receptor. *J. Biol. Chem.* Jun 6;272(23):14638-14642, 1997.
394. **Prat A, Biernacki K, Pouly S, Nalbantoglu J, Couture R, Antel JP.** Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59: 896-906, 2000.
395. **Privitera PJ, Beckstead RM, Yates P, Walgren R.** Autoradiographic localization of [125I-Tyr⁰]bradykinin binding sites in brains of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Neurobiol.* 23: 805-815, 2003.
396. **Privitera PJ, Thibodeaux H, Yates P.** Rostral ventrolateral medulla as a site for the central hypertensive action of kinins. *Hypertension.* 23: 52-58, 1994.
397. **Privitera PJ, Daum PR, Hill DR, Hiley CR.** Autoradiographic visualization and characteristics of [125I]bradykinin binding sites in guinea pig brain. *Brain Res.* 577: 73-9, 1992.
398. **Qadri F, Schwartz EC, Hauser W, Jöhren O, Müller-Esterl W, Dominiak P.** Kinin B2 receptor localization and expression in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis of spontaneously hypertensive rats. *Int Immunopharmacol.* 3: 285-292, 2003.
399. **Qadri F, Hauser W, Jöhren O, Dominiak P.** Kinin B1 and B2 receptor mRNA expression in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80: 258-263, 2002.
400. **Qadri F, Baurle L, Hauser W, Rascher W, Dominiak P.** Centrally bradykinin B2-receptor-induced hypertensive and positive chronotropic effects are mediated via activation of the sympathetic nervous system. *J. Hypertens.* 17: 1265-1271, 1999.

401. **Quilley J, Sarubbi D, McGiff JC.** Influence of diabetes mellitus on renal vascular responses to bradykinin. *Agents Actions Suppl.*; 38: 31-35, 1992.
402. **Quitterer U, AbdAlla S, Jarnagin K, Muller-Esterl W.** Na⁺ ions binding to the bradykinin B2 receptor suppress agonist-independent receptor activation. *Biochemistry* 35: 13368-77, 1996.
403. **Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL.** Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol.* 55: 1139-1149, 1998.
404. **Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Sorensen O, Rajotte RV, Power RF.** TNF-alpha down-regulates type 1 cytokines and prolongs survival of syngeneic islet grafts in nonobese diabetic mice. *J. Immunol.* 159: 6298-6303, 1997.
405. **Rae F, Bulmer B, Nicol D, Clements J.** The human tissue kallikreins (KLKs 1-3) and a novel KLK1 mRNA transcript are expressed in a renal cell carcinoma cDNA library. *Immunopharmacology* 45: 83-88, 1999.
406. **Racine RJ.** Modification of seizure activity by electrical stimulation: cortical areas. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 38: 1-12, 1975.
407. **Racine R, Livingston K, Joaquin A.** Effects of procaine hydrochloride, diazepam, and diphenylhydantoin on seizure development in cortical and subcortical structures in rats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 38: 355-365, 1975 a.
408. **Racine R, Newberry F, Burnham WM.** Post-activation potentiation and the kindling phenomenon. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 39: 261-271, 1975 b.
409. **Racine R, Tuff L, Zaide J.** Kindling, unit discharge patterns and neural plasticity. *Can J Neurol Sci.* 2: 395-405, 1975 c.
410. **Raidoo DM, Bhoola KD.** Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol Ther.* 79: 105-127, 1998.

411. **Raidoo DM, Bhoola KD.** Kinin receptors on human neurones. *J. Neuroimmunol.* 77: 39-44, 1997.
412. **Raidoo DM, Ramchurren N, Naidoo Y, Naidoo S, Muller-Esterl W, Bhoola KD.** Visualisation of bradykinin B2 receptors on human brain neurons. *Immunopharmacology.* 33: 104-107, 1996 a.
413. **Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Bhoola KD.** Regional distribution of tissue kallikrein in the human brain. *Immunopharmacology.* 32: 39-47, 1996 b.
414. **Ranadive SA, Chen AX, Serajuddin AT.** Relative lipophilicities and structural-pharmacological considerations of various angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. *Pharm. Res.* 9: 1480-1486, 1992.
415. **Rao PJ, Bhattacharya SK.** Hyperthermic effect of centrally administered bradykinin in the rat: role of prostaglandins and serotonin. *Int. J. Hyperthermia.* 4: 183-189, 1988.
416. **Rapp JP.** Use and misuse of control strains for genetically hypertensive rats. *Hypertension.* 10: 7-10, 1987.
417. **Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ.** Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 348: 1-10, 1998.
418. **Regoli D, Jukic D, Gobeil F. & Rhaleb, NE.** Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis. *Can. J Physiol. Pharmacol.* 71: 556-567, 1993.
419. **Regoli DC, Marceau F, Lavigne J.** Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. *Eur. J. Pharmacol.* 71: 105-15, 1981.
420. **Regoli D & Barabe J.** Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32: 1-46, 1980.
421. **Regoli D, Marceau F, Barabe J.** De novo formation of vascular receptors for bradykinin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 56: 674-7, 1978.

422. **Regoli D, Barabe J, Park WK.** Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55: 855-867, 1977.
423. **Reimers JI.** Interleukin-1 beta induced transient diabetes mellitus in rats. A model of the initial events in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus? *Dan. Med. Bull.* 45:157-180, 1998.
424. **Rett K, Maerker E, Renn W, van Gilst W, Haering HU.** Perfusion-independent effect of bradykinin and fosinoprilate on glucose transport in Langendorff rat hearts. *Am J Cardiol.* 80: 143A-147A, 1997.
425. **Revtyak GE, Buja LM, Chien KR, Campbell WB.** Reduced arachidonate metabolism in ATP-depleted myocardial cells occurs early in cell injury. *Am J Physiol* 259: H582-H591, 1990.
426. **Richoux JP, Gelly JL, Bouhnik J, Baussant T, Alhenc-Gelas F, Grignon G, Corvol P.** The kallikrein-kinin system in the rat hypothalamus. Immunohistochemical localization of high molecular weight kininogen and T kininogen in different neuronal systems. *Histochemistry.* 96: 229-243, 1991.
427. **Ricupero DA, Romero JR, Rishikof DC, Goldstein RH.** Des-Arg(10)-kallidin engagement of the B1 receptor stimulates type I collagen synthesis via stabilization of connective tissue growth factor mRNA. *J. Biol. Chem.* 275: 12475-12480, 2000.
428. **Rifo J, Pourrat M, Vavrek RJ, Stewart JM, Huidobro-Toro JP.** Bradykinin receptor antagonists used to characterize the heterogeneity of bradykinin-induced responses in rat vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* 142: 305-312, 1987.
429. **Rocha e Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G.** Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Amer. J. Physiol.* 156: 261-273, 1949.

430. **Rodi D, Ongali B, Couture R and Simonato M.** Targeting Kinin Receptors For The Treatment Of Neurological Diseases. *Current Pharmaceutical Design* Bentham. (2004), soumis.
431. **Rojas A, Romay S, Gonzalez D, Herrera B, Delgado R, Otero K.** Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end products. *Circ Res.* 86: E50-E54, 2000.
432. **Rosenkranz AC, Dusting GJ, Ritchie RH.** Hyperglycaemia abolishes the antihypertrophic efficacy of bradykinin in rat ventricular myocytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26: 519-521, 1999.
433. **Rosenthal T, Erlich Y, Rosenmann E, Cohen A.** Effects of enalapril, losartan, and verapamil on blood pressure and glucose metabolism in the Cohen-Rosenthal diabetic hypertensive rat. *Hypertension* 29: 1260-1264, 1997.
434. **Rothschild AM, Melo VL, Reis ML, Foss MC, Gallo L Jr.** Kininogen and prekallikrein increases in the blood of streptozotocindiabetic rats are normalized by insulin in vivo and in vitro. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 360: 217-220, 1999.
435. **Sabourin T, Morissette G, Bouthillier J, Levesque L & Marceau F.** Expression of kinin B(1) receptor in fresh or cultured rabbit aortic smooth muscle: role of NF-kappa B. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283: H227-237, 2002.
436. **Sabourin T, Guay K, Houle S, Bouthillier J, Bachvarov DR, Adam A, Marceau F.** Absence of ligand-induced regulation of kinin receptor expression in the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* 133: 1154-1162, 2001.
437. **Saifudeen Z, Du H, Dipp S, El-Dahr SS.** The bradykinin type 2 receptor is a target for p53-mediated transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 275: 15557-62, 2000.

438. **Samani NJ, Swales JD, Jeffreys AJ, Morton DB, Naftilan AJ, Lindpaintner K, Ganten D, Brammar WJ.** DNA fingerprinting of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats: implications for hypertension research. *J. Hypertens.* 7: 809-816, 1989.
439. **Sardi SP, Rey-Ares V, Pujol-Lereis VA, Serrano SA & Rothlin RP.** Further pharmacological evidence of nuclear factor-kappa B pathway involvement in bradykinin B₁ receptor-sensitized responses in human umbilical vein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301: 975-980, 2002.
440. **Sarret P.** Signalisation par les récepteurs membranaires couplés aux protéines-G. Etude fonctionnelle des récepteurs de la somatostatine et de la neurotensine. Thèse de doctorat. Université de Nice - Sophia antipolis - France (2000).
441. **Saunders MA, Belvisi MG, Cirino G, Barnes PJ, Warner TD, Mitchell JA.** Mechanisms of prostaglandin E₂ release by intact cells expressing cyclooxygenase-2: evidence for a 'two-component' model. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 1101-1106, 1999.
442. **Sawutz DG, Singh SS, Tiberio L, Koszewski E, Johnson CG, Johnson CL.** The effect of TNF α on bradykinin receptor binding, phosphatidylinositol turnover and cell growth in human A431 epidermoid carcinoma cells. *Immunopharmacology* 24: 1-10, 1992.
443. **Schanstra JP, Neau E, Drogoz P, Arevalo Gomez MA, Lopez Novoa JM, Calise D, Pecher C, Bader M, Girolami JP, Bascands JL.** In vivo bradykinin B₂ receptor activation reduces renal fibrosis. *J. Clin. Invest.* 110: 371-379, 2002.
444. **Schanstra JP, Bataille E, Marin Castaño ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP & Bascands JL.** The B₁-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous

- upregulation of the bradykinin B₁-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 101: 2080-2091, 1998.
445. **Schelling P, Ganten U, Sponer G, Unger T, Ganten D.** Components of the renin-angiotensin system in the cerebrospinal fluid of rats and dogs with special consideration of the origin and the fate of angiotensin II. *Neuroendocrinology.* 31: 297-308, 1980.
446. **Schmaier AH.** The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am J Physiol Regul Integr Comp. Physiol.* 285:R1-R13, 2003.
447. **Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM.** The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest.* 108: 949-955, 2001.
448. **Schmidt RE, Beaudet LN, Plurad SB, Dorsey DA.** Axonal cytoskeletal pathology in aged and diabetic human sympathetic autonomic ganglia. *Brain Res.* 769: 375-383, 1997.
449. **Schulz J, Plesnila N, Eriskat J, Stoffel M, Pruneau D, Baethmann A.** LF16-0687 a novel non-peptide bradykinin B₂ receptor antagonist reduces vasogenic brain edema from a focal lesion in rats. *Acta Neurochir.* 76: 137-139, 2000.
450. **Schweisfurth H, Schiöberg-Schiegnitz S.** Assay and biochemical characterization of angiotensin-I-converting enzyme in cerebrospinal fluid. *Enzyme.* 32: 12-19, 1984.
451. **Scicli AG, Forbes G, Nolly H, Dujovny M, Carretero OA.** Kallikrein-kinins in the central nervous system. *Clin Exp Hypertens A.* 6: 1731-1738, 1984.
452. **Seabrook GR, Bowery BJ, Heavens R, Brown N, Ford H, Sirinathsinghi DJ, Borkowski JA, Hess JF, Strader CD, Hill RG.** Expression of B₁ and B₂ bradykinin receptor mRNA and their functional roles in sympathetic ganglia and sensory dorsal

- root ganglia neurones from wild-type and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology*. 36: 1009-1017, 1997.
453. **Shandra AA, Godlevsky LS, Vastyanov RS, Oleinik AA, Konovalenko VL, Rapoport EN, Korobka NN.** The role of TNF-alpha in amygdala kindled rats. *Neurosci. Res.* 42: 147-153, 2002.
454. **Sharma JN, Kesavarao U, Yusof AP.** Altered cardiac tissue and plasma kininogen levels in hypertensive and diabetic rats. *Immunopharmacology* 43: 129-132, 1999.
455. **Sharma JN, Uma K, Yusof AP.** Left ventricular hypertrophy and its relation to the cardiac kinin-forming system in hypertensive and diabetic rats. *Int J Cardiol* 6: 229-235, 1998.
456. **Shen H, Witowski SR, Boyd BW, Kennedy RT.** Detection of peptides by precolumn derivatization with biuret reagent and preconcentration on capillary liquid chromatography columns with electrochemical detection. *Anal Chem.* 71: 987-994, 1999.
457. **Shughrue PJ, Ky B, Austin CP.** Localization of B1 bradykinin receptor mRNA in the primate brain and spinal cord: an in situ hybridization study. *J. Comp. Neurol.* 465: 372-384, 2003.
458. **Simard B, Gabra BH, Sirois P.** Inhibitory effect of a novel bradykinin B1 receptor antagonist, R-954, on enhanced vascular permeability in type 1 diabetic mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80: 1203-1207, 2002.
459. Simonato M, Mazzuferi M, Rodi D, Binaschi A, Mantovani S, Ongali B, and Couture R. Induction of B₁ bradykinin receptors in the kindled brain. *Kindling* 6 (2004) soumis.

460. **Simson JA, Dom R, Chao J, Woodley C, Chao L, Margolius HS.** Immunocytochemical localization of tissue kallikrein in brain ventricular epithelium and hypothalamic cell bodies. *J. Histochem Cytochem.* 33: 951-953, 1985.
461. **Singh B, Rabinovitch A.** Influence of microbial agents on the development and prevention of autoimmune diabetes. *Autoimmunity.* 15: 209-213, 1993.
462. **Siragy HM, Carey RM.** Protective role of the angiotensin AT2 receptor in a renal wrap hypertension model. *Hypertension.* 33: 1237-42, 1999.
463. **Siragy HM, Inagami T, Ichiki T, Carey RM.** Sustained hypersensitivity to angiotensin II and its mechanism in mice lacking the subtype-2 (AT2) angiotensin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 25;96(11):6506-6510, 1999.
464. **Snyman C, Naidoo Y, Narotam PK, Figueroa CD, Van Dellen JR, Bhoola KD.** Cellular localization of atrial natriuretic peptide and tissue kallikrein in the human hypothalamus. *Braz J Med Biol Res.* 27: 1877-1883, 1994.
465. **Sobey CG.** Bradykinin B2 receptor antagonism: a new direction for acute stroke therapy? *Br. J. Pharmacol.* 139: 1369-1371, 2003
466. **Soskic V, Nyakatura E, Roos M, Muller-Esterl W, Godovac-Zimmermann J.** Correlations in palmitoylation and multiple phosphorylation of rat bradykinin B2 receptor in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 274: 8539-8545, 1999.
467. **Stein JH, Congbalay RC, Karsh DL, Osgood RW, Ferris TF.** The effect of bradykinin on proximal tubular sodium reabsorption in the dog: evidence for functional nephron heterogeneity. *J. Clin. Invest.* 51: 1709-1721, 1972.
468. **Steranka LR, Manning DC, DeHaas CJ, Ferkany JW, Borosky SA, Connor JR, Vavrek RJ, Stewart JM, Snyder SH.** Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85: 3245-3249, 1988.

469. **Stewart JM, Gera L, Chan DC, Bunn PA Jr, York EJ, Simkeviciene V, Helfrich B.** Bradykinin-related compounds as new drugs for cancer and inflammation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80:275-280, 2002.
470. **Stewen P, Mervaala E, Karppanen H, Nyman T, Saijonmaa O, Tikkanen I, Fyhrquist F.** Sodium load increases renal angiotensin type 1 receptors and decreases bradykinin type 2 receptors. *Hypertens Res.* 26: 583-589, 2003.
471. **Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, Hadden D, Turner RC, Holman RR.** Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ.* 321: 405-412, 2000.
472. **Strittmatter SM, De Souza EB, Lynch DR, Snyder SH.** Angiotensin-converting enzyme localized in the rat pituitary and adrenal glands by [³H]captopril autoradiography. *Endocrinology.* 118: 1690-169, 1986.
473. **Strittmatter SM, Lynch DR, De Souza EB, Snyder SH.** Enkephalin convertase demonstrated in the pituitary and adrenal gland by [³H]guanidinoethylmercaptosuccinic acid autoradiography: dehydration decreases neurohypophyseal levels. *Endocrinology.* 117: 1667-1674, 1985.
474. **Strittmatter SM, Lo MM, Javitch JA, Snyder SH.** Autoradiographic visualization of angiotensin-converting enzyme in rat brain with [³H]captopril: localization to a striatonigral pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81: 1599-1603, 1984.
475. **Su JB, Houel R, Heloire F, Barbe F, Beverelli F, Sambin L, Castaigne A, Berdeaux A, Crozatier B, Hittinger L.** Stimulation of bradykinin B(1) receptors induces vasodilation in conductance and resistance coronary vessels in conscious dogs: comparison with B(2) receptor stimulation. *Circulation* 101: 1848-53, 2000.

476. **Taddei S, Viridis A, Ghiadoni L, Mattei P, Salvetti A.** Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on endotheliumdependent vasodilatation in essential hypertensive patients. *J. Hypertens.* 16: 447-456, 1998.
477. **Takahashi H, Buñag RD.** Centrally induced cardiovascular and sympathetic nerve responses to bradykinin in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther* 216: 192-197, 1981.
478. **Takano M, Horie M, Yayama K, Okamoto H.** Lipopolysaccharide injection into the cerebral ventricle evokes kininogen induction in the rat brain. *Brain Res.* 978: 72-82, 2003.
479. **Takano M, Kondo J, Yayama K, Otani M, Sano K, Okamoto H.** Molecular cloning of cDNAs for mouse low-molecular-weight and high-molecular-weight prekininogens. *Biochim Biophys Acta.* 1352: 222-230, 1997.
480. **Tallant EA, Diz DI, Ferrario CM.** State-of-the-Art lecture. Antiproliferative actions of angiotensin-(1-7) in vascular smooth muscle. *Hypertension.* 34: 950-957, 1999.
481. **Tanaka M, Tsuchida S, Imai T, Fujii N, Miyazaki H, Ichiki T, Naruse M, Inagami T.** Vascular response to angiotensin II is exaggerated through an upregulation of AT1 receptor in AT2 knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258: 194-198, 1999.
482. **Tani M, Mizuno K, Hashimoto S, Kunii N, Niimura S, Yabe R, Watari H, Fukuchi S.** Demonstration and characterization of angiotensin-converting enzyme in human pituitary tissue. *Life Sci.* 38: 2277-2284, 1986.
483. **Taub JS, Guo R, Leeb-Lundberg LM, Madden JF, Daaka Y.** Bradykinin receptor subtype 1 expression and function in prostate cancer. *Cancer Res.* 63:2037-2041, 2003.

484. **Thomas GR, Hiley CR.** Cardiovascular effects of intracerebro-ventricular bradykinin and melittin in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 40: 721-723, 1988.
485. **Thomas GR, Thibodeaux H, Margolius HS, Privitera PJ.** Cerebrospinal fluid kinins and cardiovascular function. Effects of cerebroventricular melittin. *Hypertension.* 6: I46-I50, 1984.
486. **Thompson RE, Mandle R Jr, Kaplan AP.** Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J. Clin. Invest.* 60:1376-1380, 1977.
487. **Tiffany CW, Burch RM.** Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett.* 247: 189-192, 1989.
488. **Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, Cooper ME.** Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension.* 41: 392-397, 2003.
489. **Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, Lee RJ, Wexler RR, Saye JA, Smith RD.** Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol. Rev.* 45: 205-251, 1993.
490. **Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ.** A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 275:33238-33243, 2000.
491. **Tom B, Dendorfer A, Danser AH.** Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ACE inhibitors: how do they interact? *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 35: 792-801, 2003.
492. **Tom B, Dendorfer A, de Vries R, Saxena PR, Jan Danser AH.** Bradykinin potentiation by ACE inhibitors: a matter of metabolism. *Br. J. Pharmacol.* 137: 276-284, 2002.

493. **Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T.** Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev.* 44: 103-150, 1992.
494. **Tschöpe C, Schultheiss HP, Walther T.** Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: role of ACE inhibition and AT1 receptor blockade. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 39: 478-487, 2002.
495. **Tschöpe C, Heringer-Walther S, Koch M, Spillmann F, Wendorf M, Leitner E, Schultheiss HP, Walther T.** Upregulation of bradykinin B1-receptor expression after myocardial infarction. *Br J Pharmacol* 129: 1537-1538, 2000.
496. **Tschöpe C, Reinecke A, Seidl U, Yu M, Gavriluk V, Riester U, Gohlke P, Graf K, Bader M, Hilgenfeldt U, Pesquero JB, Ritz E, Unger T.** Functional, biochemical, and molecular investigations of renal kallikrein-kinin system in diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 277: H2333-H2340, 1999a.
497. **Tschöpe C, Walther T, Yu M, Reinecke A, Koch M, Seligmann C, Heringer SB, Pesquero JB, Bader M, Schultheiss H, Unger T.** Myocardial expression of rat bradykinin receptors and two tissue kallikrein genes in experimental diabetes. *Immunopharmacology* 44: 35-42, 1999b.
498. **Tschöpe C, Gohlke P, Zhu YZ, Linz W, Scholkens B, Unger T.** Antihypertensive and cardioprotective effects after angiotensin-converting enzyme inhibition: role of kinins. *J. Card. Fail.* 3: 133-148, 1997.
499. **Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T.** Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *J. Clin. Invest.* 104: 925-935, 1999.

500. **Turner AJ, Tipnis SR, Guy JL, Rice G, Hooper NM.** ACEH/ACE2 is a novel mammalian metalloproteinase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80:346-353, 2002.
501. **Tuunanen J, Pitkanen A.** Do seizures cause neuronal damage in rat amygdala kindling? *Epilepsy Res.* 39: 171-176, 2000.
502. **Ueda H, Matsunaga S, Inoue M, Yamamoto Y, Hazato T.** Complete inhibition of purinoceptor agonist-induced nociception by spinorphin, but not by morphine. *Peptides.* 21: 1215-1221, 2000.
503. **Uehara M, Kishikawa H, Isami S, Kisanuki K, Ohkubo Y, Miyamura N, Miyata T, Yano T, Shichiri M.** Effect on insulin sensitivity of angiotensin converting enzyme inhibitors with or without a sulphhydryl group: bradykinin may improve insulin resistance in dogs and humans. *Diabetologia.* 37: 300-307, 1994.
504. **Valensi P, Miossec P, Attali JR.** [Gastric emptying and diabetic instability] *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu.* 257-270, 1995.
505. **Valensi P, Attali JR, Behar A, Attalah M, Sebaoun J.** Increased capillary permeability to albumin and diabetic neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 11: 41-46, 1991.
506. **Valensi F, Durand V, Bastenaire B, Flandrin G.** Splenic B-cell lymphoma with villous lymphocytes (SLVL). A lymphocytic lymphoma simulating hairy cell leukemia. A study of 8 cases. *Nouv Rev Fr Hematol.* 32: 409-414, 1990.
507. **Vallejo S, Angulo J, Peiro C, Nevado J, Sanchez-Ferrer A, Petidier R, Sanchez-Ferrer CF, Rodriguez-Manas L.** Highly glycosylated oxyhaemoglobin impairs nitric oxide relaxations in human mesenteric microvessels. *Diabetologia.* 43: 83-90, 2000.

508. **Vasta V, Meacci E, Romiti E, Farnararo M, Bruni P.** A role for phospholipase D activation in the lipid signalling cascade generated by bradykinin and thrombin in C2C12 myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1391: 280-286, 1998.
509. **Vavrek RJ & Stewart JM.** Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides* 6:161-164, 1985.
510. **Vavrek RJ, Stewart JM, Snyder SH.** Bradykinin as a pain mediator: receptors are localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 3245-3249, 1988.
511. **Vezzani A, Rizzi M, Conti M, Samanin R.** Modulatory role of neuropeptides in seizures induced in rats by stimulation of glutamate receptors. *J. Nutr.* 130: 1046S-1048S, 2000.
512. **Vianna RM, Ongali B, Regoli D, Calixto JB, Couture R.** Up-regulation of kinin B1 receptor in the lung of streptozotocin-diabetic rat: autoradiographic and functional evidence. *Br. J. Pharmacol.* 138:13-22, 2003.
513. **Vlaeminck-Guillem V, Laudet V, Duterque-Coquillaud M.** Negative cross-talk between nuclear receptors and transcription factors: implications in inflammation and oncogenesis. *Med. Sci.* 19: 1121-1127, 2003.
514. **Wagner S, Kalb P, Lukosava M, Hilgenfeldt U, Schwaninger M.** Activation of the tissue kallikrein-kinin system in stroke. *J. Neurol. Sci.* 202: 75-76, 2002.
515. **Walker K, Dray A, Perkins M.** Hyperalgesia in rats following intracerebroventricular administration of endotoxin: effect of bradykinin B1 and B2 receptor antagonist treatment. *Pain.* 65: 211-219, 1996 a.
516. **Walker K, Dray A, Perkins M.** Development of hyperthermia following intracerebroventricular administration of endotoxin in the rat: effect of kinin B1 and B2 receptor antagonists. *Br. J. Pharmacol.* 117: 684-688, 1996 b.

517. **Walker K, Perkins M, Dray A.** Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochem Int.* 26:1-16 discussion 17-26, 1995.
518. **Walter M, Tepel M, Nofer JR, Neusser M, Assmann G, Zidek W.** Involvement of phospholipase D in store-operated calcium influx in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 479: 51-56, 2000.
519. **Wang DZ, Chao L, Chao J.** Hypotension in transgenic mice overexpressing human bradykinin B2 receptor. *Hypertension* 29: 488-493, 1997.
520. **Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL.** Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280: E685-E694, 2001.
521. **Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM.** Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 97: 238-243, 1996.
522. **Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yan SD, Brett J, et al.** Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 7742-7746, 1994.
523. **Wautier JL, Paton RC, Wautier MP, Pintigny D, Abadie E, Passa P, Caen JP.** Increased adhesion of erythrocytes to endothelial cells in diabetes mellitus and its relation to vascular complications. *N. Engl. J. Med.* 305: 237-242, 1981.
524. **Webb M, McIntyre P, Phillips E.** B₁ and B₂ bradykinin receptors encoded by distinct mRNAs. *J. Neurochem.* 62: 1247-1253, 1994.

525. **Weisel JW, Nagaswami C, Woodhead JL, De La Cardeua RA, Page JD, Colman RW.** The shape of high molecular weight kininogen. *J. Biol. Chem.* 269: 10100-10106, 1994.
526. **Wen Z, Darnell Jr JE.** Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res.* 25: 2062-2067, 1997.
527. **Wen Z, Zhong Z, Darnell Jr JE.** Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell.* 82: 241-250, 1995.
528. **Werle E, Götze W, Kepler A.** Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz. *Biochem. Z.* 289: 217-233, 1937.
529. **Werle E, Grunz M.** Zur Kenntnis der darmkontrahierenden, uterus erregenden und blutdrucksenkenden Substanz DK. *Biochem. Z.* 301: 429-436, 1939.
530. **Werle E, Zach P.** [Distribution of kininogen in the serum and tissues of rats and other mammals] *Z Klin Chem Klin Biochem.* 8: 186-189. 1970.
531. **Whalley ET, Nwator IA.** Selective expression of des-Arg9-BK sensitive (B1) receptors in vivo and in vitro by angiotensin converting enzyme inhibitors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 247A: 185-199, 1989.
532. **Whalley ET, Wahl M.** Cerebrovascular reactivity to angiotensin and angiotensin-converting enzyme activity in cerebrospinal fluid. *Brain Res.* 438: 1-7, 1988.
533. **Wheal HV, Thomson AM.** The electrical properties of neurones of the rat suprachiasmatic nucleus recorded intracellularly in vitro. *Neuroscience.* 13: 97-104, 1984.

534. **Wigg SJ, Tare M, Tonta MA, O'Brien RC, Meredith IT, Parkington HC.** Comparison of effects of diabetes mellitus on an EDHF-dependent and an EDHF-independent artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281: H232-H240, 2001.
535. **Wilkinson DL, Scroop GC.** Role of prostaglandins and the areas postrema in the central pressor action of bradykinin. *Eur. J. Pharmacol.* 113: 287-290, 1985.
536. **Windischhofer W, Leis HJ.** [³H]bradykinin receptor-binding, receptor-recycling, and receptor-internalization of the B2 bradykinin receptor in the murine osteoblast-like cell line MC3T3-E1. *J. Bone Miner. Res.* 12: 1615-1625, 1997.
537. **Wirth K, Breipohl G, Stechl J, Knolle J, Henke S, Scholkens B.** DesArg⁹-D-Arg[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸]bradykinin (desArg¹⁰-[Hoe140]) is a potent bradykinin B1 receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 205: 217-218, 1991.
538. **Wisden W & Morris B.** *In situ* hybridization protocols for the brain. Academic press, 1994.
539. **Wisdom R.** AP-1: one switch for many signals. *Exp. Cell. Res.* 253: 180-185, 1999.
540. **Wolfrum S, Dendorfer A, Dominiak P.** Identification of kallidin degrading enzymes in the isolated perfused rat heart. *Jpn. J. Pharmacol.* 79: 117-120, 1999.
541. **Wotherspoon G, Winter J.** Bradykinin B1 receptor is constitutively expressed in the rat sensory nervous system. *Neurosci Lett.* 294: 175-178, 2000.
542. **Wu HF, Venzie RD, Cohen WM, Jenzano JW, Featherstone GL, Lundblad RL.** Identification of tissue kallikrein messenger RNA in human neutrophils. *Agents Actions.* 38:27-31, 1993.
543. **Xie P, Browning DD, Hay N, Mackman N, Ye RD.** Activation of NF-kappa B by bradykinin through a Galpha(q)- and Gbeta gamma-dependent pathway that involves phosphoinositide 3-kinase and Akt. *J. Biol. Chem.* 275: 24907-24914, 2000.

544. **Xu J, Hsu CY, Junker H, Chao S, Hogan EL, Chao J.** Kininogen and kinin in experimental spinal cord injury. *J Neurochem.* 57: 975-980, 1991.
545. **Yaari Y, Beck H.** "Epileptic neurons" in temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol.* 12: 234-239, 2002.
546. **Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ.** Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 156-160, 1996.
547. **Yamasaki S, Sawada S, Komatsu S, Kawahara T, Tsuda Y, Sato T, Toratani A, Kono Y, Higaki T, Imamura H, Tada Y, Akamatsu N, Tamagaki T, Tsuji H, Nakagawa M.** Effects of bradykinin on prostaglandin I₂ synthesis in human vascular endothelial cells. *Hypertension* 36: 201-207, 2000.
548. **Yang C, Chao J, Hsu WH.** The effect of bradykinin on secretion of insulin, glucagon, and somatostatin from the perfused rat pancreas. *Metabolism* 46: 1113-1115, 1997.
549. **Yang CM, Chien CS, Wang CC, Hsu YM, Chiu CT, Lin CC, Luo SF, Hsiao LD.** Interleukin-1 β enhances bradykinin-induced phosphoinositide hydrolysis and Ca²⁺ mobilization in canine tracheal smooth-muscle cells: involvement of the Ras/Raf/mitogenactivated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)/MAPK pathway. *Biochem. J.* 354: 439-446, 2001.
550. **Yang HY, Erdos EG, Levin Y.** A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim. Biophys. Acta.* 214:374-376, 1970.
551. **Yang HY, Erdos EG, Chiang TS.** New enzymatic route for the inactivation of angiotensin. *Nature.* 218: 1224-1226, 1968.
552. **Yang HY, Erdos EG.** Second kininase in human blood plasma. *Nature.* 15: 1402-1403, 1967.

553. **Yang HY, Neff NH.** Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain. *J. Neurochem.* 19: 2443-2450, 1972.
554. **Yang X, Taylor L, Polgar P.** p53 down-regulates human bradykinin B₁ receptor gene expression. *J. Cell. Biochem.* 82: 38-45, 2001.
555. **Yang X, Taylor L, Polgar P.** Mechanisms in the transcriptional regulation of bradykinin B₁ receptor gene expression. Identification of a minimum cell-type specific enhancer. *J. Biol. Chem.* 273: 10763-70, 1998.
556. **Yang X, Polgar P.** Genomic structure of the human bradykinin B₁ receptor gene and preliminary characterization of its regulatory regions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222: 718-725, 1996.
557. **Yang XP, Liu YH, Peterson E, Carretero OA.** Effect of neutral endopeptidase 24.11 inhibition on myocardial ischemia/reperfusion injury: the role of kinins. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 29: 250-256, 1997a.
558. **Yang XP, Liu YH, Scicli GM, Webb CR, Carretero OA.** Role of kinins in the cardioprotective effect of preconditioning: study of myocardial ischemia/reperfusion injury in B₂ kinin receptor knockout mice and kininogen-deficient rats. *Hypertension* 30: 735-740, 1997b.
559. **Yau L, Wilson DP, Werner JP, Zahradka P.** Bradykinin receptor antagonists attenuate neointimal proliferation postangioplasty. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 281: H1648-H1656, 2001.
560. **Yemeni KK, Bai W, Khan BV, Medford RM, Natarajan R.** Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes.* 48:855-864, 1999.

561. **Yoshida T, Nosaka S.** Some characteristics of a peptidyl dipeptidase (kininase II) from rat CSF: differential effects of NaCl on the sequential degradation steps of bradykinin. *J. Neurochem.* 55: 1861-1869, 1990.
562. **Yousef GM, Diamandis EP.** The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr. Rev.* 22: 184-204, 2001.
563. **Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N, Baethmann A.** Effects of LF 16-0687 Ms, a bradykinin B(2) receptor antagonist, on brain edema formation and tissue damage in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 950: 268-278, 2002.
564. **Zhang DX, Zou AP, Li PL.** Ceramide reduces endothelium-dependent vasodilation by increasing superoxide production in small bovine coronary arteries. *Circ. Res.* 88: 824-831, 2001.
565. **Zhang J, Rivest S.** Anti-inflammatory effects of prostaglandin E2 in the central nervous system in response to brain injury and circulating lipopolysaccharide. *J. Neurochem.* 76: 855-864, 2001.
566. **Zhang JJ, Wang C, Lin KF, Chao L, Chao J.** Human tissue kallikrein attenuates hypertension and secretes into circulation and urine after intramuscular gene delivery in hypertensive rats. *Clin. Exp. Hypertens.* 21: 1145-1160, 1999.
567. **Zhang X, Blenis J, Li H-C, Schindler C, Chen-Kiang S.** Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* 267: 1990-1994, 1995.
568. **Zhao G, Zhang X, Smith CJ, Xu X, Ochoa M, Greenhouse D, Vogel T, Curran C, Hintze TH.** Reduced coronary NO production in conscious dogs after the development of alloxan-induced diabetes. *Am. J. Physiol.* 277: H268-H278, 1999.

569. **Zheng SL, Zhang JP, Chen XM, Huang ZL, Lin ZY, Wong WT.** Syntheses, structures, photoluminescence, and theoretical studies of a novel class of d10 metal complexes of 1H-[1,10]phenanthroline-2-one. *Chemistry*. 9: 3888-3896, 2003.
570. **Zhou X, Prado GN, Taylor L, Yang X, Polgar P.** Regulation of inducible bradykinin B₁ receptor gene expression through absence of internalization and resensitization. *J. Cell. Biochem.* 78: 351-362, 2000.
571. **Zhou X, Prado GN, Chai M, Yang X, Taylor L, Polgar P.** 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, 1999.
572. **Zhou X, Polgar P, Taylor L.** Roles for interleukin-1beta, phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B₁ receptor gene expression. *Biochem. J.* 330: 361-366, 1998.
573. **Zhu YM, Bradbury DA, Pang L, Knox AJ.** Transcriptional regulation of interleukin (IL)-8 by bradykinin in human airway smooth muscle cells involves prostanoic-dependent activation of AP-1 and nuclear factor (NF)-IL-6 and prostanoic-independent activation of NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 278: 29366-29375, 2003.
574. **Zicha J, Kunes J.** Ontogenetic aspects of hypertension development: analysis in the rat. *Physiol Rev.* 79: 1227-1282, 1999.
575. **Zubenko GS, Volicer L, Drenfeld LK, Freeman M, Langlais PJ, Nixon RA.** Cerebrospinal fluid levels of angiotensin-converting enzyme in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy. *Brain Res.* 328: 215-221, 1985.
576. **Zuccollo A, Navarro M, Frontera M, Cueva F, Carattino M, Catanzaro OL.** The involvement of kallikrein-kinin system in diabetes type I (insulinitis). *Immunopharmacology.* 45: 69-74, 1999.

577. **Zuccollo A, Navarro M, Catanzaro O.** Effects of B1 and B2 kinin receptor antagonists in diabetic mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 586-589, 1996.

ANNEXES

ANNEXE 1: Contribution des auteurs

Article 1 : Ongali, B., Campos M.M., Bregola, G., Rodi, D., Regoli D., Thibault, G., Simonato, M. and Couture, R (2003). Autoradiographic analysis of rat brain kinin B₁ and B₂ receptors: normal distribution and alterations induced by epilepsy. *Journal of Comparative Neurology* 461:506-519.

Les chirurgies effectuées sur les rats Spague Dawley pour l'implantation des électrodes et la production des rats kindling ainsi que les sacrifices et prélèvements des tissus ont été réalisés par l'étudiante en stage post-doctoral Donata Rodi et l'assistant de recherche Gianni Bregola au laboratoire du Dr Simonato en Italie. Les antagonistes peptidiques nous ont été fournis par le Dr Regoli. L'iodation de ces peptides dans le laboratoire du Dr Thibault ainsi que la réalisation des sections histologiques des cerveaux et moelles épinières, l'expérimentation en autoradiographie, la compilation et l'analyse des résultats ont été réalisées à Montréal par moi avec la précieuse collaboration de l'étudiante en stage post-doctoral Maria Martha Campos dans les laboratoires du Dr Couture.

Assisté de Maria Martha Campos, j'ai également participé à la rédaction du manuscrit et à la conception des graphiques et photos sous la supervision et les directives des Drs Couture et Simonato.

Article 2 : Ongali, B., Buck De Sousa, H., Cloutier, F., Legault, F., Regoli, D., Lambert, C., Thibault, G., Couture, R. (2003) Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.284:H1949-H1958

Ce travail de collaboration avec le département de pharmacologie a connu l'implication de Mme Francine Legault, assistante de recherche du Dr Lambert, pour les traitements pharmacologiques et le suivi des animaux. L'étudiant au Doctorat Frank Cloutier et moi avons procédé aux sacrifices des animaux et au prélèvement des tissus. Assisté par l'étudiant en stage post-doctoral (de Souza Buck H), j'ai réalisé les coupes histologiques, les expériences en autoradiographie, la compilation et l'analyse des données expérimentales. De plus, j'ai iodé les peptides fournis par le Dr Regoli sous la supervision du Dr Thibault. La rédaction du manuscrit et la conception des photos et des graphiques ont été entièrement réalisées par moi, sous la supervision et les directives du Dr Couture.

Article 3 : Ongali, B., Campos, MM., Petcu, M., Rodi, Cloutier, F., Chabot, JG., Thibault, G., Couture R. Up regulation of kinin B₁ receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat: Autoradiography and *in situ* hybridization survey (en preparation pour Neuroreport) .

Le traitement des rats à la STZ pour induire le diabète et le prélèvement des tissus ont été effectués par l'étudiant au Doctorat (Frank Cloutier), l'étudiant à la maîtrise (Petcu Mihai) et par moi. Les sections histologiques ont été entièrement réalisées par moi. Les expérimentations en autoradiographie ont été effectuées avec l'assistance de Campos MM., Rodi D. et Petcu M. La rédaction du manuscrit et la conception des figures et photos ont été entièrement réalisées par moi sous la supervision du Dr Couture.

| |
|---|
| ANNEXE 2: Contributions scientifiques de l'auteur |
|---|

Brice ONGALI

| |
|--------------|
| PUBLICATIONS |
|--------------|

1. ARTICLES

a) Published

- 1- **Ongali, B.**, Campos, M.M., Petcu, M., Rodi, D., Cloutier, F., Chabot J.G. , Thibault, G. and Couture, R. (2004) Expression of kinin B₁ receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *Neuroreport*. 15: 2463-2466
- 2- Cloutier, F., **Ongali, B.**, Campos, M.M. and Couture, R. (2004) Correlation between brain bradykinin receptor binding sites and cardiovascular function in young and adult spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*: 142: 285-296
- 3- Duguay, D., Der Sarkissian, S., Kouz, R., **Ongali, B.**, Couture, R., and deBlois, D. (2004) Kinin B₂ receptor is not involved in Enalapril-induced Apoptosis and regression of hypertrophy in Spontaneous Hypertensive rat aorta: possible role of B₁ receptor. *British Journal of Pharmacology* 141:728-736
- 4- Abdouh, M., Khanjari, A., Abdelazziz, N., **Ongali, B.**, Couture, R., and Hasséssian, M. H. (2003) Early upregulation of kinin B₁ receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *British Journal of Pharmacology* 140: 33-40
- 5- **Ongali, B.**, De Sousa Buck, H., Cloutier, F., Legault, F., Regoli, D., Lambert , C., Thibault, G., Couture, R. (2003) Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 284:H1949-H1958
- 6- **Ongali, B.**, Campos M.M., Bregola, G., Rodi, D., Regoli D., Thibault, G., Simonato, M. and Couture, R (2003). Autoradiographic analysis of rat brain kinin B₁ et B₂ receptors: normal distribution and alterations induced by epilepsy. *Journal of Comparative Neurology* 461:506-519
- 7- Vianna, R.M., **Ongali, B.**, Regoli, D., Calixto, J.B. and Couture, R. (2003) Up-regulation of kinin B₁ receptor in the lung of streptozotocin-diabetic rat: autoradiographic and functional evidence. *British Journal of Pharmacology* 138: 13-22.
- 8- De Sousa Buck, H, **Ongali, B.**, Thibault, G., Lindsey, J.C. and Couture, R. (2002) Autoradiographic detection of kinin receptors in the human medulla of control, hypertensive, and diabetic donors. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 80: 249-257.
- 9- Cloutier, F., De Sousa Buck, H., **Ongali, B.**, and Couture, R. (2002) Pharmacologic

and autoradiographic evidence for an up-regulation of kinin B₂ receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology* 135: 1641-1654.

- 10- **Ongali, B.**, Ase, A.R., Hébert, C., Amdiss, F. and Reader, T.A. (2000) Dopamine D₁ and D₂ receptors in the forebrain of *Dystonia musculorum* mutant mice: an autoradiographic survey in relation to dopamine contents *Synapse* 37: 1-15.

b) In Press

1. Rodi, D., Couture, R. **Ongali, B.**, and Simonato, M. Targeting Kinin Receptors For The Treatment Of Neurological Diseases (review). *Current Pharmaceutical Design* (2004).

c) Submitted

1. **Ongali, B.**, Petcu, M., Midaoui, A.E., Rodi, D., de Champlain, J., Neugebauer, W. and Couture, R. Effects of Alpha-lipoic acid on kinin B₁ and B₂ receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. *Peptide* (2004)
2. **Ongali, B.**, Midaoui, A.E., Petcu, M., Rodi, D., de Champlain, J. and Couture, R.. Induction of kinin B₁ receptors in two rat models of insulin resistance: effect of alpha-lipoic acid. *Hypertension. Peptide* (2004)
3. Mavoungou, D., Hamet, P., Akoume NDong, M.Y. & **Ongali, B.** Evidence for pre-hypertensive and dyslipidaemia status in young adult Gabonese birth with low body weight. *Journal of Biological chemistry* (2004)
4. Mavoungou, D., Poaty-Mavoungou, V., Mavoungou, E., Akoume Ndong, M.Y. & **Ongali, B.** Inhibition of HIV-1 induced cell-cell fusion by immunor 28. *Virology* (2004).
5. Mavoungou, D., Mavoungou, E., **Ongali, B.**, Akoume Ndong, M.Y., and Moukabi, A. Evidence of Hypothalamopituitary gonadal axis and immune system imbalance during chronic filarial infections. *Brain, Behavior, and Immunity* (2004).

d) In preparation

1. Petcu, M., **Ongali, B.**, Pena, J., Thibault, G., Couture, R. Upregulation of kinin B₁ and B₂ receptors in the spinal cord and dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* (2004)
2. **Ongali, B.**, Rodi, D., Hellal, F., Marchand-Verrecchia, C., Combal, J.P., Pruneau, D., Couture, R. In vivo binding properties of LF 16-0687 Ms to brain bradykinin B₂ receptors after closed head trauma (CHT) in mice. *Journal of Comparative Neurology* (2004)

3. Campos, M.M., **Ongali, B.**, Chabot J.G., Cloutier, F., Thibault, G. and Couture, R. Distribution of mRNA and kinin B₁ receptors in the brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Comparative Neurology* (2004)
4. **Ongali, B.**, Campos, M.M., Cloutier, F., Pruneau, D. and Couture, R. Binding properties of LF 16-0687 Ms to bradykinin B₂ receptors in the rat central nervous system. *European journal of pharmacology* (2004)
5. **Ongali, B.**, Campos, M.M., Thibault, G. and Couture R. Distribution of bradykinin B₂ receptors in the central nervous system of streptozotocin-diabetic rats. *Peptide* (2004)
6. Cloutier F **Ongali, B.**, Deschamps K., Brouillette J., Neugebauer W., Couture R. Up regulation and cardiovascular action of tachykinin NK-1 and NK-3 receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rat (SHR) (2004).

2. DOCUMENTS & BOOK CHAPTERS

a) Published

1. Simonato M., Mazzuferi M., Rodi D., Binaschi A., Mantovani S., **Ongali, B.**, and Couture R.. (2004) Induction of B₁ bradykinin receptors in the kindled brain. *Kindling* 6.
2. Mavoungou, D., **Ongali, B.**, Maka, G., Akoume Ndong, M.Y., Mavoungou, E., Moukabi, A. (2002) Indirect evidence of TH1 and TH2 cytokines equilibrium restoration and significant reduction of opportunistic affections in HIV-1 patient treated by IM28, a DHEA analog. *Monduzzi Editore C708L4830*: 111-116.
3. Mavoungou, D., Mavoungou, E., Maka, G., **Ongali, B.**, and Owone-Zé (2000) M., IM28 Inhibiting HIV-1 Glycoproteins envelope-Mediated Cell Fusion and its effects on Haemoglobin levels of HIV-1 patients, *Monduzzi Editore A709/C/0493*: 137-141.
4. **Ongali, B.** Distribution des récepteurs D₁ et D₂ dans le cerveau antérieur de la souris *Dystonia muscularum*. M.Sc. Thesis (1998) (Dir. Thomas A. Reader, U de Montréal).

3. ABSTRACTS

a) Published

1. **Ongali, B.**, Rodi D., Hellal F., Marchand-Verrecchia C., Combal J.P., Pruneau D., Couture R. (2004) In-vivo binding properties of LF 16-0687 Ms to bradykinin B₂ receptors after closed head trauma (CHT) in mice. 34th Annual meeting of Neurosciences. 23-27 October (2004) San Diego, USA

2. Petcu M., **Ongali, B.**, Couture R. Up regulation of kinin B₁ and B₂ receptors in the spinal cord and dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain. 34th Annual meeting of Neurosciences. 23-27 October (2004) San Diego, USA
3. **Ongali, B.**, El Midaoui, A., Petcu, M., Rodi, D., De Champlain, J., Couture, R. Effects of Alpha-lipoic acid on kinin B₁ and B₂ receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. 24th Canadian Cardiovascular Congress, Calgary, 25-29 oct. (2004). *Can. J. Cardiol.* 20 (suppl D), p. 53D/034
4. El Midaoui, A., **Ongali, B.**, Petcu, M., Rodi, D., De Champlain, J., Couture, R. Induction of kinin B₁ receptors in two rat models of insulin resistance: effect of alpha-lipoic acid. 24th Canadian Cardiovascular Congress, Calgary, 25-29 oct. (2004). *Can. J. Cardiol.* 20 (suppl D), p. 54D/035
5. Campos, M.M., **Ongali, B.**, Cloutier, F., Chabot, J-G, Couture, R. Determination of kinin B₁ receptor distribution in the brain of streptozotocin (STZ) diabetic rats by in situ hybridization . 4th Congress of The Federation of the European Pharmacological Societies (EPHAR), Porto, Portugal (2004) p. 82.
6. Petcu M., **Ongali, B.**, Couture R. Up regulation of kinin B₁ and B₂ receptors in the spinal cord and dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain. An International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 31-August 4 (2004) Abstr.60, P. 66
7. Midaoui AE, **Ongali, B.**, Petcu M., Rodi, D., de Champlain, J. and Couture, R. Induction of kinin B₁ receptors in two rat models of insulin resistance: effect of alpha-lipoic acid. Hypertension. An International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 31-August 4 (2004) Abstr. 72, P. 69
8. **Ongali, B.**, Campos MM., Petcu M., Chabot JG, Couture R Distribution of mRNA and kinin B₁ receptor in the central nervous system of STZ-diabetic rats. An International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 31-August 4 (2004) Abstr. 73, P. 70.
9. **Ongali, B.**, Midaoui AE, Petcu M., Rodi, D., de Champlain, J. and Couture, R. Effects of Alpha-lipoic acid on kinin B₁ and B₂ receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. An International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 31-August 4 (2004) Abstr.74, P. 70.
10. Cloutier F **Ongali, B.**, Deschamps K., Brouillette J., Neugebauer W., Couture R. Up regulation and cardiovascular action of tachykinin NK-1 and NK-3 receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rat (SHR). An International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 31-August 4 (2004) Abstr. 82, P. 72
11. **Ongali, B.**, Rodi , D., Campos, M.M., Cloutier, F., Petcu, M., Neugebauer, W., Thibault, G., Regoli, D., & Couture, R. Autoradiographic characterization of Bradykinin B₁ and B₂ receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. 15^{eme}

Congrès annuel du G.R.S.N.A. 4 décembre (2003), Université de Montréal, Montréal, Canada.

12. **Ongali, B.**, Rodi, D., Campos, M.M., Cloutier, F., Petcu, M., Neugebauer, W., Thibault, G., Regoli, D., & Couture, R. Autoradiographic characterization of Bradykinin B₁ and B₂ receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. 33th Annual meeting of Neurosciences. 8-12th November (2003), New Orleans, USA.
13. Campos, M.M., **Ongali, B.**, Rodi, D., Cloutier, F., Petcu, M., Neugebauer, W., Thibault, G., Regoli, D., & Couture, R. Autoradiographic characterization of Bradykinin B₁ and B₂ receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats XXXV Congress of the Brazilian Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. September 21st - 24th (2003), Águas de Lindóia, SP, Brazil.
14. Hellal, F., **Ongali, B.**, Rodi, D., Marchand-Verrecchia, C., Combal, J.P., Pruneau, D., Couture, R. In vivo binding properties of LF 16-0687 Ms to brain bradykinin B₂ receptors after closed head trauma (CHT) in mice. The 21st Annual National Neurotrauma Symposium. 6-7th November (2003), Biloxi, Mississippi, USA.
15. **Ongali, B.**, Campos, M.M., Bregola, G., Thibault, G., Simonato, M., Couture, R. Plasticité des récepteurs B₁ et B₂ des kinines dans un modèle épileptique chez le rat. Congrès des stagiaires. Palais des congrès de Montréal, Montréal, (2003), Médecine Sciences 19 Suppl. 2, Abstr.254 P-045.
16. **Ongali, B.**, Campos, M.M., Bregola, G., Thibault, G., Simonato, M., Couture, R. Plasticité des récepteurs B₁ et B₂ des kinines dans un modèle épileptique chez le rat. 44^{ème} Réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec. Saint-Sauveur, 19-21 Septembre (2002), Médecine Sciences 18 Suppl. 2 Abstr.190 P-039.
17. Bregola, G., Couture, R., **Ongali, B.**, Rodi, D., Zucchini, S., Beani, L., Simonato, M. Expression and biological activity of B₁ bradykinin receptors in the hippocampus of Kindled rats. 32nd annual meeting of neurosciences. Orlando, Florida USA; 2-7 November (2002), Program Number: 603.13 Poster Z-52
18. Cloutier, F., **Ongali, B.**, De Sousa Buck, H., Legault, F., Regoli, D., Lambert, C., Thibault, G., Couture, R. Chronic effects of angiotensin-1 converting enzyme inhibitors and losartan on kinin receptors in the rat spinal cord. 32nd annual meeting of neurosciences. Orlando, Florida USA; 2-7 November (2002), Program Number: 860.4 Poster I-16.
19. Mavoungou, D., Maka, G., Ndong, J., **Ongali, B.**, Owono-Ze, M. and Toung Mve, M. IM28 and its precursor DHEA increasing hemoglobin levels in HIV1 patients : evidence of reduction of viral load and CD4 levels augmentation. XIIème Conférence Internationale sur le SIDA et les Maladies Sexuellement Transmissibles en Afrique Ouagadougou, BurkinaFaso, 9-13 Décembre (2001), 10 PT4-327.
20. Couture R., Bregola, G., **Ongali, B.** and Simonato, M. Expression and biological activity of B₁ bradykinin receptors in the Hippocampus of kindled rats (2001), Philadelphia of Epilepsy Academic Society.

21. **Ongali, B.**, De Sousa Buck, H., Cloutier, F., Legault, F., Regoli, D., Lambert, C., Thibault, G., et Couture, R. Sur-expression des récepteurs B₂ des kinines dans la moelle épinière du rat spontanément hypertendu (SHR) par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion. 43^{ème} Réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Mont Ste-Anne, Québec, 20-22 septembre, (2001), Médecine Sciences, 17 Suppl. 2 Abst. 220 P. 37.
22. Vianna, R.M., **Ongali, B.**, Regoli, D. et Couture, R. L'activation du récepteur B₁ des kinines cause la pleurésie chez le rat diabétique traité à la streptozotocine (STZ). 43^{ème} Réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Mont Ste-Anne, Québec, 20-22 septembre, (2001), Médecine Sciences, 17 Suppl. 2 Abst. 182 P. 31.
23. Cloutier, F., De Sousa Buck, H., **Ongali, B.**, and Couture, R. Up-regulation of kinin receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 29-August 2, 2001, P51.
24. De Sousa Buck, H., **Ongali, B.** and Couture, R. Quantitative autoradiographic analysis of kinin receptor expression in the Human medulla of hypertensive and diabetic donors. International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 29-August 2, (2001), P54.
25. Vianna, R.M., **Ongali, B.**, Regoli, D. and Couture, R. Activation of B₁ kinin receptor induces pleurisy in streptozocin (STZ)-Diabetic rats. International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 29-August 2 (2001), P 93.
26. **Ongali, B.**, De Sousa Buck, H., Cloutier, F., Legault, F., Regoli, D., Lambert, C., Thibault, G., and Couture, R. Up-regulation of spinal B₂ kinin receptors by ACE inhibitors in spontaneously hypertensive rat (SHR). International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 29-August 2 (2001), P 52.
27. **Ongali, B.**, De Sousa Buck, H., Cloutier, F. et Couture, R. Distribution des récepteurs B₁ et B₂ des kinines dans la moelle épinière du rat spontanément hypertendu (SHR) traité au Losartan. Congrès annuel des stagiaires de recherches de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, Québec. , 19 janvier (2001), Abst 35.
28. Cloutier, F., De Sousa Buck, H., **Ongali, B.**, Couture, R. Sur-expression des récepteurs B₁ et B₂ dans la moelle épinière du rat spontanément hypertendu (SHR): évidences pharmacologiques et en autoradiographie. 9^{ème} réunion scientifique annuelle de la Société Québécoise d'hypertension artérielle, 11-13 janvier (2001), à Québec, Médecine Sciences 17 supp 1 P.16.
29. **Ongali, B.**, Cloutier, F. et Couture, R. Mise au point d'un nouveau protocole expérimental pour l'étude des récepteurs B₂ des kinines dans la moelle épinière. 42^{ème} Réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec. (2000), Médecine Sciences 16 supp. 2abstr 85, P. 15.

30. **Ongali, B.**, Cloutier, F. et Couture, R. Augmentation des sites récepteurs B₂ dans la moelle épinière du rat traité à la streptozotocine. Congrès annuel des stagiaires de recherches de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Montréal, Québec. (19 janvier 2000), Abst 22.
31. **Ongali, B.**, Amdiss, F., Ase, A.R., Hébert, C., Lalonde, R., Botez, M.I et Reader, T.A. Distribution des récepteurs dopaminergiques D₁ et D₂ chez les souris mutantes neurologiques lurcher, weaver et dystonia musculorum. XXIV Réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec. Trois-Rivières, Québec (1997), Médecine Sciences 13 Suppl. 2 Abst.36 P-079.
32. Ase, A.R., **Ongali, B.**, Amdiss, F., Hébert, C. and Reader, T.A. Dopamine receptors in dystonia musculorum mice: quantitative autoradiography in relation to endogenous dopamine contents. XVI World Congress of Neurology, Buenos Aires, Argentina. J.Neurol. Sci. 150 suppl. (1997) S263 Abst. 4-42-06.
33. **Ongali, B.**, Lalonde, R., Strazielle, C., Botez, M.I., and Reader, T.A. Distribution of beta-adrenergic receptors in dystonia musculorum mutant mice: an autoradiographic study. CFBS Meeting, Quebec (1997) Abst. 101.
34. **Ongali, B.**, Amdiss, F., Hébert, C. et Reader, T.A. Distribution des récepteurs dopaminergiques D₁ chez les souris mutantes neurologiques lurcher, weaver et dystonia musculorum. XXIII Réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec. (1996), Médecine Sciences 12 Suppl. 2 abstr.50 P-195.

c) Submitted

4. Oral presentation

1. Simonato, M., Mazzuferi, M., Rodi, D., Binaschi, A., Bregola, G., Mantovani, S., **Ongali, B.**, Regoli, D., Couture, R. Induction of B1 bradykinin in a rat model of temporal lobe epilepsy. An International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, July 31-August 4 (2004) VII.O.2. P. 45
2. **Ongali, B.**, Campos, M.M., Rodi, D., Petcu, M., and Couture, R. Expression nerveuse centrale des récepteurs B₁ et B₂ des kinines chez le rat diabétique. 15^{ème} Congrès annuel du G.R.S.N.A. Université de Montréal, Montréal, Canada, 4 décembre 2003.
3. Petcu, M., **Ongali, B.**, and Couture R. Plasticité des récepteurs aux neuropeptides dans le ganglion de la racine dorsale et la moelle épinière dans un modèle de neuropathie chez le rat. 15^{ème} Congrès annuel du G.R.S.N.A. Université de Montréal, Montréal, Canada, 4 décembre 2003
4. Petcu, M., **Ongali, B.**, Cloutier, F., and Couture R. Le rôle des kinines en physiopathologie sensorielle, Séminaire de maîtrise en physiologie (PSL 6051),

Université de Montréal, Montréal, Canada, 13 février 2003.

5. **Ongali, B.**, Buck, H. S., Cloutier, F., Legault, F., Regoli, D., Lambert, C., Thibault, G., et Couture, R. Effets chroniques du traitement aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion à l'angiotensine sur les récepteurs B₁ et B₂ des kinines dans la moelle épinière du rat spontanément hypertendu. Séminaire étudiant en Sciences Neurologiques. Université de Montréal, Montréal, Canada, 25 janvier 2003.
 6. Cloutier, F., de Sousa Buck, H., **Ongali, B.**, and Couture, R. Surexpression du récepteur B₂ des kinines dans la moelle épinière du rat spontanément hypertendu (SHR): évidence pharmacologique et en autoradiographie. 14eme Congrès annuel du G.R.S.N.A. Université de Montréal, Montréal, Canada, 9 décembre 2002.
 7. Cloutier, F., de Sousa Buck, H., **Ongali, B.**, and Couture, R. Surexpression du récepteur B₂ des kinines dans la moelle épinière du rat spontanément hypertendu (SHR): évidence pharmacologique et en autoradiographie. Séminaire étudiant en Sciences Neurologiques, Université de Montréal, Montréal, Canada, 26 novembre 2002.
 8. Couture, R., Harrison, M., Vianna, R.M., Cloutier, F., **Ongali, B.** Kinin receptors in pain and inflammation. International Symposium on Peptide receptors, from Gene to Therapy, Montréal, Canada, IV.0.6. July 29-August 2 (2001).
 9. **Ongali, B.**, Buck, H. S., Cloutier, F., Legault, F., Regoli, D., Lambert, C., Thibault, G., et Couture, R. Sur-expression des récepteurs B₂ des kinines dans la moelle épinière du rat spontanément hypertendu (SHR) par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion. 13eme Congrès annuel du G.R.S.N.A. Université de Montréal, Montréal, Canada, 28 novembre 2001.
 10. **Ongali, B.**, Buck, H. S., Cloutier, F., et Couture, R. Distribution des récepteurs B₁ et B₂ des kinines dans la moelle épinière du rat spontanément hypertendu (SHR). Séminaire étudiant en Sciences Neurologiques. Université de Montréal, Montréal, Canada, 27 février 2001.
 11. **Ongali, B.**, Brouillette, J., Xavier, F., Valois, C., Lessard, A., et Cloutier, F. Pour ou Contre les organismes génétiquement modifiés, débat en Bioéthique. Université de Montréal, Montréal Canada, 01 avril 2000.
 12. **Ongali, B.**, Hallenbeck, P. Insertion d'une cassette chloramphénicol en amont du promoteur de fdhf préalablement clonée dans le multisite de bluescript. Séminaire étudiant. Département de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada (1995).
 13. **Ongali, B.**, Brakier Gingra, L. Contrôle traductionnel de l'expression du récepteur B₂ adrenergique. Séminaire étudiant. Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Canada (1995).
-