



Rôle du système kallicréine-kinine(s) dans les complications du diabète

Dorinne Desposito

► **To cite this version:**

Dorinne Desposito. Rôle du système kallicréine-kinine(s) dans les complications du diabète. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. <NNT : 2015PA066258>. <tel-01283690>

HAL Id: tel-01283690

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01283690>

Submitted on 6 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale ED 394 : Physiologie, physiopathologie et thérapeutique

Equipe Ronan Roussel, Complications vasculaires du diabète

Rôle du système kallibréine-kinine(s) dans les complications du diabète

Par Dorinne Desposito

Thèse de doctorat de Physiopathologie

Dirigée par Ronan Roussel

Présentée et soutenue publiquement le 04 septembre 2015

Devant un jury composé de :

Pr. Christian Funck-Brentano, PUPH, Président du jury

Pr. Ronan Roussel, PUPH, Directeur de thèse

Pr. Jacqueline Azay-Milhau, Professeur d'Université, Rapporteur

Pr. Pierre Boutouyrie, PUPH, Rapporteur

Pr. Agnès Hartemann, PUPH, Examineur

Dr. Jean-Pierre Girolami, DR, Examineur

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, le Pr. Ronan Roussel, pour son encadrement et son soutien tout au long de cette thèse. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait confiance tout au long de mes travaux, et plus particulièrement, dans le projet « ischémie cérébrale ». Merci pour toutes les discussions scientifiques et ta disponibilité malgré ton emploi du temps surchargé. Merci de m'avoir laissée l'opportunité de présenter mes travaux aux quatre coins du monde (ou du moins à Paris, Strasbourg, San Francisco et Moscou, ce qui est un bon début !).

Mes remerciements vont également au Dr. Ludovic Waeckel, non pas pour sa bonne humeur (☺), mais pour tout le reste ! Je le remercie de m'avoir conseillée et formée dans mes premiers pas en tant que chercheuse. Je le remercie aussi pour toutes les nombreuses discussions (plus ou MOINS scientifiques) eues durant la première moitié de ma thèse.

Je remercie également le Dr. François Alhenc-Gelas et le Dr. Nadine Bouby pour leurs disponibilités, leurs conseils, leurs confiances, leurs expertises et toutes les discussions scientifiques que nous avons eues.

Je remercie l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail de thèse. Je tiens à remercier :

Le Pr. Christian Funck-Brentano de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Le Pr. Jacqueline Azay-Milhau, qui après avoir été ma directrice de thèse d'exercice de pharmacie, me fait le plaisir de tout de même accepter d'être rapporteur de cette thèse ! Je la remercie pour sa gentillesse, pour le temps qu'elle m'a consacré et pour ses conseils et suggestions depuis plusieurs années.

Le Pr. Pierre Boutouyrie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse ; ses remarques ont contribué à améliorer la qualité de ce manuscrit.

Le Dr. Jean-Pierre Girolami d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse ; je le remercie également pour tous ses conseils et son aide apportés lors de la rédaction de ce manuscrit.

Le Pr. Agnès Hartemann d'avoir accepté de faire partie du jury et d'apporter son expertise en diabétologie.

Je remercie tous les membres de l'équipe Roussel (anciennement équipe 2) des Cordeliers non mentionnés ci-dessus : Catherine Chollet, Florence Bordu, Frédéric Fumeron, Gilberto Velho, Naïma Bellili-Munoz, Ray El-Boustany, et Lise Bankir ; sans oublier Louis Potier qui *n'aura* pas réussi à me faire parler français avant la fin de ma thèse... et Christopher Taveau pour sa gentillesse et son aide. Je n'oublierai pas de remercier Anthony Nicolas pour sa bonne humeur,

son soutien et son écoute en particulier quand j'ai été « dégoûtée ! » à peu près 10 fois par jour. Bien qu'il ne fasse pas partie de l'équipe, j'en profite pour remercier Georges Zadigue pour son aide technique, sa disponibilité et sa sympathie.

Je remercie également tous nos collaborateurs pour leur contribution dans la réalisation des projets et leurs réponses à mes nombreuses interrogations dont notamment Michel Plotkine, Nathalie Kubis, Patrick Bruneval, Clovis Adam et Fernand Gobeil Junior.

Je remercie tous les Jeunes Chercheurs des Cordeliers, si on peut encore nous appeler comme ça, pour tous ces bons moments passés... surtout autour d'une bière O'Prince ! Merci pour toutes les soirées, les pique-niques, les repas, les pauses café (sans café), etc. Je remercie particulièrement Claire Quiney et Laure Delavallée sans qui je n'aurais pas pu garder mon excellente condition physique tout au long de ma thèse ! Je remercie Lauriane Cabon pour nos petits tête-à-tête ; Antoine Tarjus pour son écoute et nos discussions interminables (et oui finalement... pas si asociale que ça !) ; Basile Gravez pour sa bonne humeur et pour toutes les fois où on était les derniers ; mais aussi Ivan Peyron, Thomas Aranas, Guillaume Galmiche, Riccardo Urbanet, Charlotte Smichtt, Anthony Nicolas (encore), Adrien Cosson, et les deux petits nouveaux Mathieu Buonafine et Audrey Bertaux. J'espère n'avoir oublié personne. Merci à tous d'avoir fait que finalement faire une thèse... c'est plutôt sympa !

Mes remerciements vont aussi à ma famille et mes amis, sans qui, *ben*, je ne serai pas qui je suis. Je remercie tout particulièrement mes parents qui ont toujours été présents pour moi et qui m'ont toujours soutenue. Merci papa pour ton côté rassurant et réconfortant quand j'ai des doutes. Merci maman pour ta présence et tes inquiétudes. Merci de penser à tout ce dont je n'aurais jamais pensé ! Je remercie également mes sœurs à qui, malgré tout, je tiens énormément. Je remercie Laura pour tout ce qu'elle m'apporte sans s'en rendre compte, pour son insouciance, sa joie et son amour qui ne serait pas pareil sans le petit zeste d'angoisse associé ! Comment ne pas remercier Florence, ma grande sœur parisienne, sans qui toute cette aventure n'aurait même pas commencé. Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir soutenue il y a trois ans et pendant ces trois ans. Je remercie également mes amis du Sud qui ont résisté à l'épreuve de la distance, je pense principalement à la petite (ou plutôt grande) famille Goudemare que j'adore et à mon meilleur ami Pascal. Enfin, je te remercie Pierre pour ton soutien quoi qu'il arrive, pour ta patience dans la dernière ligne droite, ton encouragement tout au long de ma thèse et pour toutes les nombreuses fois où tu as du entendre parler du SKK ! Merci de me suivre dans toutes mes lubies qui vont nous amener presque au bout du monde !

Je terminerai avec la phrase suivante : nous aurons tout le temps de nous reposer quand nous serons vieux ... Alors pourquoi pas profiter de la vie avant ?!

LISTE DES PUBLICATIONS ASSOCIEES

- **Peer Reviews :**

1. **Dorinne Desposito**, Georges Zagigue, Christopher Taveau, Clovis Adam, Nadine Bouby, François Alhenc-Gelas, Ronan Roussel. Effect of KKS modulation on brain damage and mortality in experimental cerebral ischemia in non-diabetic and diabetic mice. Article en preparation.

2. **Desposito D**, Chollet C, Taveau C, Descamps V, Roussel R, Alhenc-Gelas F, Bouby N, Waeckel L. Improvement of skin wound healing in diabetic mice by kinin B2 receptor blockade. Clinical Science. Article en révision.

3. Taveau C, Chollet C, Waeckel L, **Desposito D**, Bichet DG, Arthus MF, Magnan C, Philippe E, Paradis V, Foufelle F, Hainault I, Enhorning S, Velho G, Roussel R, Bankir L, Melander O, Bouby N. Vasopressin and hydration play a major role in the development of glucose intolerance and hepatic steatosis in obese rats. Diabetologia. 2015 May;58(5):1081-90.

4. **Desposito D**, Potier L, Chollet C, Gobeil F Jr, Roussel R, Alhenc-Gelas F, Bouby N, Waeckel L. Kinin receptor agonism restores hindlimb postischemic neovascularization capacity in diabetic mice. J Pharmacol Exp Ther. 2015 Feb;352(2):218-26.

- **Brevet :**

Brevet européen « B2R antagonist / diabetic ulcer » déposé le 23/04/2015 via Inserm transfert (numéro du dépôt PCT/FR2015/051112).

- **Rapport de congrès :**

CoDia 2014 à Paris, « Cœur et Diabète : Quoi de neuf ? » publié dans Correspondances en MHDN (Métabolismes Hormones Diabètes et Nutrition) avril-mai 2014.

- **Abstracts :**

1. **Desposito D. et al.** Selective pharmacological kinin receptor activation restores postischemic neovascularization and hindlimb perfusion in diabetic mice. Hypertension 2014;64:A334.

2. **Desposito D. et al.** Role of kinins in diabetic wound healing. Diabetes. 2014;63(1):A645-P.

3. **Desposito D. et al.** Specific activation of the kallikrein-kinin system in hindlimb ischemia in diabetic mice. Cardiovascular Diseases. 2014 April;6(1):22

RESUME

Le système kallibréine-kinine(s) (SKK) est un système peptidique vasomoteur avec des effets multiples et complexes qui dépendent principalement du tissu et des pathologies étudiés. Le SKK a notamment été impliqué dans le développement d'anomalies métaboliques conduisant au diabète mais aussi dans certaines de ses complications telles que la néphropathie diabétique, la rétinopathie diabétique ou les pathologies cardiaques liées au diabète. Les kinines, les métabolites vasoactifs de ce système, activent deux types de récepteurs : le récepteur B1 (RB1) et le récepteur B2 (RB2). **L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle de ce système dans certaines complications associées au diabète chez la souris.** Pour cela, nous avons utilisé des approches pharmacologiques en utilisant des nouveaux agonistes spécifiques des RB1 ou des RB2 et un antagoniste spécifique des RB2.

Dans la première partie de ce travail, nous avons pu montrer que les récepteurs des kinines (RB1 et RB2) sont fortement impliqués dans les processus de néovascularisation post-ischémique chez la souris présentant un diabète de type 1. En effet, l'administration chronique d'un agoniste spécifique des RB1 ou des RB2 corrige entièrement le défaut de néovascularisation post-ischémique observé chez la souris diabétique notamment en augmentant les paramètres inflammatoires dans la circulation sanguine et dans la zone ischémisée. L'administration de ces nouveaux agonistes représente donc une nouvelle cible thérapeutique intéressante dans le cas des artérites diabétiques.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle du SKK dans les processus de cicatrisation cutanée. L'activation des RB1 n'a pas d'effet dans la cicatrisation chez la souris. En revanche, l'activation des RB2 entraîne une désorganisation des couches cutanées et un épaississement de l'épiderme qui sont associés à un retard important de cicatrisation chez la souris non-diabétique et chez la souris diabétique. Le résultat intéressant de cette étude est que le traitement par l'icatibant, un antagoniste spécifique des RB2, accélère de façon significative la cicatrisation dans deux modèles de diabète, un modèle proche du diabète de type 1 et un modèle proche du diabète de type 2. Le traitement avec l'icatibant, déjà commercialisé dans une autre indication, est donc très prometteur pour la cicatrisation du pied du diabétique.

Pour finir, nous avons tenté de clarifier le rôle du SKK dans l'ischémie cérébrale. L'activation des RB2 augmente la mortalité et l'atteinte fonctionnelle dans un modèle de souris non-diabétiques d'ischémie-reperfusion cérébrale. Les mécanismes délétères de l'activation des RB2 semblent impliquer le développement d'un œdème cérébral et d'une insuffisance rénale rapidement après une ischémie cérébrale. Les RB1 ne semblent pas jouer de rôle majeur après une ischémie cérébrale chez les souris non diabétiques ; mais chez les souris diabétiques, l'activation des RB1 réduit la taille de l'infarctus et les déficits neurologiques sans effet négatif sur la fonction rénale et la survie des animaux.

Pour conclure, nous avons pu montrer au cours de ces travaux que le SKK a des effets contradictoires en fonction des organes étudiés. L'étude des nouveaux agonistes des récepteurs des kinines ouvre des nouvelles voies thérapeutiques dans les complications du diabète, toutefois une évaluation rigoureuse de l'ensemble des effets potentiellement associés est nécessaire.

ABSTRACT

The kallikrein-kinin(s) system (KKS) is a peptide system with various pathophysiological effects. KKS appear to play a role in the pathogenesis of metabolic abnormalities leading to diabetes and also in some of its complications. Kinins exert their actions through activation of two different receptor subtypes: B1 receptor (B1R) and B2 receptor (B2R). The aim of my thesis was to study the role of this system in diabetic complications in mice. We used pharmacological approaches using new specific agonists of B1R or B2R, or a specific antagonist of B2R.

In the first part of this work, we showed that B1R or B2R are involved in post-ischemic neovascularization in diabetic mice. Indeed, selective pharmacological activation of B1 or B2 kinin receptor overcomes the effect of diabetes on post-ischemic neovascularization and restores tissue perfusion through monocyte/macrophage mobilization. So, kinin receptors are potential therapeutic targets in limb ischemia in diabetes.

In the second part of this thesis, we focused on the role of KKS in skin wound healing processes. B1R activation has no effect on wound healing in mice. In contrast, B2R agonist impairs wound repair in both non-diabetic and diabetic mice, inducing skin disorganization and epidermis thickening. Interestingly, B2 receptor blockade improves skin wound healing in two mouse models of diabetes. B2R antagonist is a potential therapeutic approach to diabetic ulcers.

In a last part, we attempted to clarify the role of KKS in transient cerebral ischemia. We show that B2R activation increases mortality by mechanisms that may involve brain oedema and renal insufficiency. B1R activation has no effect in non-diabetic mice but in diabetic animals it reduces infarct size and improves neurological deficit without adverse effect on renal function and survival. Further studies are needed to better understand mechanisms implicated in neuroprotective effects of B1R activation after transient cerebral ischemia in diabetic mice.

To conclude, KKS has contradictory effects depending on the organs studied. The study of new B1 or B2 kinin receptor agonists opens new therapeutic options in diabetic complications in particular in case of ischemia. However, careful evaluation of all potentially associated effects with the administration of agonists is needed.

TABLE DES MATIERES

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
CHAPITRE 1 : LE DIABETE	8
1. Définition	8
2. Epidémiologie	9
3. Les différents types de diabète.....	10
3.1. Diabète de type 1	10
3.1.1. Physiopathologie	10
3.1.2. Origines	11
3.1.3. Symptômes et traitements	11
3.2. Diabète de type 2	12
3.2.1. Physiopathologie	12
3.2.2. Origines	13
3.2.3. Symptômes et traitements	13
3.3. Autres diabètes	14
4. Modèles expérimentaux de diabète	14
4.1. Principaux modèles expérimentaux de diabète	14
4.2. Modèle de diabète induit par injection de streptozotocine.....	15
4.2.1. Mécanisme d'action	15
4.2.2. Conséquences métaboliques.....	16
4.2.3. Méthode d'induction	16
4.3. Souris db/db	16
4.3.1. Mécanisme d'action	16
4.2.2. Conséquences métaboliques.....	17
5. Complications du diabète	17
5.1. Classification des complications du diabète.....	18
5.2. Complications microvasculaires	18
5.2.1. Rétinopathie diabétique.....	19
5.2.2. Néphropathie diabétique	19
5.3. Complications macrovasculaires	20
5.3.1. Infarctus du myocarde	21
5.3.2. Accidents vasculaires cérébraux (AVC)	21
5.3.3. Artériopathie des membres inférieurs au cours du diabète	22
5.4. Neuropathie diabétique.....	22
5.5. Autres complications.....	23
5.5.1. Troubles de l'érection.....	23
5.5.2. Augmentation du risque infectieux	23
5.5.3. Retard de cicatrisation.....	23
5.5.4. Pied du diabétique	24
5.5.5. Cancers	24
5.5.5. Autres	25
6. Conclusion du chapitre	25

CHAPITRE 2 : LE SYSTEME KALLICREINE-KININE.....	26
1. Introduction.....	26
2. Formation des kinines.....	27
2.1. Kininogènes.....	27
2.2. Kallibréines.....	28
2.2.1. Kallibréine plasmatique (PK).....	28
2.2.2. Kallibréine tissulaire (TK).....	28
2.3. Kinines.....	29
3. Degréation des kinines.....	30
3.1. Kininases I.....	31
3.2. Kininase II ou enzyme de conversion de l'angiotensine I.....	31
3.3. Autres kininases.....	32
4. Récepteurs des kinines.....	33
4.1. Structure des récepteurs des kinines.....	33
4.2. Expression des récepteurs.....	34
4.2.1. Expression des RB1.....	34
4.2.2. Expression des RB2.....	34
4.3. Régulation des récepteurs.....	34
4.4. Voies de signalisation.....	35
4.4.1. Voies de signalisation des RCPG.....	35
4.4.2. Principales voies de signalisation des RB2.....	35
4.4.3. Seconds messagers de l'activation des RB1.....	36
4.5. Effets physiologiques des récepteurs des kinines.....	37
5. Interactions entre le SKK et le SRA.....	37
6. Outils génétiques et pharmacologiques d'étude du système kallibréine kinine.....	38
6.1. Outils génétiques.....	38
6.1.1. Souris déficientes en TK (TK ^{-/-}).....	38
6.1.2. Souris déficientes en RB1 (RB1 ^{-/-}).....	38
6.1.3. Souris déficientes en RB2 (RB2 ^{-/-}).....	39
6.1.4. Souris invalidées pour les deux récepteurs (RB1 ^{-/-} /RB2 ^{-/-}).....	39
6.2. Outils pharmacologiques.....	39
6.2.1. Antagonistes des RB1.....	39
6.2.2. Antagonistes des RB2.....	40
6.2.2.1. Icatibant.....	40
6.2.2.2. Propriétés pharmacocinétiques de l'icatibant.....	40
6.2.2.3. Utilisation de l'icatibant.....	41
6.2.3. Agonistes des RB1.....	41
6.2.3.1. Agoniste NG29 ou RB1-ag.....	41
6.2.3.2. Propriétés pharmacocinétiques de RB1-ag.....	42
6.2.3.3. Utilisation de RB1-ag.....	42
6.2.4. Agonistes des RB2.....	42
6.2.4.1. Agoniste NG291 ou RB2-ag.....	43
6.2.4.2. Propriétés pharmacocinétiques de RB2-ag.....	43
6.2.4.3. Utilisation de RB2-ag.....	43
7. Rôles du système kallibréine-kinine.....	44
7.1. SKK et rein.....	44
7.1.1. SKK et physiologie rénale.....	44

7.1.2. SKK et pression artérielle	45
7.1.3. SKK et néprotection.....	45
7.2. SKK et cœur.....	46
7.2.1. SKK et physiologie cardiaque.....	46
7.2.2. SKK et cardioprotection.....	46
7.3. SKK et vaisseaux	46
7.3.1. Expression des composants du SKK dans les vaisseaux.....	46
7.3.2. SKK et angiogénèse	47
7.4. SKK et cerveau	47
7.4.1. Expression des composants du SKK dans le cerveau	47
7.4.2. SKK et physiologie cérébrale.....	48
7.4.3. SKK et pathologies cérébrales	48
7.5. SKK, douleur et inflammation	50
7.6. Autres rôles physiopathologiques du SKK	50
7.6.1. SKK et pathologies gastro-intestinales	50
7.6.2. SKK et cicatrisation cutanée	51
7.6.3. SKK et cancers	51
7.6.4. Autres	51
8. Conclusion du chapitre	52
PARTIE EXPERIMENTALE.....	53
CHAPITRE 3 : SYSTEME KALLICREINE-KININE ET DIABETE	
1. Introduction.....	54
1.1. SKK et physiopathologie du diabète.....	54
1.1.1. Expression des récepteurs RB1 et RB2 et diabète	54
1.1.2. SKK, insulinosécrétion et insulino-résistance	54
1.1.3. SKK et transport de glucose.....	55
1.1.4. SKK et DT1.....	55
1.2. SKK et physiopathologie des complications du diabète	55
1.2.1. SKK et néphropathie diabétique	55
1.2.2. SKK et rétinopathie diabétique	56
1.2.3. SKK et cardiomyopathie diabétique	56
1.2.4. SKK et artérite diabétique	56
1.2.5. SKK et pied du diabétique	56
1.2.6. SKK et AVC en cas de diabète	57
2. Objectifs de la thèse.....	57
3. Etude 1 : Rôle du SKK dans l'ischémie des membres inférieurs chez la souris diabétique.....	59
3.1. Introduction	59
3.1.1. Artérite des membres inférieurs	59
3.1.1.1. Définition et épidémiologie.....	59
3.1.1.2. Physiopathologie	59
3.1.1.3. Conséquences physiopathologiques.....	60
3.1.1.4. Facteurs de risque.....	60
3.1.1.5. Angiogénèse et SKK	61
3.1.2. Objectifs de l'étude	61

3.2. Article : Kinin receptor antagonism restores hindlimb postischemic neovascularization capacity in diabetic mice.....	61
3.3. Discussion.....	72
3.3.1. Rôle des récepteurs des kinines dans l'angiogenèse en conditions diabétiques	72
3.3.2. Modification des paramètres inflammatoires	72
3.3.3. Voies de signalisation impliquées	73
3.3.4. Conclusions	73
4. Etude 2 : Rôle du SKK dans la cicatrisation diabétique	74
4.1. Introduction	74
4.1.1. Cicatrisation cutanée	74
4.1.1.1. Cicatrisation en conditions physiologiques.....	74
4.1.1.2. Altération de la cicatrisation	76
4.1.1.3. Cicatrisation et SKK.....	76
4.1.2. Objectifs de l'étude	76
4.2. Article : Improvement of skin wound healing in diabetic mice by kinin B2 receptor blockade	76
4.3. Expérimentations supplémentaires	101
4.3.1. Expériences <i>in vivo</i>	101
4.3.1.1. Matériels et méthodes.....	101
4.3.1.2. Résultats	102
4.3.2. Expériences <i>in vitro</i>	104
4.3.2.1. Matériels et méthodes.....	104
4.3.2.2. Résultats	105
4.4. Discussion.....	106
4.4.1. Rôle de la TK dans la cicatrisation.....	106
4.4.2. Rôle des récepteurs des kinines dans la cicatrisation.....	106
4.4.3. Effets secondaires du traitement chronique par voie i.p. du RB2-ag.....	106
4.4.4. Application locale de RB2-ag	107
4.4.5. Effet d'un antagoniste des RB2 sur la cicatrisation	107
4.4.6. Voies de signalisation impliquées	107
4.4.7. Limites de cette étude.....	108
4.4.8. Conclusions	108
5. Etude 3 : Rôle du SKK dans l'ischémie cérébrale.....	110
5.1. Introduction	110
5.1.1. Accident vasculaire cérébral	110
5.1.1.1. Définition et épidémiologie.....	110
5.1.1.2. Physiopathologie de l'AVC de type ischémique.....	110
5.1.1.3. Facteurs de risque	112
5.1.1.4. Traitements.....	112
5.1.1.5. AVC et SKK.....	112
5.1.2. Objectifs de l'étude	113
5.2. Modèle d'ischémie cérébrale	113
5.2.1. Choix du modèle	114
5.2.2. Modèle endovasculaire.....	114
5.2.2.1. Méthode chirurgicale.....	114
5.2.2.2. Facteurs de variabilité du modèle.....	115
5.2.2.3. Validation du modèle au sein du laboratoire.....	116
5.3. Article : Effect of modulation of kallikrein-kinin system on brain damage and mortality in experimental cerebral ischemia in non-diabetic and diabetic mice	116

5.4. Discussion	140
5.4.1. Effets de l'activation des RB1 et des RB2 après une ischémie cérébrale chez la souris non-diabétique	140
5.4.2. Mécanismes neuroprotecteurs <i>versus</i> neurotoxiques de l'activation des RB2 après une ischémie cérébrale	140
5.4.3. Effets de l'activation des RB1 après une ischémie cérébrale chez la souris diabétique	141
5.4.4. Conclusions	141
 CONCLUSION GENERALE / PERSPECTIVES.....	 143
REFERENCES.....	149
ANNEXES.....	169
1. Annexe 1 : Matériels et méthodes de l'étude 1.....	169
2. Annexe 2 : Matériels et méthodes de l'étude 2.....	171
3. Annexe 3: Mise en place du modèle d'ischémie cérébral au laboratoire.....	173
4. Annexe 4 : Coloration au TTC et à l'H&E.....	179
5. Annexe 5 : Echelle d'évaluation de l'atteinte comportementale après un AVC	181
6. Annexe 6 : Matériels et méthodes de l'étude 3.....	184
7. Annexe 7 : Tableaux récapitulatifs des résultats de l'étude 3.....	185
LISTE DES FIGURES	186
LISTE DES TABLEAUX.....	187

LISTE DES ABBREVIATIONS

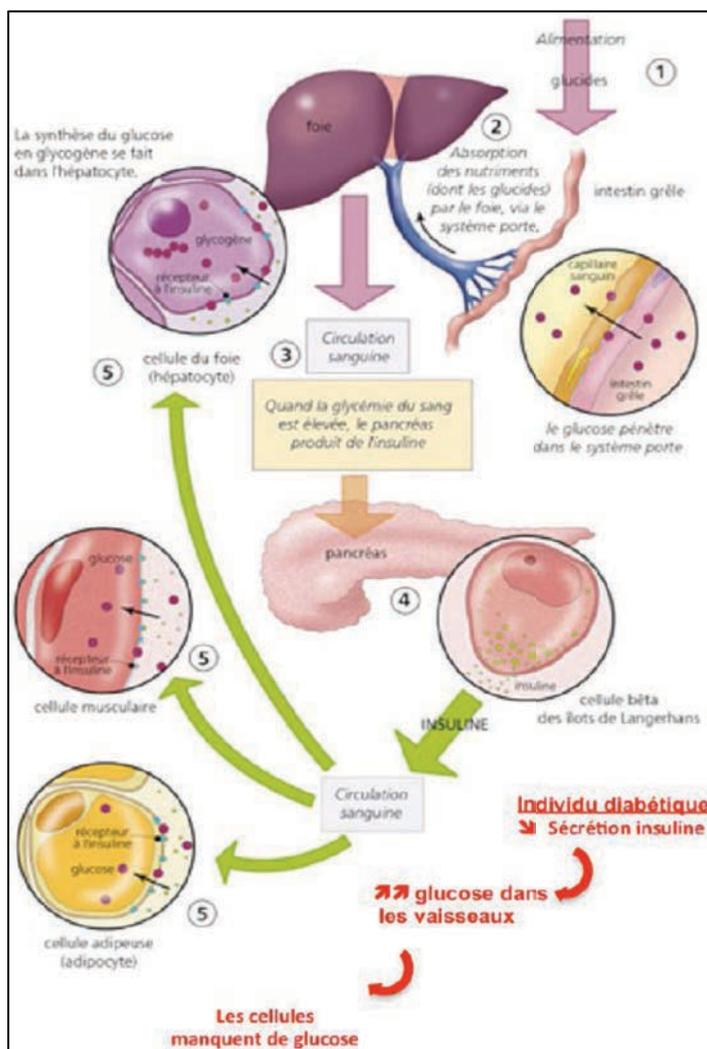
ACE ou ECA: artère carotide externe	NonDiab : non-diabétique
ACM ou MCA : artère cérébrale moyenne	NonIsch : non-ischémie
AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs	NOS : Nitric oxyde synthase
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	PCA : artère pterygopalatine antérieure
AT : récepteur de l'angiotensine II	PGs : prostaglandines
ATP : adenosine triphosphate	PK : kallibréine plasmatique
AVC : accidents vasculaires cérébraux	PKC : protéine kinase C
BK : bradykinine	PLA2 : phospholipase A2
CCA : artère carotide commune	PLC : la phospholipase C
DAG : diacylglycérol	PLD : phospholipase D
Diab : diabétique	RB1 : récepteur B1 des kinines
DT1 : diabète de type 1	RB2 : récepteur B2 des kinines
DT2 : diabète de type 2	RB1-ag : peptide NG29
ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine	RB2-ag : peptide NG291
EDHF : endothelium-derived hyperpolarizing factor	RB2-ant : HOE-140 ou icatibant
EGFR : epidermal growth factor receptor	RCPG : récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G
Erk : extracellular signal-regulated kinases	RE : réticulum endoplasmique
FBS : sérum bovin fœtal	SKK : système kallibréine-kinine(s)
GLUT : transporteurs de glucose	Souris RB1 ^{-/-} : souris déficientes en RB1
GMPc : guanosine monophosphate cyclique	Souris RB2 ^{-/-} : souris déficientes en RB2
GTP : guanosine triphosphate	Souris RB1 ^{-/-} /RB2 ^{-/-} : souris déficientes en RB1 et en RB2
H&E : hématoxyline et éosine	Souris db/db : souris déficiente pour le récepteur de la leptine
HTA : hypertension artérielle	Souris TK ^{-/-} : souris déficientes en TK
ICA : artère carotide interne	SRA : système rénine-angiotensine
IP3 : inositol triphosphate	STZ : streptozotocine
Isch : ischémie	TEC : teneur en eau du cerveau
KBPM : kininogène de bas poids moléculaire	TK : kallibréine tissulaire
KHPM : kininogène de haut poids moléculaire	TNF- α : tumor necrosis factor α
LDL : lipoprotéines de faible poids moléculaire	TTC : triphenyltetrazolium chloride
Lys-BK : kallidine	VEGF : vascular endothelial growth factor
MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1	
NBCS : sérum de veau nouveau-né	
NO : monoxyde d'azote	

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : LE DIABETE

1. DEFINITION

Le diabète est une affection métabolique chronique caractérisée par une élévation de la concentration du glucose dans le sang (hyperglycémie). L'insuline est l'hormone qui régule la glycémie (Figure 1). L'hyperglycémie retrouvée chez le diabétique est liée à une déficience soit de la sécrétion de l'insuline par le pancréas, soit de l'action de cette dernière dans l'organisme, soit des deux. Chez l'homme, le diabète est défini biologiquement par une glycémie veineuse à jeun supérieure à 1,26 g/l (ou 7 mmol/l) lors de 2 dosages successifs ; ou par une glycémie supérieure à 2,00 g/l (ou 11,1 mmol/l) deux heures après une hyperglycémie provoquée par voie orale à 75 grammes de glucose^{1,2}.



Après un repas, les nutriments, dont le glucose, passent dans l'intestin grêle (1) puis sont absorbés par le foie via le système porte (2) pour finir dans la circulation sanguine (3). Les cellules β du pancréas vont alors produire de l'insuline pour réguler l'élévation de la glycémie et la distribution de glucose dans les organes (4). L'insuline joue donc un rôle fondamental dans la régulation du métabolisme énergétique. Elle contrôle l'utilisation et le stockage des nutriments dans le foie (hépatocytes), les muscles (cellules musculaires) et le tissu adipeux (adipocytes). Lorsque la glycémie augmente, l'insuline est produite pour distribuer le glucose : soit dans les hépatocytes pour être transformé en glycogène et être stocké à court terme ; soit dans les cellules musculaires pour fournir de l'énergie rapidement (glycolyse) ; soit dans les adipocytes pour être transformé en triglycérides et être stocké à long terme (5). A distance des repas, la sécrétion d'insuline est diminuée ce qui permet la libération de glucose à partir du foie ou des cellules adipeuses, en cas de jeun prolongé. L'action de l'insuline sur ses tissus cibles est médiée par son récepteur (IR) qui est un hétérodimère avec une activité tyrosine-kinase intracellulaire. La cascade de phosphorylations suivant l'activation du récepteur IR va activer le mouvement des transporteurs de glucose (GLUT) dans les membranes plasmiques des cellules cibles favorisant le transport actif du glucose vers le cytoplasme de ces cellules. Lorsque la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas est diminuée ou impossible, les taux de glucose dans le sang augmente et une hyperglycémie s'installe : c'est le diabète.

Figure 1 : Régulation de la glycémie chez l'individu sain et chez le patient diabétique.

Image issue du site internet <http://diabete-reunion.over-blog.com/>

2. EPIDEMIOLOGIE

Le diabète est un problème majeur en terme de santé publique en France et dans le monde puisque l'on compte près de 387 millions de personnes diabétiques dans le monde en 2014. En France, le nombre de diabétiques est évalué à environ 4 millions de personnes soit près de 6 % de la population. Ces chiffres sont largement sous-estimés car ils ne tiennent pas compte des personnes non traitées ou non diagnostiquées. En effet, le diabète est une maladie souvent silencieuse ce qui fait qu'environ 20 % des personnes diabétiques âgées de 18 à 74 ans ne sont pas diagnostiquées. La prévalence du diabète est en constante augmentation³. L'Organisation Mondiale de la Santé estime à plus de 582 millions de personnes diabétiques dans le monde en 2035. Cette augmentation est liée au vieillissement de la population, à l'augmentation de l'espérance de vie des diabétiques ou encore à la modification de l'hygiène de vie⁴⁻⁶ (Figure 2).

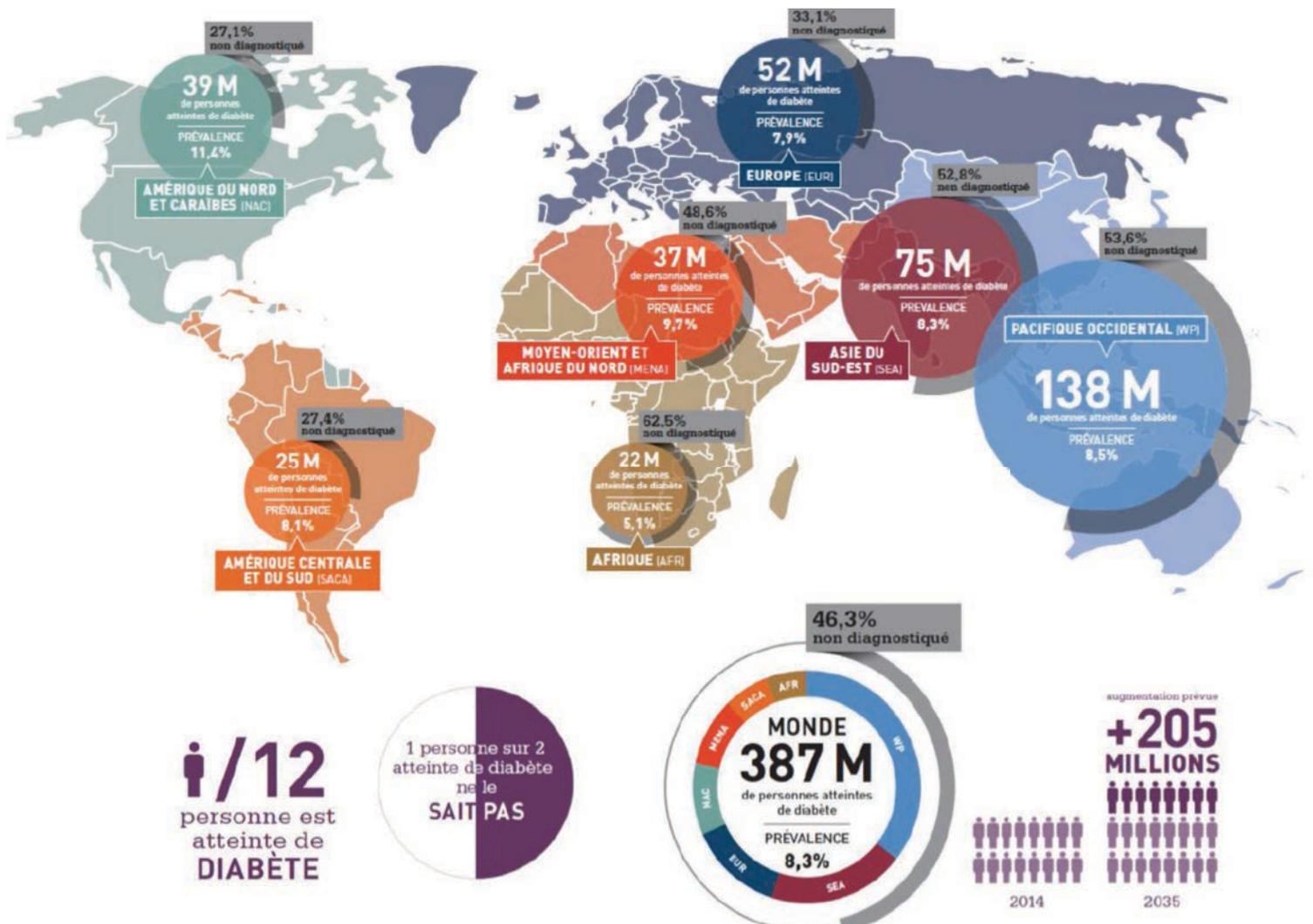


Figure 2 : Incidence et prévalence du diabète dans le monde.

Image issue du site internet <http://www.idf.org/diabetesatlas>.

La gravité du diabète est principalement liée à ses complications chroniques qui peuvent avoir des conséquences finales très délétères pour le patient : cécité, amputations des membres, insuffisance rénale, infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux, etc. En 2012, le diabète a été responsable de 4,8 millions de décès dans le monde. L'Organisation Mondiale de la Santé prévoit qu'en 2030, le diabète sera la septième cause de décès dans le monde⁶. De plus, la durée de vie d'un diabétique est diminuée de 5 à 10 ans. La sévérité des complications et l'augmentation de la prévalence de la maladie font aussi du diabète une maladie chronique coûteuse économiquement. En France, en 2011, les coûts pour l'Assurance Maladie des personnes traitées pour le diabète et ses complications s'élevaient à 17,7 milliards d'euros soit près de 10 % des dépenses de santé totales. La prise en charge du diabète représente donc aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique mais aussi un enjeu économique.

3. LES DIFFERENTS TYPES DE DIABETE

On distingue principalement deux types de diabète : le diabète de type 1 et le diabète de type 2. Ce dernier est le plus fréquent puisqu'il représente près de 90% des diabétiques dans le monde.

3.1. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1), anciennement appelé diabète insulino-dépendant, représente environ 10% des cas de diabète. Sa prévalence ne cesse d'augmenter depuis une vingtaine d'années (3-4% par an)⁷. La maladie est habituellement découverte chez les sujets jeunes : enfants, adolescents ou jeunes adultes (essentiellement avant 20 ans).

3.1.1. Physiopathologie

Le DT1 est une maladie auto-immune caractérisée par un déficit de production d'insuline (insulinopénie). Les patients développent une réaction inflammatoire locale, appelée insulite, dans et autour des îlots de Langerhans du pancréas, ce qui entraîne la destruction des cellules β sécrétrices d'insuline. Lorsque plus de 80% environ des cellules β sont détruites, une insulinopénie, à l'origine de l'hyperglycémie, apparaît (*Figure 3*).

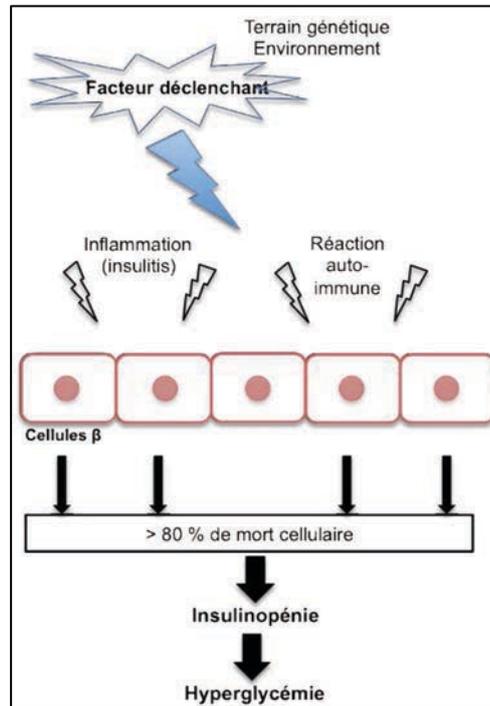


Figure 3 : Physiopathologie du DT1.

3.1.2. Origines

Malgré l'augmentation des connaissances sur les mécanismes immunitaires conduisant à la destruction des cellules β , le facteur déclenchant du DT1 n'est pas connu et son apparition reste aujourd'hui inévitable. Dans le cas du DT1, l'apparition de la réaction auto-immune serait liée à l'association de plusieurs gènes de prédisposition et de facteurs environnementaux⁸⁻¹². En effet, en dehors de rares cas de DT1 d'origine monogénique, les variants génétiques associés à cette forme de diabète sont multiples. Le plus important d'entre eux découvert à ce jour est localisé dans le système d'histocompatibilité HLA, impliqué dans la tolérance immunitaire vis à vis des cellules du "soi" par l'activation des lymphocytes T¹³. Quant aux facteurs environnementaux participant au développement du DT1, ils sont encore à l'étude. Le taux d'infections virales, l'accroissement de l'âge maternel, l'alimentation, la modification de la flore intestinale ou encore l'exposition à des toxines sont certainement fortement impliqués dans le déclenchement de la maladie qui conduit à l'activation initiale des lymphocytes T^{8 9}.

3.1.3. Symptômes et traitements

Les principaux symptômes du DT1 sont une polyurie (excrétion excessive d'urine), une polydipsie (sensation de soif) et une polyphagie (faim constante). Ces symptômes peuvent apparaître brutalement. D'autres symptômes peuvent aussi se manifester, comme une fatigue importante, une perte de poids, ou un trouble de la vision.

Il n'existe actuellement pas de traitement définitif du DT1 permettant la guérison. Plusieurs essais thérapeutiques ont essayé de prévenir la maladie, de restaurer la tolérance immunitaire envers les cellules β du pancréas ou de régénérer les cellules pancréatiques mais ils ont pour l'instant échoué¹⁴. Le traitement du DT1 a pour objectif de contrôler la glycémie grâce à des injections quotidiennes d'insuline. Le traitement par l'insuline, qui n'est plus produite par le pancréas endocrine, se fera durant toute la vie du patient. Le diabète et l'évolution de ses possibles complications doivent être suivis très régulièrement.

3.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2), anciennement appelé diabète non-insulinodépendant, est un problème majeur de santé publique puisqu'il représente près de 90% des cas de diabète observés dans le monde. L'incidence du DT2 augmente et en particulier avec l'âge. La maladie se manifeste généralement après 40 ans et elle est diagnostiquée à un âge moyen proche de 65 ans. L'incidence est maximale entre 75 et 79 ans. Cependant, du fait de la fréquence croissante de l'obésité chez l'enfant, le DT2 touche aussi des sujets plus jeunes^{15, 16}.

3.2.1. Physiopathologie

Le DT2 résulte de l'utilisation inadéquate de l'insuline par l'organisme et est en grande partie la conséquence d'une surcharge pondérale et d'une sédentarité. La pathogénèse du DT2 est plus complexe que celle du DT1 car elle implique de nombreux tissus et mécanismes physiopathologiques. Le DT2 possède schématiquement deux composantes principales : le développement d'une insulino-résistance et un trouble de l'insulinosécrétion, condition nécessaire. La quantité d'insuline est alors insuffisante face à la demande augmentée des tissus cibles devenus insulino-résistants (perte de sensibilité des récepteurs de l'insuline) et une hyperglycémie apparaît. Cette hyperglycémie est suivie d'une augmentation des lipides, qui elle-même, est associée à une inflammation, un stress du réticulum endoplasmique et un stress oxydant qui sont délétères pour la cellule. Ainsi, les organes (foie, muscle, tissu adipeux) sont soumis à une diminution du signal insulinique et à une toxicité sur les cellules β entraînant des troubles de l'insulinosécrétion pancréatique (*Figure 4*). L'ensemble de ces phénomènes conduirait progressivement à un épuisement du pancréas, une intolérance au glucose et une hyperglycémie chronique conduisant au développement du DT2^{17, 18}. Dans le DT2, les troubles de l'insulinosécrétion conduisent à un manque d'insuline qui est produite en quantité insuffisante face à une demande accrue des organes cibles. L'hormone ne parvient plus à

générer un signal efficace pour assurer l'entrée du glucose dans les cellules, carburant métabolique essentiel, ce qui entraîne des dysfonctionnements cellulaires et tissulaires.

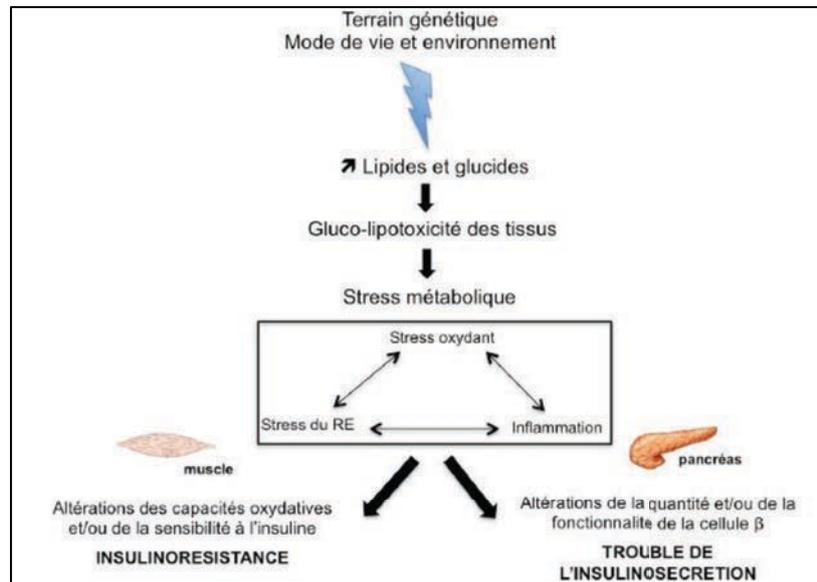


Figure 4 : Physiopathologie du DT2.

RE, réticulum endoplasmique.

3.2.2. Origines

Les mécanismes à l'origine de l'insulinorésistance et du déficit d'insulinosécrétion sont complexes, multiples et partiellement compris. Dans plus de 95% des cas, l'insulinorésistance semble corrélée à l'âge et à l'interaction entre le génome et les conditions de vie (sédentarité, hypertension, surpoids, hypercholestérolémie, obésité)¹⁹. En effet, l'augmentation des apports caloriques et lipidiques et la diminution de l'activité physique entraînent une accumulation de lipides dans le tissu adipeux viscéral, le foie, le muscle et le pancréas. De plus, l'analyse de plusieurs cohortes de patients a permis d'identifier de nombreux gènes, dits « de susceptibilité au diabète », impliqués dans le fonctionnement des cellules β pancréatiques¹⁷. Il existe donc une prédisposition génétique au DT2.

Ainsi, lorsqu'elles sont soumises à des facteurs environnementaux défavorables, les cellules β « fragiles » génétiquement deviennent dysfonctionnelles et leur masse va diminuer.

3.2.3. Symptômes et traitements

Le DT2 peut se développer et rester asymptomatique pendant de nombreuses années. Le plus souvent le diagnostic se fait de façon fortuite à l'occasion d'une prise de sang, ou en cas de complication après l'âge de 50 ans. Après plusieurs années d'évolution, les signes cliniques d'hyperglycémie (polyurie, polydipsie et polyphagie) peuvent apparaître. Le retard

au diagnostic du DT2 est d'environ 5 ans, ainsi, dans 20 % des cas, une complication du diabète est déjà présente au moment du diagnostic. Le DT2 est souvent associé à d'autres facteurs de risque cardiovasculaire tels que l'hypertension artérielle essentielle et/ou l'hypertriglycéridémie.

Comme pour le DT1, il n'existe pas de traitement curatif du DT2. Son traitement repose sur une perte de poids lorsqu'elle est nécessaire, une alimentation équilibrée et la pratique d'une activité physique régulière. La modification des habitudes de vie peut être suffisante pour contrôler la glycémie. En seconde intention, la prise de médicaments antidiabétiques aide à maintenir l'équilibre glycémique. Comme pour le DT1, la prévention et la prise en charge rapide des complications du diabète font parties intégrantes du traitement du DT2. En effet, lorsque le diabète est diagnostiqué, un suivi par le médecin et/ou un diabétologue est nécessaire. Des examens complémentaires réguliers suivant l'évolution du diabète et de ses potentielles complications associées permettent de mettre en place une prise en charge adaptée du diabète et de ses complications afin d'éviter l'aggravation.

3.3. Autres diabètes

Il existe d'autres types de diabète comme le diabète gestationnel, qui apparaît brutalement au cours de la grossesse chez des femmes n'ayant jamais présenté des signes d'hyperglycémie, ou le diabète secondaire, déclenché par un autre facteur telles qu'une maladie (la mucoviscidose par exemple) ou la prise de médicaments. Cependant, ces formes de diabète sont bien plus rares.

4. MODELES EXPERIMENTAUX DE DIABETE

4.1. Principaux modèles expérimentaux de diabète

L'utilisation de modèles expérimentaux est indispensable pour étudier l'étiologie et les mécanismes impliqués dans le diabète et ses complications. Aujourd'hui, de nombreux modèles de diabète existent et ont été principalement obtenus chez le rat et la souris. Dans ces modèles, l'installation du diabète se fait soit spontanément par sélection génétique, soit par induction expérimentale (régime alimentaire, chirurgie, chimie, etc.). De nombreuses revues décrivent ces différents modèles de diabète²⁰⁻²³. Les principaux modèles utilisés sont repris dans le *Tableau 1*. D'autres modèles, que nous ne détaillerons pas, permettent l'étude des complications vasculaires du diabète²⁴.

Méthodes d'induction	Méthode	Mécanismes	Type de diabète	Espèces
Chimique	Injection d'alloxane	Destruction des cellules β pancréatiques	1	Souris, rats
	Injection de streptozotocine ²⁵			
Chirurgie ²¹	Pancréatectomie (ablation de 90% du pancréas endocrine)	Apparition d'une intolérance au glucose	2	Souris, rats
	Ligature du canal pancréatique	Pancréatite et dysfonctionnement des cellules β pancréatiques	2	Lapin
Immunologique	Infection par virus encéphalomyocarditis	Intégration de l'ADN viral dans le génome des cellules β altérant leurs fonctions notamment la synthèse et sécrétion d'insuline	1	Souris, primate
Régime alimentaire	Régime riche en lipides + une injection de streptozotocine à faible dose ²⁶	Développement d'une obésité, intolérance au glucose, hyperinsulinémie et hyperglycémie	2	Rat Sprague-Dawley
Transgénique	Déficience récessive pour le récepteur à la leptine	Développement d'une obésité, insulino-résistance, hyperinsulinémie, hyperlipidémie avec glycémie normale	2	Rat Zucker ²⁰
	Inactivation de certains gènes codant pour le métabolisme insulinaire ^{22, 27, 28} (exemples : insuline humaine, transporteurs de glucose, etc.)	Variables en fonction du gène inactivé	2	Souris
Spontané ²² (susceptibilité génétique)	Réaction auto-immune spontanée	Infiltration des cellules T du pancréas dans les îlots de Langerhans et destruction sélective des cellules β	1	Souris NOD ^{29, 30} (femelle), souris Akita ³¹ (mâle)
	Sélection génétique pour la récession de certains gènes ^{20, 32} (exemples : déficience en leptine ou de son récepteur)	Développement d'une insulino-résistance puis d'une hyperglycémie	2	Souris ob/ob, souris db/db

Tableau 1 : Principaux modèles expérimentaux de diabète.

Chaque modèle expérimental permet d'étudier un aspect particulier de la pathologie humaine pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques du diabète et de ses complications dans le but de trouver de nouveaux traitements. Durant ce travail de thèse, deux modèles de diabète ont été utilisés, un proche du DT1 (insulinoprive, induit par injection de streptozotocine) et un proche du DT2 (souris db/db) de l'homme.

4.2. Modèle de diabète induit par injection de streptozotocine

4.2.1. Mécanisme d'action

Ce modèle expérimental est un modèle de DT1. La streptozotocine (STZ) est une substance chimique toxique pour les îlots pancréatiques²⁵. Deux agents sont couramment utilisés pour induire une pancréatectomie chimique mais la STZ est le composé le plus utilisé dans les études expérimentales²⁰. La STZ est hydrophile et ne franchit pas la membrane

plasmique. Elle va emprunter le transporteur du glucose GLUT2 pour traverser les membranes et entrer dans les cellules, en particulier dans les cellules β du pancréas. La STZ exerce sa toxicité grâce à une activité d'alkylation de l'ADN, de glycosylation des protéines et de ribosylation de l'ADP. Ces phénomènes conduisent à la mort des cellules β du pancréas mais aussi de toutes les cellules porteuses du transporteur GLUT2 telles que les cellules du rein et du foie³³. La toxicité de la STZ sur les îlots pancréatiques est irréversible.

4.2.2. Conséquences métaboliques

Les animaux développent une hyperglycémie rapide associée à une hypo-insulinémie. Rapidement, on observe chez ces animaux un arrêt de la croissance pondérale ou voire une perte de poids et les signes cliniques de diabète (polydipsie et polyurie)²⁵.

4.2.3. Méthode d'induction

La STZ est diluée extemporanément dans une solution de sodium citrate (0,05 mol/l, pH 4,5). La solution est ensuite administrée par injection intrapéritonéale à des souris (C57BL/6, mâles). Les injections sont réalisées durant cinq jours consécutifs à une dose de 50 mg/kg de poids corporel³⁴. Très rapidement, les souris développent une hyperglycémie (quelques jours à une semaine). La glycémie des souris est mesurée à l'aide d'un glucomètre à 7, 14 et 28 jours après la dernière injection. Les souris sont considérées comme diabétiques lorsque leur glycémie à jeun est supérieure à 250 mg/dl.

4.3. Souris db/db

4.3.1. Mécanisme d'action

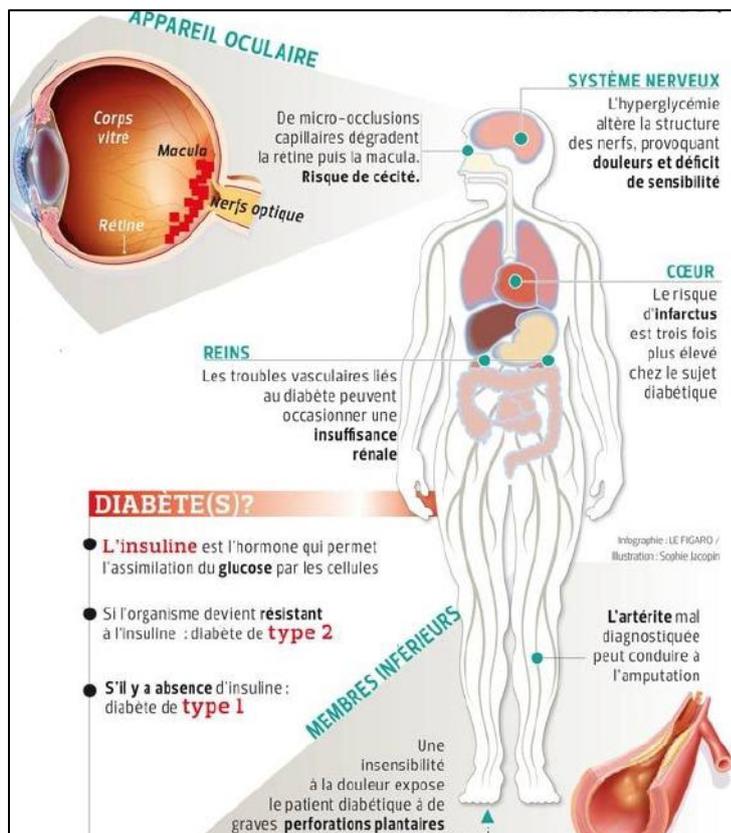
Les souris db/db sont un modèle génétique d'obésité compliquée de diabète (DT2). Ce modèle de DT2 est un modèle de déficience génétique conduisant à une insulino-résistance. Les souris db/db sont des souris déficientes en récepteurs de la leptine obR1. Cette mutation des récepteurs de la leptine altère notamment la sensation de satiété chez ces souris. En effet, la leptine est une hormone protéique qui a une influence importante dans la balance énergétique et le comportement alimentaire puisqu'elle intervient dans les processus d'absorption intestinale, dans la signalisation de la satiété, dans la lipolyse et dans d'autres réponses telles que les réponses inflammatoires. Des études épidémiologiques ont aussi montré une corrélation entre l'hyperinsulinémie, caractéristique de l'insulino-résistance, et une hyperleptinémie^{20, 32, 35}.

4.2.2. Conséquences métaboliques

Les souris db/db présentent rapidement une obésité sévère, une hyperphagie, une polydispisie et une polyurie. Elles vont développer une insulino-résistance puis un DT2 avec les complications cardiométaboliques associées^{35,36}.

5. COMPLICATIONS DU DIABETE

Le diabète entraîne de nombreuses complications associées à des mécanismes complexes liés à l'hyperglycémie³⁷, l'insulino-résistance, l'inflammation et l'athérogénèse accélérée³⁸. Ainsi, les conséquences physiopathologiques attribuables au diabète sont nombreuses, locales ou systémiques, insidieuses, chroniques et souvent graves (*Figure 5*). Les mécanismes responsables du développement de ces complications ne sont pas encore bien établis. Cependant, de nombreuses anomalies touchant la signalisation cellulaire, l'expression génique, et la régulation de l'homéostasie cellulaire semblent impliquées dans les effets physiopathologiques du diabète³⁹. La sévérité du diabète, et en particulier du DT2, est ainsi essentiellement liée à ses complications.



Les hyperglycémies répétées et prolongées, et le déséquilibre du diabète provoquent une altération des nerfs, des vaisseaux et de nombreuses cellules de l'organisme entraînant la mise en place de mécanismes adaptatifs délétères pour le fonctionnement de plusieurs organes tels que : le cœur, les yeux, les reins, les membres inférieurs, etc.

Figure 5 : Complications du diabète et organes cibles.

Image issue du site internet <http://sante.lefigaro.fr/actualite/2012/10/02/19179-diabete-comment-eviter-complications>

5.1. Classification des complications du diabète

Les complications du diabète se classent en deux types en fonction du diamètre des vaisseaux atteints. En effet, l'endothélium vasculaire est le tissu en contact permanent avec le plasma hyperglycémique. Les cellules endothéliales qui le constituent forment la couche la plus interne des vaisseaux sanguins et permettent le maintien des fonctions vasculaires (contrôle du tonus vasculaire, hémostasie et fibrinolyse, etc.). L'endothélium vasculaire est donc la principale cible des complications de l'hyperglycémie chronique. Ainsi, les complications microvasculaires du diabète sont secondaires à un épaissement de la membrane basale des petits vaisseaux. Les complications macrovasculaires, elles, sont celles des lésions d'athérosclérose qui concernent les gros vaisseaux et touchent les artères coronaires, les artères cérébrales et les artères des membres inférieurs. L'athérosclérose correspond à un remaniement de la paroi des artères et à la formation de plaques d'athérome à composantes lipidiques. Le diabète touche également les nerfs, conduisant à la neuropathie diabétique. Même si les anomalies qui en sont à l'origine n'impliquent pas le vaisseau mais directement les cellules nerveuses, la neuropathie diabétique est souvent classée avec les complications microvasculaires. Le risque de survenue des complications du diabète, en particulier pour les complications microvasculaires, dépend de la durée d'exposition au diabète et de la sévérité de l'hyperglycémie^{37, 39}.

5.2. Complications microvasculaires

Les complications microvasculaires sont les plus spécifiques du diabète. Souvent asymptomatiques au début de la maladie, leur délai moyen d'apparition est d'environ cinq ans après l'installation du diabète. Elles peuvent être observées au niveau de tous les organes, mais ont une traduction clinique pour la vascularisation rétinienne (rétinopathie diabétique), rénale (néphropathie diabétique) et nerveuse (neuropathie diabétique).

Les mécanismes physiopathologiques sont multiples. Il existe une relation forte entre l'hyperglycémie et les microangiopathies. L'hyperglycémie entraîne des modifications structurelles des composantes protéiques des membranes cellulaires qui vont favoriser la rigidité et la porosité des membranes aboutissant à une perturbation des grandes fonctions. Elle est aussi associée à des modifications hémodynamiques et à la libération de radicaux libres qui vont épaisir les membranes, les endommager et entraîner un dysfonctionnement des cellules endothéliales. L'hyperglycémie et l'obésité viscérale associée au DT2 participent à une augmentation de l'inflammation chronique induisant une augmentation de cytokines

pro-inflammatoires, un stress du réticulum endoplasmique et d'autres facteurs impliqués dans la physiopathologie des complications du diabète³⁸.

5.2.1. Rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique touche tous les composants de la structure de l'œil, et en particulier la rétine. Elle est caractérisée par la présence de lésions progressives fragilisant la paroi des vaisseaux de la rétine. La perméabilité des capillaires rétiniens augmente ce qui provoque des fuites des vaisseaux rétiniens (hémorragies et exsudats). Les vaisseaux rétiniens peuvent aussi s'occlure conduisant à une ischémie de la rétine. Ces atteintes entraînent une néovascularisation périphérique importante aboutissant à des œdèmes maculaires et des saignements qui provoquent à terme un décollement de la rétine⁴⁰. Associée aux atteintes artérielles, une dysfonction neurosensorielle peut s'ajouter et est difficilement détectable chez l'homme. La rétinopathie diabétique est la conséquence de l'hyperglycémie chronique mais son évolution est aussi influencée par l'équilibre tensionnel et lipidique³⁸.

Non traitée, la rétinopathie diabétique peut entraîner une perte progressive de l'acuité visuelle et une cécité. Elle touche environ 50% des patients avec un DT2 et reste la cause la plus fréquente de cécité chez l'adulte dans les pays occidentaux. Sa prévalence est fortement corrélée à la durée du diabète et au niveau de l'hyperglycémie.

Le diabète est également un facteur de risque pour le glaucome (lésions du nerf optique entraînant une perte progressive de la vision) et la cataracte (opacification du cristallin entraînant un trouble de la vision), qui se produisent plus tôt et plus fréquemment chez les diabétiques³⁸.

5.2.2. Néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique est une détérioration progressive et définitive de la fonction rénale secondaire à l'hyperglycémie chronique. Dans les années 1930, Kimmelstiel et Wilson ont été les premiers à décrire les lésions diabétiques classiques de glomérulosclérose nodulaire et les modifications histologiques caractéristiques, tardives de la néphropathie diabétique⁴¹. Cependant, la première anomalie dépistable cliniquement est la microalbuminurie qui témoigne de la perméabilité anormale de la barrière glomérulaire et donc d'une atteinte rénale débutante mais également de l'atteinte vasculaire liée au diabète. L'hyperglycémie chronique va entraîner un épaissement des membranes basales glomérulaires et tubulaires et l'expansion de la matrice mésangiale, qui vont progresser

lentement vers la glomérulosclérose et la fibrose tubulo-interstitielle⁴². La néphropathie diabétique à un stade avancé entraîne une insuffisance rénale terminale. Quand les reins ont perdu plus de 85 % de leurs capacités fonctionnelles, un traitement de suppléance par dialyse est nécessaire.

La néphropathie diabétique touche actuellement 20 à 40% des patients diabétiques et est la première cause d'insuffisance rénale terminale dans les pays occidentaux (24 % des cas d'insuffisance rénale terminale en France)⁴³. Aujourd'hui le DT2 est la première cause d'entrée en dialyse en Europe³⁸. Le niveau d'hyperglycémie et la durée d'exposition à l'hyperglycémie sont les principaux déterminants de l'apparition et de l'évolution de la néphropathie diabétique. Mais d'autres facteurs vont également influencer sur la néphropathie diabétique tels que : l'âge, la pression artérielle, l'athérosclérose ou le facteur génétique, etc.³⁸.

5.3. Complications macrovasculaires

Les complications macrovasculaires sont liées au développement de la maladie athéromateuse chez le diabétique. Les anomalies métaboliques qui accompagnent le diabète, telles que l'hyperglycémie chronique mais aussi la dyslipidémie, l'insulinorésistance et l'inflammation, sont responsables d'un déficit d'artériogénèse (formation des artères) et d'une dysfonction artérielle qui favorise l'athérosclérose et le remodelage vasculaire ce qui altère la structure des gros vaisseaux⁴⁴. Le mécanisme de développement de l'athérosclérose en cas de diabète n'est pas encore bien connu ; il est vraisemblablement multifactoriel⁴⁴. En revanche, le déficit d'artériogénèse en cas de diabète est principalement lié à l'augmentation de l'inflammation de la paroi vasculaire et à l'altération des cellules et des signaux/facteurs proathérogéniques^{45, 46}. De plus, l'hyperglycémie augmente l'activation plaquettaire et conduit à un état prothrombotique⁴⁴.

Ces atteintes sont retrouvées au niveau du cœur, du cerveau ou des membres inférieurs et se traduisent par une augmentation du risque d'infarctus du myocarde, d'accidents vasculaires cérébraux et d'artériopathie des membres inférieurs chez les patients diabétiques. Ces complications ont des formes cliniques particulières chez le diabétique. Elles sont plus sévères, plus diffuses et souvent silencieuses ou de symptomatologie clinique atypique. Le diabète représente donc un facteur de risque cardiovasculaire indépendant majeur et aggrave le pronostic du patient. En effet, les complications cardiovasculaires sont deux à trois fois plus fréquentes chez le diabétique par rapport au non-diabétique⁴⁷. De plus, les accidents

cardiaques et cérébrovasculaires sont souvent plus graves, avec un risque de séquelles ou de décès augmenté, chez le diabétique que chez le non-diabétique^{48,49}. Ainsi, les complications cardiovasculaires (infarctus du myocarde⁵⁰, accident ischémique cérébral⁵¹, artériopathie des membres inférieurs⁵²) représentent la première cause de mortalité chez le patient DT2, soit plus de la moitié des décès³⁹. Le diabète augmente aussi le risque d'hypertension artérielle.

5.3.1. Infarctus du myocarde

Au niveau cardiaque, le diabète est un facteur de risque de coronaropathie connu depuis de nombreuses années (risque multiplié par 2-3 chez un homme diabétique)^{53,54}. Le risque coronarien est dépendant de l'équilibre glycémique³⁷. De plus, chez les patients à très haut risque cardiovasculaire, le diabète représente un sur-risque de mortalité après un infarctus du myocarde⁵⁵ et de récidives à court et long terme⁵⁶.

5.3.2. Accidents vasculaires cérébraux (AVC)

Le diabète est un facteur de risque certain pour l'AVC, en particulier l'AVC de type ischémique. De nombreuses études ont montré qu'un patient diabétique a 2 à 6 fois plus de risque de faire un AVC⁵¹. Parmi ces patients, 75 à 90% présentent un DT2⁵⁷. Des études rétrospectives réalisées chez l'homme ont montré que l'infarctus cérébral survient généralement à un âge plus jeune⁵⁸ et la mortalité est augmentée^{59,60} par rapport aux patients non-diabétiques. Le diabète semble également intervenir sur le risque de démence après un AVC⁶¹. De plus, le pronostic de ces patients est défavorable avec des séquelles importantes et un temps de récupération ralenti^{57,62,63}.

L'hyperglycémie augmente la taille de la zone cérébrale infarctée^{61,64}, affecte la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique^{51,65} et entraîne des modifications physiopathologiques au niveau de la structure, de la densité et de la fonction des vaisseaux cérébraux⁶³. De nombreuses études expérimentales, réalisées sur des modèles d'ischémie cérébrale en cas d'hyperglycémie, ont en effet montré que la taille de la lésion, de l'œdème et de l'hémorragie sont augmentées chez les animaux hyperglycémiques par rapport aux animaux normoglycémiques⁵¹. Chez les souris db/db le diabète aggrave les dommages post-ischémiques en altérant les processus de réparation tissulaire médiés par les réponses inflammatoires⁶⁶.

5.3.3. Artériopathie des membres inférieurs au cours du diabète

Le diabète est un facteur de risque indépendant d'athérosclérose. Lorsque l'atteinte artérielle est située au niveau des membres inférieurs, on parle d'artérite diabétique. Des études épidémiologiques ont confirmé l'association entre le diabète et l'augmentation de la prévalence d'artérite des membres inférieurs⁶⁷. Ainsi, une personne diabétique a un risque d'artérite augmenté de 2 à 5 fois^{44, 68, 69}. De plus, les artérites diabétiques sont plus précoces, plus fréquentes et plus graves que les artérites de patients non-diabétiques car la revascularisation est plus difficile⁷⁰, le diagnostic est plus tardif et par conséquent les complications de l'ischémie (ulcères, gangrène, etc.) plus présentes⁷¹.

La physiopathologie de l'artérite chez le sujet diabétique est similaire à celle retrouvée chez le sujet non-diabétique. Cependant, l'artérite est plus distale et se caractérise par une atteinte préférentielle des petites artères situées entre le genou et les orteils. Le rétrécissement du diamètre de ces artères entraîne une diminution de la perfusion sanguine des muscles et des tissus cutanés des extrémités du pied. De plus, le diabète est associé à un déficit important du processus de néovascularisation post-ischémique⁷². Ainsi, le développement de la circulation collatérale est faible et l'ischémie plus sévère.

D'autres facteurs associés au diabète peuvent aussi aggraver le pronostic du patient : l'existence d'une neuropathie ou d'une infection, le développement des troubles trophiques du pied, l'insensibilité chronique du pied des diabétiques, etc.⁷³. Ainsi, les patients diabétiques sont plus sujets aux complications des artérites (ulcères, gangrène, etc.) et le risque d'amputation est très important chez ces patients⁶⁸.

5.4. Neuropathie diabétique

La neuropathie diabétique se caractérise par un trouble ou une absence de sensibilité à la douleur notamment dans les membres inférieurs. Comme pour la rétinopathie, l'hyperglycémie et la durée d'évolution du diabète sont les deux facteurs déterminants principaux. L'hyperglycémie prolongée cause des lésions au niveau de la structure et de la fonction nerveuse, parfois irréversibles, qui vont ralentir la conduction nerveuse. Les atteintes des nerfs touchent 50% des diabétiques après une quinzaine d'années d'évolution de la maladie³⁸. L'expression clinique est multiple car les lésions touchent aussi bien le système nerveux périphérique que le système nerveux autonome. Cependant, les neuropathies diabétiques périphériques se caractérisent le plus souvent par des symptômes sensitifs et moteurs comme des douleurs, des pertes de sensibilité et de réflexes et des picotements

principalement aux extrémités des membres, mais peuvent investir d'autres territoires tels que l'appareil digestif ou le système urinaire ou encore favoriser la mort subite (neuropathie autonome).

Le mécanisme physiopathologique neurotoxique de l'hyperglycémie chronique est complexe. Il est probablement le résultat combiné du stress oxydatif, de l'activation de la voie des polyols, d'une présence excessive de glucose intracellulaire neuronal et de perturbations des produits finaux de glycation du métabolisme cellulaire à l'origine de lésions microvasculaires³⁸.

Le principal risque des neuropathies diabétiques périphériques est que des lésions, des fractures ou des infections surviennent plus fréquemment, passent inaperçues et s'aggravent.

5.5. Autres complications

5.5.1. Troubles de l'érection

L'atteinte des vaisseaux irriguant la verge et la neuropathie peuvent engendrer des troubles érectiles. Ces troubles de la fonction érectile touchent près de la moitié des hommes diabétiques de plus de 50 ans⁷⁴.

5.5.2. Augmentation du risque infectieux

Les patients diabétiques sont plus sensibles aux infections. L'hyperglycémie favorise la prolifération des germes. De plus, elle entraîne un affaiblissement des défenses de l'organisme en exerçant de nombreux effets délétères sur l'immunité innée et adaptative. En effet, la fonction cellulaire des leucocytes, la production des cytokines et les lignes de défense locales et systémiques vont être perturbées par l'hyperglycémie chronique⁷¹. Ainsi, chez le diabétique, les infections sont plus fréquentes, plus graves, avec une mortalité accrue et ont pour support des germes inhabituels. Les diabétiques sont plus sensibles aux infections dermatologiques, urinaires, gynécologiques ou bronchiques⁷⁵.

5.5.3. Retard de cicatrisation

Dans le cas des ulcères liés au diabète, la cicatrisation post-lésionnelle est ralentie par un ensemble de facteurs intrinsèques et extrinsèques^{76, 77}. Parmi les facteurs intrinsèques du diabète, on peut retrouver : les neuropathies, les anomalies de perfusion, les altérations de la formation de la matrice extracellulaire, etc. Les facteurs extrinsèques, eux, sont liés aux infections, aux lésions du pied et aux déformations plantaires. Au cours du diabète, chaque

étape du processus de cicatrisation connaît des anomalies. Ainsi, la progression d'une phase à l'autre est plus lente, excessive et/ou désordonnée ce qui rend la cicatrisation difficile⁷⁸. De plus, le phénotype cellulaire notamment des fibroblastes ou des macrophages est altéré par l'hyperglycémie chronique⁷⁸. Enfin, un échec de la contraction cutanée peut aussi être fortement impliqué dans l'ulcération plantaire du diabétique⁷⁸.

5.5.4. Pied du diabétique

Les troubles trophiques du pied observés chez le patient diabétique sont la conséquence des trois types des complications du diabète (microangiopathiques, macroangiopathiques, et neuropathiques). C'est donc une « complication des complications » du diabète. Les complications du diabète touchant les pieds sont liées à la présence de^{38,79} :

- neuropathie sensitive ou baisse de la sensibilité des nerfs qui est responsable d'une perte d'alerte douloureuse au niveau des pieds favorisant le développement de déformations plantaires et les plaies ;

- neuropathie végétative entraînant une sécheresse cutanée très importante ;

- artérite des membres inférieurs et des troubles de la circulation des capillaires qui entraîne des ischémies et un déficit d'oxygénation tissulaire nécessaire à la cicatrisation.

Ainsi, la cicatrisation difficile, les troubles de la circulation et la perte de sensibilité aux traumatismes vont exposer le pied du diabétique à des plaies étendues et profondes. De plus, l'augmentation du risque infectieux liée aux perturbations métaboliques et au caractère chronique de ces plaies aggrave le tableau et expose le diabétique à un risque de gangrène important. En pratique, ces lésions sont très hétérogènes ce qui les rend difficiles à traiter⁷⁷. Le risque d'amputation chez les patients diabétiques est très important car elle est souvent le dernier recours pour contrer la dissémination profonde osseuse et/ou générale des infections⁷⁶. Ainsi, le diabète est la première cause d'amputation non-traumatique dans les pays occidentaux⁸⁰. En France, on dénombre près de 10 000 amputations par an dues aux complications du diabète⁵².

5.5.5. Cancers

Parmi les complications émergentes du DT2 figurent certains cancers. Aujourd'hui, une relation entre diabète et la survenue de différents types de cancer a clairement été établie⁸¹. En effet, de nombreuses méta-analyses ont montré des associations entre le diabète et le cancer des sphères digestives, le cancer hépatique, le cancer pancréatique, le cancer de

l'endomètre ou le cancer du sein^{75, 82}. Le cancer de la prostate semble toutefois faire exception⁸³.

5.5.5. Autres

Le diabète est aussi impliqué dans des situations à risque tels que la stéatose hépatique non alcoolique, le syndrome d'apnée du sommeil, le déclin cognitif, les troubles de l'humeur et l'altération du métabolisme osseux⁷⁵.

6. CONCLUSION DU CHAPITRE

Le diabète est une maladie chronique complexe dont les mécanismes physiopathologiques ne sont pas encore aujourd'hui tous bien compris. C'est un facteur de risque cardiovasculaire majeur, et ses nombreuses complications font sa gravité. L'hyperglycémie, l'insulinorésistance, l'inflammation, l'athérogénèse et la sensibilité aux infections sont à la base de la plupart des complications du diabète. Actuellement, il n'existe pas de traitement spécifique du diabète. A défaut de pouvoir traiter le diabète lui-même de façon curative ou de pouvoir obtenir une normalisation durable de la glycémie, la prévention de ses complications est importante. Ainsi, le traitement du diabète repose principalement sur le contrôle de la glycémie et la surveillance des complications associées. Toutefois, malgré un contrôle satisfaisant de la glycémie, 15 à 20 % des patients diabétiques développeront des complications. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques est donc importante afin de développer des méthodes de diagnostic plus précoces et des traitements plus spécifiques et efficaces dans le cas du diabète et de ses complications.

Aujourd'hui, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion ont largement montré leur efficacité dans la néphropathie diabétique. Dans ce contexte, le système kallibréine-kinine pourrait être une cible thérapeutique intéressante dans les complications du diabète. Plusieurs études ont montré que ce système joue de nombreux rôles physiopathologiques au niveau de nombreux organes et notamment au niveau du rein, du cœur, du cerveau, des vaisseaux, etc. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle de ce système kallibréine-kinine dans le développement de certaines complications macrovasculaires du diabète et des anomalies de cicatrisation. Nous nous sommes attachés à défendre expérimentalement que sa modulation pourrait être une alternative thérapeutique dans ces situations.

CHAPITRE 2 : LE SYSTEME KALLICREINE-KININE

1. INTRODUCTION

Le système kallibréine-kinine (SKK) est un système peptidique vasomoteur décrit pour la première fois en 1909 par Abelous et Bardier⁸⁴. Il joue un rôle important dans la défense et l'adaptation de l'organisme lorsque ce dernier est confronté à un stress vasculaire. Les principaux constituants de ce système sont : les kallibréines, les kininogènes et les kinines. La kallibréine tissulaire, enzyme activatrice, clive le kininogène en kinines vasoactives. Les kinines vont alors activer deux types de récepteur : B1 et B2 (*Figure 6*).

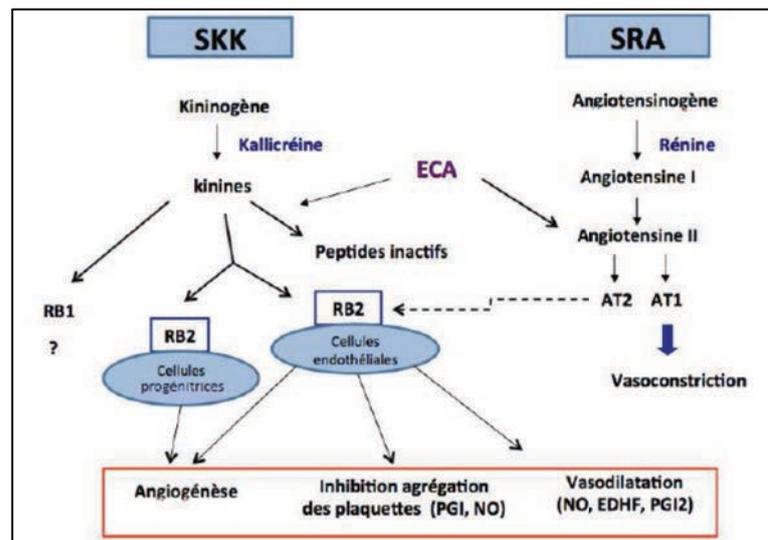


Figure 6 : Systèmes kallibréine-kinine (SKK) et rénine-angiotensine (SRA).

ECA, enzyme de conversion de l'angiotensine ; RB1, récepteur B1 des kinines ; RB2, récepteur B2 des kinines ; AT2, récepteur de l'angiotensine II 2 ; AT1, récepteur de l'angiotensine II 1 ; PGI, prostacyclines ; NO, nitric oxyde ; EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor.

En conditions physiologiques, le SKK contrôle la tonicité des cellules vasculaires lisses ainsi que la pression artérielle. En effet, les kinines sont de puissants activateurs de l'endothélium vasculaire responsables de la vasodilatation, l'angiogénèse mais aussi de l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et de la fibrinolyse⁸⁵. Leur action est principalement régulée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Le SKK est couplé par cette dernière au système rénine-angiotensine (SRA), un autre système peptidique vasomoteur qui a

lui une action vasoconstrictrice. L'ECA va, d'une part dégrader les kinines en peptides inactifs et, d'autre part, catalyser la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II, ce qui permet la régulation du tonus vasculaire. Un déséquilibre dans la régulation de ces systèmes entraîne une hypertension et des dommages au niveau de différents organes. En effet, il existe de nombreuses données en faveur d'une implication du SKK dans le développement et la progression de diverses pathologies notamment à composantes vasculaires^{74, 85, 86}.

2. FORMATION DES KININES

La formation des kinines, ainsi que leur dégradation, sont strictement régulées. Les kinines sont formées à partir du clivage du kininogène, de bas poids moléculaire ou de haut poids moléculaire, par les kalicréines (*Figure 7*).

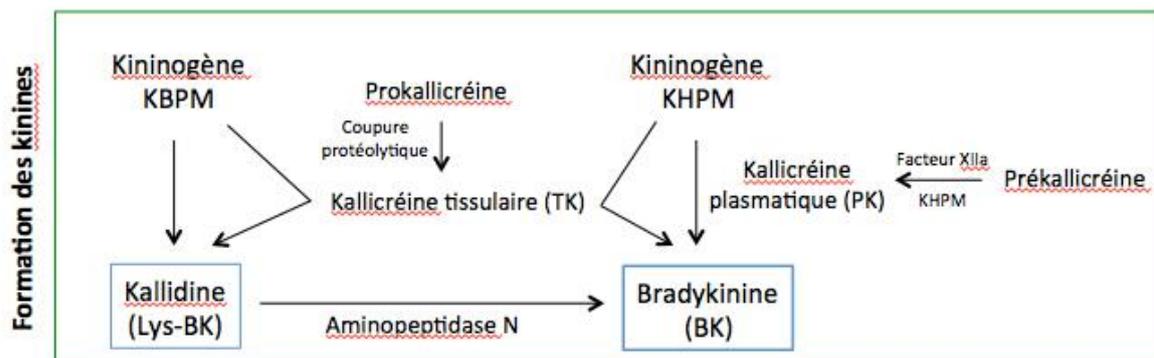


Figure 7 : Formation des kinines.

KBPM, kininogène de bas poids moléculaire ; KHPM, kininogène de haut poids moléculaire ; TK, kalicréine tissulaire ; PK, kalicréine plasmatique ; BK, bradykinine ; Lys-BK, kallidine.

La PK convertit le KHPM en BK. La TK, elle, convertit le KHPM en kallidine qui sera elle-même rapidement convertie en BK par l'aminopeptidase N.

2.1. Kininogènes

Les kininogènes sont des glycoprotéines synthétisées principalement au niveau du foie mais également dans d'autres organes et tissus (rein, cœur, endothélium) et dans le plasma^{87, 88}. Chez l'homme, sa concentration plasmatique est voisine à 300 µg/ml⁸⁷. Il existe deux types de kininogènes différenciés par le poids moléculaire de leurs chaînes légères : le kininogène de bas poids moléculaire (KBPM, 66 kDa) et le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM, 110 kDa)⁸⁹. Leur principal rôle est d'être le précurseur de la formation des kinines, mais ils sont aussi impliqués dans la coagulation, la fibrinolyse, l'inflammation et

l'angiogénèse⁹⁰. En effet, le KHPM, en particulier, par la richesse en résidus histidine, proline et lysine de sa chaîne légère, a des propriétés de cofacteur de la coagulation en se fixant sur les surfaces chargées négativement.

2.2. Kallibréines

Les kallibréines sont des sérine-protéases retrouvées dans les cellules glandulaires, les neutrophiles et les fluides biologiques. Elles regroupent en fait deux enzymes : la kallibréine plasmatique (PK) et la kallibréine tissulaire (TK). Ces deux enzymes diffèrent dans leurs poids moléculaires, leurs compositions, leurs fonctions et le type de kinines formées.

2.2.1. Kallibréine plasmatique (PK)

La PK, est synthétisée et sécrétée au niveau du foie sous la forme d'un précurseur inactif, la prékallibréine, et circule dans le plasma sous forme inactive complexée au KHPM. Le gène de la PK, ou KLKB1, est situé sur le chromosome 4 chez l'homme⁹¹. La prékallibréine peut directement être activée en PK par le facteur de coagulation XIIa ou par le KHPM. Une fois activée en PK, la prékallibréine libère la bradykinine à partir du KHPM. La PK ne contribue pas de façon importante à la formation des kinines en conditions physiologiques⁹². Cependant, elle a un rôle important dans la production des kinines dans certaines conditions pathologiques, et en particulier dans la coagulation.

2.2.2. Kallibréine tissulaire (TK)

Chez l'homme, la kallibréine tissulaire a une structure et une physiologie très différentes de la PK. C'est également une enzyme à sérine codée par un gène, KLK1, du chromosome 19⁹³. Chez la souris, l'espèce chez laquelle la famille des kallibréines a été décrite initialement, les gènes des kallibréines, dont le gène Klk1 de la TK, se trouvent au même locus du chromosome 7⁹⁴. On la retrouve dans différents organes et cellules dont les glandes exocrines et salivaires, le pancréas, le rein, le cœur, les vaisseaux sanguins (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses), le cerveau et les muscles squelettiques⁸⁹. La TK fait partie d'une grande famille de protéases elle-même aussi appelée « kallibréines tissulaires ». Cette famille est composée de 14 kallibréines dont les fonctions sont très variées et différentes. La TK est la principale enzyme de cette famille et permet la libération des kinines à partir des kininogènes. Initialement synthétisée sous forme d'une proenzyme, la prokallibréine, la TK est activée par clivage protéolytique. L'hydrolyse du kininogène par la

TK libère des polypeptides actifs : la bradykinine (BK), un nonapeptide, et la kallidine (Lys-BK), un décapeptide. La kallidine est uniquement produite chez l'homme. La TK murine libère exclusivement de la BK. La TK est la principale enzyme de formation des kinines.

2.3. Kinines

Les kinines désignent une famille de polypeptides dont les principaux sont la BK et la kallidine chez l'homme et la BK chez le rongeur. Ces variations inter-espèces résultent de différences dans les structures primaires du kininogène formateur. Les affinités de la BK et de la kallidine pour leur récepteur sont donc différentes en fonction de l'espèce étudiée. Ces différences doivent être prise en compte lors d'études expérimentales.

La BK est généralement retrouvée dans les liquides biologiques telles que le sang, l'urine, la salive et la sueur mais aussi dans plusieurs organes tels que le cœur, les vaisseaux, le rein, le colon, le cerveau ou le foie⁹⁵. La kallidine, elle, est principalement retrouvée dans le cœur, les urines et la circulation sanguine⁹⁶. En plus de ces deux principales kinines, il existe d'autres kinines telles que la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD. Certains produits de dégradation des kinines, ou métabolites, peuvent aussi avoir une activité physiologique. La BK(1-5), par exemple, joue un rôle dans la coagulation⁹⁷.

Les kinines exercent leurs activités pharmacologiques en activant deux types de récepteur : B1 (RB1) et B2 (RB2). La BK et la kallidine sont des agonistes endogènes préférentiels des RB2 tandis que la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD, qui sont issues du métabolisme des kinines natives, sont les agonistes sélectifs des RB1⁹⁵ (*Tableau 2*).

Kinine	Récepteur
Bradykinine (BK) Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	RB2
Kallidine (Lys-BK) Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg	RB2
des-Arg⁹-BK Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe	RB1
des-Arg¹⁰-KD Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe	RB1

Tableau 2 : Principales kinines actives chez l'homme et leurs récepteurs.

RB1, récepteur B1 des kinines ; RB2, récepteur B2 des kinines. La spécificité pharmacologique de chacun de ces peptides réside dans leur partie C-terminale⁸⁸. Tableau issu de Albert-Weissenberger *et al.* 2013⁹⁵.

3. DEGRADATION DES KININES

Les kinines sont rapidement dégradées par des amino-, carboxy- et endopeptidases appelées kininases pour aboutir à la production de plusieurs métabolites actifs ou inactifs (Figure 8b). La durée de vie des kinines dans le plasma est très courte ; celui de la BK ne dépasse pas 30 secondes⁸⁸. Le terme « kininases » regroupe deux principaux types d'enzymes principalement responsables de la dégradation de la BK : la kininase I (carboxypeptidases M et N) et l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) ou kininase II⁹⁸. Les kininases sont retrouvées de façon ubiquitaire. Leur participation est dépendante de leur localisation (cellules endothéliales, rein, sang, etc.) et de l'espèce. L'ECA est la principale enzyme de dégradation des kinines chez l'homme dans la circulation sanguine⁹⁹. En revanche, chez le rat, l'existence d'au moins une voie de dégradation supplémentaire serait responsable de plus de 42% de l'activité totale des kininases¹⁰⁰.

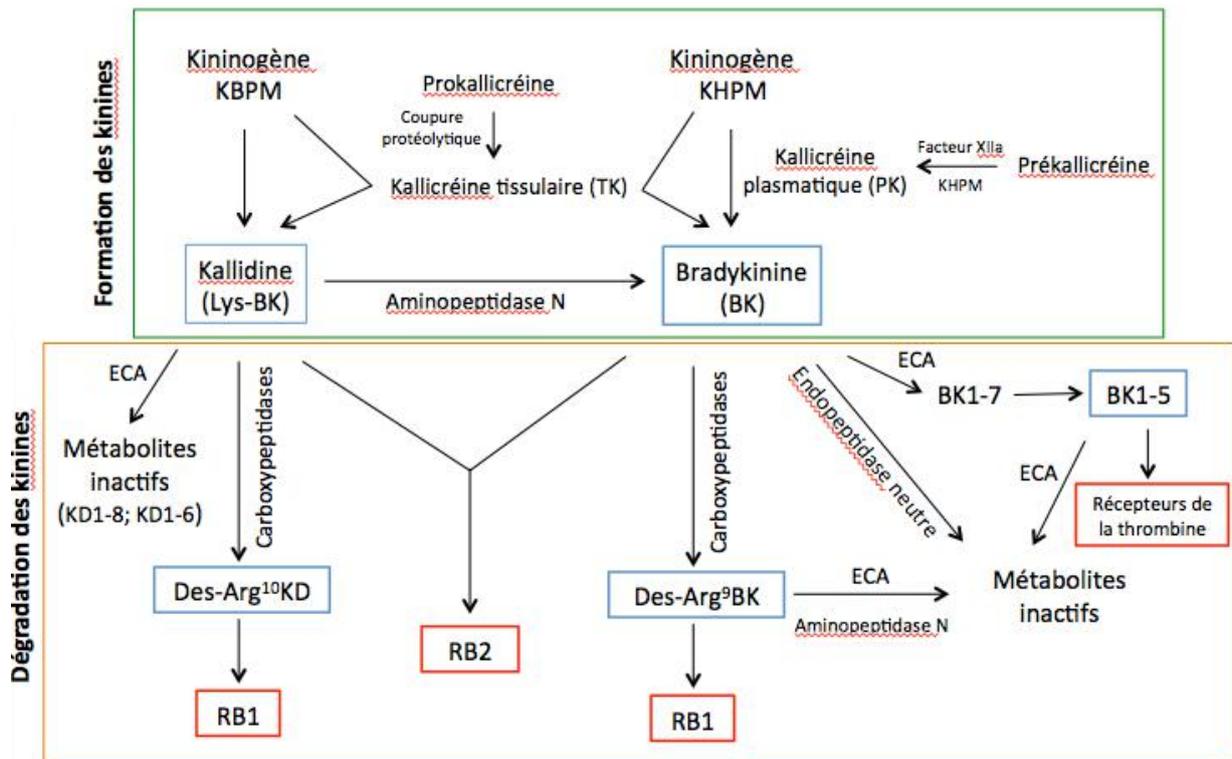


Figure 8 : Formation (a) et dégradation (b) des kinines.

KBPM, kininogène de bas poids moléculaire ; KHPM, kininogène de haut poids moléculaire ; TK, kallibréine tissulaire ; PK, kallibréine plasmatique ; BK, bradykinine ; Lys-BK, kallidine ; ECA, enzyme de conversion de l'angiotensine ; RB1, récepteur B1 des kinines ; RB2, récepteur B2 des kinines.

3.1. Kininases I

Les kininases I sont des exopeptidases circulantes ou membranaires qui regroupent les carboxypeptidases M et N. La carboxypeptidase M est membranaire et est présente dans le rein, les poumons et l'endothélium vasculaire. La carboxypeptidase N est circulante et synthétisée dans le foie. Les kininases I clivent l'arginine en C-terminal de la BK ou de la kallidine pour donner des métabolites actifs : la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-Kallidine respectivement⁸⁸. Ces kinines vont activer les RB1 (*Tableau 2*) et vont être impliquées dans la réponse inflammatoire induite par l'activation des RB1¹⁰¹. Ces voies, physiologiquement mineures, deviennent importantes lorsque l'ECA est inhibée.

3.2. Kininase II ou enzyme de conversion de l'angiotensine I

La kininase II, ou ECA, est une ectoenzyme membranaire. L'ECA est l'enzyme majeure de dégradation des kinines. Elle est principalement exprimée au niveau de l'endothélium vasculaire pulmonaire mais également au niveau du rein, de l'intestin et du placenta. L'ECA agit comme une dipeptidylcarboxypeptidase, c'est à dire qu'elle va cliver le dipeptide Phe⁸-Arg⁹ de la BK et de la kallidine³⁸. La dégradation des kinines par l'ECA entraîne donc la libération de BK(1-7) et de KD(1-8) puis de la BK(1-5) et de la KD(1-6). La BK(1-5), ou Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, est un métabolite stable¹⁰² avec un rôle physiologique propre notamment dans l'activation plaquettaire thrombine-dépendante^{97, 103} et dans la réponse inflammatoire¹⁰⁴. L'ECA est également capable de métaboliser la kallidine et la des-Arg⁹-BK.

Bien que les kinines soient leurs substrats majeurs, les kininases II clivent aussi d'autres peptides⁹⁹. Ainsi, l'ECA est également une enzyme clé de l'activation du SRA puisqu'elle va catalyser la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, qui est un puissant vasoconstricteur. Des études ont montré que l'ECA possède deux domaines catalytiques avec des rôles physiologiques indépendants. Par exemple, alors que la BK est dégradée par les deux domaines catalytiques, la conversion de l'angiotensine I se fait seulement par un seul des deux domaines¹⁰⁵.

Le SKK est donc couplé au SRA par cette ECA qui d'une part dégrade les kinines en peptides majoritairement inactifs et, d'autre part, catalyse la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II (*Figure 6*). L'action vasomotrice opposée de ces deux systèmes (kinines : vasodilatateur et angiotensine II : vasoconstricteur) permet la régulation du tonus vasculaire et le maintien de l'homéostasie vasculaire.

3.3. Autres kininases

D'autres peptidases métabolisant les kinines existent telles que : l'endopeptidase neutre¹⁰⁶, les carboxypeptidases A et B¹⁰⁷ et l'aminopeptidase P¹⁰⁸. Ces enzymes jouent un rôle mineur dans l'inactivation plasmatique des kinines.

L'endopeptidase neutre clive le même site de liaison de la BK (Pro7-Phe8) que l'ECA mais aussi la liaison Gly4-Phe5¹⁰⁹. Du fait de sa présence en grande quantité dans le néphron, l'endopeptidase neutre compte pour plus de la moitié de l'activité kininase rénale et urinaire chez l'homme. C'est donc la principale enzyme impliquée dans le métabolisme des kinines dans le rein¹⁰⁶.

L'aminopeptidase P est formée par les cellules endothéliales. Elle peut donc être membranaire ou plasmatique. Elle clive le premier acide aminé de la BK (N-ter) pour former la des-Arg⁹-BK. Elle constitue, au niveau plasmatique, la principale enzyme de métabolisation de la des-Arg⁹-BK, agoniste des RB1¹¹⁰. D'autres aminopeptidases (N, plasmatique et M, membranaire) convertissent la KD en des-Arg¹⁰-KD et la BK en des-Arg⁹-BK.

Les carboxypeptidases A et B sont les enzymes dégradant les métabolites actifs des kinines, dont la des-Arg⁹-BK, dans le plasma humain^{111, 112}.

La *figure 9* ci-après permet de résumer le catabolisme des différentes kinines.

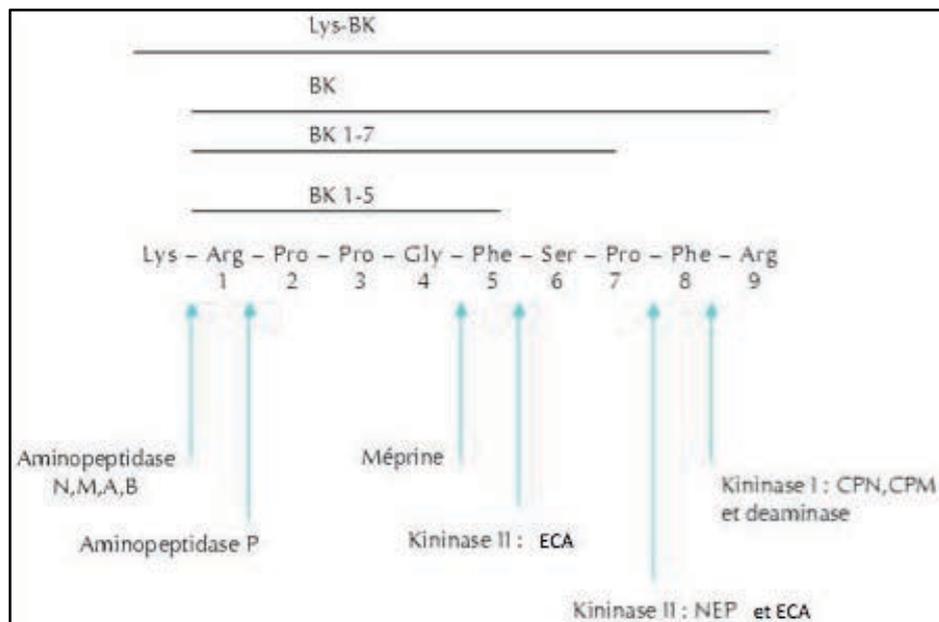


Figure 9 : Catabolisme des kinines.

Lys-BK, kallidine ; BK, bradykinine ; ACE, enzyme de conversion de l'angiotensine ; NEP, endopeptidase neutre ; CPM, carboxypeptidases M ; CPN, carboxypeptidases N. Image issue de Griffons *et al.* 2005⁹².

4. RECEPTEURS DES KININES

Les kinines et leurs métabolites actifs activent deux types de récepteur : RB1 et RB2. Les différentes fonctions physiopathologiques des kinines, incluant la perméabilité vasculaire, la formation de l'œdème vasculaire, la migration des cellules et l'inflammation suivant une lésion, sont médiées par ces deux récepteurs. Malgré la similarité de leur structure, les deux récepteurs présentent des caractéristiques et des effets différents.

4.1. Structure des récepteurs des kinines

Il s'agit de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) (*Figure 10*). Le RB1 et le RB2 sont codés par deux gènes différents chez tous les mammifères¹¹³. Chez l'homme, ces gènes sont situés sur le chromosome 14, au niveau du même locus (14q32.1-q32.2). Le gène humain du RB1 (*BDKRB1*) code pour un peptide de 353 acides aminés et sa séquence présente 70% d'homologie avec le gène *Bdkrb1* du rat et de la souris. Le RB2, lui, est composé de 391 acides aminés chez l'homme (392 chez la souris). Son gène humain *BDKRB2* présente une homologie de 80% avec le gène *Bdkrb2* du rat et de la souris⁹².

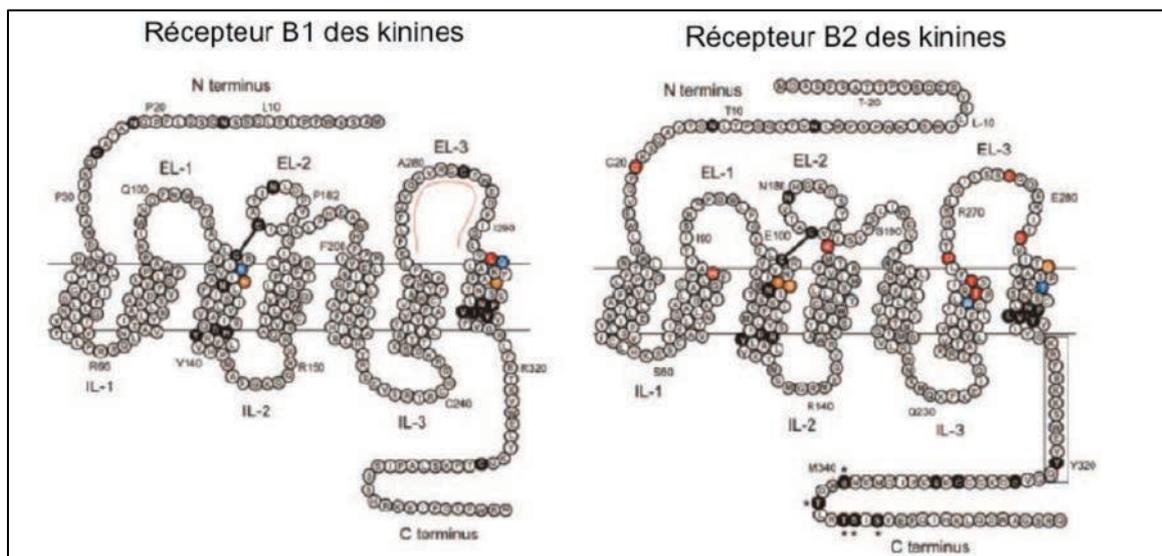


Figure 10 : Récepteurs des kinines.

Les deux récepteurs présentent 36% d'homologie dans leur structure biochimique⁹². Image issue de Leeb-Lundberg *et al.* 2005¹¹³.

4.2. Expression des récepteurs

Les deux récepteurs sont exprimés de façon très différente dans les tissus.

4.2.1. Expression des RB1

Le RB1 n'est pas présent ou est faiblement exprimé en conditions physiologiques. Son expression est induite lors de phénomènes inflammatoires d'origines diverses, après une lésion tissulaire et dans certaines conditions pathologiques notamment en cas de stress cellulaire, de diabète ou d'ischémie¹¹⁴⁻¹¹⁹. Le RB1 est aussi exprimé en absence du RB2, c'est-à-dire en cas de déficience ou d'inactivation génétique du RB2, et peut remplacer le RB2 dans ces fonctions vasculaires et cardiaques¹²⁰. Chez la souris déficiente en RB2, par exemple, le RB1 est exprimé de façon constitutive dans la plupart des tissus, probablement par un phénomène de compensation¹²¹. Aujourd'hui, le rôle du RB1 reste moins bien identifié que celui des RB2.

4.2.2. Expression des RB2

Le RB2 est constitutif dans les tissus. Il a été identifié dans la plupart des tissus et plus particulièrement dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules mésangiales, les cellules épithéliales, certains neurones, les astrocytes et les polynucléaires neutrophiles^{87, 116}. Le RB2 est responsable des principaux effets connus des kinines¹¹³.

4.3. Régulation des récepteurs

Comme la plupart des RCPG, les récepteurs des kinines sont régulés par des modifications post-transcriptionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation ou la glycosylation. La phosphorylation de RB2 est dépendante de la stimulation par son agoniste (BK). Le RB2 est désensibilisé après sa stimulation et internalisé. Son internalisation rapide est suivie de son recyclage vers la membrane^{122, 123}. La stimulation chronique du RB2 diminue son expression membranaire par modifications post-transcriptionnelles. Ainsi, les RB2 sont le plus souvent impliqués dans des réponses aiguës. A la différence des RB2, les RB1 ne subit pas de désensibilisation et d'internalisation du RB1 après sa stimulation par son agoniste¹²⁴. Cette absence d'internalisation du RB1 conduit à une dissociation lente avec le ligand et explique l'implication du RB1 dans des effets chroniques comme la phase chronique de la réponse inflammatoire.

4.4. Voies de signalisation

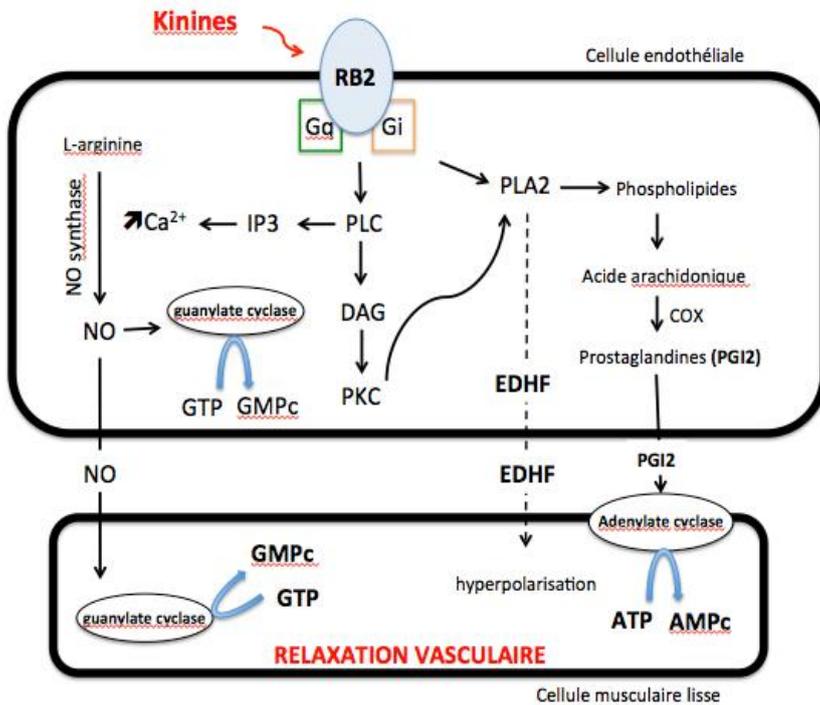
4.4.1. Voies de signalisation des RCPG

Du fait de leur structure, les deux récepteurs ont une transduction du signal comparable à celle des RCPG. Les RCPG constituent la plus grande famille de protéines membranaires participant à la régulation des fonctions physiologiques. Les principales voies de signalisation des RCPG, la voie des phospholipases et celle des cyclases¹²⁵, impliquent l'activation des protéines G qui les constituent. Cette activation de leurs protéines G conduit au relargage de différents seconds messagers et à la modification des concentrations calciques intracellulaires. Ces différentes modifications vont permettre aux cellules de répondre aux variations de leur environnement. Du fait de son internalisation rapide, l'action du RB2 via l'augmentation de calcium intracellulaire est transitoire. En revanche, l'absence de désensibilisation du RB1 entraîne une élévation prolongée du calcium intracellulaire^{117, 126}.

D'autres voies de signalisation du RB2, moins importantes, sont indépendantes des protéines G. Ces voies peuvent être impliquées dans des phénomènes de prolifération, de migration et de différenciation cellulaires^{92, 113}.

4.4.2. Principales voies de signalisation des RB2

Au niveau endothélial, les kinines jouent un rôle clé dans la relaxation des cellules musculaires lisses et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. La BK va stimuler les protéines G α_q et donc la phospholipase C (PLC), les protéines G α_i et G α_s et donc la phospholipase A2 (PLA2), et la phospholipase D (PLD)⁹². La stimulation de ces enzymes a comme conséquence la libération de seconds messagers en cascade aboutissant à la relaxation vasculaire (*Figure 11*).



La stimulation de la PLA2 entraîne la libération d'EDHF et d'acide arachidonique à l'origine de la production de PGI2. La libération d'EDHF conduit à une augmentation transitoire de Ca²⁺. En parallèle, la stimulation de la PLC va aboutir à la formation d'IP3 et de DAG. La libération d'IP3 va entraîner une augmentation de Ca²⁺ qui va à son tour déclencher l'activation de la eNOS et donc la synthèse de NO, un puissant vasodilatateur. La libération de DAG conduit à une activation de la PKC qui potentialise l'action de la PLA2. L'activation des cyclases par le NO ou la PGI2 conduit à la production d'AMPc et de GMPc. L'action conjointe des seconds messagers GMPc, PGI2 et EDHF produit une relaxation au niveau des cellules musculaires lisses, responsable de l'effet vasodilatateur des kinines^{95, 127}.

Figure 11 : Voies de signalisation de l'activation des RB2 au niveau de l'endothélium.

RB2, récepteur B2 des kinines ; PLA2, phospholipase A2 ; COX, cyclooxygénases ; Ca²⁺, calcium intracellulaire ; PGI2, prostacyclines, NO, monoxyde d'azote ; EDHF, facteur hyperpolarisant endothélial (endothelial derived-hyperpolarizing factor) ; IP3, inositol triphosphate ; PLC, la phospholipase C ; DAG, diacylglycérol ; PKC, protéine kinase C, AMPc, adénosine monophosphate cyclique ; GMPc ; guanosine monophosphate cyclique ; ATP, adenosine triphosphate ; GTP, guanosine triphosphate.

De la même façon, les kinines peuvent stimuler la libération de t-PA (activateur du plasminogène endogène) par l'activation des cellules endothéliales ce qui va indirectement entraîner des effets profibrinolytiques et anticoagulants^{97, 128}.

4.4.3. Seconds messagers de l'activation des RB1

Les médiateurs générés par la stimulation des RB1 ne sont pas aussi bien déterminés que ceux des RB2. La voie principalement activée serait celle associée à l'activation de la PLC¹¹⁹. Récemment il a aussi été montré que l'activation des RB1 induit la phosphorylation de la NOSi (monoxyde d'azote synthase inductible) en activant la voie Erk (extracellular signal-regulated kinases) et l'unité Gai du RCPG¹²⁹.

4.5. Effets physiologiques des récepteurs des kinines

De par leurs différences d'expression et de sensibilisation, les RB1 et les RB2 ont des effets physiologiques différents au niveau du cœur, des vaisseaux, du rein, des poumons, etc. Les différents rôles des kinines, par l'activation de ces récepteurs, seront décrits dans le paragraphe « 7. Rôles du Système Kallicréine-Kinine ».

5. INTERACTIONS ENTRE LE SKK ET LE SRA

Comme nous l'avons vu précédemment, le SKK et le SRA sont connectés par l'ECA. Cependant, le SKK et le SRA présentent de nombreux autres niveaux d'interactions potentiels¹³⁰. Notamment, des études réalisées chez l'homme et dans certains modèles animaux expérimentaux montrent qu'il existe une interaction et une hétérodimérisation entre les récepteurs des deux systèmes suggérant que l'activation des récepteurs du SRA (principalement AT₂) pourrait augmenter l'expression de la TK et la libération de kinines et donc stimuler les RB2 (*Figure 6*). De plus, le RB2 interagit avec le récepteur AT₁ pour former des hétérodimères qui vont activer les protéines G⁹².

Ces deux systèmes sont très interdépendants et donc tout changement dans un des deux systèmes est obligatoirement associé à une modification de l'autre système. Ainsi, les interventions thérapeutiques sur l'un des deux systèmes conduit inévitablement à modifier le deuxième. Depuis de nombreuses années, plusieurs études utilisant des approches pharmacologiques ou génétiques ont montré que les effets bénéfiques de l'inhibition de l'ECA, en particulier dans le traitement de l'hypertension ou des pathologies cardiovasculaires et rénales, sont en grande partie attribués à l'accumulation des kinines^{131, 132}. La revue d'Alhenc-Gelas *et al.*⁸⁵ résume les principales études réalisées sur le rôle du SKK dans les effets des inhibiteurs de l'ECA. Les effets du SKK peuvent donc contre réguler les effets délétères du RAS en particulier en situation pathologique. Cependant, l'augmentation des niveaux de la BK peut aussi entraîner des effets indésirables⁷⁴. L'effet bronchoconstricteur des kinines, par exemple, est suspecté d'être responsable de la toux secondaire à l'administration des inhibiteurs de l'ECA¹³³.

6. OUTILS GENETIQUES ET PHARMACOLOGIQUES D'ETUDE DU SYSTEME KALLICREINE KININE

Les outils génétiques et pharmacologiques sont nécessaires pour étudier le rôle physiopathologique du SKK. A l'heure actuelle, la plupart des données expérimentales sur le rôle du SKK dans les différentes pathologies étudiées ont été obtenues grâce à l'utilisation de modèles d'inactivation génétique (souris déficientes en RB2 et/ou RB1 et en TK) et/ou pharmacologique (antagonistes des RB2 ou des RB1). Du fait de la grande labilité des agonistes naturels des récepteurs des kinines, l'étude expérimentale du rôle du SKK par activation du système est restée longtemps limitée à l'administration de gène de la TK humaine. Récemment, l'équipe du Pr. Fernand Gobeil Jr. de l'Université de Sherbrooke a développé deux nouveaux peptides de synthèse, l'un actif spécifiquement sur les RB1 et l'autre sur les RB2. Au cours de ma thèse, j'ai été amenée à utiliser plusieurs de ces outils pharmacologiques (antagoniste RB2, agoniste des RB1 et des RB2) et génétiques (souris déficientes en TK).

6.1. Outils génétiques

6.1.1. Souris déficientes en TK (TK^{-/-})

Les souris déficientes en TK (ou TK^{-/-}) ont été développées dans notre laboratoire grâce à la technologie de transgénèse ciblée par recombinaison homologue¹³⁴. La déficience du gène de la TK chez ces souris entraîne une réduction d'au moins 95 % de la formation des kinines au niveau du cœur, des reins, du colon, du pancréas, des poumons et des glandes salivaires. De plus, les kinines sont indétectables dans la circulation et les urines¹³⁴. Dans des conditions physiologiques normales, les souris TK^{-/-} possédant un fond génétique C57Bl/6, comme celles utilisées dans l'étude, sont normotendues et ne présentent pas d'altérations dans leur phénotype cardiovasculaire et rénal basal^{135, 136}.

6.1.2. Souris déficientes en RB1 (RB1^{-/-})

Les souris RB1^{-/-} ont été générées par Pesquero *et al.* afin de clarifier le rôle physiologique des RB1. Les souris RB1^{-/-} sont saines, fertiles et normotensives. Toutefois, elles présentent une inhibition des processus inflammatoires et une diminution de la sensation à la douleur¹³⁷. Chez ces souris, le RB2 semble jouer un rôle de compensation de la déficience RB1, notamment au niveau de la fonction cardiaque¹³⁸.

6.1.3. Souris déficientes en RB2 (RB2^{-/-})

De façon similaire au souris TK^{-/-}, les souris RB2^{-/-} ont été obtenues par transgénèse ciblée par recombinaison homologue¹³⁹. Bien qu'une hypertrophie cardiaque a été observée dans certaines études, ces souris ne semblent pas avoir d'altération dans leur phénotype cardiovasculaire et rénal basal. Chez ces souris, le RB2 est totalement absent dans les différents tissus. Toutefois, ces souris présentent une expression constitutive des RB1 probablement par un mécanisme compensateur destiné à pallier l'absence des RB2¹²¹.

6.1.4. Souris invalidées pour les deux récepteurs (RB1^{-/-}/RB2^{-/-})

Ces souris présentent une déficience à la fois des RB1 et des RB2. Ces souris sont normotendues. Elles ont principalement été utilisées dans des études de physiologie rénale.

Ainsi, l'induction de diabète par la streptozotocine, ou d'une autre pathologie par une méthode chimique et/ou chirurgicale chez ces animaux présentant une déficience génétique pour un composant du SKK permet d'étudier l'influence du système impacté dans la pathologie induite.

6.2. Outils pharmacologiques

La découverte et la synthèse des premiers antagonistes stables et spécifiques de chaque type de récepteurs ont permis la meilleure compréhension du rôle du SKK mais représentent aussi des nouveaux traitements potentiels dans de nombreuses pathologies. Plus récemment, la synthèse de nouveaux agonistes spécifiques des récepteurs des kinines donne de nouvelles perspectives thérapeutiques.

6.2.1. Antagonistes des RB1

Les antagonistes des RB1 ont été les premières molécules de modulation du SKK découvertes. En effet, en 1977, Regoli *et al.* ont été les premiers à montrer la présence d'un antagoniste du RB1 dans l'aorte de lapin^{140, 141}. Cet antagoniste a été obtenu en remplaçant un acide aminé (Phe par Leu) en position C terminale de la Des-Arg⁹-BK. Par la suite, plusieurs antagonistes puissants des RB1 ont été synthétisés¹¹³.

6.2.2. Antagonistes des RB2

Les premiers antagonistes des RB2 ont été produits dès 1985. Ces antagonistes avaient une activité résiduelle d'agoniste partiel. Par la suite, d'autres antagonistes des RB2, aussi appelés antagonistes de seconde génération, tels que l'icatibant, ont été synthétisés¹⁴¹. Ces antagonistes ont une activité antagoniste forte sans activité agoniste résiduelle dans la plupart des espèces mammifères¹¹³ et ont déjà démontré leur efficacité dans divers modèles expérimentaux de pathologies humaines¹⁴². Plus récemment, une troisième génération d'antagonistes des RB2 non-peptidiques, plus spécifiques et sélectifs, et efficaces par voie orale, a été produite^{113, 141, 143}.

6.2.2.1. Icatibant

L'icatibant (ou HOE-140, 049 JE) fait partie des antagonistes des RB2 les plus utilisés dans les études expérimentales⁹². C'est un antagoniste peptidomimétique puissant des RB2, spécifique et sélectif, composé de dix acides aminés. Il a été produit par Hoechst Marion Roussel et décrit pour la première fois en 1991¹⁴⁴. Son poids moléculaire est de 1304,59 kDa et sa formule est donnée dans la *figure 12*.

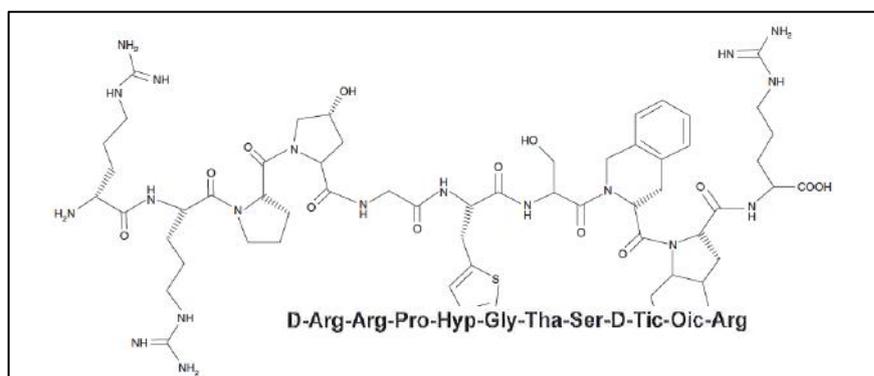


Figure 12 : Formule développée et séquence peptidique de l'icatibant (ou HOE-140).

6.2.2.2. Propriétés pharmacocinétiques de l'icatibant

Bien que le plus souvent décrit comme un antagoniste de seconde génération dépourvu d'activité résiduelle d'agoniste^{144, 145}, il faut savoir que l'icatibant peut avoir des propriétés d'agonistes faibles en fonction des tissus et des espèces étudiées notamment chez le lapin^{146, 147}. A l'heure actuelle, de nombreuses données de la littérature montrent, *in vivo*, les propriétés d'antagoniste spécifique des RB2 de l'icatibant dans plusieurs espèces animales, dont l'homme et la souris¹¹⁸.

L'icatibant a une grande affinité pour les RB2 mais il semblerait qu'il n'ait pas le même site de liaison que la BK¹⁴⁸. Après son administration, par voie sous-cutanée, l'icatibant est rapidement absorbé avec un pic de concentration dans les 30 minutes. Chez l'homme, sa biodisponibilité est de 97 % pour une dose de 30 mg et sa liaison aux protéines est faible (environ 44 %). Sa demi-vie d'élimination est de $1,4 \pm 0,4$ heures. Il est dégradé par des enzymes protéolytiques en métabolites inactifs qui seront excrétés dans l'urine. Son métabolisme est donc indépendant des cytochromes P450.

L'effet de l'icatibant n'est pas dose-dépendant^{149, 150}.

6.2.2.3. Utilisation de l'icatibant

Aujourd'hui l'icatibant, par sa spécificité et son action, a été utilisé dans de nombreuses études expérimentales notamment dans la recherche des différents rôles physiopathologiques du SKK¹⁴⁹. En 2008, l'icatibant a obtenu, après des études cliniques et des études d'innocuité¹⁵¹, une autorisation de mise sur le marché dans le traitement des crises aiguës d'angioedème héréditaire chez l'adulte¹⁵⁰.

6.2.3. Agonistes des RB1

La grande labilité du ligand naturel du RB1 (des-Arg⁹-BK) rend son utilisation difficile dans les études expérimentales¹⁵². Le « meilleur » agoniste des RB1 était le Sar[DPhe⁸]des-Arg⁹-BK. Cependant, cet agoniste a une moindre susceptibilité à la protéolyse et son affinité pour le RB1 est modérée par rapport au ligand naturel¹⁵³. Dans ce contexte, Côté *et al.* (équipe du Pr. Gobeil) ont identifié plusieurs peptides agonistes des RB1 en modifiant la synthèse du Sar[DPhe⁸]des-Arg⁹-BK¹⁵⁴. L'activité de ces agonistes a été étudiée à la fois *in vitro*, sur des tissus isolés (tissus ombilicaux humains et cellules transfectées) et sur la pression artérielle de modèles expérimentaux (lapins et rats). Ces études ont montré que ces nouveaux agonistes possèdent une plus grande affinité et une plus grande puissance que l'agoniste précédent. L'agoniste SarLys[Hyp³,Igl⁵,DPhe⁸]desArg⁹-BK (peptide NG29 ou RB1-ag), en particulier, a une durée d'action pharmacologique prolongée (> 6-12 fois) et une spécificité aux RB1 très importante.

6.2.3.1. Agoniste NG29 ou RB1-ag

Le RB1-ag se retrouve sous forme d'une poudre blanche. Son poids moléculaire est de 1106 g/mol. Sa formule développée est donnée dans la *figure 13*.

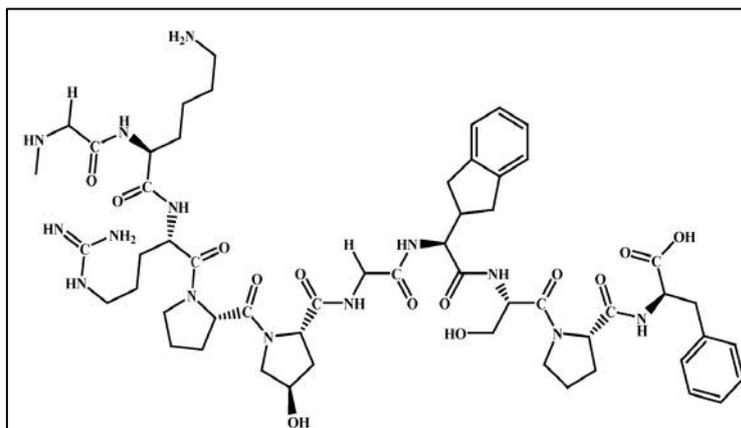


Figure 13 : Formule développée de RB1-ag (SarLys[Hyp³,Igl⁵,DPhe⁸]desArg⁹-BK).

6.2.3.2. Propriétés pharmacocinétiques de RB1-ag

Il existe des différences inter-espèces pour ce produit, notamment au niveau de son affinité pour les récepteurs et de sa puissance pharmacologique¹⁵⁴. Le RB1-ag est un analogue du Sar[DPhe⁸]des-Arg⁹-BK, lui-même analogue des ligands naturels des RB1, son élimination est donc similaire à ces derniers. Cependant, de par leurs modifications en N-terminal et l'insertion d'acides aminés non standards, le Sar[DPhe⁸]des-Arg⁹-BK et, encore plus, le RB1-ag sont résistants à la dégradation enzymatique en particulier chez le lapin et chez l'homme¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Ceci explique la prolongation de sa durée d'action pharmacologique. L'agoniste RB1-ag est capable de passer la barrière hémato-encéphalique¹⁵⁸.

6.2.3.3. Utilisation de RB1-ag

Depuis sa synthèse, le RB1-ag a très peu été utilisé dans des modèles expérimentaux. L'équipe du Pr. Gobeil l'a utilisé pour étudier le rôle des RB1 dans la perméabilité membranaire et le développement des tumeurs cérébrales^{158, 159}. Au sein de notre laboratoire, nous nous intéressons aux rôles du SKK dans les complications vasculaires du diabète. Le développement de cet agoniste puissant, sélectif et résistant à la dégradation peptidique représente donc un outil pharmacologique important pour notre équipe. Ainsi, Louis Potier a montré au cours de sa thèse qu'une administration aiguë de RB1-ag est cardioprotectrice dans un modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque chez la souris diabétique¹⁶⁰.

6.2.4. Agonistes des RB2

De nombreuses études ont montré le rôle des RB2 et le potentiel thérapeutique des agonistes des RB2 (dont la BK) dans des modèles expérimentaux de pathologies¹⁶¹. Cependant, l'utilisation des ligands naturels du RB2 (BK principalement) est difficile du fait

de leur grande labilité (demi-vie extrêmement courte par dégradation enzymatique)¹⁵². Bélanger *et al.* (équipe du Pr. Gobeil) ont modifié la séquence peptidique de la BK pour obtenir un autre agoniste des RB2, de séquence peptidique [Hyp³,Thi⁵,^NChg⁷,Thi⁸]desArg⁹-BK (peptide NG291 ou RB2-ag)¹⁶². Le RB2-ag a une activité biologique fortement améliorée par rapport aux autres agonistes connus.

6.2.4.1. Agoniste NG291 ou RB2-ag

Le RB2-ag se retrouve sous forme d'une poudre blanche. Son poids moléculaire est de 1129,5 g/mol et sa formule développée est donnée dans la *figure 14*.

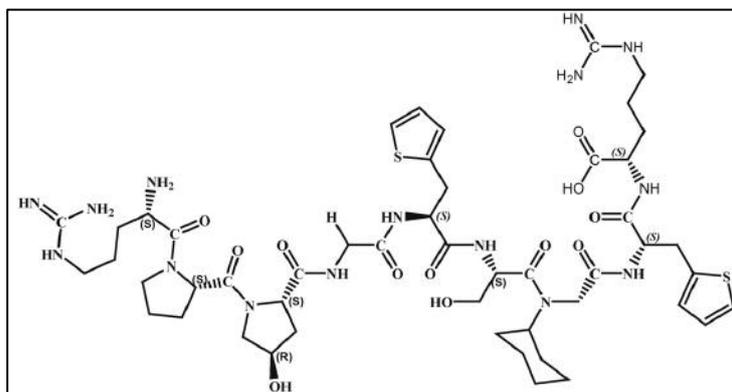


Figure 14 : Formule développée de RB2-ag ([Hyp³,Thi⁵,^NChg⁷,Thi⁸]desArg⁹-BK).

6.2.4.2. Propriétés pharmacocinétiques de RB2-ag

L'addition d'une protection à son extrémité N-ter confère au RB2-ag une haute résistance à la protéolyse (amino-, endo- et carboxy-peptidases). Ainsi, sa durée d'action est augmentée et ses propriétés anti-thrombotiques, hypotensives et profibrinolytiques sont améliorées¹⁶³. Malgré les modifications apportées, le RB2-ag reste proche de la BK et son élimination, bien que retardée, est similaire à celle de cette dernière. Comme le RB1-ag, le RB2-ag est capable de passer la barrière hémato-encéphalique¹⁵⁸.

6.2.4.3. Utilisation de RB2-ag

Le RB2-ag a été principalement utilisé dans ses études de stabilité et pour montrer que ses propriétés sont semblables à celles de la BK^{162, 163}. Comme pour le RB1-ag, cet agoniste puissant, sélectif et résistant à la dégradation peptidique est un outil pharmacologique important pour notre laboratoire. Dans sa thèse, Louis Potier a aussi montré qu'une administration aiguë de RB2-ag est cardioprotectrice dans un modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque chez la souris non-diabétique¹⁶⁰.

7. ROLES DU SYSTEME KALLICREINE-KININE

Les kinines jouent un rôle important dans la régulation de la perméabilité vasculaire et les processus inflammatoires post-lésionnels¹¹³. Les principaux effets des kinines sont médiés par l'activation du RB2. De nombreuses études montrent que les kinines sont fondamentales non seulement dans la régulation de la pression artérielle et la fonction rénale mais aussi dans la régulation des fonctions cardiaques, cérébrales ou gastro-intestinales. Les kinines jouent aussi de nombreux rôles en conditions pathologiques telles que l'ischémie cardiaque, l'accident vasculaire cérébral ou la douleur, etc.^{74, 86, 164} (Figure 15).

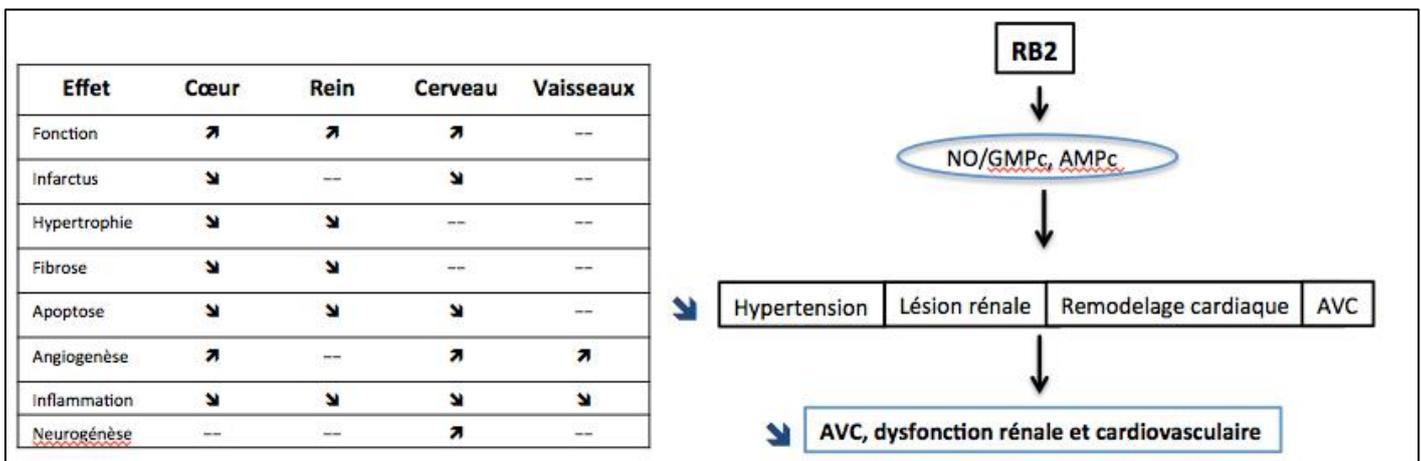


Figure 15 : Rôles du SKK dans les fonctions cardiovasculaires, rénales et cérébrales.

AVC, accident vasculaire cérébral ; RB2, récepteur B2 des kinines ; AMPc, adénosine monophosphate cyclique ; GMPc ; guanosine monophosphate cyclique. Image issue de Chao J *et al.* 2005⁸⁶.

7.1. SKK et rein

7.1.1. SKK et physiologie rénale

Tous les composants du SKK, précédemment décrits, ont été identifiés dans le rein⁸⁸. Les reins sont capables de produire, localement et de façon abondante, les kinines. Les kinines dont principalement la BK, *via* les RB2, augmentent le flux sanguin rénal sans modifier le taux de filtration glomérulaire et ont des effets natriurétiques et diurétiques. Le SKK joue donc un rôle dans le transport rénal d'électrolytes et la fonction artérielle⁸⁵. Certaines études montrent qu'il pourrait aussi avoir un rôle dans la maturation rénale¹⁶⁵.

7.1.2. SKK et pression artérielle

L'implication du SKK dans l'hypertension artérielle (HTA) est connue depuis de nombreuses années¹⁶⁶. En effet, des études ont montré que le développement d'une HTA est lié à un défaut de formation des kinines^{92, 166, 167}. Les adaptations physiologiques observées sont la conséquence d'une augmentation du débit rénal. Toutefois, la déficience en RB1, en RB2 ou en TK ne modifie pas la pression artérielle chez les souris^{135, 137}. Ces résultats suggèrent que le SKK n'est peut-être pas un déterminant majeur du système de régulation de la pression artérielle en conditions basales mais que le RB2 pourrait jouer un rôle central dans la régulation des débits rénaux locaux⁹². De plus, le risque cardiovasculaire associé à l'HTA est influencé par les variations fonctionnelles des gènes des RB1 et des RB2⁹².

Plusieurs études, décrites dans la revue d'Adam *et al.*⁸⁸, ont aussi montré l'importance du SKK dans le contrôle de l'HTA associée à une sensibilité accrue au sel. Par exemple, les souris RB2^{-/-}, habituellement normotendues, présentent une HTA lorsqu'elles sont soumises à une diète riche en sodium^{168, 169}.

7.1.3. SKK et néprotection

Aujourd'hui, l'effet néprotecteur des kinines est bien décrit, notamment en réduisant la fibrose rénale^{85, 164} et en supprimant la production des espèces réactives de l'oxygène *via* l'activation des RB2¹⁷⁰. En effet, bien que les souris TK^{-/-} ne présentent pas de modifications de leur pression artérielle ou de défaut de leur fonction vasomotrice¹³⁶, plusieurs polymorphismes des gènes du SKK ont été associés à une augmentation du risque de développer une pathologie rénale¹²⁵. De plus, les dommages liés à l'ischémie-reperfusion rénale sont plus importants chez les souris invalidées pour le gène du RB2 (RB2^{-/-}) et cet effet est aggravé chez les souris doublement invalidées pour le RB1 et le RB2 (RB1^{-/-}/RB2^{-/-})¹⁷¹. Le SKK a aussi un rôle protecteur contre les lésions rénales associées à une sensibilité accrue au sel telles que la fibrose rénale, l'hypertrophie glomérulaire ou les lésions tubulaires en inhibant le stress oxydant et l'inflammation⁸⁶. En effet, la TK diminue les dommages rénaux et cet effet est spécifique de l'activation des RB2 puisqu'il est abolit par l'administration d'un antagoniste des RB2¹⁷⁰.

7.2. SKK et cœur

7.2.1. SKK et physiologie cardiaque

Le SKK joue un rôle fondamental dans le développement du système cardiovasculaire. De nombreuses expériences réalisées sur des souris RB2^{-/-} ont montré que ces souris présentent une hypertrophie cardiaque et une augmentation de la pression dans le ventricule gauche¹⁶⁹. Le RB1 semble aussi participer dans la réponse hypotensive après une infection dans certaines espèces animales¹⁷⁰. D'autres études ont montré que les souris TK^{-/-} présentent des anomalies morphologiques au niveau du cœur (diminution de la masse du ventricule gauche et amincissement du septum) pouvant être associées à une altération des fonctions cardiaques lors de la stimulation β -adrénergique¹³⁴.

7.2.2. SKK et cardioprotection

La BK, vasodilatatrice et pro-inflammatoire, a des effets multiples sur le système cardiovasculaire. De nombreuses revues décrivent ces effets^{74, 172, 173, 85}. Le SKK joue un rôle majeur dans la protection myocardique après une ischémie¹⁷⁰. En effet, plusieurs études utilisant des souris TK^{-/-} ou RB2^{-/-}, ont montré que la suppression d'un constituant du SKK favorise le développement d'anomalies cardiaques et leur aggravation^{134, 136, 174}. L'administration d'activateurs du SKK (gène de la TK, TK recombinante ou BK) est bénéfique sur les fonctions cardiaques dans de nombreux modèles d'hypertension, d'infarctus du myocarde ou d'ischémie-reperfusion cardiaque^{86, 160, 175-177}. De plus, la BK est cardioprotectrice en agissant sur le préconditionnement cardiaque^{170, 178}. Les effets physiologiques des kinines sont couramment utilisés dans le traitement de l'hypertension et de l'ischémie cardiaque pour diminuer le volume infarcté^{85, 179}. Notamment, les effets bénéfiques cardioprotecteurs des inhibiteurs d'ECA dans l'ischémie cardiaque sont en très grande partie attribuables à l'augmentation des kinines^{180, 181}.

7.3. SKK et vaisseaux

7.3.1. Expression des composants du SKK dans les vaisseaux

En conditions physiologiques, tous les composants du SKK ont été identifiés dans les vaisseaux¹⁸². L'expression tissulaire de la TK est augmentée dans des modèles murins d'ischémie périphérique par ligature de l'artère fémorale¹⁸³. De plus, le processus ischémique

via la réaction inflammatoire associée augmente l'expression des RB1 ce qui attire les kinines dans la zone ischémisée⁹².

7.3.2. SKK et angiogénèse

L'implication du SKK dans les processus angiogéniques a été établie au cours du développement embryonnaire (participation à la vasculogénèse et stimulation de l'angiogénèse)⁹². Depuis, de nombreuses études utilisant des modèles d'ischémie périphérique chez la souris et le rat ont décrit le rôle du SKK dans les processus de néovascularisation post-ischémique^{92, 184}. Dans un premier temps, Silvestre *et al.* ont montré que les effets proangiogéniques des inhibiteurs de l'ECA sont largement médiés par l'activation des RB2^{185, 186}. En effet, dans ces études, les effets d'augmentation de la densité vasculaire et de la perfusion du membre inférieur suivant l'administration d'inhibiteurs de l'ECA disparaissent chez les souris RB2^{-/-} non-diabétiques¹⁸⁵. Par la suite, toujours dans un modèle d'ischémie périphérique, Emanuelli *et al.* ont montré que l'administration locale de gène de la TK humaine (transfection intramusculaire de TK vectorisée par plasmide nu ou par adénovirus) accélère l'angiogénèse et la restauration de la perfusion sanguine^{183, 187, 188}. Ces effets sont inhibés par l'inactivation pharmacologique ou génétique des RB1 (RB1^{-/-}) et/ou des RB2 (RB2^{-/-})^{183, 189, 190}. Ce qui confirme l'implication des deux récepteurs dans ces processus. De plus, chez les souris TK^{-/-}, les fonctions des cellules proangiogéniques circulantes sont endommagées¹⁹¹ et la néovascularisation post-ischémique est très diminuée¹⁹². Ainsi, une déficience génétique du SKK (TK^{-/-}, RB1^{-/-} ou RB2^{-/-}) dans des modèles d'ischémie périphérique chez la souris diminue les processus d'angiogénèse post-ischémique réparateurs^{190, 193}.

D'autres études ont montré que le SKK, par l'intermédiaire de l'activation du RB2, joue un rôle important dans les différentes fonctions des cellules progénitrices endothéliales, dont notamment le recrutement, après une ischémie^{194, 195}.

7.4. SKK et cerveau

7.4.1. Expression des composants du SKK dans le cerveau

Tous les composants du SKK (TK, kininogène, kinines et leurs récepteurs) sont présents au sein des différents tissus cérébraux⁹⁵. Les récepteurs des kinines (RB1 et RB2) sont exprimés dans la plupart des cellules cérébrales telles que : les neurones, les astrocytes, la microglie, les oligodendrocytes et les cellules endothéliales neuronales. Le RB1 est

faiblement exprimé en conditions physiologiques, mais surexprimé en cas d'inflammation ou de diabète. En revanche, le RB2 est exprimé de façon constitutive. Dans les modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale, les lésions post-ischémiques modifient l'expression des composants du SKK. L'expression des récepteurs (ARNm et protéique), par exemple, a parfois été rapportée comme augmentée dans l'hémisphère affecté dès les quatre premières heures après une ischémie-reperfusion cérébrale¹⁹⁶. Cette augmentation peut persister au moins durant trois jours (aucune donnée disponible pour un délai supérieur)^{95, 197, 198}. Les niveaux de BK (cérébral et sanguin) sont aussi augmentés durant les 24 premières heures après une ischémie cérébrale, avec un pic maximal à 12 heures¹⁹⁸. Ces niveaux de BK ont d'ailleurs été corrélés avec la progression de l'œdème cérébral^{199, 200}.

7.4.2. SKK et physiologie cérébrale

Dans le cerveau, le SKK joue principalement un rôle dans le contrôle de la pression artérielle intracérébrale, l'inflammation et dans la perméabilité vasculaire. Les différents rôles des RB1 et des RB2 dans les cellules cérébrales sont décrits dans le tableau suivant :

Récepteurs de la BK	Type cellulaire	Effets
RB1/RB2	Cellules endothéliales	Perméabilité vasculaire Maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique Pro-inflammatoire
RB1/RB2	Astrocytes	Inflammation Production de radicaux libres de l'oxygène Libération de glutamate Stimulation de l'expression des MMP-9 (MAPK-dépendant)
RB2	Neurones	Neuroprotection (via la voie ERK1/2) ?
Non déterminé	Oligodendrocytes	Renouvellement cellulaire Libération de Ca ²⁺ intracellulaire Inflammation
RB1/RB2	Microglie	Anti-inflammatoire (diminution de la libération de IL-1, TNF-α) Libération de Ca ²⁺ intracellulaire
RB1		Migration cellulaire

Tableau 3 : Rôles des récepteurs des kinines dans les cellules cérébrales.

Tableau issu de Albert-Weissenberger *et al.* 2013⁹⁵.

7.4.3. SKK et pathologies cérébrales

Le rôle du SKK après une lésion cérébrale d'origine ischémique ou traumatique est encore très incertain^{95, 201}. Bien que l'activation post-ischémique du SKK semble délétère dans certaines études, d'autres études montrent qu'elle serait neuroprotectrice^{86, 95}.

De nombreuses études ont montré que l'inflammation est impliquée dans les processus post-ischémiques cérébraux²⁰²⁻²⁰⁴. Dans ce contexte, de par ses propriétés inflammatoires et vasodilatatrices, le SKK pourrait jouer un rôle important. Plusieurs études se sont donc intéressées aux rôles des récepteurs des kinines dans l'ischémie cérébrale. Cependant, les résultats sont très contrastés. Cette variabilité des résultats pourrait être expliquée par les différences dans les choix du modèle d'ischémie, dans la durée de l'ischémie ou dans la période étudiée (phase précoce ou phase tardive post-ischémique). En effet, alors que certaines études montrent que l'inactivation génétique (souris RB2^{-/-}) ou pharmacologique (antagoniste spécifique) des RB2 après une ischémie cérébrale induit une neuroprotection, diminue la taille de la zone infarctée et la réaction inflammatoire post-ischémique chez la souris^{198, 205-208} ; d'autres études ont montré qu'à l'inverse l'activation du RB2 ou l'administration de TK avant ou dans les 24h après l'ischémie améliore la prolifération, la migration et la différenciation des neuroblastes au niveau de la zone de pénombre et favorise la neurogénèse et la neuroprotection chez la souris^{86, 196, 209, 210}. *In vitro*, l'activation spécifique des RB2 aurait des effets neuroprotecteurs sur les neurones^{211, 212}. En ce qui concerne le RB1, peu d'études ont été réalisées. Cependant, le blocage ou la déficience des RB1 pourraient diminuer la taille de la zone infarctée ainsi que la formation d'œdème cérébral et la réaction inflammatoire^{196, 213}. Ainsi, toutes ces études suggèrent que, bien que le SKK semble avoir un rôle délétère dans la phase précoce de l'AVC ischémique, son activation dans les phases plus tardives permet d'induire une diminution de la taille de la zone infarctée, une neuroprotection et d'améliorer le devenir des animaux⁹⁵. L'explication principale pourrait être liée aux propriétés inflammatoires du SKK. En effet, immédiatement après un AVC, l'inflammation serait délétère en favorisant les dommages cérébraux post-ischémiques ; en revanche, elle aurait des effets bénéfiques durant la phase tardive de l'AVC notamment en déclenchant les processus de réparation tissulaire. Ainsi, durant la phase précoce de l'AVC, l'inhibition du SKK pourrait limiter les dommages cérébraux post-ischémiques en limitant les phénomènes inflammatoires délétères. Toutefois ; le SKK semble impliquer dans d'autres mécanismes qui pourraient avoir des effets neuroprotecteurs post-ischémiques²¹⁴. L'activation du SKK durant la phase tardive de l'AVC pourrait avoir des propriétés neuroprotectrices en activant les processus inflammatoires et de réparation tissulaire.

Le SKK a aussi été impliqué dans de nombreuses pathologies neurologiques comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la schizophrénie^{74, 215, 216}.

7.5. SKK, douleur et inflammation

La BK est importante dans les processus inflammatoires. L'activation des deux types de récepteurs (RB1 et RB2) est impliquée de façon majeure dans les deux phases inflammatoires (aiguë et chronique)¹⁷⁰. Plusieurs études pharmacologiques et moléculaires ont montré que les RB2 jouent un rôle important dans la phase aiguë de l'inflammation et de la douleur alors que les RB1 interviendraient plutôt durant la phase chronique des processus inflammatoires et de la douleur. Ces résultats sont en accord avec le mécanisme de régulation cellulaire des récepteurs (désensibilisation rapide après activation des RB2 *versus* désensibilisation des RB1 limitée). Les RB2 sont impliqués dans les signes d'inflammation aiguë incluant la perméabilité vasculaire, la constriction veineuse, la dilatation artérielle et la douleur, mais leurs rôles dans le recrutement cellulaire dont les leucocytes restent mineurs. En revanche, les RB1 ont des effets pro-inflammatoires en favorisant le recrutement leucocytaire, la formation de l'œdème et la douleur²¹⁷. L'induction du RB1 participe également à l'amplification de l'inflammation en favorisant le recrutement des cellules mononuclées (polynucléaires, monocytes) sur le site inflammatoire²¹⁸. Le SKK pourrait aussi être impliqué dans l'infiltration des macrophages dans le tissu lésé⁸⁶. Le système nerveux central et les nerfs sont sensibles à la BK en particulier en cas de lésions tissulaires²¹⁹. Les modèles d'inactivation génétique ou d'inhibition pharmacologique des récepteurs ont permis de mettre en évidence une diminution de la douleur dans différents modèles de neuropathie et principalement de neuropathie diabétique.

Bien que les mécanismes ne soient pas encore tous élucidés, les RB1 semblent importants dans le développement des maladies inflammatoires avec une composante auto-immunitaire tels que le diabète de type 1, la sclérose en plaque, la polyarthrite rhumatoïde ou l'asthme²¹⁷.

7.6. Autres rôles physiopathologiques du SKK

7.6.1. SKK et pathologies gastro-intestinales

Les récepteurs de la BK sont impliqués dans plusieurs pathologies gastro-intestinales. L'activation excessive du SKK est en effet responsable de complications post-chirurgicales gastriques et peut aussi favoriser la formation de carcinomes pouvant engendrer des tumeurs intestinales et/ou des métastases hépatiques. La libération de prostaglandines par l'activation des récepteurs de la BK peut aussi être à l'origine de diarrhée ou d'inflammation du colon⁷⁴.

7.6.2. SKK et cicatrisation cutanée

Certaines études, moins nombreuses, se sont intéressées aux rôles du SKK dans la cicatrisation cutanée et la fonction des kératinocytes²²⁰. Tous les composants du SKK (kininogènes, kinines et récepteurs) ont été retrouvés dans la peau humaine normale, traumatisée ou pathologique^{221, 222}. Les RB1 sont faiblement exprimés mais constitutifs dans la peau. Leur expression est fortement augmentée durant la phase inflammatoire aiguë post-lésionnelle^{221, 223}. L'activation de ces récepteurs (RB1) après la lésion, contribue notamment à la différenciation et à la migration des kératinocytes en activant la voie de signalisation tyrosine kinase ou en interagissant avec les récepteurs des facteurs de croissance épidermiques ErbB²²⁴. Les différentes fonctions des kératinocytes sont aussi influencées par les kinines et les RB2. En effet, plusieurs études, réalisées *in vitro* sur des lignées humaines de kératinocytes, ont montrées que les kinines et leurs récepteurs affectent l'expansion²²⁵, la prolifération²²⁶ ou l'apoptose et la régénération²²⁷ des kératinocytes. Les kinines semblent être importantes dans la pathogénèse et/ou la progression des pathologies cutanées²²⁵. De plus, Gao *et al.* ont montré, dans une étude réalisée chez le rat, que la TK augmente la migration des kératinocytes et la fermeture de la plaie en activant la voie PAR1 (protéase-activated receptor 1) et EGFR (epidermal growth factor receptor)²²⁸. Le SKK semble donc jouer un rôle dans la médiation des réponses cutanées suite à une lésion et dans la cicatrisation.

7.6.3. SKK et cancers

En cancérologie, de nombreuses preuves sur le rôle du SKK dans le développement et la croissance des tumeurs ainsi que dans la perméabilité vasculaire des tumeurs ont été apportées^{229 128, 129}. Le rôle du SKK dans la progression tumorale n'est pas complètement élucidés mais plusieurs mécanismes semblent impliqués tels que : la dégradation de la matrice extracellulaire, le clivage hormonal ou la production de substrats et facteurs de croissance¹⁷⁰. Ainsi, le SKK joue un rôle dans le cancer de la prostate, le cancer cervical ou le cancer cérébral par exemple^{74, 230, 231}.

7.6.4. Autres

Le SKK joue aussi un rôle dans la fièvre, en modulant les processus de thermorégulation au niveau du système nerveux central ; dans les réactions allergiques tels que la bronchite allergique et l'asthme, en étant bronchoconstricteur ou dans l'apparition de l'angioedème héréditaire⁷⁴. Il semble aussi que le SKK soit impliqué dans certaines maladies inflammatoires de la peau²³².

8. CONCLUSION DU CHAPITRE

Le SKK, connu depuis fort longtemps, est impliqué dans un grand nombre de processus physiopathologiques. La TK est la principale sérine-protéase responsable de la production des kinines ; alors que l'ECA est la principale enzyme de dégradation des kinines. De nombreuses études ont largement montré que les kinines, par l'activation des RB2 mais aussi des RB1, sont impliquées dans l'homéostasie vasculaire, l'inflammation et les processus antiprolifératifs, antithrombotiques, antifibrotiques et antioxydants. Le SKK joue donc de nombreux rôles notamment dans l'HTA, la douleur, les dommages rénaux et cardiaques, l'AVC, la cicatrisation cutanée, etc. De plus, les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ECA notamment au niveau cardiaque et rénal sont en grande partie attribuables à l'accumulation des kinines. Le SKK semble donc être une cible intéressante pour le développement de nouvelles thérapies dans de nombreuses pathologies, tout en étant potentiellement associé à des effets secondaires du fait précisément de ses effets multiples.

Le SKK participe également à la régulation du métabolisme glucidique et lipidique. De nombreux liens ont été mis en évidence entre le SKK et le diabète. En effet, le SKK a été impliqué dans des mécanismes physiopathologiques d'apparition du diabète mais aussi dans la survenue de ses complications microvasculaires (rétinopathie diabétique, neuropathie diabétique, néphropathie diabétique) et macrovasculaires (ischémie périphérique et cardiaque, cardiopathie diabétique).

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 3 : SYSTEME KALLICREINE-KININE ET DIABETE

1. INTRODUCTION

1.1. SKK et physiopathologie du diabète

1.1.1. Expression des récepteurs RB1 et RB2 et diabète

L'expression des récepteurs des kinines, et en particulier des RB1, est fortement augmentée dans la plupart des tissus et des organes en cas de diabète^{113, 233}.

1.1.2. SKK, insulinosécrétion et insulino-résistance

Le rôle de la kallibréine dans le métabolisme glucidique est connu de longue date. En effet, les travaux de Frey et *al.* en 1932, avaient rapporté l'effet hypoglycémiant de la perfusion de kallibréine *via* l'activation des RB2²³⁷. De plus, le déficit en insuline chez les patients diabétiques est responsable d'une diminution de l'activation du SKK. Le SKK intervient dans la survenue du diabète en lui-même²³⁴⁻²³⁷ en participant au contrôle du métabolisme glucidique et lipidique, à la sensibilité à l'insuline et à l'homéostasie glucidique⁹². Il a notamment été impliqué dans les processus physiopathologiques conduisant au DT2²³⁸. En effet, des études cliniques montrent une diminution de l'incidence du DT2 chez les sujets traités avec un inhibiteur de l'ECA²³⁹ et une modulation de la sensibilité à l'insuline liée au polymorphisme Insertion/Délétion du gène de l'ECA²⁴⁰. Les études expérimentales, utilisant des outils génétiques et/ou pharmacologiques, de l'effet du SKK sur l'action et la sécrétion de l'insuline sont nombreuses⁹². Il a été observé, chez les souris RB2^{-/-} : une insulino-résistance²⁴¹ ; chez les souris RB1^{-/-} : une augmentation de l'insulinosensibilité et une réduction de l'insulinosécrétion²⁴² et ; chez les souris doublement déficientes (RB1^{-/-}/RB2^{-/-}) : une amélioration des paramètres glucidiques^{237, 243}. Expérimentalement, la sensibilité à l'insuline est améliorée lors de la perfusion de BK²⁴⁴. De plus, chez la souris et le rat, il a été montré que les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ECA sur la sensibilité à l'insuline sont principalement liés aux kinines²³⁹. Les effets des récepteurs dans la régulation des processus métaboliques sont donc très différents, cependant, les deux composantes de la pathogenèse du DT2 (insulinosécrétion et insulinosensibilité) semblent être influencées par le SKK²⁴⁵.

En revanche, le déficit partiel ou complet en TK ne modifie pas le développement des anomalies métaboliques chez l'homme et dans deux modèles d'obésité et de DT2 chez la souris²⁴⁶.

1.1.3. SKK et transport de glucose

Les kinines facilitent le transport du glucose et augmentent son utilisation par les cellules. Plusieurs mécanismes sont à l'origine de ces effets d'interaction entre la BK et l'insuline : la BK augmente la libération d'insuline à partir des cellules β pancréatiques *via* l'augmentation de calcium intracellulaire en réponse à l'hyperglycémie^{240, 247} ; l'activation des RB2 favorise la consommation cellulaire de glucose en activant le transporteur de glucose 4 (GLUT-4) ; et la BK facilite la phosphorylation des récepteurs de l'insuline²³⁸.

1.1.4. SKK et DT1

Les RB1, ayant un rôle important dans le développement des maladies auto-immunes et une expression augmentée dans les tissus des patients DT1, pourraient aussi être directement impliqués dans la physiopathologie du DT1. L'administration d'un antagoniste des RB1 préviendrait d'ailleurs l'insulte pancréatique²⁴⁸. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires pour confirmer cette hypothèse⁷⁴.

1.2. SKK et physiopathologie des complications du diabète

1.2.1. SKK et néphropathie diabétique

L'expression rénale des RB1 et des RB2 est stimulée en cas de diabète²⁴⁹. Le SKK est impliqué dans le développement de la néphropathie diabétique. En effet, de nombreuses études utilisant des approches pharmacologiques et/ou des modèles de déficience génétique, en partie décrite dans la revue de Tomita *et al.*²⁵⁰, ont montré que l'inhibition du SKK aggrave la néphropathie diabétique et son activation diminue la progression des dommages rénaux^{34, 136, 237}. De plus, les RB2 ont largement été impliqués dans les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ECA dans le traitement de la néphropathie diabétique^{170, 251}. Ainsi, la majorité des travaux réalisés vont dans le sens d'un effet néphroprotecteurs des RB2. Cependant, certaines études, moins nombreuses, sont en faveur d'un rôle délétère de l'activation des RB2 dans le développement de la néphropathie diabétique²⁵². Ces variations sont en partie expliquées par la variabilité des modèles (différence dans la sensibilité à la sévérité de la néphropathie diabétique des différentes souches de souris utilisées)²⁵³.

1.2.2. SKK et rétinopathie diabétique

Les composants du SKK sont exprimés au niveau de l'œil (vaisseaux, rétine, choroïde et corps ciliaire)²⁵⁴ et sont surexprimés en cas de diabète^{255, 256}. De nombreuses études montrent que le SKK, de par ses propriétés vasodilatatrices, inflammatoires et proangiogéniques, a un effet délétère dans la pathogénèse de la rétinopathie diabétique²⁵⁷⁻²⁵⁹. En effet, les RB1 principalement, mais aussi les RB2, sont impliqués dans la progression de la rétinopathie diabétique en augmentant le stress oxydant et l'inflammation au niveau de la rétine^{254, 257, 258}.

1.2.3. SKK et cardiomyopathie diabétique

Le SKK a été impliqué dans la physiopathologie de la cardiomyopathie diabétique²⁶⁰. La déficience en RB1, par exemple, diminue la fibrose cardiaque durant le développement de la cardiomyopathie diabétique chez la souris²⁶¹. De plus, une étude, récemment réalisée dans notre laboratoire par Louis Potier, a montré que l'administration d'un agoniste spécifique des RB2 (RB2-ag) est cardioprotecteur dans un modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque chez la souris non-diabétique alors que l'administration d'un agoniste spécifique des RB1 (RB1-ag) l'est chez la souris diabétique¹⁶⁰.

1.2.4. SKK et artérite diabétique

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, de nombreuses études suggèrent que le SKK joue un rôle clé dans la néovascularisation post-ischémique chez l'animal non-diabétique (souris ou rat) et que les récepteurs des kinines semblent être des cibles thérapeutiques intéressantes en cas d'ischémie tissulaire¹⁹³. Cependant, peu d'études se sont intéressées à son rôle en cas de diabète. L'administration de gène de la TK humaine chez la souris présentant un DT1 semble toutefois augmenter la néovascularisation après une ischémie de la patte²⁶². De plus, les effets des inhibiteurs de l'ECA sur l'angiogénèse (augmentation de la densité vasculaire et de la perfusion du membre inférieur) médiés par les RB2 chez la souris non-diabétique¹⁸⁵ semblent aussi l'être chez la souris diabétique²⁶³.

1.2.5. SKK et pied du diabétique

Le pied du diabétique est une pathologie multifactorielle liée à une cicatrisation difficile, des troubles de la circulation, l'augmentation du risque infectieux et la perte de sensibilité aux traumatismes. Le SKK pourrait intervenir dans un grand nombre de ces

facteurs puisque de nombreuses études ont montré qu'il est impliqué dans les processus de cicatrisation, l'angiogenèse, la douleur et l'inflammation (*Chapitre 2*). Cependant, à ce jour, aucune étude ne s'est intéressée au rôle du SKK dans ces conséquences physiopathologiques en cas de diabète.

1.2.6. SKK et AVC en cas de diabète

A ce jour, aucune étude n'a été réalisée sur le rôle du SKK dans l'ischémie cérébrale en cas de diabète.

2. OBJECTIFS DE LA THESE

Le SKK a donc été impliqué dans le développement d'anomalies métaboliques conduisant au diabète mais aussi dans certaines de ses complications (néphropathie diabétique, rétinopathie diabétique, cardiomyopathie diabétique ou ischémie-reperfusion cardiaque). Grâce à une approche expérimentale mettant en jeu de nouveaux outils pharmacologiques (RB1-ag, RB2-ag, icatibant) et des animaux génétiquement modifiés pour le SKK (souris TK^{-/-}), l'ensemble du travail de cette thèse a eu pour objectif de mieux comprendre le rôle du SKK dans certaines complications du diabète : l'artérite diabétique, la cicatrisation diabétique et l'AVC.

Ainsi, ce travail a comporté trois études principales :

Dans la première étude, nous avons recherché les effets de nouveaux agonistes du SKK, un spécifique des RB1 (RB1-ag) et un spécifique des RB2 (RB2-ag), dans la néovascularisation post-ischémique chez la souris présentant un DT1. Nous avons aussi recherché les mécanismes, notamment inflammatoires, impliqués dans ces effets. Ce travail fait l'objet d'une publication en premier auteur dans le *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*²⁶⁴.

La deuxième étude a été consacrée au rôle du SKK dans la cicatrisation chez la souris diabétique et les différences possibles avec la souris non-diabétique. Ce travail comprend une approche pharmacologique avec l'utilisation des nouveaux agonistes RB1-ag et RB2-ag et d'un antagoniste des RB2 (icatibant) mais aussi une approche génétique avec l'utilisation de souris TK^{-/-}. Des études cellulaires notamment de prolifération et de migration des fibroblastes et des kératinocytes ont aussi été utilisées afin d'essayer de mieux comprendre les

effets observés *in vivo*. Une publication en premier auteur est en cours de révision par le journal *Clinical Science*.

Enfin, la dernière et troisième étude de cette thèse a eu pour objectif la meilleure compréhension du rôle du SKK dans les fonctions vasculaires cérébrales et notamment dans la réponse à une ischémie cérébrale, chez la souris non-diabétique et chez la souris diabétique. Ce travail a nécessité, dans un premier temps, la mise au point d'un nouveau modèle au sein du laboratoire : un modèle d'ischémie-reperfusion cérébrale. Les atteintes fonctionnelles et/ou histologiques ont été mesurées à l'aide d'échelles mises en place dans le laboratoire. Ce travail comprend une approche génétique (souris TK^{-/-}) et une approche pharmacologique (agonistes des RB1 ou des RB2). Une publication en premier auteur est en cours de préparation.

3. ETUDE 1 : ROLE DU SKK DANS L'ISCHEMIE DES MEMBRES INFERIEURS CHEZ LA SOURIS DIABETIQUE

3.1. Introduction

3.1.1. Artérite des membres inférieurs

3.1.1.1. Définition et épidémiologie

L'artérite des membres inférieurs, ou artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI), est une pathologie caractérisée par une obstruction partielle ou totale d'une ou plusieurs artères destinées aux membres inférieurs. L'AOMI se manifeste par des symptômes (gêne progressive et croissante à la marche, douleur dans le mollet puis dans la cuisse) lorsque l'apport de sang est insuffisant et l'ischémie s'installe. Sa prévalence est d'environ 5 à 10 % chez la population adulte (patients asymptomatiques non pris en compte)^{265, 266}.

3.1.1.2. Physiopathologie

L'artérite des membres inférieurs est le plus souvent d'origine athéromateuse. Les plaques d'athérome entraînent un épaissement de la paroi des vaisseaux, ce qui réduit le calibre de l'artère. Ces rétrécissements (ou sténoses) peuvent aboutir à des obstructions totales (ou thromboses) (*Figure 16*). L'arrivée de sang artériel dans les membres inférieurs diminue progressivement et une ischémie des tissus environnants s'installe²⁶⁷. La progression de l'ischémie peut être lente et silencieuse. Ainsi, la pathologie peut rester asymptomatique pendant plusieurs années. Suite à l'ischémie, l'hypoxie et l'inflammation vont déclencher des processus de revascularisation (ou néovascularisation post-ischémique) pour former des vaisseaux collatéraux qui vont assurer un afflux sanguin suffisant et limiter la zone ischémisée⁷². Lorsque ces mécanismes sont dépassés et/ou défectueux, l'ischémie tissulaire installée en aval du territoire vasculaire obstrué devient importante, entraînant l'apparition des premiers symptômes d'artérite.

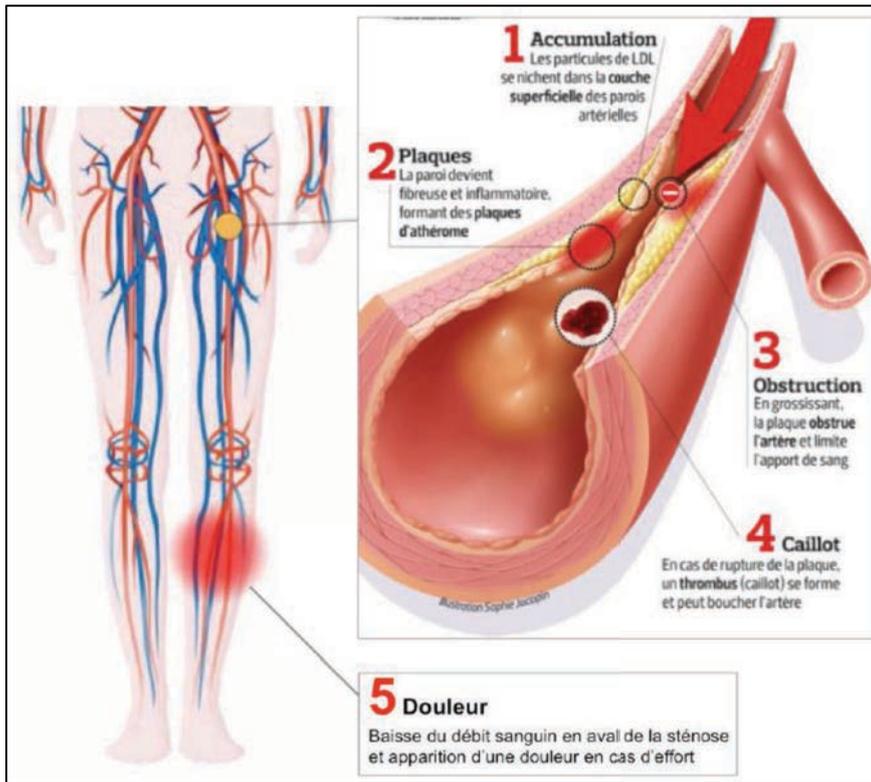


Figure 16 : Evolution de la plaque d'athérome.

LDL, lipoprotéines de faible poids moléculaire.

3.1.1.3. Conséquences physiopathologiques

La majorité des patients présente une AOMI asymptomatique²⁶⁸. Les symptômes de douleur permanente ou de gangrène sont regroupés sous le terme « ischémie critique des membres inférieurs ». L'ischémie critique touche près de 2 % des patients²⁶⁹. A ce stade, l'artériopathie est sévère et la prise en charge chirurgicale est urgente. Dans des cas plus rares, l'arrêt de l'afflux sanguin artériel peut être brutal provoquant une ischémie aiguë.

Depuis de nombreuses années, l'association entre la présence d'une AOMI et une atteinte coronarienne et/ou cérébrale est établie²⁷⁰. Ainsi, la présence d'une AOMI impose la recherche des autres localisations de maladie athéromateuse ainsi que de ses facteurs de risque.

3.1.1.4. Facteurs de risque

Les facteurs de risque de l'AOMI sont ceux favorisant le développement de l'athérosclérose et des événements cardiovasculaires associés. On retrouve donc : le tabac, l'HTA, les troubles lipidiques, l'âge, la sédentarité et l'obésité^{68, 267, 271}. De plus, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, le diabète est un facteur de risque important d'AOMI. En effet, les artérites diabétiques sont plus précoces, plus fréquentes et plus graves que celles

Au niveau de la paroi interne des vaisseaux, un dépôt par accumulation de LDL se forme (1). La paroi des vaisseaux va alors s'épaissir formant une plaque d'athérome (2). Le calibre de l'artère est rétréci puis obstrué ce qui va progressivement diminuer l'apport de sang dans le membre (3). Un caillot peut aussi se former par rupture de la plaque d'athérome et obstrué l'artère (4). Une ischémie des tissus en aval s'installe progressivement jusqu'à apparition des premiers symptômes (5).

Etude 1 : Rôle du SKK dans l'ischémie des membres inférieurs chez la souris diabétique

retrouvées chez le patient non-diabétique^{71, 272}. De plus, en cas de diabète, d'autres facteurs aggravent le pronostic de ces patients^{68, 72, 73}. Ainsi, les patients diabétiques sont plus sujets aux complications des artérites (ulcères, gangrène, etc.) et le risque d'amputation est très important chez ces patients⁶⁸. L'élaboration de thérapies alternatives ayant pour objectif de stimuler la revascularisation en augmentant la néovascularisation post-ischémique pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique dans le cas de l'artérite critique du diabétique⁷². Dans ce contexte, le SKK semble être une cible intéressante.

3.1.1.5. Angiogénèse et SKK

Le SKK a très largement été impliqué dans les processus de néovascularisation post-ischémique et le recrutement des cellules progénitrices endothéliales en conditions non-diabétiques (*Chapitre 2*). Toutefois, comme nous l'avons vu précédemment peu d'études se sont intéressées à son rôle en cas de diabète.

3.1.2. Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude a été de rechercher les effets des nouveaux agonistes spécifiques des RB1 (RB1-ag) ou des RB2 (RB2-ag), proposés par le Pr. Gobeil dans un modèle d'ischémie de la patte chez la souris présentant un DT1 (*Annexe 1 : Matériels et méthodes de l'étude 1*) et les mécanismes associés. En effet, ces agonistes puissants, sélectifs et résistants à la dégradation peptidique représentent une stratégie thérapeutique intéressante dans la pathologie de l'artérite critique du diabétique.

3.2. Article : Kinin receptor antagonism restores hindlimb postischemic neovascularization capacity in diabetic mice

Kinin Receptor Agonism Restores Hindlimb Postischemic Neovascularization Capacity in Diabetic Mice^{SI}

Dorinne Desposito, Louis Potier, Catherine Chollet, Fernand Gobeil Jr., Ronan Roussel, Francois Alhenc-Gelas, Nadine Bouby, and Ludovic Waeckel

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1138, Université Paris Descartes, and Université Pierre et Marie Curie, Paris, France (D.D., L.P., C.C., R.R., F.A.-G., N.B., L.W.); Université Paris Diderot, and Diabétologie-Endocrinologie-Nutrition, DHU FIRE, Hôpital Bichat, AP-HP, Paris, France (L.P., R.R.); and Department of Pharmacology, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada (F.G.)

Received August 8, 2014; accepted November 7, 2014

ABSTRACT

Limb ischemia is a major complication of thromboembolic diseases. Diabetes worsens prognosis by impairing neovascularization. Genetic or pharmacological inactivation of the kallikrein-kinin system aggravates limb ischemia in nondiabetic animals, whereas angiotensin I-converting enzyme/kininase II inhibition improves outcome. The role of kinins in limb ischemia in the setting of diabetes is not documented. We assessed whether selective activation of kinin receptors by pharmacological agonists can influence neovascularization in diabetic mice with limb ischemia and have a therapeutic effect. Selective pseudopeptide kinin B1 or B2 receptor agonists resistant to peptidase action were administered by osmotic minipumps at a nonhypotensive dosage for 14 days after unilateral femoral artery ligation in mice previously rendered diabetic by streptozotocin. Comparison was made with ligatured, nonagonist-treated nondiabetic and diabetic mice. Diabetes reduced neovascularization, assessed by

microangiography and histologic capillary density analysis, by roughly 40%. B1 receptor agonist or B2 receptor agonist similarly restored neovascularization in diabetic mice. Neovascularization in agonist-treated diabetic mice was indistinguishable from nondiabetic mice. Both treatments restored blood flow in the ischemic hindfoot, measured by laser-Doppler perfusion imaging. Macrophage infiltration increased 3-fold in the ischemic gastrocnemius muscle during B1 receptor agonist or B2 receptor agonist treatment, and vascular endothelial growth factor (VEGF) level increased 2-fold. Both treatments increased, by 50–100%, circulating CD45/CD11b-positive monocytes and CD34⁺/VEGFR2⁺ progenitor cells. Thus, selective pharmacological activation of B1 or B2 kinin receptor overcomes the effect of diabetes on postischemic neovascularization and restores tissue perfusion through monocyte/macrophage mobilization. Kinin receptors are potential therapeutic targets in limb ischemia in diabetes.

Introduction

Limb ischemia secondary to arterial obstruction is a major cause of morbidity and premature mortality, especially in subjects with diabetes mellitus. Development of collateral blood vessels restores, to some extent, distal blood flow, limits ischemic damage,

and is a critical factor for recovery. Reduced ability to develop new vessels contributes to enhanced severity of limb ischemia in diabetes (Johannesson et al., 2009). Several molecular and cellular defects are involved in impairment of neovascularization development in diabetes. These defects include reduced monocyte mobilization and altered vascular endothelial growth factor (VEGF) synthesis and signaling (Rivard et al., 1999; Waltenberger et al., 2000). Also, the proangiogenic capacity of bone marrow-derived progenitor cells has been shown to be impaired in diabetes, contributing to the defect in neovascularization (Tepper et al., 2002; Tamarat et al., 2004). Arterial desobstruction, the most straightforward treatment for restoring limb perfusion and suppressing ischemia, is not always feasible, especially in the presence of multiple and/or distal obstructive lesions. Pharmacological interventions promoting neovascularization and restoring distal blood flow are needed for improving prognosis of limb ischemia, especially in diabetes. Here, we show that kinin receptors can be targeted for this purpose.

Kinins are potent vascular endothelium activators, triggering release of endothelial mediators promoting smooth muscle

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris Descartes University, Pierre et Marie Curie University, the Société Francophone du Diabète, and the European Union 6 and 7 framework programs. R.R. was a consultant for/recipient of research grants from Sanofi-Aventis, MSD Chibret, Servier, Roche, Eli Lilly, AstraZeneca, Bristol-Myers Squibb, Novartis, Novo Nordisk, and LifeScan; F.A.-G. was a recipient of a research grant from Bristol-Myers Squibb.

This study was previously presented at the following abstract: Desposito D, Potier L, Chollet C, Gobeil F, Roussel R, Bouby N, Alhenc-Gelas F, and Waeckel L (2014) Selective pharmacological kinin receptor activation restores postischemic neovascularization and hindlimb perfusion in diabetic mice. *2014 High Blood Pressure Research Conference*; 2014 Sept 9–12; San Francisco, CA. American Heart Association, Dallas, TX.

Laboratory of origin: Pathophysiology and therapeutics of vascular and renal diseases related to diabetes and nutrition, Cordeliers Research Center, Paris, France.

dx.doi.org/10.1124/jpet.114.219196.

^{SI} This article has supplemental material available at jpet.aspetjournals.org.

ABBREVIATIONS: ACE, angiotensin I-converting enzyme/kininase II; BM-MNC, bone marrow mononuclear cell; B1R, B1 bradykinin receptor; B2R, B2 bradykinin receptor; EPC, endothelial progenitor cell; FITC, fluorescein isothiocyanate; KKS, kallikrein-kinin system; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor 2.

relaxation, fibrinolysis, and inhibition of platelet aggregation (Furchgott and Vanhoutte, 1989; Brown et al., 2000). Kinins also activate progenitor cells with neovessel development capacity (Krankel et al., 2008; Spinetti et al., 2011). Kinins are synthesized in several organs, including arteries (Bergaya et al., 2001; Meneton et al., 2001). The peptides are released from precursors, kininogens, by kallikreins and are mainly inactivated in circulation by angiotensin I-converting enzyme (ACE/kininase II). Kinins exert their biologic effects by stimulating two distinct G protein-coupled receptors, the B1 bradykinin receptor (B1R) and the B2 bradykinin receptor (B2R). B2Rs are constitutively synthesized in tissues and mediate most biologic effects of kinins. B1Rs are induced in pathologic situations, such as ischemia, inflammation, or diabetes. The role of B1R in ischemic diseases and diabetes, however, is unclear (Couture et al., 2014).

Studies have suggested a role for the kallikrein-kinin system (KKS) in postischemic neovascularization in an experimental model in nondiabetic animals. Indeed, neovascularization development after femoral artery occlusion was severely reduced in tissue kallikrein-deficient mice (Stone et al., 2009; Spinetti et al., 2011). Conversely, local delivery of human tissue kallikrein gene was reported to accelerate angiogenesis in a model of hindlimb ischemia, an effect that was prevented by pharmacological or genetic inactivation of B1R or B2R (Emanuelli et al., 2001a,b, 2002; Emanuelli and Madeddu, 2002). These experimental studies suggest a potential therapeutic value of KKS activation in hindlimb ischemia. Interestingly, it has been shown that the proangiogenic effect of ACE inhibitors in hindlimb ischemia was mediated, in large part, by kinin receptor signaling (Silvestre et al., 2001; Li et al., 2008). Although tissue kallikrein concentration was increased in femoral venous effluent of patients with arterial obstruction (Porcu et al., 2002), kallikrein activity level is low in arteries and kinin production and accumulation are slow, even after ACE inhibition (Bergaya et al., 2001; Alhenc-Gelas et al., 2011). Developing new pharmacological interventions for KKS activation has potential therapeutic interest. Kallikrein cannot be easily targeted for pharmacological activation, but recently, potent selective and long-acting B1R and B2R agonists have been synthesized and their therapeutic efficacy has been documented in experimental cardiac ischemia (Belanger et al., 2009; Cote et al., 2009; Potier et al., 2013).

The aim of the present study was to evaluate the effects of B1R and B2R agonists in peripheral ischemia in diabetic mice. Here, we show that selective activation of kinin receptors by pharmacological agonists enhances neovascularization and restores blood flow after femoral artery occlusion in diabetic mice.

Materials and Methods

Animals and Treatments

Ten-week-old male C57BL/6J mice (Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) were used. Diabetes was induced by five daily intraperitoneal injections of streptozotocin (50 mg/kg body weight in 0.05 mol/l sodium citrate, pH 4.5) (Bodin et al., 2009). Five weeks after the first injection, mice with established diabetes (fasting glycemia ≥ 250 mg/dl) underwent surgery for inducing unilateral hindlimb ischemia. Animals were anesthetized by isoflurane inhalation, and ischemia was induced by ligation of the right femoral artery as previously described (Silvestre et al., 2000; Waeckel et al., 2005). Immediately after inducing ischemia, mice were implanted

with osmotic minipumps (Alzet, model 1002; Charles River Laboratories) delivering either the selective B1R agonist SarLys[Hyp3, Igl5, DPhe8] desArg9-bradykinin (Cote et al., 2009) or the selective B2R agonist [Hyp(3),Thi(5),(N)Chg(7),Thi(8)]-bradykinin (Belanger et al., 2009; Savard et al., 2013) at a nonhypotensive dose of 720 nmol/kg·day⁻¹ or vehicle (saline). An additional, nondiabetic group ($n = 10$) underwent arterial femoral ligation and received saline infusion via Alzet minipump.

A first series of mice ($n = 10$ /group) was studied for 14 days after femoral ligation for neovascularization development. A second series ($n = 10$ /group) submitted to ischemia with or without treatment was studied at 3 and 7 days for blood and bone marrow phenotypes ($n = 5$ -7/group), as described later.

All mice were housed with a 12-hour light/dark cycle, and had free access to food and water. All experimental procedures were approved by the Charles Darwin Ethics Committee for Animal Experimentation (Pierre and Marie Curie University, Paris, France) and were performed in accordance with European legislation for the care and use of laboratory animals (L358-86/609/EEC).

Blood Pressure Measurement

As the B2R agonist dose dependently decreases blood pressure during acute administration in mice (Potier et al., 2013), we assessed the blood pressure effect of chronic B2R agonist treatment in dedicated groups of mice. In brief, four groups of 10-week-old male C57BL/6J mice, diabetic or not ($n = 10$ /group; Charles River Laboratories), were treated with 720 nmol/kg·day⁻¹ or vehicle (saline) for 5 weeks via Alzet minipump. Systolic blood pressure was measured at 3 and 5 weeks by tail-cuff plethysmography in trained animals, as previously described (Meneton et al., 2001).

Quantification of Neovascularization

Postischemic neovascularization was evaluated by three different and complementary methods, as previously described (Silvestre et al., 2000; Waeckel et al., 2005).

Microangiography. Blood vessel density was evaluated by high-definition microangiography (Trophy X-Ray system; Trophy Radiologie, Vincennes, France) 14 days after artery ligation. Mice were anesthetized (ketamine 60 mg/kg, xylazine 15 mg/kg) and a polyethylene catheter was inserted through laparotomy into the abdominal aorta for injecting contrast medium (barium sulfate, 1 g/ml). Images (two per animal) were acquired by a high-definition digital X-ray transducer and assembled to obtain a complete view of hindlimbs. Blood vessel density was expressed as a microangiographic score: ratio of the percentage of pixels per image occupied by blood vessels in the quantification area in the ischemic and nonischemic hindlimb.

Capillary Density Analysis. Microvessel density was assessed by histologic analysis at 14 days after sacrifice. Ischemic and nonischemic gastrocnemius muscles were dissected and frozen in isopentane solution cooled in liquid nitrogen. Cryosections (7 μ m) were incubated for 30 minutes in a solution of phosphate-buffered saline containing 5% bovine serum albumin at room temperature, and then 30 minutes with a rabbit polyclonal antibody directed against total fibronectin (dilution 1:50; Abcam, Paris, France) (Napoli et al., 2005). Capillaries were revealed with a fluorescent fluorescein isothiocyanate (FITC) antirabbit antibody (dilution 1:10; Abcam), and capillary density (capillary object/field) was determined using Leica V03 software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Laser Doppler Perfusion Imaging. Cutaneous foot perfusion was measured in anesthetized (1.5% isoflurane inhaling) mice by laser Doppler perfusion imaging (Moor Instruments, Millwey, UK) before (day 0) and at days 7 and 14 after artery ligation, as previously described (Silvestre et al., 2001; Mallat et al., 2002). In brief, mice were anesthetized by isoflurane inhalation and limbs were depilated. Mice were then placed on a heating plate at 37°C. Blood flow was measured in the foot of ischemic and nonischemic limbs. Image was quantified using the associated software. Results are presented using a color scale: from low blood flow in blue to high blood flow in red.

For the three methods of quantification of neovascularization, results are expressed as a ratio of signal value for ischemic limb to signal value for nonischemic limb. This allows each animal to be its own control and minimizes experimental variability.

Analysis of Circulating Monocytes and Proangiogenic Progenitor Cells by Flow Cytometry

The effect of agonist treatment on CD45/CD11b-positive cells and $\text{lin}^-/\text{Sca1}^+/\text{cKit}^+$ progenitor cell mobilization in response to tissue ischemia was assessed 7 days after artery ligation (Asahara et al., 1997; Dimmeler, 2010) in dedicated groups of mice treated as described earlier. Briefly, blood was withdrawn from the tail, and low-density mononuclear cells were studied by flow cytometry after immunostaining, as previously described (Tamarat et al., 2004; Waeckel et al., 2006). For CD45/CD11b, monocyte cells were incubated with antibody directed against CD45 (1:100; eBioscience, Paris, France) and CD11b (0.25 $\mu\text{g}/\text{million}$ cells; BioLegend, Saint Quentin Yvelines, France) for 30 minutes at 4°C. Number of CD45/CD11b-positive cells was analyzed using FlowJo software (FlowJo, LLC, Ashland, OR). For $\text{lin}^-/\text{Sca1}^+/\text{cKit}^+$ progenitors, mononuclear cells were incubated with antibodies directed against mouse hematopoietic lineage (1:100; eBioscience), Ska1 (1:100; eBioscience), and cKit (1:100; eBioscience). Density of double-positive cells among lineage-negative cells was evaluated by flow cytometry using FlowJo software.

In these mice, circulating CD34⁺/VEGFR2⁺ cells were also studied at 3 days after artery ligation. Low-density mononuclear cells were incubated with antibody directed against CD34 (1:100; eBioscience) and VEGFR2 (1:100; eBioscience), and double-positive cells were analyzed using FlowJo software.

Isolation of Bone Marrow Mononuclear Cells and Endothelial Progenitor Cell Differentiation Assay

Bone marrow cells were obtained by flushing tibias and femurs of nondiabetic and diabetic mice treated or not treated with agonists for 7 days. Bone marrow mononuclear cells (BM-MNCs) were isolated by density gradient centrifugation with Ficoll and immediately plated on 35-mm cell culture dishes (5×10^6 BM-MNCs/well) coated with 0.1% rat plasma vitronectin–0.1% gelatin (Sigma-Aldrich, Lyon, France). The cells were maintained for 4 days in endothelial basal medium (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK), and endothelial progenitor cell (EPC) differentiation was evaluated as previously described (Tamarat et al., 2004; Waeckel et al., 2006). This assay measures accumulation of endothelial marker-bearing cells (Fadini et al., 2012). In brief, nonadherent cells were removed and adherent cells were stained with DiI-AcLDL and FITC-BS-1 lectin. Cells were incubated for 1 hour at 37°C with DiI-AcLDL (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France) in culture medium. Cells were then washed three times with phosphate-buffered saline and fixed with 2% paraformaldehyde and incubated with FITC-labeled BS-1 lectin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich). Double-positive cells were considered as EPCs and counted per well. The ex vivo effect of agonists on BM-MNC differentiation was also studied. BM-MNCs were isolated from nondiabetic mice and plated in the absence or presence of B1R agonist (10^{-6} and 10^{-7} mol/l) or B2R agonist (10^{-6} and 10^{-7} mol/l) for 4 days. The number of EPCs was quantified as described earlier.

Evaluation of Macrophage Infiltration in Ischemic Muscle

Frozen tissue sections (7 μm) of gastrocnemius muscle sampled at 14 days after arterial occlusion were incubated with rat monoclonal antibody directed against Mac-3 (1:50; BD Pharmingen, Le Pont-de-Claix, France) to identify and quantify infiltrated macrophages. Immunostains were visualized using avidin-biotin horseradish peroxidase visualization systems (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Les Ulis Cedex B, France), and Mac-3-positive cells were counted using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD) in four randomly chosen fields.

Quantification of Monocyte Chemoattractant Protein 1 mRNA and Protein in Muscle and Blood

Chemokine monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) level is a critical, rate-limiting factor for monocyte/macrophage infiltration in ischemic tissue (Ito et al., 1997a; Hong et al., 2005). Total RNA was isolated from the gastrocnemius muscle using TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise Cedex, France) and reverse-transcribed with superscript II reverse transcriptase as previously described (Bodin et al., 2009). The cDNAs were amplified and quantified using TaqMan Universal Master Mix and Assays-on-Demand Gene Expression Probes for genes of MCP-1 in an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, France). Each sample was tested in triplicate. Data were normalized to 18S mRNA. Changes in the target gene were calculated by the $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ comparative method for each sample (Livak and Schmittgen, 2001).

Plasma MCP-1 concentration was determined in blood sampled at 7 days using a mouse MCP-1 enzyme-linked immunosorbent assay kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Measurement of VEGF Protein Level in Muscle

Fragments of gastrocnemius muscle were homogenized in 200 μl of radioimmunoprecipitation assay buffer containing protease inhibitors (cOmplete; Roche, Mannheim, Germany). Protein concentration was determined, and 20 μg of protein was separated by SDS-PAGE and then blotted onto a nitrocellulose sheet. Membranes were probed with antibodies directed against VEGF-A (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) and beta-actin (1:10,000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Stained proteins were detected by chemiluminescent reaction (ECL+ kit; Amersham Biosciences, Glattbrugg, Switzerland). Signals were analyzed in ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, Vélizy-Villacoublay, France) and quantified using Multi Gauge software 2.0 (FujiFilm, Tokyo, Japan). Results for VEGF were normalized to actin and expressed as the ratio of ischemic to nonischemic hindlimb.

Statistical Analysis

Results were expressed as the mean \pm S.E.M. Statistical difference was analyzed using one-way or two-way analysis of variance for comparing effects of diabetes and treatment in mice. Analysis of variance was followed by an ad-hoc multiple comparison Tukey test. $P < 0.05$ was considered as significant.

Results

Physiologic Data. Body weight was not different among experimental groups. Glycemia was significantly higher in diabetic mice when compared with nondiabetic mice (Table 1). Treatment with B1R or B2R agonist did not alter fasting glycemia in diabetic mice.

Effect of B2R Agonist Treatment on Blood Pressure. Chronic administration of B2R agonist had no hypotensive effect in nondiabetic or diabetic mice. Systolic blood pressure measured by tail-cuff plethysmography after 3 and 5 weeks of treatment with 720 nmol/kg-day⁻¹ of B2R agonist was not

TABLE 1

Baseline body weight and fasting plasma glucose of experimental groups

Data are the baseline body weight and fasting plasma glucose in nondiabetic mice (NonDiab), diabetic mice (Diab), and diabetic mice treated with B1R agonist (Diab + B1R-ag) or B2R agonist (Diab + B2R-ag). Values are the mean \pm S.E.M. ($n = 20$ /group).

	NonDiab	Diab	Diab + B1R-ag	Diab + B2R-ag
Body weight (g)	27 \pm 0.4	26 \pm 0.8	25 \pm 0.8	25 \pm 1.1
Blood glucose (mg/dl)	165 \pm 27	388 \pm 26**	385 \pm 25**	387 \pm 24**

** $P < 0.01$ versus NonDiab mice.

influenced by diabetes or agonist treatment (Fig. 1). In addition, 6 days of administration of the B2R agonist at different doses to diabetic and nondiabetic mice had no effect on either systolic or diastolic blood pressure, measured through a catheter inserted into the carotid artery in anesthetized mice (data not shown).

Effect of Diabetes and B1R or B2R Agonist Treatment on Postischemic Neovascularization and Blood Flow. Hindlimb vessel density assessed by microangiography was reduced by roughly 40% in diabetic mice treated with vehicle when compared with nondiabetic mice (ischemic/nonischemic hindlimb score ratio 0.60 ± 0.06 versus 0.99 ± 0.13 , $P < 0.05$). In diabetic mice, B1R or B2R agonist treatment increased vessel density in the ischemic hindlimb (both $P < 0.01$ compared with vehicle-treated diabetic mice). Both treatments restored the angiographic score to values similar to nondiabetic animals (Fig. 2A).

Microangiographic data were confirmed by capillary density analysis (Fig. 2B). In diabetic mice, the ischemic/nonischemic hindlimb capillary density ratio was decreased by roughly 50% in comparison with nondiabetic mice ($P < 0.05$). In diabetic mice, B1R or B2R agonist treatment increased capillary density in the ischemic hindlimb 2.5- and 2.6-fold, respectively ($P < 0.01$ compared with vehicle-treated diabetic mice), back to values observed in nondiabetic animals.

Effect on vessel density was associated with changes in tissue perfusion (Fig. 2C). At day 7, blood flow was reduced in all occluded groups by comparison with day 0, as expected, but flow remained higher in B1R agonist-treated diabetic mice than in other diabetic groups ($P < 0.05$ versus vehicle-treated

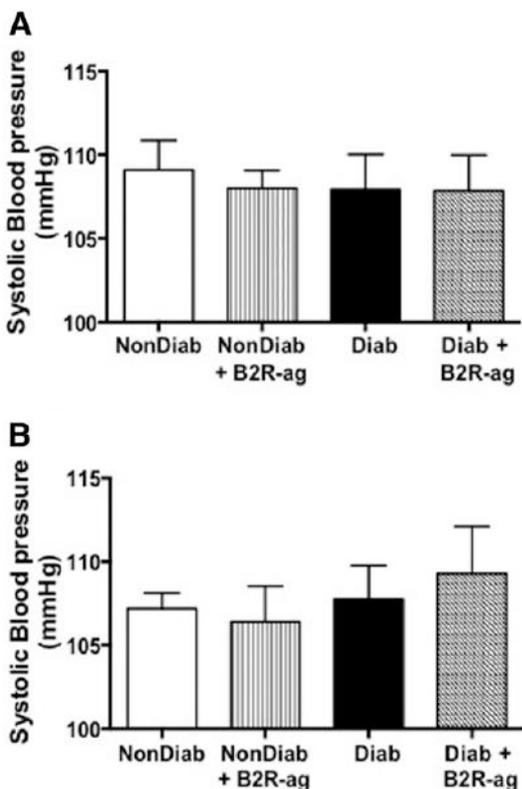


Fig. 1. Systolic blood pressure in nondiabetic (NonDiab) and diabetic (Diab) mice after 3 weeks (A) or 5 weeks (B) of treatment with $720 \text{ nmol/kg-day}^{-1}$ of B2 receptor agonist or saline. Values are the mean \pm S.E.M. ($n = 10/\text{group}$); effect of diabetes or treatment = not significant. B2R-ag, B2R agonist.

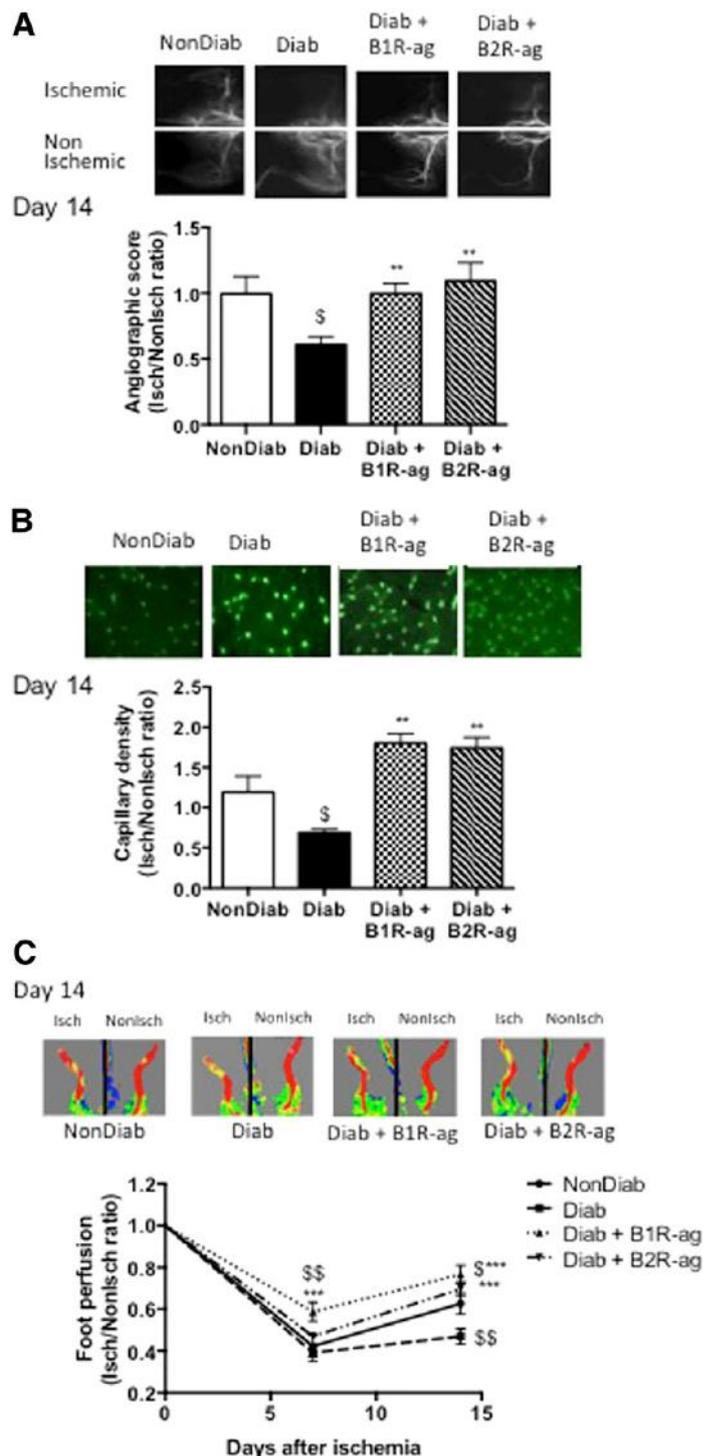


Fig. 2. Representative illustrations and quantitative evaluation of data for microangiography (A) and capillary density analysis (B) at day 14, and for foot perfusion measurement (C) at day 7 and day 14 in ligatured nondiabetic mice (NonDiab), vehicle-treated diabetic mice (Diab), and diabetic mice treated with $720 \text{ nmol/kg-day}^{-1}$ of B1R agonist (Diab + B1R-ag) or $720 \text{ nmol/kg-day}^{-1}$ of B2R agonist (Diab + B2R-ag). Graphs show means \pm S.E.M. of ratio of ischemic to nonischemic hindlimb values (Isch/Nonisch ratio) for angiographic score (A), capillary density (B), and blood flow (C). $n = 10/\text{group}$; $^{\$}P < 0.05$, $^{\$\$}P < 0.01$ versus NonDiab mice; $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ versus Diab mice. Scale bar, $100 \mu\text{m}$. Color scale for blood flow: blue, low; yellow, intermediate; red, high.

diabetic mice). At day 14, foot perfusion remained low in vehicle-treated diabetic mice ($P < 0.05$ compared with nondiabetic mice). Treatment with either B1R or B2R agonist increased blood flow ($P < 0.001$ compared with vehicle-treated

diabetic mice), restoring foot perfusion to values similar to or slightly higher than nondiabetic animals. There was no significant difference between effect of B1R and B2R agonist treatment on neovascularization.

Effects of Diabetes and Agonist Treatment on Progenitor Cell Mobilization and Differentiation. No significant effect of diabetes and B1R or B2R agonist treatment on circulating $\text{lin}^-/\text{Sca1}^+/\text{cKit}^+$ was observed (Supplemental Fig. 1). Furthermore, in bone marrow from treated and nontreated mice, B1R or B2R agonist treatment had no effect on number of EPCs derived from BM-MNCs when compared with vehicle-treated diabetic mice (Supplemental Fig. 1). Additionally, in vitro, BM-MNC differentiation into EPC was unaffected when BM-MNCs isolated from nontreated diabetic mice were cultured for 4 days in the presence of B1R agonist (10^{-6} and 10^{-7} mol·l $^{-1}$) or B2R agonist (10^{-6} and 10^{-7} mol·l $^{-1}$) (data not shown).

In contrast, the number of circulating $\text{CD34}^+/\text{VEGFR2}^+$ cells was significantly decreased in diabetic mice when compared with nondiabetic mice ($0.08 \pm 0.01\%$ versus $0.18 \pm 0.01\%$, $P < 0.05$). Three days of treatment with either B1R or B2R agonist increased circulating $\text{CD34}^+/\text{VEGFR2}^+$ mononuclear cell levels in diabetic mice back to values observed in nondiabetic mice (B1R agonist: $0.20 \pm 0.01\%$; B2R: $0.17 \pm 0.03\%$; both $P < 0.05$ versus vehicle-treated diabetic mice) (Fig. 3).

Effects of Diabetes and Agonist Treatment on Circulating Monocyte CD45/CD11b-Positive Cells. Diabetes had no detectable effect on circulating CD45/CD11b-positive cells evaluated 7 days after femoral ligation. Treatment with either B1R or B2R agonist increased circulating CD45/CD11b-positive cells by 30–50% by comparison with vehicle-treated diabetic mice (B1R agonist: $14.2 \pm 0.6\%$, $P < 0.05$; B2R agonist: $15.9 \pm 0.8\%$, $P < 0.01$ versus vehicle-treated: $10.7 \pm 0.5\%$) (Fig. 4).

Effect of Diabetes and Agonist Treatment on Macrophage Infiltration in Ischemic Tissue. Fourteen days after surgery, the number of Mac-3–positive cells was reduced by 62% in the gastrocnemius muscle of vehicle-treated diabetic mice, compared with nondiabetic mice ($P < 0.001$; Fig. 5). B1R and B2R agonist treatments induced a more than 3-fold increase in macrophage infiltration in diabetic mice compared with vehicle-treated diabetic mice ($P < 0.001$).

Effects of Diabetes and Agonist Treatment on Tissue VEGF Protein Level. VEGF protein level was markedly reduced (–62%) in ischemic muscle of vehicle-treated diabetic mice compared with nondiabetic mice ($P < 0.05$; Fig. 6). B1R or B2R agonist treatment restored VEGF protein levels in muscle to levels similar to nondiabetic animals.

Effect of Diabetes and B2R Agonist Treatment on MCP-1 mRNA and Protein Level. In nondiabetic mice, ischemia was associated with a 2.8-fold increase in MCP-1 mRNA level in gastrocnemius muscle when compared with nonischemic nondiabetic mice ($P < 0.05$), but this effect was abrogated in vehicle-treated diabetic mice (Fig. 7A). In diabetic mice, B1R agonist treatment had no effect on MCP-1 mRNA levels. By contrast, B2R agonist treatment increased MCP-1 mRNA levels in ischemic muscle 6.6-fold ($P < 0.05$) when compared with contralateral nonischemic muscle, and 4.4-fold ($P < 0.05$) when compared with ischemic muscle from vehicle-treated diabetic mice. B2R agonist, but not B1R agonist, moderately but significantly increased plasma MCP-1 protein levels ($P < 0.01$, compared with vehicle-treated diabetic mice; Fig. 7B).

Discussion

The present study shows that selective kinin receptor activation by potent pharmacological agonists reverses the defect

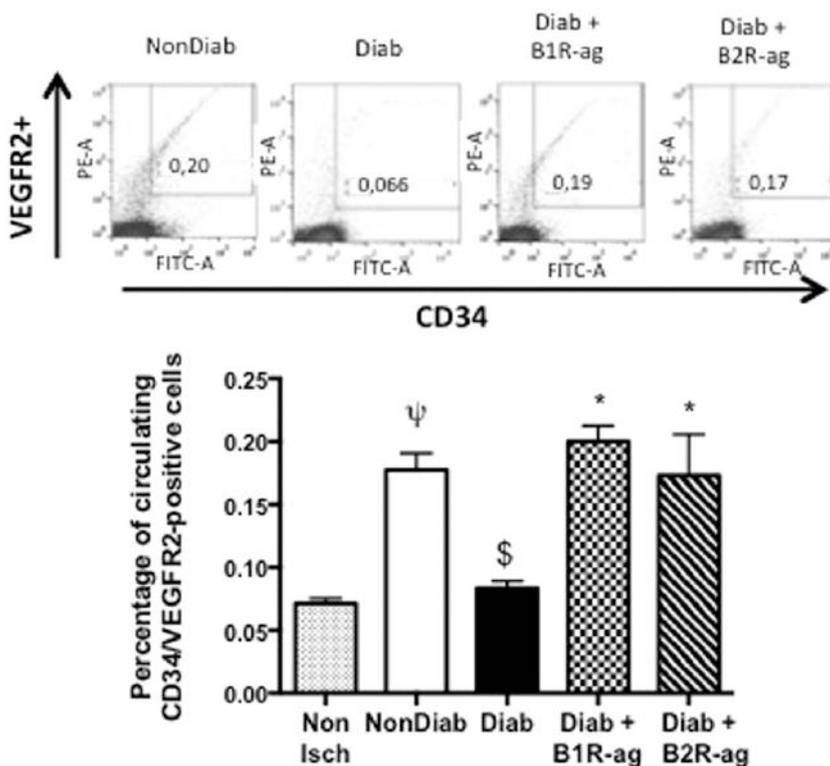


Fig. 3. Circulating $\text{CD34}^+/\text{VEGFR2}^+$ cells quantified by flow cytometry in ligatured nondiabetic mice (NonDiab), vehicle-treated diabetic mice (Diab), and diabetic mice treated with $720 \text{ nmol/kg}\cdot\text{day}^{-1}$ of B1R agonist (Diab + B1R-ag) or $720 \text{ nmol/kg}\cdot\text{day}^{-1}$ of B2R agonist (Diab + B2R-ag) for 3 days. The top row shows flow cytometry results for FITC-A and PE-A staining of cells in representative experiments. The percentage of cells expressing both markers is displayed in the boxes drawn in the upper-right quadrant, where threshold PE-A is 10 on the vertical axis and FITC-A is 10 on the horizontal axis in each panel. The bar graph shows the mean \pm S.E.M. ($n = 6$ mice/group); $^{\psi}P < 0.05$ versus nonischemic (NonIsch); $^{\S}P < 0.05$ versus NonDiab mice; $^*P < 0.05$ versus Diab mice. PE, phycoerythrin.

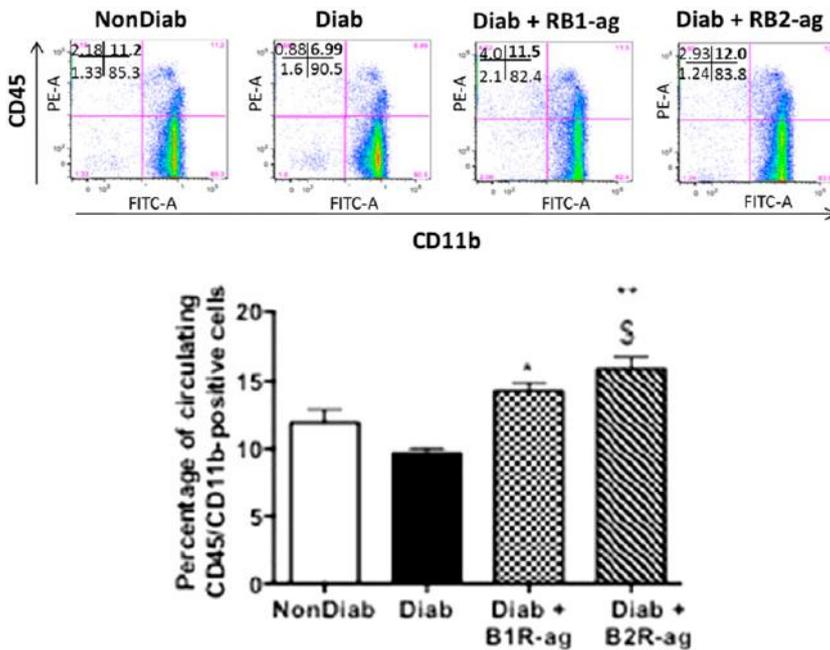


Fig. 4. Circulating CD45/CD11b-positive monocyte cells quantified by flow cytometry in ligatured nondiabetic mice (NonDiab), vehicle-treated diabetic mice (Diab), and diabetic mice treated with $720 \text{ nmol/kg}\cdot\text{day}^{-1}$ of B1R agonist (Diab + B1R-ag) or $720 \text{ nmol/kg}\cdot\text{day}^{-1}$ of B2R agonist (Diab + B2R-ag) for 3 days. The top row shows flow cytometry results for FITC-A and PE-A staining of cells in representative experiments. The percentage of cells expressing both markers is displayed in the boxes drawn in the upper-right quadrant, where threshold PE-A is 10^3 on the vertical axis and FITC-A is 10^3 on the horizontal axis in each panel. The bar graph shows the mean \pm S.E.M. ($n = 6$ mice/group); $^{\$}P < 0.05$ versus NonDiab mice; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ versus Diab mice. PE, phycoerythrin.

in postischemic neovascularization observed in diabetic mice. Pharmacological activation of either the B1 or B2 receptor has a therapeutic effect on hindlimb ischemia, restoring blood flow to ischemic tissues. These observations demonstrate, using a gain-of-function approach and new, specific pharmacological tools, the strong proangiogenic effect of KKS activation in hindlimb ischemia and the role of the two kinin receptor subtypes. The data further suggest that monocyte/macrophage mobilization and activation is involved in restoration of postischemic neovascularization capacity by kinin receptor agonists in diabetic mice.

Diabetes impairs postischemic neovascularization development after arterial obstruction, resulting in enhanced severity of leg ischemia in diabetic patients. Similarly, in the experimental setting, recovery from hindlimb ischemia induced by femoral artery ligation in mice or rats occurs quickly, in less than 2 weeks, in nondiabetic animals through neovessel formation, but in diabetic animals the neovascularization process is severely hampered, and recovery is delayed. A number of studies, focused on kallikrein or B2R, have suggested a role for KKS in postischemic neovascularization in nondiabetic mice or rats (Silvestre et al., 2001; Emanuelli et al., 2002; Li et al., 2008; Smith et al., 2008; Stone et al., 2009). However, whether KKS activation can influence the defective postischemic neovascularization process in diabetic animals needed to be documented. Prophylactic gene therapy with human tissue kallikrein has been reported to ameliorate postischemic recovery in diabetic mice (Emanuelli et al., 2004). In the present study, we show that 2-week treatment with selective, pharmacological B1R or B2R agonists started after femoral artery occlusion is sufficient for restoring normal postischemic neovascularization in mice with established diabetes. The effect of B2R agonist is consistent with a previous observation of a lack of proangiogenic effect of ACE inhibition in B2R-deficient diabetic mice (Ebrahimian et al., 2005). The role of B1R in postischemic neovascularization in diabetic animals has not been documented before, despite induction of this receptor by ischemia and hyperglycemia.

We found that B1R and B2R activation have a similar beneficial effect in hindlimb ischemia in diabetic mice. This is

in contrast with cardiac ischemia where B1R, but not B2R, activation reduces ischemia-reperfusion damage in diabetic mice (Potier et al., 2013). These findings indicate that, although diabetes suppresses B2R signaling in the heart, it does not alter B2R function in proangiogenic cells.

We studied cellular pathways involved in neovascularization development and known to be defective in diabetes to address mechanism of restoration of neovascularization by kinin receptor agonists. Postischemic neovascularization is

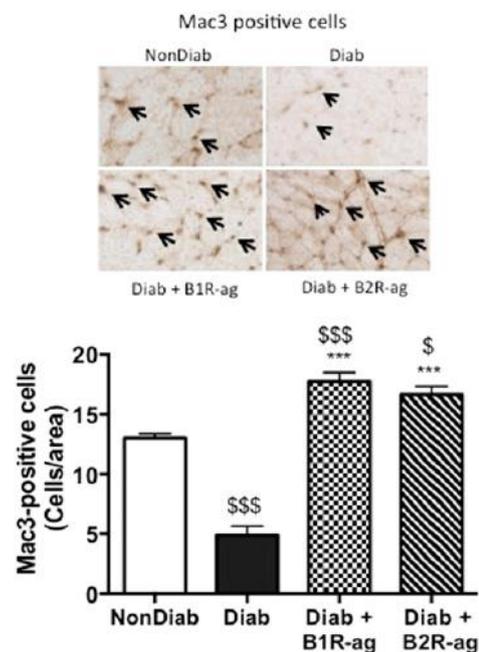


Fig. 5. Representative photomicrographs and quantitative evaluation of Mac3-positive cells in ischemic gastrocnemius muscle of nondiabetic mice (NonDiab), vehicle-treated diabetic mice (Diab), and diabetic mice treated with $720 \text{ nmol/kg}\cdot\text{day}^{-1}$ of B1R agonist (Diab + B1R-ag) or $720 \text{ nmol/kg}\cdot\text{day}^{-1}$ of B2R agonist (Diab + B2R-ag) for 14 days. Arrows represent positive staining for Mac-3. Values are the mean \pm S.E.M. ($n = 5$ /group); $^{\$}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ versus NonDiab mice; $^{***}P < 0.001$ versus Diab mice. Scale bar represents $100 \mu\text{m}$.

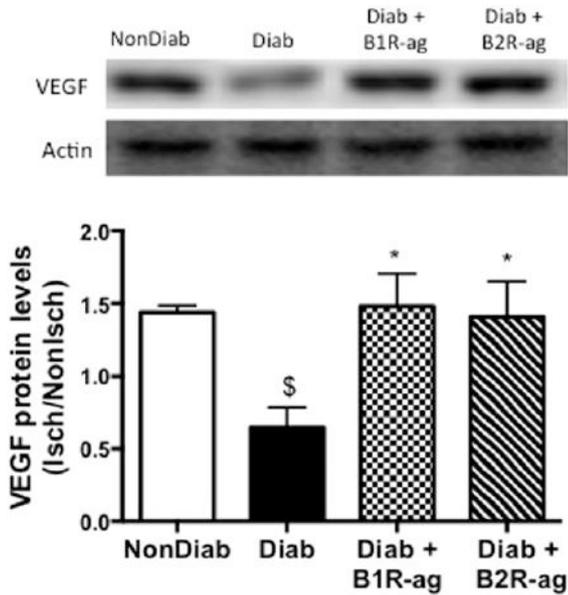


Fig. 6. Representative blots and quantitative evaluation of VEGF protein level in ischemic gastrocnemius muscle of nondiabetic mice (NonDiab), vehicle-treated diabetic mice (Diab), and diabetic mice treated with 720 nmol/kg-day⁻¹ of B1R agonist (Diab + B1R-ag) or 720 nmol/kg-day⁻¹ of B2R agonist (Diab + B2R-ag) for 14 days. Values are the mean \pm S.E.M. of ischemic to nonischemic muscle ratio. VEGF level is normalized to actin level ($n = 7$ /group). [§] $P < 0.05$ versus NonDiab mice; ^{*} $P < 0.05$ versus Diab mice. Isch/NonIsch, ischemic/nonischemic.

not solely the result of proliferation of endothelial cells, but also involves mobilization of progenitor cells and vasculogenesis. Decreased number of circulating progenitor cells is observed in human diabetes, and circulating progenitor level is negatively related to glycemic control (Yue et al., 2011). Consistent with these human studies, we observed a decrease in number of circulating CD34⁺/VEGFR2⁺ cells in diabetic mice compared with nondiabetic mice. Treatment with either B1R or B2R agonist counteracted the effect of diabetes and increased CD34⁺/VEGFR2⁺ cell number. Given the previous observation that stimulation of CD34⁺/VEGFR2⁺ cell mobilization by interleukin-11 treatment results in enhanced collateral vessel growth in a model of femoral artery ligation (Aitsebaomo et al., 2011), the present observation suggests a role for these cells in the proangiogenic effect of kinin receptor agonists. On the other hand, our results do not support the hypothesis that this proangiogenic effect is mediated by lin⁻/Ska1⁺/cKit⁺ mobilization or BM-MNC differentiation into EPCs (Supplemental Fig. 1).

There is increasing evidence that inflammation is involved in neovascularization development in the setting of ischemia. Inflammatory cells have been shown to accumulate in the ischemic area and positively modulate neovascularization and arteriogenesis through various mechanisms, including production of angiogenic factors, secretion of proinflammatory cytokines, and matrix degradation (Arras et al., 1998; Tamarat et al., 2002; Silvestre et al., 2003; Stabile et al., 2003, 2006; Hong et al., 2005; Waeckel et al., 2005, 2006; Hillmeister et al., 2011). In diabetes, monocyte dysfunction and reduced VEGF production have been observed (Waltenberger et al., 2000; Tchaikovski et al., 2009; Waltenberger, 2009; Carr et al., 2011). Consistent with these studies, we observed a sharp reduction in number of infiltrated macrophages and decreased VEGF protein level in ischemic muscles of diabetic mice compared with

nondiabetic mice. B1R or B2R agonist treatment fully restored the inflammatory response. Both treatments increased circulating monocyte CD45/CD11b-positive cells in blood and monocyte/macrophage infiltration in ischemic tissue in diabetic mice. These results suggest that the proangiogenic effect of the agonists is due, at least partly, to restoration of the cellular inflammatory response to ischemia.

We observed that B2R activation stimulates MCP-1 synthesis, consistent with its effect on monocyte mobilization, and MCP-1 upregulates hypoxia-inducible factor 1 α gene expression and subsequently VEGF-A synthesis (Hong et al., 2005). This chemokine is a major regulator of monocyte/macrophage trafficking in the ischemic area, and is implicated in postischemic neovascularization. After vessel occlusion, administration of MCP-1 stimulates monocyte trafficking in the adventitia of growing arteries, whereas blockade of MCP-1 the receptor C-C chemokine receptor type 2 inhibits this process (Ito et al., 1997b; Arras et al., 1998; Heil et al., 2002; Waeckel et al., 2006). In addition, MCP-1 induces chemotaxis of human endothelial cells at nanomolar concentrations in the absence of leukocyte infiltrates (Salcedo et al., 2000). However, although triggering monocyte mobilization and increasing macrophage infiltration in ischemic tissue in a manner similar to the B2R agonist, the B1R agonist had no effect on MCP-1. However, monocytes, a major source of MCP-1, display a relatively high level of B1 receptor mRNA in mice with femoral artery occlusion (data not shown). The reason for the difference between the two receptors in coupling to MCP-1 gene expression remains unclear. Other chemokines beside MCP-1 can promote angiogenesis and

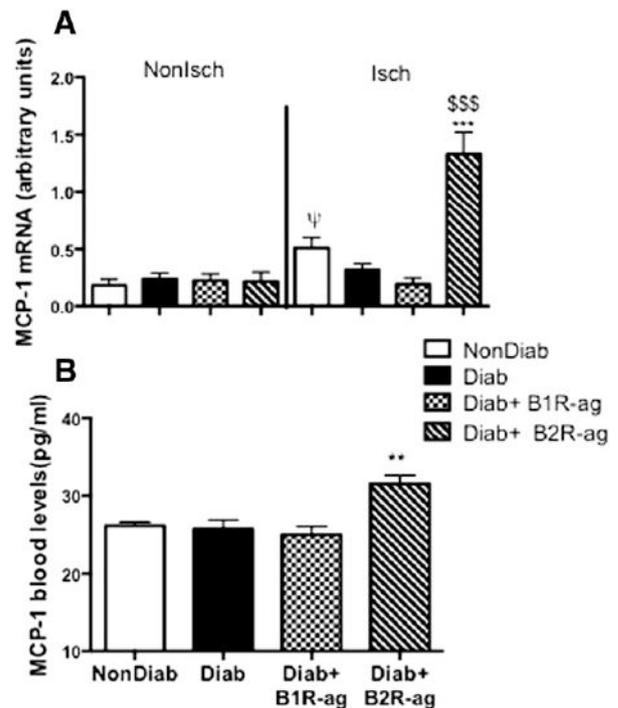


Fig. 7. MCP-1 mRNA level in ischemic (Isch) and nonischemic (NonIsch) gastrocnemius muscle (A) and MCP-1 protein level in blood (B) of nondiabetic mice (NonDiab), vehicle-treated diabetic mice (Diab), and diabetic mice treated with 720 nmol/kg-day⁻¹ of B1R agonist (Diab + B1R-ag) or 720 nmol/kg-day⁻¹ of B2R agonist (Diab + B2R-ag) for 14 days. MCP-1 mRNA is normalized to 18S. Values are the mean \pm S.E.M. ($n = 5$ /group); [§] $P < 0.05$ versus nonischemic muscle of NonDiab mice; ^{§§§} $P < 0.001$ versus ischemic muscle of NonDiab mice; ^{**} $P < 0.01$ versus all other groups; ^{***} $P < 0.001$ versus ischemic muscle of Diab mice.

may be involved in B1R action (Ahluwalia and Perretti, 1996; Duchene et al., 2007).

In summary, the present study demonstrates that kinin receptor signaling has strong proangiogenic potential in hindlimb ischemia in diabetes in mice. It shows that, in this experimental setting, B1R and B2R signaling are equally effective. The proangiogenic effect of B1R and B2R activation in diabetes results, at least in part, from monocyte mobilization and macrophage infiltration, and from mobilization of proangiogenic CD34⁺/VEGFR2⁺-mononuclear cells. Treatment with B1 or B2 receptor agonist restores the impaired neovascularization capacity of diabetic mice. Development of kinin receptor agonists for therapeutic use in diabetic patients may thus be considered. Potential occurrence of side effects, such as hypotension or angioedema, is a concern (Alhenc-Gelas et al., 2011), albeit no hypotension or lethality was observed in diabetic or nondiabetic mice chronically treated with agonists.

Authorship Contributions

Participated in research design: Desposito, Waeckel, Alhenc-Gelas, Roussel, Bouby.

Conducted experiments: Desposito, Waeckel, Potier, Chollet.

Contributed new reagents or analytic tools: Gobeil.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Desposito, Waeckel, Alhenc-Gelas, Roussel, Bouby, Gobeil.

References

- Ahluwalia A and Perretti M (1996) Involvement of bradykinin B1 receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 beta in vivo in the mouse. *J Immunol* **156**:269–274.
- Aitsebaomo J, Srivastava S, Zhang H, Jha S, Wang Z, Winnik S, Veleva AN, Pi X, Lockyer P, Faber JE, et al. (2011) Recombinant human interleukin-11 treatment enhances collateral vessel growth after femoral artery ligation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**:306–312.
- Alhenc-Gelas F, Bouby N, Richer C, Potier L, Roussel R, and Marre M (2011) Kinins as therapeutic agents in cardiovascular and renal diseases. *Curr Pharm Des* **17**:2654–2662.
- Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, and Schaper W (1998) Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* **101**:40–50.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattman G, and Isner JM (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**:964–967.
- Bélangier S, Bovenzi V, Côté J, Neugebauer W, Amblard M, Martinez J, Lammek B, Savard M, and Gobeil F, Jr (2009) Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin B2 receptor. *Peptides* **30**:777–787.
- Bergaya S, Meneton P, Bloch-Faure M, Mathieu E, Alhenc-Gelas F, Lévy BI, and Boulanger CM (2001) Decreased flow-dependent dilation in carotid arteries of tissue kallikrein-knockout mice. *Circ Res* **88**:593–599.
- Bodin S, Chollet C, Goncalves-Mendes N, Gardes J, Pean F, Heudes D, Bruneval P, Marre M, Alhenc-Gelas F, and Bouby N (2009) Kallikrein protects against microalbuminuria in experimental type I diabetes. *Kidney Int* **76**:395–403.
- Brown NJ, Gainer JV, Murphy LJ, and Vaughan DE (2000) Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release from human forearm vasculature through B(2) receptor-dependent, NO synthase-independent, and cyclooxygenase-independent pathway. *Circulation* **102**:2190–2196.
- Carr CL, Qi Y, Davidson B, Chadderdon S, Jayaweera AR, Belcik JT, Benner C, Xie A, and Lindner JR (2011) Dysregulated selectin expression and monocyte recruitment during ischemia-related vascular remodeling in diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**:2526–2533.
- Côté J, Savard M, Bovenzi V, Bélangier S, Morin J, Neugebauer W, Larouche A, Dubuc C, and Gobeil F, Jr (2009) Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles. *Peptides* **30**:788–795.
- Couture R, Blaes N, and Girolami JP (2014) Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr Vasc Pharmacol* **12**:223–248.
- Dimmeler S (2010) Regulation of bone marrow-derived vascular progenitor cell mobilization and maintenance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**:1088–1093.
- Duchene J, Lecomte F, Ahmed S, Cayla C, Pesquero J, Bader M, Perretti M, and Ahluwalia A (2007) A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B1 receptor and the chemokine CXCL5. *J Immunol* **179**:4849–4856.
- Ebrahimian TG, Tamarat R, Clergue M, Duriez M, Levy BI, and Silvestre JS (2005) Dual effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on angiogenesis in type 1 diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**:65–70.
- Emanuelli C, Bonaria Salis M, Stacca T, Pintus G, Kirchmair R, Isner JM, Pinna A, Gaspa L, Regoli D, Cayla C, et al. (2002) Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation* **105**:360–366.
- Emanuelli C, Graiani G, Salis MB, Gadau S, Desortes E, and Madeddu P (2004) Prophylactic gene therapy with human tissue kallikrein ameliorates limb ischemia recovery in type 1 diabetic mice. *Diabetes* **53**:1096–1103.
- Emanuelli C and Madeddu P (2002) Renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems coordinately modulate angiogenesis. *Hypertension* **39**:e29.
- Emanuelli C, Minasi A, Zacheo A, Chao J, Chao L, Salis MB, Straino S, Tozzi MG, Smith R, Gaspa L, et al. (2001a) Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* **103**:125–132.
- Emanuelli C, Salis MB, Stacca T, Gaspa L, Chao J, Chao L, Piana A, and Madeddu P (2001b) Rescue of impaired angiogenesis in spontaneously hypertensive rats by intramuscular human tissue kallikrein gene transfer. *Hypertension* **38**:136–141.
- Fadini GP, Losordo D, and Dimmeler S (2012) Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circ Res* **110**:624–637.
- Furchtgott RF and Vanhoutte PM (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* **3**:2007–2018.
- Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, and Schaper W (2002) Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**:H2411–H2419.
- Hillmeister P, Gatzke N, Dülsner A, Bader M, Schadock I, Hoefler I, Hamann I, Infante-Duarte C, Jung G, Troidl K, et al. (2011) Arteriogenesis is modulated by bradykinin receptor signaling. *Circ Res* **109**:524–533.
- Hong KH, Ryu J, and Han KH (2005) Monocyte chemoattractant protein-1-induced angiogenesis is mediated by vascular endothelial growth factor-A. *Blood* **105**:1405–1407.
- Ito WD, Arras M, Scholz D, Winkler B, Htun P, and Schaper W (1997a) Angiogenesis but not collateral growth is associated with ischemia after femoral artery occlusion. *Am J Physiol* **273**:H1255–H1265.
- Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, and Schaper W (1997b) Monocyte chemotactic protein-1 increases collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res* **80**:829–837.
- Johannesson A, Larsson GU, Ramstrand N, Turkiewicz A, Wiréhn AB, and Atroshi I (2009) Incidence of lower-limb amputation in the diabetic and nondiabetic general population: a 10-year population-based cohort study of initial unilateral and contralateral amputations and reamputations. *Diabetes Care* **32**:275–280.
- Kränkel N, Katare RG, Siragusa M, Barcelos LS, Campagnolo P, Mangialardi G, Fortunato O, Spinetti G, Tran N, Zacharowski K, et al. (2008) Role of kinin B2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential. *Circ Res* **103**:1335–1343.
- Li P, Kondo T, Numaguchi Y, Kobayashi K, Aoki M, Inoue N, Okumura K, and Murohara T (2008) Role of bradykinin, nitric oxide, and angiotensin II type 2 receptor in imidapril-induced angiogenesis. *Hypertension* **51**:252–258.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta-Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402–408.
- Mallat Z, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussanne S, Lecomte-Raclet L, Corbaz A, Clergue M, Duriez M, Barateau V, Akira S, Tedgui A, et al. (2002) Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates ischemia-induced neovascularization in mice hindlimb. *Circ Res* **91**:441–448.
- Meneton P, Bloch-Faure M, Hagege AA, Ruettens H, Huang W, Bergaya S, Ceiler D, Gehring D, Martins I, Salmon G, et al. (2001) Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:2634–2639.
- Napoli C, Williams-Ignarro S, de Nigris F, de Rosa G, Lerman LO, Farzati B, Matarazzo A, Sica G, Botti C, Fiore A, et al. (2005) Beneficial effects of concurrent autologous bone marrow cell therapy and metabolic intervention in ischemia-induced angiogenesis in the mouse hindlimb. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:17202–17206.
- Porcu P, Emanuelli C, Kapatsoris M, Chao J, Chao L, and Madeddu P (2002) Reversal of angiogenic growth factor upregulation by revascularization of lower limb ischemia. *Circulation* **105**:67–72.
- Potier L, Waeckel L, Vincent MP, Chollet C, Gobeil F, Jr, Marre M, Bruneval P, Richer C, Roussel R, Alhenc-Gelas F, et al. (2013) Selective kinin receptor agonists as cardioprotective agents in myocardial ischemia and diabetes. *J Pharmacol Exp Ther* **346**:23–30.
- Rivard A, Silver M, Chen D, Kearney M, Magner M, Annex B, Peters K, and Isner JM (1999) Rescue of diabetes-related impairment of angiogenesis by intramuscular gene therapy with adeno-VEGF. *Am J Pathol* **154**:355–363.
- Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, and Murphy WJ (2000) Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* **96**:34–40.
- Savard M, Labonté J, Dubuc C, Neugebauer W, D'Orléans-Juste P, and Gobeil F, Jr (2013) Further pharmacological evaluation of a novel synthetic peptide bradykinin B2 receptor agonist. *Biol Chem* **394**:353–360.
- Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, and Levy BI (2001) Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ Res* **89**:678–683.
- Silvestre JS, Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, Duverger N, Branelle D, Tedgui A, and Levy BI (2000) Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res* **87**:448–452.
- Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimian TG, Le-Roux A, Clergue M, Emmanuel F, Duriez M, Schwartz B, Branelle D, and Lévy BI (2003) Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res* **93**:114–123.
- Smith RS, Jr, Gao L, Chao L, and Chao J (2008) Tissue kallikrein and kinin infusion promotes neovascularization in limb ischemia. *Biol Chem* **389**:725–730.
- Spinetti G, Fortunato O, Cordella D, Portararo P, Kränkel N, Katare R, Sala-Newby GB, Richer C, Vincent MP, Alhenc-Gelas F, et al. (2011) Tissue kallikrein is essential for invasive capacity of circulating proangiogenic cells. *Circ Res* **108**:284–293.

- Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A, Miller JM, Shou M, Epstein SE, and Fuchs S (2003) Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* **108**:205–210.
- Stabile E, Kinnaird T, la Sala A, Hanson SK, Watkins C, Campia U, Shou M, Zbinden S, Fuchs S, Kornfeld H, et al. (2006) CD8+ T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD4+ mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation* **113**:118–124.
- Stone OA, Richer C, Emanuelli C, van Weel V, Quax PH, Katare R, Kraenkel N, Campagnolo P, Barcelos LS, Siragusa M, et al. (2009) Critical role of tissue kallikrein in vessel formation and maturation: implications for therapeutic revascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**:657–664.
- Tamarat R, Silvestre JS, Durie M, and Levy BI (2002) Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways. *Lab Invest* **82**:747–756.
- Tamarat R, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Lecomte-Raclet L, Clergue M, Duriez M, Tobelem G, and Lévy BI (2004) Impairment in ischemia-induced neovascularization in diabetes: bone marrow mononuclear cell dysfunction and therapeutic potential of placenta growth factor treatment. *Am J Pathol* **164**:457–466.
- Tchaikovski V, Olieslagers S, Böhmer FD, and Waltenberger J (2009) Diabetes mellitus activates signal transduction pathways resulting in vascular endothelial growth factor resistance of human monocytes. *Circulation* **120**:150–159.
- Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, and Gurtner GC (2002) Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* **106**:2781–2786.
- Waeckel L, Bignon J, Liu JM, Markovits D, Ebrahimian TG, Vilar J, Mees B, Blanc-Brude O, Barateau V, Le Ricousse-Roussanne S, et al. (2006) Tetrapeptide AcSDKP induces postischemic neovascularization through monocyte chemoattractant protein-1 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**:773–779.
- Waeckel L, Mallat Z, Potteaux S, Combadière C, Clergue M, Duriez M, Bao L, Gerard C, Rollins BJ, Tedgui A, et al. (2005) Impairment in postischemic neovascularization in mice lacking the CXC chemokine receptor 3. *Circ Res* **96**:576–582.
- Waltenberger J (2009) VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. *Biochem Soc Trans* **37**:1167–1170.
- Waltenberger J, Lange J, and Kranz A (2000) Vascular endothelial growth factor-A-induced chemotaxis of monocytes is attenuated in patients with diabetes mellitus: A potential predictor for the individual capacity to develop collaterals. *Circulation* **102**:185–190.
- Yue WS, Lau KK, Siu CW, Wang M, Yan GH, Yiu KH, and Tse HF (2011) Impact of glycemic control on circulating endothelial progenitor cells and arterial stiffness in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* **10**:113.

Address correspondence to: Ludovic Waeckel, INSERM UMRS1138, Centre de Recherches des Cordeliers, 15, rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France. E-mail: ludovic.waeckel@crc.jussieu.fr

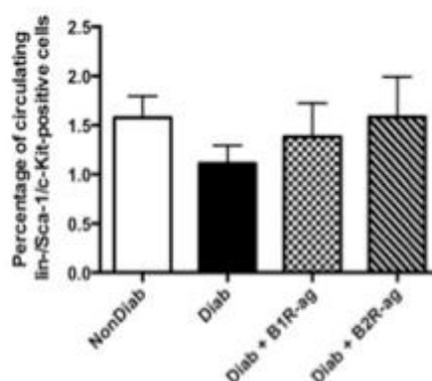
Kinin receptor agonism restores hindlimb postischemic neovascularization capacity in diabetic mice

Dorinne Desposito, Louis Potier, Catherine Chollet, Fernand Gobeil Jr, Ronan Roussel, Francois Alhenc-Gelas, Nadine Bouby, Ludovic Waeckel

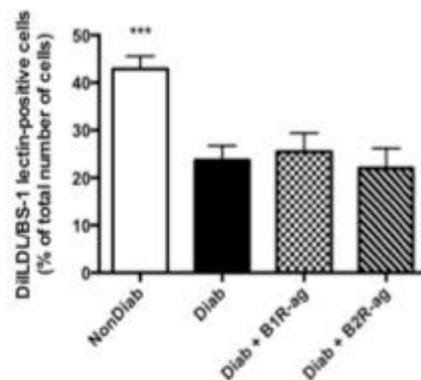
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics

Supplemental figures

A



B



Supplemental figures. (A) Circulating lin⁺/Sca-1/c-Kit-positive cells in ligatured non-diabetic mice (NonDiab), diabetic mice vehicle treated (Diab) and diabetic mice treated with 720 nmol/kg.day⁻¹ of B1R agonist (Diab + B1R-ag) or 720 nmol/kg.day⁻¹ of B2R agonist (Diab + B2R-ag) for 7 days. (B) Quantification of AcLDL-Dil/BS-1 lectin-positive cells in bone marrow. BM-MNC were isolated from NonDiab mice, Diab mice and Diab + B1R-ag or Diab + B2R-ag mice, 7 days after femoral ligation. BM-MNC were cultured for 4 days and EPC were characterised as adherent cells with double positive staining for AcLDL-Dil and BS-1 lectin. Values are mean \pm SEM; n=5-7/group; ***p<0.001 vs NonDiab mice.

3.3. Discussion

Au cours de cette étude, nous avons pu montrer que les récepteurs des kinines (RB1 et RB2) sont fortement impliqués dans les processus de néovascularisation post-ischémique chez la souris présentant un DT1.

3.3.1. Rôle des récepteurs des kinines dans l'angiogenèse en conditions diabétiques

De nombreuses études ont montré que les RB1 et les RB2 sont impliqués dans les processus d'angiogenèse suite à une ischémie périphérique^{185, 189, 193}. Notre étude montre que ces récepteurs sont aussi impliqués dans la néovascularisation post-ischémique en condition diabétique. En effet, l'administration chronique d'un agoniste spécifique des RB1 ou des RB2 restaure entièrement le défaut de néovascularisation post-ischémique observé chez la souris diabétique. Après 14 jours de traitement par le RB1-ag ou le RB2-ag, le score angiogénique, la densité capillaire et le flux sanguin au niveau de la surface du pied sont augmentés chez les souris diabétiques ayant subi une ischémie de la patte²⁶⁴. Ces résultats sont associés à une augmentation de la mobilisation des cellules progénitrices CD34⁺/VEGFR2⁺ après trois jours de traitement par les agonistes. Toutefois, nous n'avons pas pu mettre en évidence de rôle de l'activation des récepteurs des kinines dans la différenciation des cellules progénitrices endothéliales.

3.3.2. Modification des paramètres inflammatoires

Aujourd'hui, il existe de nombreuses preuves dans la littérature associant la néovascularisation post-ischémique à l'inflammation²⁷³⁻²⁷⁶. De plus, des études ont montré que le diabète entraîne des dysfonctionnements au niveau des cellules inflammatoires et une diminution de la production de VEGF (vascular endothelial growth factor)²⁷⁷⁻²⁷⁹. Dans notre étude, nous avons montré que les effets bénéfiques de l'activation des RB1 et des RB2 dans l'angiogenèse sont associés à une augmentation des paramètres inflammatoires dans la zone ischémisée (infiltration des macrophages et niveau de VEGF) et dans le sang (mobilisation des cellules monocytaires CD45⁺/CD11b⁺). Ces résultats montrent que les effets proangiogéniques de l'activation des récepteurs des kinines sont en grande partie liés au rétablissement des réponses inflammatoires post-ischémiques²⁶⁴.

3.3.3. Voies de signalisation impliquées

La cytokine chemoattractive MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) est une voie de signalisation qui a été impliquée dans les réponses inflammatoires, la mobilisation des monocytes/macrophages et les processus de néovascularisation post-ischémique²⁸⁰⁻²⁸². Le traitement par le RB2-ag entraîne une augmentation des taux circulants de MCP-1, ainsi qu'une augmentation de ses niveaux d'expression au niveau de la zone ischémisée²⁶⁴. Les effets de RB2-ag sont donc possiblement médiés par l'augmentation de cette cytokine. En revanche, le RB1-ag n'influence pas les niveaux plasmatiques et d'ARNm de MCP-1²⁶⁴. Ainsi, d'autres cytokines pro-inflammatoires semblent être impliquées dans les effets du RB1-ag²¹⁸.

3.3.4. Conclusions

La modulation du SKK *via* le RB1-ag et le RB2-ag permet de restaurer les processus de néovascularisation post-ischémique chez la souris diabétique. Ces effets bénéfiques du traitement chronique du RB1-ag et du RB2-ag impliquent une augmentation des paramètres inflammatoires dans la zone ischémisée. L'administration de RB1-ag ou de RB2-ag représente une nouvelle cible thérapeutique intéressante dans le cas des artérites diabétiques.

4. ETUDE 2 : ROLE DU SKK DANS LA CICATRISATION DIABETIQUE

4.1. Introduction

4.1.1. Cicatrisation cutanée

Les processus de cicatrisation cutanée nécessitent l'intégration de plusieurs événements biologiques et moléculaires notamment de migration et de prolifération cellulaires, de formation de la matrice extracellulaire et de remodelage. La cicatrisation cutanée est un phénomène complexe de réponses cellulaires impliquant : les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages et les plaquettes.

4.1.1.1. Cicatrisation en conditions physiologiques

Après une lésion cutanée, quatre phases successives se mettent en place : la coagulation, l'inflammation, la migration/prolifération cellulaire, puis le remodelage cutané⁷⁸,
283

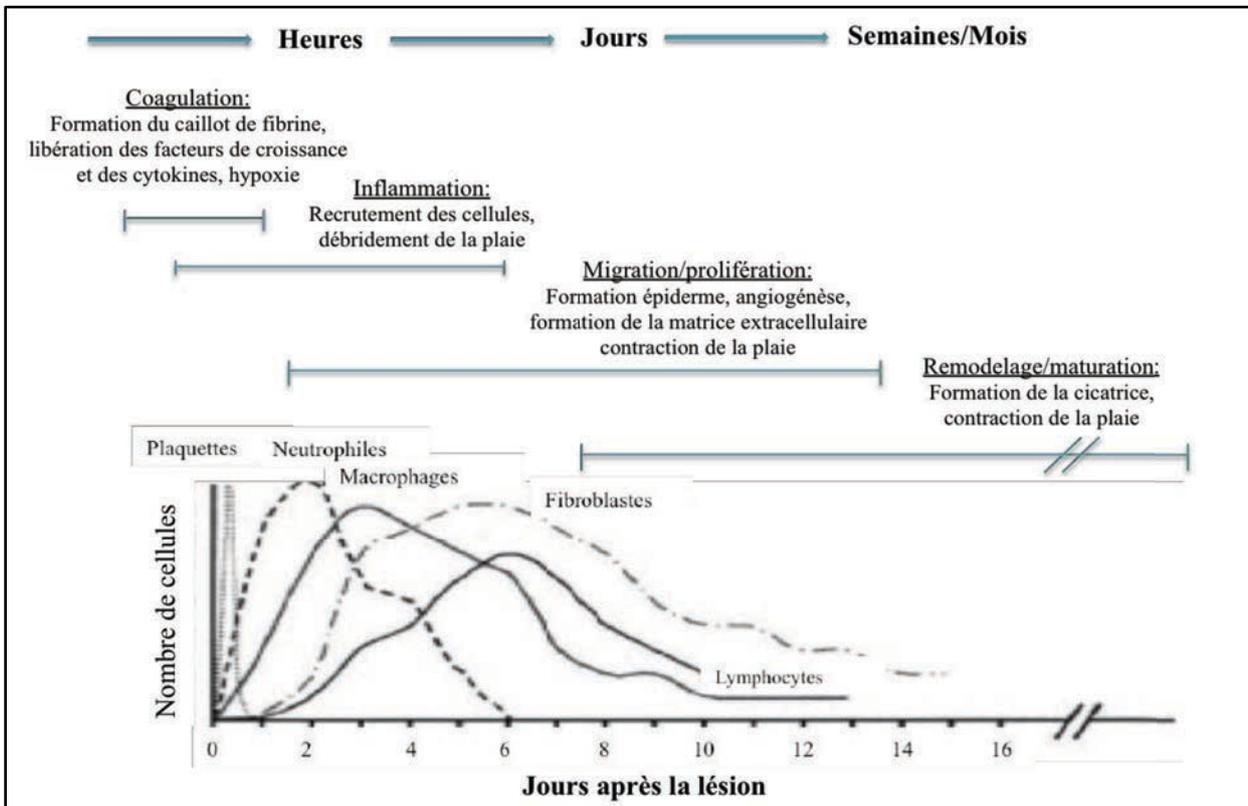


Figure 17 : Les quatre phases de la cicatrisation et les principaux types de cellules impliqués.

Image issue et adaptée de deux articles^{78, 284}.

Les deux premières phases de la cicatrisation (coagulation et inflammation) sont mises en place dès les premières minutes après la lésion cutanée. La formation du caillot de fibrine a pour objectifs de protéger la plaie et de réguler l'homéostasie vasculaire mais aussi de libérer des facteurs de croissance qui auront un rôle important dans le recrutement cellulaire et la formation de la matrice extracellulaire²⁸⁵. Simultanément, une grande variété de signaux chimiotactiques va déclencher le recrutement des cellules inflammatoires (granulocytes neutrophiles, leucocytes, neutrophiles et macrophages) sur le site lésé. Ce phénomène conduit à l'élimination des pathogènes et à la production de nombreux facteurs de croissance et de médiateurs qui vont réguler les phases suivantes²⁸⁶, et notamment l'activation des fibroblastes et des kératinocytes. A cette étape, le caillot se rétracte et le tissu conjonctif sous-jacent prend le nom de tissu de granulation.

La phase de migration et de prolifération cellulaire inclue plusieurs étapes essentielles dans l'objectif de refermer la lésion²⁸⁶ : la formation de la matrice extracellulaire par les fibroblastes, l'angiogenèse, la contraction de la plaie, la migration des kératinocytes et la ré-épithélialisation⁷⁸. Plusieurs heures à plusieurs jours après la lésion, les cellules endothéliales lésées et les macrophages vont sécréter du VEGF ce qui va déclencher les processus d'angiogenèse. L'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse vont alors participer à la revascularisation des tissus lésés, à la formation du tissu de granulation et au recrutement cellulaire. A ce stade, le tissu de granulation est très vascularisé et contient aussi des macrophages et des fibroblastes. Ce tissu de granulation est très contractile. Environ une semaine après la lésion, les fibroblastes résidents du derme se transforment en myofibroblastes ce qui va favoriser un phénomène de contraction cutanée. La contraction, liée à la présence de ces myofibroblastes, est une étape majeure dans la cicatrisation puisqu'elle peut être corrélée à plus de 40% de la fermeture de la plaie²⁸³. Les protéines de la matrice extracellulaire, formées durant les premières phases, vont servir de support à la migration cellulaire. Les kératinocytes vont migrer sur le maillage de fibrine, alors que les fibroblastes et les cellules endothéliales vont être recrutés par le tissu de granulation naissant. Quelques heures après la lésion, une phase de prolifération supplémentaire des kératinocytes peut aussi se mettre en place lorsque la lésion est importante.

La dernière phase, la phase de remodelage cutané permet de récupérer une structure tissulaire normale. Cette phase peut durer plusieurs semaines après la lésion et aboutit à la formation de la cicatrice. Elle est principalement caractérisée par la maturation des couches cutanées nouvellement formées (matrice extracellulaire, épiderme et couche cicatricielle)²⁸⁶.

4.1.1.2. Altération de la cicatrisation

Les processus de cicatrisation sont strictement régulés dans le temps. Cependant, dans certaines situations et notamment en cas de lésions chroniques, ces processus sont déséquilibrés et altérés. Dans le cas des ulcères liés au diabète, la cicatrisation post-lésionnelle est ralentie par un ensemble de facteurs intrinsèques et extrinsèques qui ont été décrits précédemment dans le chapitre 1. Les retards de cicatrisation chez le patient diabétique sont dus à une altération de chaque étape des processus de cicatrisation et à une altération des phénotypes des principaux types cellulaires impliqués.

4.1.1.3. Cicatrisation et SKK

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, le SKK semble jouer un rôle dans la médiation des réponses cutanées suite à une lésion et dans la cicatrisation. Cependant, la plupart des études décrites ont été réalisées *in vitro* sur des lignées de kératinocytes. Des études supplémentaires *in vivo* sont nécessaires pour confirmer ces effets. De plus, le rôle des kinines dans la cicatrisation cutanée en cas de diabète, reste aujourd'hui inconnu.

4.1.2. Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude a été de mieux identifier le rôle des kinines dans les processus de cicatrisation en utilisant un modèle murin de cicatrisation (*Annexe 2 : Matériels et méthodes de l'étude 2*). Les effets de la modulation du SKK, réalisée à l'aide d'outils pharmacologiques et génétiques, ont été recherchés dans deux modèles de souris diabétiques. Les différences possibles avec la cicatrisation chez la souris non-diabétique ont aussi été explorées.

4.2. Article : Improvement of skin wound healing in diabetic mice by kinin B2 receptor blockade

Improvement of skin wound healing in diabetic mice by kinin B2 receptor blockade

Dorinne Desposito^{1,2,3}, Catherine Chollet^{1,2,3}, Christopher Taveau^{1,2,3}, Vincent Descamps^{4,5}, François Alhenc-Gelas^{1,2,3}, Ronan Roussel^{1,6,7}, Nadine Bouby^{1,2,3}, Ludovic Waeckel^{1,2,3}

¹ INSERM U 1138, Cordeliers Research Center, Paris, France; ² Paris Descartes University, Paris, France; ³ Pierre et Marie Curie University, Paris, France; ⁴ INSERM U 976, Denis Diderot University, Paris, France; ⁵ Dermatology Department, Bichat Hospital, AP-HP, Paris, France; ⁶ Denis Diderot University, Paris, France; ⁷ Diabetology, Endocrinology and Nutrition Department, DHU FIRE, Bichat Hospital, AP-HP, Paris, France

Laboratory address: INSERM U 1138, Centre de Recherches des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France

Keywords: Bradykinin receptors. Type 1 diabetes. Type 2 diabetes. Skin wound healing. Kallikrein-kinin system.

Short title: Kinins and cutaneous wound healing

Corresponding author:

Nadine Bouby

Address: INSERM U 1138, Centre de Recherches des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 PARIS, FRANCE

Tel: 33 (0)1 44 27 81 09

Fax: 33 (0)1 44 27 64 21

E-mail: nadine.bouby@crc.jussieu.fr

Abstract

Impaired skin wound healing is a major medical problem in diabetic subjects. Kinins exert a number of vascular and tissular actions limiting organ damage in ischemia or diabetes but their role in skin injury is unknown. We investigated, through pharmacological manipulation of kinin B1 and B2 receptors (B1R or B2R), the role of kinins in wound healing in non-diabetic and diabetic mice.

Using two mouse models of diabetes (streptozotocin-induced and db/db mice) and non-diabetic mice, we assessed effect of kinin receptor activation or inhibition by subtype selective pharmacological agonists (B1R and B2R) and antagonist (B2R) on healing of experimental skin wound. We also studied effects of agonists and antagonist on keratinocytes and fibroblasts *in vitro*.

B1 and B2 receptor mRNAs level increased one to two fold in healthy and wounded diabetic skin compared to non-diabetic skin. Diabetes delayed wound healing. B1R agonist had no effect on wound healing. In contrast, B2R agonist impaired wound repair in both non diabetic and diabetic mice, inducing skin disorganization and epidermis thickening. *In vitro*, B2R activation unbalanced fibroblast/keratinocyte proliferation and increased keratinocyte migration. These effects were abolished by co-administration of B2R antagonist. Interestingly, in the two mouse models of diabetes B2R antagonist administered alone normalized wound healing.

Thus, stimulation of kinin B2 receptor, impairs skin wound healing in mice. B2 receptor activation occurs in the diabetic skin delays wound healing. B2 receptor blockade improves skin wound healing in diabetic mice and is a potential therapeutic approach to diabetic ulcers.

Abbreviations

AU: arbitrary units

B1R: bradykinin type-1 receptor

B2R: bradykinin type-2 receptor

B1R-ag: bradykinin type-1 receptor agonist

B2R-ag: bradykinin type-2 receptor agonist

B2R-ant: bradykinin type-2 receptor antagonist

Diab: diabetic

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

ERK1/2: p44/42 MAP-Kinase

FBS: Foetal Bovine Serum

KKS: Kallikrein-Kinins System

NBCS: New Born Calf Serum

NonDiab: non-diabetic

PBS: Phosphate Buffered Saline

STZ: streptozotocin

STZ-Diab: diabetes induced by streptozotocin

Introduction

Impaired skin wound healing is a source of morbidity, disability, loss of quality of life and mortality in subjects affected by diabetes. Foot ulcers affect at least once in their life about 15% of patients with diabetes. Amputation rate is high in affected patients[1-3]. The pathogenesis of chronic foot ulcers is multifactorial and still incompletely understood. Loss of insulin action, hyperglycaemia, ischemia secondary to micro- and macro-angiopathy, neuropathy and infection all contribute to delayed skin repair and favour tissue necrosis, increasing amputation risk[4]. Improving skin wound healing in patients with diabetes is an important therapeutic issue.

Skin healing after wounding involves several different biological processes and comprises an acute response phase with haemostasis and inflammation, a granulation phase with cell migration, angiogenesis, production of extracellular matrix, wound contraction and re-epithelisation and a late scar maturation phase. Various cell types are involved in these processes: platelets, inflammatory cells, endothelial cells, fibroblasts and keratinocytes[5]. In diabetes, all phases of wound healing are altered. Cellular infiltration, migration and proliferation, and granulation tissue formation are delayed, together with impaired collagen organization and reduced angiogenesis[5]. Moreover, chronic hyperglycaemia alters fibroblasts and keratinocytes phenotypes. While impairment of the different components of the healing process has been documented in diabetes, therapeutic options for improving wound healing in diabetic subjects remain currently limited.

In this context, we hypothesized that the kallikrein-kinin system (KKS) could play a role in cutaneous responses to injury. This system is implicated in physiological vasodilatation[6,7], anticoagulation[8], inflammation[9], and angiogenesis[10]. Kinins have several cellular targets involved in skin repair including platelets, endothelial cells, keratinocytes and fibroblasts. Studies have documented the presence of the different components of the KKS in healthy, traumatized or diseased human skin[11-15]. Kinin receptors, bradykinin type-1 receptor (B1R) and bradykinin type-2 receptor (B2R), have been shown to participate in hyperproliferative process in chronic skin inflammation model[16]. Kinins increase skin microvascular blood flow in rabbits and humans[17]. These studies suggest a role for KKS in skin physiology. However, involvement of KKS in skin repair in the setting of diabetes remains undocumented.

The aim of the present study was to investigate the role of kinins and their receptors in wound healing in diabetic mice, and to compare with non-diabetic animals. Effect of potent selective pharmacological B1R or B2R agonists and/or of B2R antagonist was studied *in vivo* in mice and *in vitro* in cultured fibroblasts and keratinocytes. The study shows that a) B2R stimulation has deleterious effects in the wounded skin, unbalancing fibroblast/keratinocyte proliferation and migration and delaying cicatrization; b) B2R activation occurs in the diabetic skin and impairs wound healing; c) B2R blockade improves wound healing in diabetic mice and may become a therapeutic option for diabetic patients.

Materials and methods

Animals, experimental protocols and treatments

Effects of B1R or B2R agonists or B2R antagonist on wound healing were studied, in both non-diabetic (NonDiab) and diabetic (Diab) mice. All mice were housed with a 12 h light/dark cycle and had free access to standard mice chow and water. All experimental procedures were approved by the local Ethics Committee for Animal Experiment Charles Darwin and performed in accordance with European legislation for the care and use of laboratory animals (L 358-86/609/EEC).

Murine model of type 1 diabetes Diabetes was induced in 10 weeks-old mice (C57BL/6J strain, male, Charles River Laboratories, France) by 5 daily i.p. injections of streptozotocin (STZ) (Sigma-Aldrich, France) (50 mg/kg body weight in 0.05 mol/L⁻¹ sodium citrate, pH 4.5)[10,18]. Diabetes was confirmed by assessing fasting blood glucose level at 0, 7 and 30 days post STZ injection. After 5 weeks of confirmed diabetes (fasting blood glucose >300 mg/dl), excisional wounds were created on the back of the mice as described below. Control NonDiab animals were treated with vehicle only.

Murine model of type 2 diabetes Diabetic db/db mice were obtained from Janvier Labs (Saint-Berthevin, France). Experiments were performed on male mice, 12 week-old. Only mice with 4 weeks of fasting blood glucose >300 mg/dl were used.

Murine model of skin wound healing Animals were anesthetized by isoflurane inhalation (1.5% in O₂). A dorsal 8 mm diameter full-thickness wound was made on dorsal depilated and cleaned (povidone-iodine solution) skin using a sterile biopsy punch (Kai medical, Japan)[19,20]. Buprenorphine (0.05 mg/kg; Buprécare, Axience, France) was administered as analgesic agent ten minutes prior and 24 hours after biopsy. Wounds were harvested by taking high-resolution photos every 2-3 days and the area was quantified relative to a millimetre reference using Image Analyzer Software (ImageJ, NIH) and expressed as percentage of wound area measured at day 0. At day 11 after injury, corresponding to wound closure of NonDiab mice, animals were sacrificed by pentobarbital overdose (120 mg/kg) and a skin sample including wound and surrounding tissues was collected. One half of the sample was immediately fixed in 10% formalin for histological analysis, the other part being kept at -80°C for molecular analyses.

Treatments administration Immediately after wounding, mice were implanted i.p. with osmotic minipumps (Alzet, model 1002, Charles River, France) delivering the selective B1R agonist (SarLys[Hyp³,Igl⁵,DPhe⁸]desArg⁹-bradykinin, B1R-ag) or the selective B2R agonist ([Hyp⁽³⁾,Thi⁽⁵⁾,(N)Chg⁽⁷⁾,Thi⁽⁸⁾]-bradykinin, B2R-ag)[21,22], both at non-hypotensive dose of 720 nmol/kg.day⁻¹ (B1R-ag: 796 µg/kg.day⁻¹; B2R-ag: 813 µg/kg.day⁻¹) [10], associated or not with the specific B2R antagonist (HOE140, Icatibant, B2R-ant)[23] at a dose of 380 nmol/kg.day⁻¹ (500 µg/kg.day⁻¹) [24]. B2R-ant was also administered alone at the same dosage. Control mice received only vehicle (Phosphate Buffered Saline, PBS). Treatments were pursued until sacrifice (n=7-30/group).

Histological analysis Skin biopsies fixed in 10% formalin and embedded in paraffin were cut into 7-µm section and stained with Masson's trichrome according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich, France). Photomicrographs were obtained using digital camera attached to light microscope (Leica DM 4000B and LAS v3.8 software). Epidermal thickness

was measured in wounded skin and healthy surroundings area by using Image Analyzer Software (ImageJ, NIH) (3 measurements for each compartment/section, 4 sections/animal, n=7-13/group). Structure and organisation of the granulation tissue and/or the scar were observed.

Wound closure and histological studies were performed blindly with regard to treatment.

Real-time PCR Total RNA was isolated from the skin, collected at day 11, using TRIzol (Invitrogen, France) and reverse transcribed with superscript II reverse transcriptase as previously described[25]. The cDNAs were amplified and quantified using TaqMan Universal Master Mix and Assays-on-Demand Gene Expression Probes for gene of B1R and B2R (Applied Biosystems, France) in an ABI PRISM-7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, France). Each sample was tested in triplicate. Data were normalized to 18S rRNA. Changes in the target gene were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ comparative method for each sample[26].

Keratinocytes and fibroblasts cell culture

Keratinocytes (human keratinocyte cell line HaCaT; ATCC, Virginia) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, LifeTechnologies, UK) supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS, Gibco, LifeTechnologies, UK) and antibiotics (50 U/mL Penicillin, 50 U/mL Streptomycin, Gibco, LifeTechnologies, UK). Keratinocytes were used between passages 68 and 75.

Fibroblasts (NIH-3T3 mouse fibroblasts; Sigma-Aldrich, Missouri) were cultured in DMEM supplemented with 5% New Born Calf Serum (NBCS, Gibco, LifeTechnologies, UK), 5% FBS and antibiotics according to manufacturer's guidelines. Fibroblasts were used between passages 162 and 171.

Keratinocytes and fibroblasts were kept at 37°C in a 5% CO₂ environment. Culture media were changed every two-day. When the cells reached subconfluence, they were harvested using 0.05% trypsin-EDTA (Gibco, LifeTechnologies, UK), and fresh culture medium was added for obtaining single cell suspensions used for further study.

Cell proliferation assay Cell proliferation was measured using Quick Cell Proliferation Assay kit (Abcam, Cambridge, MA) according to the manufacturer's instructions[27]. This assay is based on cleavage of the tetrazolium salt WST-1 to formazan by cellular mitochondrial dehydrogenases. Briefly, keratinocytes or fibroblasts were seeded on 96-well plates (1×10^4 cells/well) and incubated with two different concentrations of B1R-ag or B2R-ag (1×10^{-6} mol.L⁻¹ and 1×10^{-7} mol.L⁻¹) and/or with B2R-ant (1×10^{-5} mol.L⁻¹) in DMEM supplemented with 2% FBS. Cell proliferation was measured after 24, 48, 72 and 96 hours of incubation. Optical density was measured at 440 nm with a reference wavelength of 650 nm using a precision microplate reader (iMark Microplate Absorbance Reader, BIORAD). Results were expressed as percentage of control (DMEM supplemented with 2% FBS). Each experiment was performed in duplicate per condition and repeated three times.

Wound closure assay Spreading and migration capabilities of cells were assessed using a scratch assay[28]. Keratinocytes or fibroblasts were seeded on 6-well plates (3×10^5 cells/well). After reaching confluence, cultures were scratch-wounded with a 0.2 ml sterile pipette tip at the centre of each well and cell debris were removed by PBS washing. For

keratinocytes, plates were pre-coated with collagen I (BD Biosciences, California). B1R-ag or B2R-ag (1×10^{-6} mol.L⁻¹ and 1×10^{-7} mol.L⁻¹) and/or B2R-ant (1×10^{-5} mol.L⁻¹) were added in DMEM supplemented with 2% FBS. Mitomycin C (Sigma-Aldrich, Missouri) (10µg/mL) was also added in medium to inhibit cellular proliferation. After 15 hours, photographs of the scratch width were taken every 3 hours until closure and scratch closure was quantified by monitoring the front of migration. Results were expressed in percentage of scratch width measured at hour 0. Each experiment was realized in duplicate per condition and repeated four times.

Western blotting Cells were deprived in FBS during 24 hours and then treated 0, 2, 5, 15 and 40 minutes with B2R-ag (1×10^{-6} mol.L⁻¹) and/or B2R-ant (1×10^{-5} mol.L⁻¹). Proteins were extracted from treated-cells using standard protein extraction protocols and were dosed using BCA protein assay (Pierce Protein Biology Products, USA). Fifteen-µg proteins were separated on a Mini-PROTEAN TGX gel (Biorad, USA) and membranes were blotted with phospho- and total p44/42 MAPK (Erk-1/2) (Thr202/Tyr204) rabbit antibody (dilution 1/1000; Cell signalling technologies, Danvers, USA). They were exposed to ECL plus western blotting reagents (Biorad, USA) and reactive bands were detected in ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, France) and quantified using Multi Gauge software 2.0 (FujiFilm, Japan). Each blot was then stripped and re-probed with anti-β-actin antibodies for data normalization. Results were confirmed by repeating the experiment 3–5 times.

Statistical analysis

Data are presented as mean±SEM. Statistical analysis was performed using one-way or two-way ANOVA for comparing effect of diabetes and/or treatments in mice. One-way ANOVA was used for comparing effect of treatment on cell migration or proliferation and effect of diabetes on receptor mRNA level. ANOVA was followed by ad-hoc multiple comparison tests. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

Treatments did not affect metabolic parameters. Body weight and plasma glucose level of the different groups of mice at the beginning and end of the experiment are presented in Table 1. Treatment with B1R-ag, B2R-ag and/or B2R-ant did not affect these parameters (Table 1).

B1R and B2R mRNA levels are increased in diabetic skin. Analysis of bradykinin receptor levels in healthy skin and wounded area at day 11 demonstrated that B1R mRNA level were increased roughly 3 times in STZ-Diab mice compared to NonDiab mice ($p < 0.01$). Similarly, B2R mRNA level were also increased 2 times compared to Non-Diab mice ($p < 0.01$) (Fig.1).

B1R agonist treatment had no effect on wound closure. B1R-ag treatment had no effect on wound closure in NonDiab mice (Fig.2A) and in STZ-Diab mice (Fig.2B). Moreover, histological analysis showed that B1R activation did not alter skin organisation and had no effect on epidermal thickness, neither in intact surrounding skin nor in wounded skin (data not shown).

B2R activation delays wound closure in mice. In NonDiab mice, B2R-ag treatment significantly delayed wound healing from the 1st day of treatment onward (Fig.2A). Co-treatment with the B2R-ant totally abrogated the wound healing delaying effect of B2R-ag. Kinetic profile of wound closure in mice co-treated with B2R-ag and B2R-ant was indistinguishable from PBS-treated mice (Fig.2A). In STZ-Diab mice, wound closure was significantly delayed when compared with NonDiab mice (Fig.2B). On day 11, wounds were healed in NonDiab mice whereas they remained open in STZ-Diab mice ($12.7 \pm 1.2 \%$, $p < 0.05$). In STZ-Diab mice, B2R-ag treatment resulted in a further significant delay in wound healing from the 1st day of treatment onward (Fig.2B). On day 11, wound area was 2.3 times larger in B2R-ag-treated STZ-Diab mice compared to PBS-treated STZ-Diab mice ($p < 0.05$).

B2R blockade improves skin wound healing in two models of diabetic mice. B2R-ant alone had no significant effect on wound healing in NonDiab mice (Fig.2A) but significantly improved skin wound healing in diabetic mice. In STZ-Diab mice, wound area was reduced on the 1st day of B2R-ant treatment and was indistinguishable from NonDiab mice during the 11 days follow-up period (Fig.2B). The beneficial effect of B2R-ant on wound healing was also observed in another diabetic model, db/db-Diab mice. In these mice, B2R-ant significantly reduced wound area during the 11th days of treatment (Fig.2C). On day 11, wound area was 3.2 times smaller in B2R-ant-treated db/db-Diab mice compared to PBS-treated db/db-Diab mice ($p < 0.05$).

B2R activation induces epidermal thickening and skin layer disorganization in wounded skin. B2R activation induced no alteration in intact part of skin in NonDiab and STZ-Diab mice (data not shown). But, in the wound of NonDiab and Diab mice, B2R-ag treatment induced important skin layer disorganisation, with a defect in skin and epidermal maturation, hypervascularisation and hypercellularisation of granulation tissue (Fig.3A). In B2R-ag-treated NonDiab mice, epidermal thickness of wound area was increased compared to PBS-treated mice ($111.1 \pm 8.7 \mu\text{m}$ vs $69.9 \pm 5.7 \mu\text{m}$; $p < 0.05$). This effect was abrogated by co-treatment with B2R-ant ($56.3 \pm 8.2 \mu\text{m}$; $p < 0.05$) (Fig.3B).

In Diab mice, treatment with B2R-ag had no further effect on epidermal thickness (Fig.3C).

B2R antagonist treatment restores wounded skin histology in diabetic mice

After B2R-ant treatment alone, the epidermis of Diab-mice was histologically indistinguishable from NonDiab mice (Fig.3A). B2R-ant decreased by 45% the epidermal thickness of diabetic wounds ($112.4 \pm 21.9 \mu\text{m}$ vs $206.3 \pm 21.6 \mu\text{m}$; $p < 0.05$) (Fig.3C).

B2R activation unbalances keratinocyte and fibroblast proliferation in vitro. Treatment with B1R-ag or B2R-ag significantly increased keratinocyte proliferation, assayed using Quick Cell Proliferation Assay kit (+36% to 46% at 48h, $p < 0.05$) (Fig.4A). Moreover, fibroblast proliferation was significantly decreased by the B2R-ag (-33% at 48h, $p < 0.05$) but was not altered by the B1R-ag (Fig.4B). These B2R-ag effects on cell proliferation were abolished by co-treatment with B2R-ant (Fig.4). B2R-ant alone had no effect on cell proliferation.

B2R activation stimulates keratinocyte but not fibroblast migration. Figure 5 shows that keratinocyte migration, assessed using scratch assay, was significantly stimulated with B2R-ag during the 30 hours scratch closure process and independently of the dose used (wound closure +32% compared to medium alone after 24h, $p < 0.05$). This effect was abolished in presence of the B2R-ant (Fig.5B). B2R-ant alone or B1R-ag had no effect on cell migration (Fig.5B). B2R-ag treatment had no effect on fibroblast migration (data not shown).

B2R activation induces ERK phosphorylation in keratinocytes. B2R-ag induced phosphorylation of ERK-1/2 in keratinocytes. Peak phosphorylation occurred 5 to 40 min after stimulation ($p < 0.05$) and thereafter, the phosphorylation level gradually decreased (60-120 min). This effect was blocked by B2R-ant co-treatment (Fig.6).

Discussion

The main findings of the present study are that kinin B2R activation delays healing in non-diabetic and diabetic mouse skin wound models. Treatment with a selective B2R antagonist accelerates skin wound repair in diabetic mice. The healing effect of B2R antagonist was consistent in two different murine models of diabetes, close to either type 1 or type 2 human diabetes. The deleterious effects of B2R activity in the wounded skin may involve unbalancing of keratinocyte and fibroblast proliferation during the re-epithelialisation and scar remodelling phases after injury.

Previous reports indicated that B1R and B2R are present in healthy human skin and in skin of patients with cutaneous wound or proliferative skin diseases[11-13]. We show that both receptors are present in murine skin and are upregulated by diabetes mellitus.

Kinins can exert their biological actions through these two types of G protein-coupled membrane receptors. While the B2R is constitutively present in most tissues and mediates the main effect of kinins, the B1R is considered as being mainly inducible and its functions are less well understood. Interestingly, we recently showed that B1R activation protects the heart against ischemia damage[29] and has pro-angiogenic effects in a diabetic mouse model of hindlimb ischemia[10]. However in the skin, B1R activation had no effect on wound healing in mice, diabetic or non-diabetic. This receptor does not seem to be importantly involved in control of skin trophicity in diabetes, despite its strong induction by chronic hyperglycaemia.

By contrast, B2R activation disorganized the architecture of the wound, increased epidermis thickness and significantly delayed wound healing in mice. The deleterious effect of B2R activation on wound repair was observed in both non-diabetic and diabetic mice and was additive to the effect of diabetes. Co-treatment with a specific B2R antagonist abrogated the effects of B2R agonist administration indicating that these effects were truly due to B2R activation.

Wound healing involves tightly regulated humoral and cellular processes. Alteration of these timely-controlled processes by chronic hyperglycaemia expands tissue damage and delays tissue repair[30]. After a cutaneous injury, the healing process can be divided into four successive, overlapping phases: coagulation, inflammation, cell migration and proliferation, and remodelling. Kinins, through B2R activation, could likely influence several of these phases.

The first steps of wound healing are haemostasis and inflammation[30]. Kinins, through vascular endothelium activation, have anti-clotting and profibrinolytic effects[31,32], increase blood flow and trigger leucocyte migration[33]. In our study, pharmacological manipulation of B2R activity influenced wound repair already on the first day of follow-up after surgery. This observation suggests that kinins influence the initial phase of wound repair.

But kinins can also influence late phases. Our histological results show that B2R agonist induced skin disorganisation and increased epidermal thickness and hypercellular granulation tissue. Moreover, previous studies suggested that bradykinin enhances keratinocyte motility[34] and differentiation even if effect on cell proliferation is unclear[12,14]. All these findings suggest that kinins influence proliferative and remodelling phases of healing. In this context, we studied *in vitro* effect of B2R activation on proliferation and migration of the two major cell types involved in scar formation: keratinocytes and fibroblasts. Our results show that B2R activation inhibited fibroblast proliferation but increased keratinocyte proliferation and migration in a cell layer injury model. These *in vitro* effects of B2R agonist are consistent with the wound repair delaying effect observed *in vivo*. Indeed, accumulation of fibroblasts, formation of granulation tissue, reconstitution of the dermis and reformation of an intact

epidermis *via* keratinocyte migration and proliferation are important features of the wound healing process[30]. Skin layer disorganization, involving stratum corneum, epidermis and dermis, observed in mice treated with B2R agonist, especially in diabetic mice, may thus reflect unbalance between hypo-proliferation of fibroblasts and hyper-proliferation of keratinocytes, impairing healing. Stimulation of keratinocyte proliferation and migration *in vitro* by B2R activation is in line with the thickening of epidermis observed in B2R agonist treated mice.

B2R activation effects on keratinocytes were associated with ERK-1/2 phosphorylation. This result is in agreement with previous observations showing that keratinocyte migration, proliferation and wound re-epithelialization involve ERK activation[35-37] and confirms the importance of this pathway in keratinocyte functionality.

The deleterious effect of B2R stimulation on wound healing was additive to the effect of diabetes. Abnormal keratinocyte and fibroblast migration, proliferation and differentiation, and decreased vascularisation contribute to delayed wound healing in diabetic patients[4,38]. In these patients, keratinocytes in epidermis of chronic ulcers are highly proliferative[39]. B2R agonist treatment probably worsened keratinocyte hyper-proliferation due to diabetes and stimulated migration, resulting in abnormal scar remodelling.

Interestingly, whereas B2R antagonist alone had no effect on the wounded skin in non-diabetic mice, it significantly accelerated wound repair in diabetic mice. Indeed, B2R blockade restored the normal proliferation and maturation pattern of the wounded epidermis in a murine model of type 1 diabetes (STZ). The beneficial effect on wound healing of B2R antagonist was extended to a second diabetic mouse model, closer to type 2 human diabetes (db/db mice). These observations indicate that endogenous kinins exert deleterious effects opposing wound repair in diabetic skin. The lack of effect of B2R antagonist in non-diabetic mice may be explained by low kinins bioavailability and/or reduced B2R synthesis in the skin in normoglycaemic condition. By contrast, in diabetes, B2R synthesis is upregulated in the skin and kinins production may also be enhanced.

In conclusion, B2R but not B1R activation exerts deleterious effects in the wounded mouse skin resulting in delayed healing, especially in diabetic animals. B1 and B2 receptors are upregulated by diabetes in skin. Treatment with a B2R antagonist accelerates wound repair in two different mouse models of diabetes. Improving skin healing is still a therapeutic issue in diabetic patients, especially for treatment of foot ulcers. A kinin B2R antagonist, already approved clinically in an unrelated indication[40], may become new treatment for diabetic cutaneous injury.

Clinical perspectives

- Impairment of skin wound repair is a major complication of diabetes, favouring development of foot ulcers and contributing to their poor prognosis. Improving skin healing is a therapeutic issue in diabetic patients.

- Our study revealed that treatment with a kinin B2-receptor antagonist normalizes wound repair in two mouse models of diabetes, close to either type 1 or type 2 human diabetes.

- B2-receptor antagonism, already approved clinically in an unrelated indication, may become new treatment for cutaneous injury in diabetic patients.

Author contributions

D.D., L.W, V.D., F.A-G., R.R., N.B. made substantial contribution to the design, acquisition and analysis of data and have drafted the manuscript script. C.C., C.T. made substantial contribution to acquisition of data. All authors have reviewed and approved the final version.

Acknowledgments

The authors thank M. Moreau (Cordeliers Research Center, Paris) and the crew of the Functional Exploration Center (Cordeliers Research Center, Paris) for technical assistance and support in mice studies. We are very grateful to Pr P. Bruneval (anatomy and pathology department, European Hospital Georges Pompidou, Paris France) for his expert help in histological analysis.

Funding

This work was supported by Société Francophone du Diabète, Institut National de la Santé Et de la Recherche Medicale, Paris-Descartes University, Pierre and Marie Curie University.

Duality of interest

The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

References

1. Ramsey S.D., Newton K., Blough D., McCulloch D.K., Sandhu N., et al. (1999) Incidence, outcomes, and cost of foot ulcers in patients with diabetes. *Diabetes Care* **22**: 382-387
2. Bartus C.L., Margolis D.J. (2004) Reducing the incidence of foot ulceration and amputation in diabetes. *Curr. Diab. Rep.* **4**: 413-418
3. Boulton A.J., Vileikyte L., Ragnarson-Tennvall G., Apelqvist J. (2005) The global burden of diabetic foot disease. *Lancet* **366**: 1719-1724
4. Brem H., Tomic-Canic M. (2007) Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* **117**: 1219-1222
5. Falanga V. (2005) Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* **366**: 1736-1743
6. Couture R., Blaes N., Girolami J.P. (2014) Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **12**: 223-248
7. Waeckel L., Potier L., Richer C., Roussel R., Bouby N., et al. (2013) Pathophysiology of genetic deficiency in tissue kallikrein activity in mouse and man. *Thromb. Haemost.* **110**: 476-483
8. Furchgott R.F., Vanhoutte P.M. (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* **3**: 2007-2018
9. Couture R., Harrisson M., Vianna R.M., Cloutier F. (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* **429**: 161-176
10. Desposito D., Potier L., Chollet C., Gobeil F. Jr., Roussel R., et al. (2015) Kinin receptor agonism restores hindlimb postischemic neovascularization capacity in diabetic mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **352**: 218-226
11. Komatsu N., Takata M., Otsuki N., Toyama T., Ohka R., et al. (2003) Expression and localization of tissue kallikrein mRNAs in human epidermis and appendages. *J. Invest. Dermatol.* **121**: 542-549
12. Vidal M.A., Astroza A., Matus C.E., Ehrenfeld P., Pavicic F., et al. (2005) Kinin B2 receptor-coupled signal transduction in human cultured keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **124**: 178-186
13. Schremmer-Danninger E., Naidoo S., Neuhof C., Valeske K., Snyman C., et al. (2004) Visualisation of tissue kallikrein, kininogen and kinin receptors in human skin following trauma and in dermal diseases. *Biol. Chem.* **385**: 1069-1076
14. Poblete M.T., Reynolds N.J., Figueroa C.D., Burton J.L., Muller-Esterl W., et al. (1991) Tissue kallikrein and kininogen in human sweat glands and psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.* **124**: 236-241
15. Milia A.F., Del Rosso A., Pacini A., Manetti M., Marrelli A., et al. (2005) Differential expression of tissue kallikrein in the skin of systemic sclerosis. *Histol. Histopathol.* **20**: 415-422
16. Pietrovski E.F., Paludo K.S., Mendes D.A., Guimaraes F.de S., Veiga S.S., et al. (2011) B1 and B2 kinin receptor participation in hyperproliferative and inflammatory skin processes in mice. *J. Dermatol. Sci.* **64**: 23-30
17. Warren J.B., Loi R.K. (1995) Captopril increases skin microvascular blood flow secondary to bradykinin, nitric oxide, and prostaglandins. *FASEB J.* **9**: 411-418
18. Johnson M.S., Ryals J.M., Wright D.E. (2008) Early loss of peptidergic intraepidermal nerve fibers in an STZ-induced mouse model of insensate diabetic neuropathy. *Pain* **140**: 35-47
19. Ebrahimian T.G., Squiban C., Roque T., Lugo-Martinez H., Hneino M., et al. (2012) Plasminogen activator inhibitor-1 controls bone marrow-derived cells therapeutic

- effect through MMP9 signaling: role in physiological and pathological wound healing. *Stem Cells* **30**: 1436-1446
20. Balaji S., Lesaint M., Bhattacharya S.S., Moles C., Dhamija Y., et al. (2014) Adenoviral-mediated gene transfer of insulin-like growth factor 1 enhances wound healing and induces angiogenesis. *J. Surg. Res.*
 21. Cote J., Savard M., Bovenzi V., Belanger S., Morin J., et al. (2009) Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles. *Peptides* **30**: 788-795
 22. Belanger S., Bovenzi V., Cote J., Neugebauer W., Amblard M., et al. (2009) Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin B2 receptor. *Peptides* **30**: 777-787
 23. Wirth K., Hock F.J., Albus U., Linz W., Alpermann H.G., et al. (1991) Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br. J. Pharmacol.* **102**: 774-777
 24. Tschöpe C., Seidl U., Reinecke A., Riester U., Graf K., et al. (2003) Kinins are involved in the antiproteinuric effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in experimental diabetic nephropathy. *Int. Immunopharmacol.* **3**: 335-344
 25. Bodin S., Chollet C., Goncalves-Mendes N., Gardes J., Pean F., et al. (2009) Kallikrein protects against microalbuminuria in experimental type I diabetes. *Kidney Int.* **76**: 395-403
 26. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408
 27. Guo S., Al-Sadi R., Said H.M., Ma T.Y. (2013) Lipopolysaccharide causes an increase in intestinal tight junction permeability in vitro and in vivo by inducing enterocyte membrane expression and localization of TLR-4 and CD14. *Am. J. Pathol.* **182**: 375-387
 28. Fronza M., Heinzmann B., Hamburger M., Laufer S., Merfort I. (2009) Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *J. Ethnopharmacol.* **126**: 463-467
 29. Potier L., Waeckel L., Vincent M.P., Chollet C., Gobeil F. Jr., et al. (2013) Selective kinin receptor agonists as cardioprotective agents in myocardial ischemia and diabetes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **346**: 23-30
 30. Li J., Chen J., Kirsner R. (2007) Pathophysiology of acute wound healing. *Clin. Dermatol.* **25**: 9-18
 31. Brown N.J., Gainer J.V., Murphey L.J., Vaughan D.E. (2000) Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release from human forearm vasculature through B(2) receptor-dependent, NO synthase-independent, and cyclooxygenase-independent pathway. *Circulation* **102**: 2190-2196
 32. Murphey L.J., Malave H.A., Petro J., Biaggioni I., Byrne D.W., et al. (2006) Bradykinin and its metabolite bradykinin 1-5 inhibit thrombin-induced platelet aggregation in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **318**: 1287-1292
 33. Blaes N., Girolami J.P. (2013) Targeting the 'Janus face' of the B2-bradykinin receptor. *Expert. Opin. Ther. Targets* **17**: 1145-1166
 34. Coutant K.D., Corvaia N., Ryder N.S. (1997) Bradykinin induces actin reorganization and enhances cell motility in HaCaT keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **237**: 257-261
 35. Gao L., Chao L., Chao J. (2010) A novel signaling pathway of tissue kallikrein in promoting keratinocyte migration: activation of proteinase-activated receptor 1 and epidermal growth factor receptor. *Exp. Cell. Res.* **316**: 376-389

36. Li W., Henry G., Fan J., Bandyopadhyay B., Pang K., et al. (2004) Signals that initiate, augment, and provide directionality for human keratinocyte motility. *J. Invest. Dermatol.* **123**: 622-633
37. Pastore S., Mascia F., Mariani V., Girolomoni G. (2008) The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *J. Invest. Dermatol.* **128**: 1365-1374
38. Albiero M., Menegazzo L., Boscaro E., Agostini C., Avogaro A., et al. (2011) Defective recruitment, survival and proliferation of bone marrow-derived progenitor cells at sites of delayed diabetic wound healing in mice. *Diabetologia* **54**: 945-953
39. Usui M.L., Mansbridge J.N., Carter W.G., Fujita M., Olerud J.E. (2008) Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *J. Histochem. Cytochem.* **56**: 687-696
40. Cicardi M., Banerji A., Bracho F., Malbran A., Rosenkranz B., et al. (2010) Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema. *N. Engl. J. Med.* **363**: 532-541

TABLE 1: Weight and blood glucose level of different experimental groups at time of wounding (beginning of the experiment) and 11 days after wounding (end of the experiment).

	n	Beginning of experiment		End of experiment	
		Weight (g)	Blood glucose (mg/dL)	Weight (g)	Blood glucose (mg/dL)
NonDiab	30	26.2 ± 0.5	178 ± 6	25.7 ± 0.4	156 ± 12
STZ-Diab					
PBS-treated	22	23.3 ± 0.2	471 ± 17 **	22.8 ± 0.3	464 ± 13 **
B1R-ag-treated	21	23.5 ± 0.2	500 ± 17 **	23.9 ± 0.2	452 ± 21 **
B2R-ag-treated	20	22.5 ± 0.2	456 ± 26 **	23.3 ± 0.3	438 ± 32 **
B2R-ant-treated	7	23.0 ± 0.3	460 ± 34 **	24.0 ± 0.5	453 ± 26 **
db/db mice					
PBS-treated	10	43.2 ± 0.9	386 ± 25 **	44.5 ± 1.2	379 ± 27 **
B2R-ant-treated	10	43.5 ± 0.4	385 ± 34 **	45.8 ± 0.8	394 ± 29 **

** $p < 0.001$: glucose level in all Diab groups vs NonDiab. NS among Diab groups.

Figure legends

Fig.1: B1R and B2R mRNA levels are increased in diabetic skin.

Kinin receptor mRNA level in non-diabetic and diabetic mouse skin (wounded or not), measured by RT-qPCR. Data are mean±SEM, n=7/group. **:p<0.01 Diab vs NonDiab

Fig.2: B2R but not B1R activation influences wound healing in NonDiab mice and in Diab mice.

Representative photographs of wound area at day 0 and 11 and time course of wound closure (**A:** NonDiab mice; **B:** STZ-Diab mice; **C:** db/db-Diab mice). Results are expressed in percentage of initial wound area at day 0. Data are mean±SEM, n=7-30/group. *:p<0.05 and **:p<0.01 vs PBS-control in each series; \$:p<0.05 and \$\$:p<0.01 Diab vs NonDiab.

Fig.3: B2R but not B1R activation increases epidermal thickness and worsens skin disorganization in wounded skin in NonDiab and STZ-Diab mice.

(**A**) Representative photographs of Masson's trichrome-stained sections of wounds at day 11 (2x; 10x; 25xmagnification) documenting change in the skin organization. Note thickness of epidermis and vascularisation and cellularisation of dermis. Bar = 1mm. (**B**) Quantification of epidermal thickness of the scar in NonDiab mice and STZ-Diab mice. Data are mean±SEM, n=7/group.

Fig.4: B2R activation unbalances keratinocytes/fibroblasts proliferation.

Cell proliferation after 48h of treatment with B1R-ag, B2R-ag and/or B2R-ant (**A:** keratinocytes; **B:** fibroblasts) at indicated doses. Data are mean±SEM, n=6 wells/group.

Fig.5: B2R but not B1R activation stimulates keratinocyte migration.

(**A**) Representative images of keratinocytes migration (10×magnification) at 0, 15 and 30h post scratch. Scratch area is delimited by black box. (**B**) Scratch closure after 24h of treatment. Data are mean±SEM and expressed as percentage of scratch width measured at 0h. Each data point represents n=8 wells. *:p<0.05; **:p<0.01 and ***:p<0.001 vs CTL.

Fig.6: B2R activation induces ERK phosphorylation in keratinocytes.

Phosphorylation of ERK-1/2 on keratinocyte lysates assessed by Western blotting after 0, 2, 5, 15 and 40 minutes of treatment with B2R-ag (1×10^{-6} mol.L⁻¹) and/or B2R-ant (1×10^{-5} mol.L⁻¹). Results are representative of 3-5 independent experiments. *:p<0.05 vs t=0min.

Summary statements

Kinin B2-receptor activation impairs skin wound healing in mice, in part through imbalance of keratinocyte/fibroblast proliferation. Such activation occurs in diabetes and contributes to delaying wound healing. B2-receptor blockade restores normal wound healing pattern in mouse models of diabetes.

Figure 1

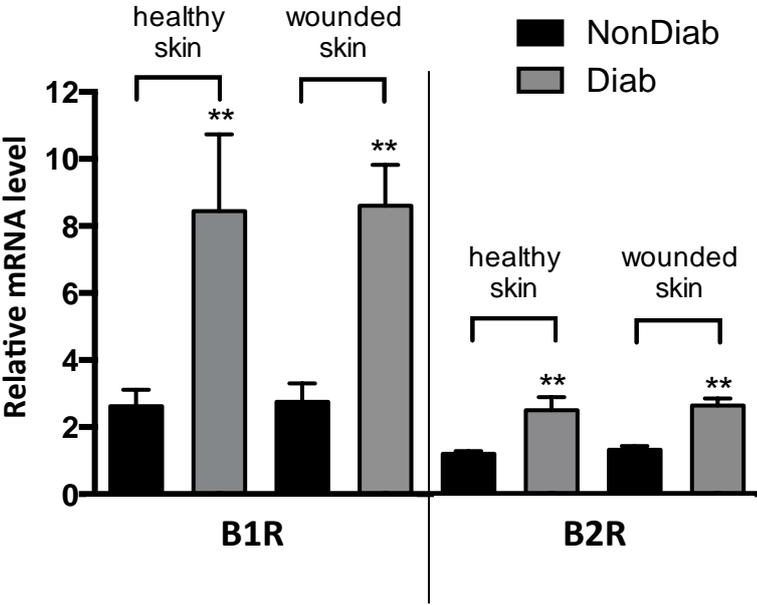


Figure 2

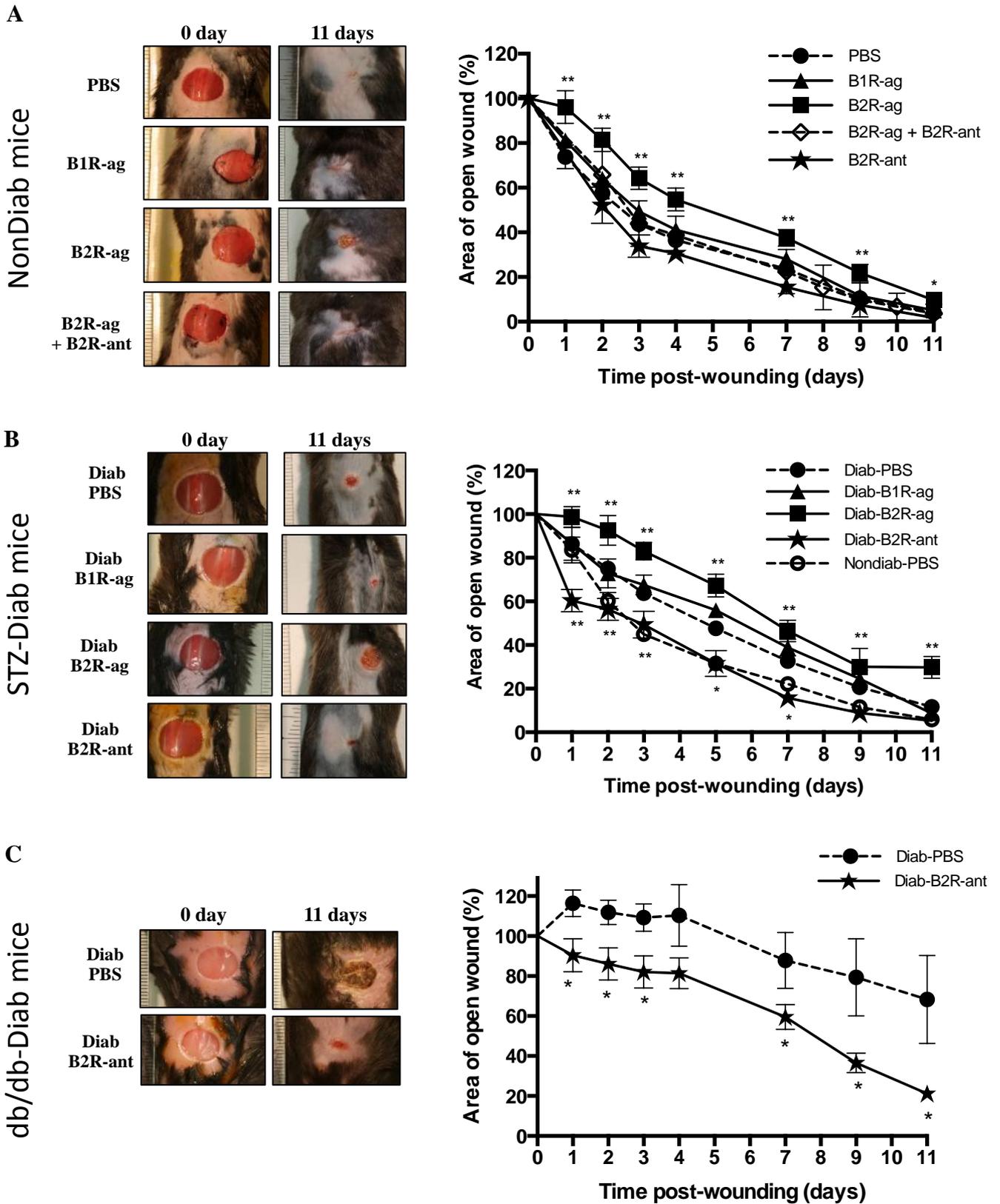


Figure 3

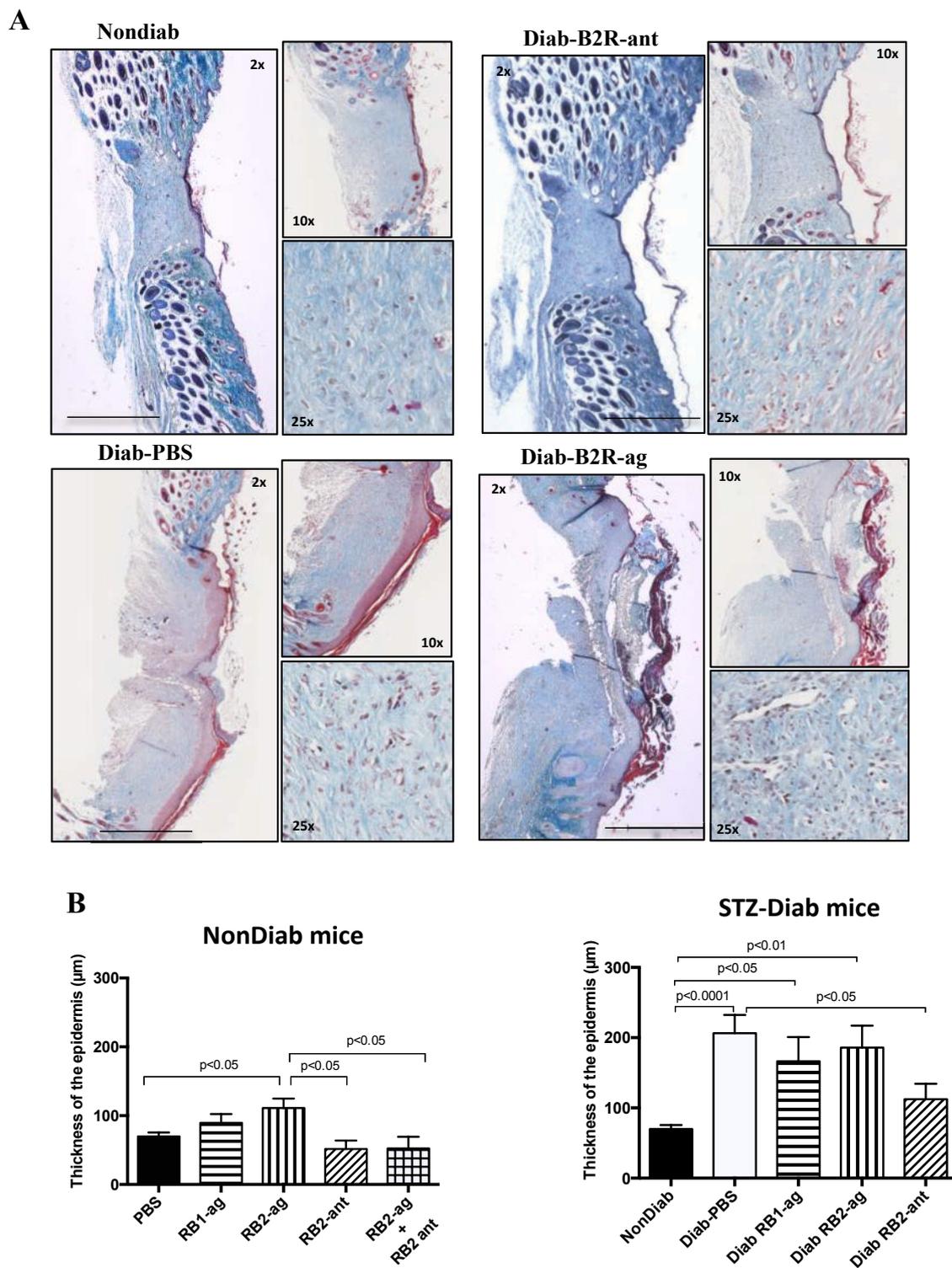


Figure 4

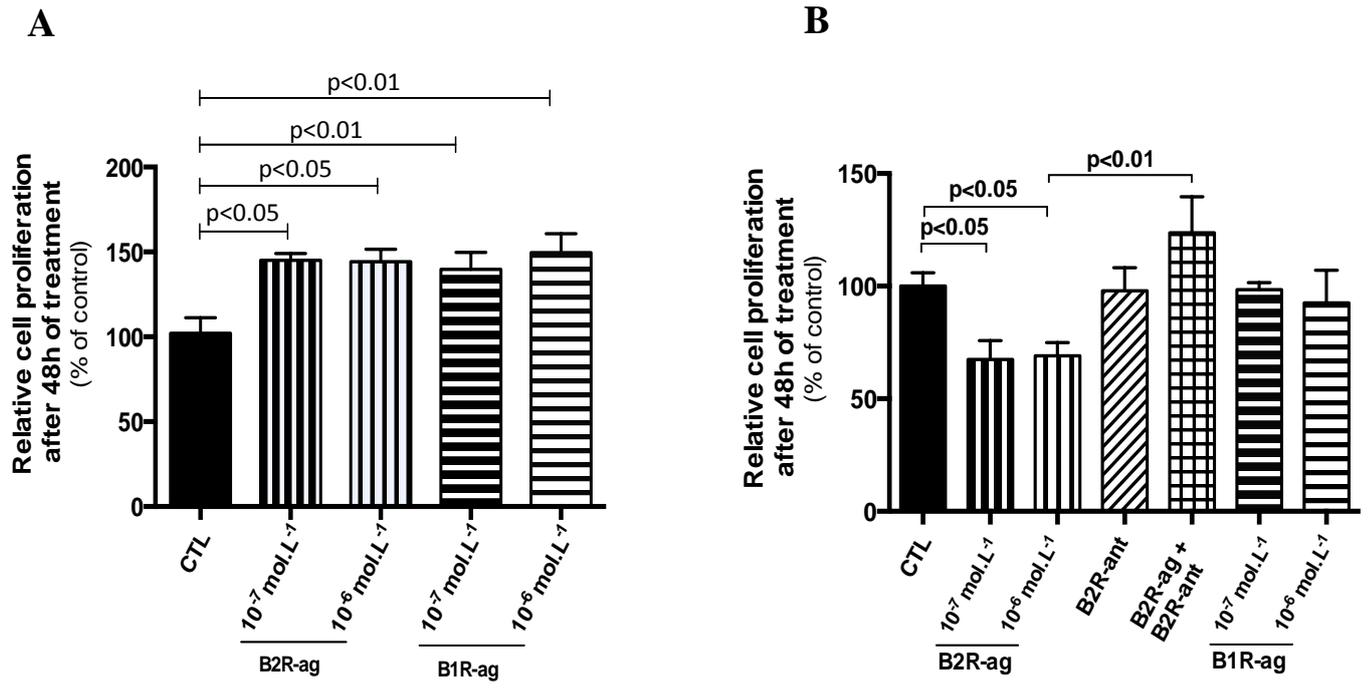


Figure 5

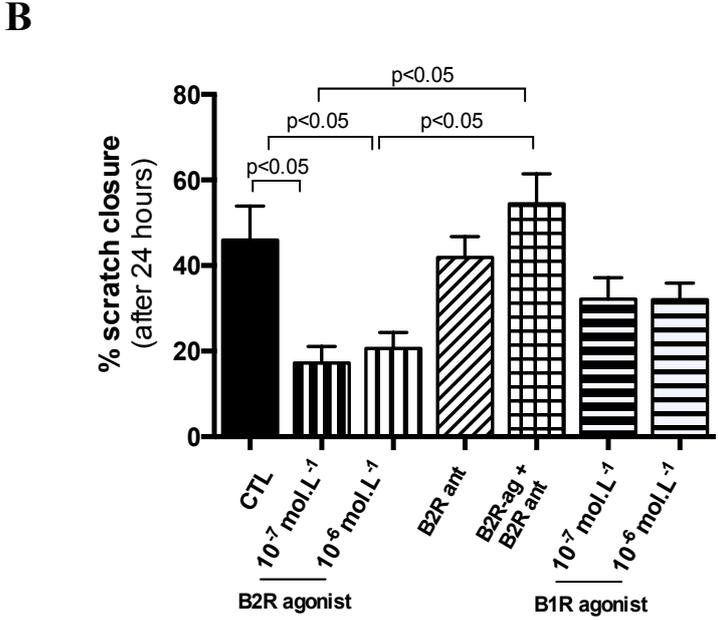
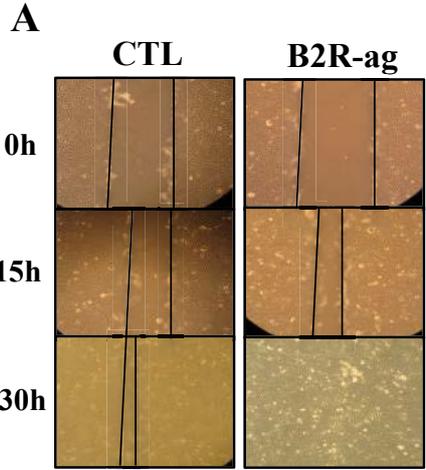
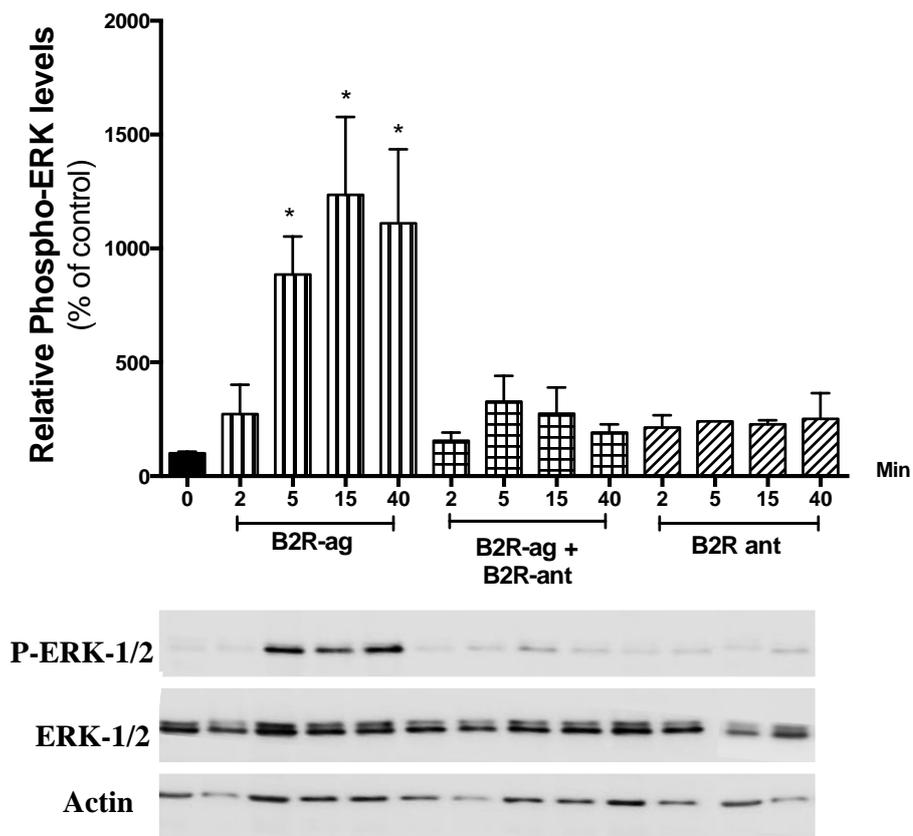


Figure 6



4.3. Expérimentations supplémentaires

4.3.1. Expériences *in vivo*

4.3.1.1. Matériels et méthodes

a) Souris TK^{-/-}

Des souris TK^{-/-}, mâles et produites au laboratoire, ont été utilisées. Les souris contrôles sont des souris C57Bl/6, mâles, âgées de 8 semaines, obtenues de chez Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). Deux séries ont été réalisées :

- une série « non-diabétique » : lorsque les souris atteignaient un âge de 12 semaines, une plaie de 8 millimètres de diamètre a été réalisée (*Annexe 2*) (n = 7 / groupe).

- une série « diabétique » : le diabète a été induit par injection de STZ chez des souris TK^{-/-} ou C57Bl/6, âgées de 8 semaines. Après 5 semaines de diabète confirmé, une plaie de 8 millimètres de diamètre a été réalisée (n = 7 / groupe).

b) Application locale de RB1-ag ou de RB2-ag

Des souris C57Bl/6 mâles, âgées de 10 semaines et obtenues de chez Charles River Laboratories (L'Arbresle, France), ont été utilisées dans cette étude. A J0, une plaie de 8 millimètres de diamètre a été réalisée (*Annexe 2*). Quotidiennement et pendant 11 jours, une crème contenant une dose de 720 nmol/kg de RB1-ag ou de RB2-ag a été appliquée sur la plaie. Le RB1-ag ou le RB2-ag ont été préalablement dissous dans 50 µL de PBS puis ajoutés à une base de crème neutre (excipient hydrocrème, Laboratoires Spirig, France).

Dans toutes les séries expérimentales réalisées, l'évolution de la fermeture de la plaie a été suivie quotidiennement par la prise de photographies et la mesure de l'aire de la plaie. Après 11 jours, les souris ont été sacrifiées et la cicatrice a été prélevée afin de réaliser des études histologiques. Les résultats ont été exprimés en pourcentage par rapport à l'aire de la plaie mesurée à J0.

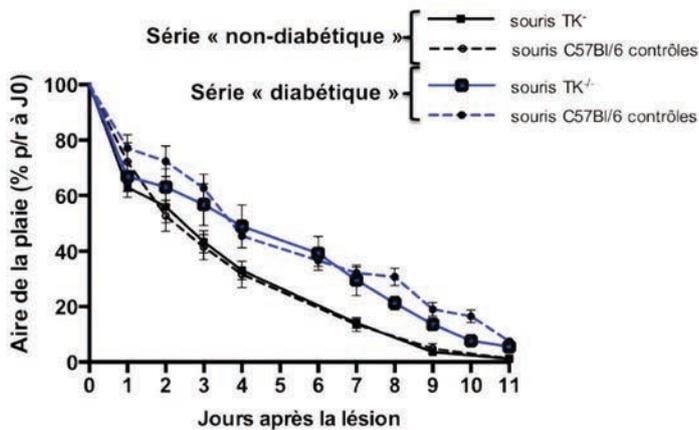
c) Etude de mortalité

Toutes les séries utilisées dans cette étude (séries décrites dans l'article et séries décrites ci-dessus) ont été incluses dans l'étude de mortalité associée au traitement par RB1-ag, RB2-ag et RB2-ant.

4.3.1.2. Résultats

a) Souris TK^{-/-}

Le diabète entraîne un retard de cicatrisation chez la souris C57Bl/6 contrôle et chez la souris TK^{-/-} (p<0,05). En revanche, la déficience en TK n'a pas d'effet sur les délais de cicatrisation, chez la souris diabétique et chez la souris non-diabétique (Figure 18). De plus, aucune différence histologique n'a été mise en évidence entre les souris TK^{-/-} et leurs contrôles (non-diabétiques ou diabétiques).



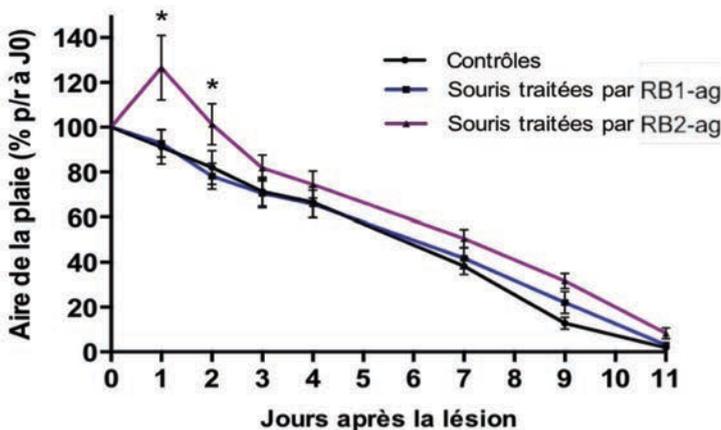
On observe aucune différence significative entre les souris TK^{-/-} et leurs contrôles C57Bl/6 respectifs (non-diabétiques, en noir, et diabétiques, en bleu).

Test statistique ANOVA two-way suivi d'un test de multiple comparaison de Turkey.

Figure 18 : Cinétique d'évolution de la cicatrisation chez la souris TK^{-/-} non-diabétique et diabétique.

b) Application locale de RB1-ag ou de RB2-ag

L'application locale, comme l'administration par voie i.p., de RB1-ag n'a pas d'effet sur la cicatrisation chez la souris non-diabétique. En revanche, l'administration locale de RB2-ag est délétère dès le premier jour d'application. Cependant, après le 3^{ème} jour de traitement, cet effet disparaît (Figure 19).



Le RB1-ag n'a pas d'effet sur la cicatrisation.

L'application locale de RB2-ag ralentit la cicatrisation de façon significative les 2^{es} jours. Après le 3^{ème} jour de traitement par le RB2-ag, la cinétique de cicatrisation est identique à celle des souris contrôles.

* : p<0,05 (test ANOVA two-way suivi d'un test de multiple comparaison de Turkey).

Figure 19 : Cinétique de cicatrisation après une application locale de RB1-ag ou de RB2-ag.

c) Etude de mortalité

Les différents résultats concernant la mortalité des souris dans les différentes séries sont décrits dans le tableau suivant (*Tableau 4*) :

Série	Traitement	n / groupe	n de mort	% de mortalité
Non-diabétique	Aucun	20	0	0
	RB1-ag	20	1	5
	RB2-ag	20	3	15
	RB2-ant	10	0	0
	RB2-ag + RB2-ant	8	0	0
Diabétique STZ	Aucun	40	0	0
	RB1-ag	20	9	45
	RB2-ag	30	13	43
	RB2-ant	8	1	12,5
Diabétique db/db	Aucun	10	0	0
	RB2-ag	8	6	75
	RB2-ant	8	1	12,5
Application locale	Aucun	10	0	0
	RB1-ag	10	0	0
	RB2-ag	10	0	0
Non-diabétique TK-/-	Aucun	10	0	0
	RB1-ag	10	0	0
	RB2-ag	10	0	0
Diabétique TK-/-	Aucun	10	0	0
	RB1-ag	10	0	0
	RB2-ag	10	0	0

Tableau 4 : Récapitulatif de la mortalité des souris en fonction des séries étudiées.

Chez les souris non-diabétiques, le traitement par l'intermédiaire d'une minipompe implantée en intrapéritonéale entraîne une mortalité faible dans les différents groupes réalisés (<15%). En revanche, en cas de diabète, cette mortalité est fortement augmentée en cas de traitement par le RB1-ag ou le RB2-ag (43 à 75 % de mortalité dans ces groupes). Le traitement par le RB2-ant chez la souris présentant un DT1 (STZ-Diab) ou un DT2 (db/db-Diab) est faible (12,5 %).

L'application locale de RB1-ag ou de RB2-ag n'a pas d'effet sur la mortalité des animaux.

La mortalité des souris traitées par voie intrapéritonéale par le RB2-ag est très importante notamment en cas de diabète (43% en cas de DT1 et 75% en cas de DT2).

4.3.2. Expériences *in vitro*

4.3.2.1. Matériels et méthodes

a) Culture et prolifération de fibroblastes primaires

Les fibroblastes ont été obtenus à partir de peau de souris C57Bl/6, obtenus au laboratoire. La peau a été découpée en petits carrés de deux millimètres de côté, déposée au centre d'un puits d'une plaque de 6 puits, et recouverte par une lamelle stérile. Du milieu de culture DMEM (ou Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 5 % de sérum de veau nouveau-né (NBCS, Gibco, LifeTechnologies, UK), 5% de sérum bovin fœtal (FBS, Gibco, LifeTechnologies, UK) et des antibiotiques (50 U/mL Penicilline et 50 U/mL Streptomycine) a été ajouté dans chaque puits. La plaque de 6 puits a ensuite été incubée à 37°C pendant 3 ou 4 jours. A confluence ou après 10 jours de mise en culture, la lamelle et les explants de peau ont été retirés ; et le lendemain, les cellules ont été nettoyées puis passées dans une flasque T25. Le milieu de culture a été changé tous les 3 jours. Quand les cellules étaient à confluence, elles étaient passées dans une flasque de taille supérieure. Les fibroblastes d'origine primaire doivent être utilisés avant leur septième passage après lequel ils commencent à se différencier.

Comme pour les expérimentations réalisées et décrites dans l'article, la prolifération des fibroblastes primaires (passage 6) a été mesurée à l'aide du test de prolifération « Quick Cell Proliferation Assay kit » (Abcam, Cambridge, USA). Les cellules ont été mises en culture dans une plaque de 96 puits (1×10^4 cellules/puits) et incubées avec le RB2-ag à des doses de 10^{-6} mol.L⁻¹ et 10^{-7} mol.L⁻¹. Cette expérience a été réalisée deux fois.

b) Voie de signalisation de l'EGFR

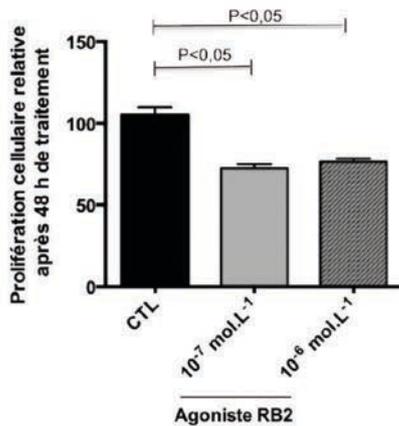
Les expérimentations concernant la voie de signalisation de l'EGFR ont été réalisées sur des kératinocytes par Western-Blot de la même manière que celles réalisées pour la voie de signalisation d'Erk-1/2 et décrites dans l'article. Préalablement, les kératinocytes ont été mis en culture dans des plaques de 6 puits. Une fois à confluence, les différents traitements ont été ajoutés dans le milieu de culture (RB2-ag, RB2-ant ou les deux) pendant 2 à 40 minutes. Les membranes ont été incubées avec les anticorps de lapin d'EGFR sous sa forme phosphorylée ou sous sa forme totale (dilution 1/1000 ; Abcam, Cambridge, USA). Les résultats ont été confirmés en répétant l'expérience trois fois.

4.3.2.2. Résultats

a) Culture et prolifération de fibroblastes primaires

Bien que nous n'ayons pas pu obtenir suffisamment de fibroblastes à partir des explants de peau de souris C57BL/6 pour réaliser toutes les expérimentations, nous avons tout de même pu réaliser des expériences de prolifération cellulaire sur ces fibroblastes.

La prolifération des fibroblastes issus de culture primaire est inhibée en présence de RB2-ag et ceci de façon indépendante de la dose utilisée (10^{-6} mol.L⁻¹ ou 10^{-7} mol.L⁻¹) (Figure 20). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec la lignée de fibroblastes d'origine murine NIH-3T3 décrits dans l'article.



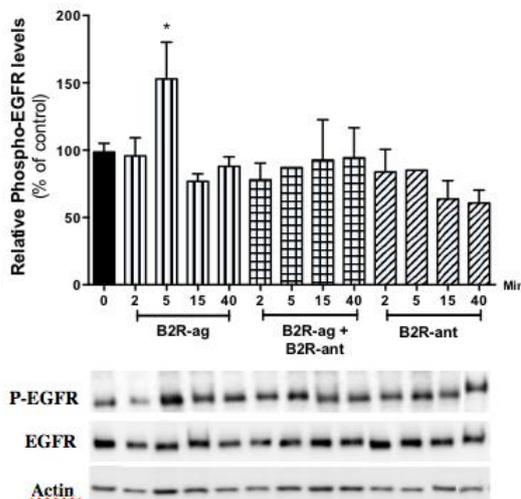
L'addition de RB2-ag dans le milieu de culture à la dose de 10^{-6} mol.L⁻¹ ou de 10^{-7} mol.L⁻¹ diminue de façon significative la prolifération des fibroblastes après 48 heures ($p < 0,05$).

Test statistique : test ANOVA one-way suivi d'un test de multiple comparaison de Dunnett

Figure 20 : Prolifération des fibroblastes de culture primaire.

b) Voie de signalisation de l'EGFR

Au niveau des kératinocytes, l'activation spécifique des RB2 (dose de 10^{-6} mol.L⁻¹) induit une phosphorylation de l'EGFR (Figure 21).



L'addition du RB2-ag dans le milieu de culture stimule de façon brève mais significative la phosphorylation de l'EGFR. Le pic de phosphorylation est observé après 5 minutes de traitement ($p < 0,05$). Ces effets sont bloqués lors de la co-administration avec le RB2-ant.

Figure 21 : Phosphorylation de l'EGFR mesurée par Western-Blot.

4.4. Discussion

Au cours de cette étude, nous avons pu montrer que le SKK est impliqué dans les processus de cicatrisation cutanée.

4.4.1. Rôle de la TK dans la cicatrisation

Les kinines sont produites à partir de la TK et/ou de la PK activée. Des études ont montré que la TK est présente dans la peau humaine^{221, 222, 287}. Cependant, chez la souris, les études de rt-qPCR ne nous ont pas permis d'identifier la TK dans la peau en conditions physiologiques (données non montrées). De plus, chez la souris déficiente en TK, non-diabétique ou diabétique, nous n'avons pas observé d'altération dans l'évolution de la fermeture de la plaie. Ces résultats suggèrent que la TK n'est pas impliquée de façon importante dans la production des kinines au niveau cutané chez la souris. La PK activée pourrait donc être responsable de la majeure partie de la production des kinines dans la peau. Cette hypothèse reste cependant à confirmer.

4.4.2. Rôle des récepteurs des kinines dans la cicatrisation

Dans cette étude nous avons pu montrer que les RB1 et les RB2 sont présents dans la peau de souris et sont surexprimés en cas de diabète. L'activation des RB1 n'a pas d'effet dans la cicatrisation chez la souris. Ce récepteur ne semble donc pas avoir un rôle important dans les phases de cicatrisation post-lésionnelles. En revanche, l'activation des RB2 par un agoniste spécifique entraîne une désorganisation des couches cutanées et un épaissement de l'épiderme qui sont associés à un retard important de cicatrisation chez la souris non-diabétique et chez la souris diabétique. *In vitro*, l'activation de ces RB2 déséquilibre la migration et la prolifération des fibroblastes et des kératinocytes. Au vu des résultats obtenus au cours de cette étude, les kinines, par l'intermédiaire de l'activation des RB2, semblent influencer toutes les phases de la cicatrisation (cf. article).

4.4.3. Effets secondaires du traitement chronique par voie i.p. du RB2-ag

Chez les souris diabétiques, et en particulier en cas de DT2, le traitement par l'implantation i.p. de minipompes osmotiques délivrant le RB2-ag est corrélé à un fort taux de mortalité. Une hypothèse pourrait être que le traitement chronique par RB2-ag à la dose de 720 nmol/kg.jour⁻¹ ait des effets néfastes sur le système digestif entraînant la mort des

animaux. En effet, de nombreuses données de la littérature montrent que l'activation des récepteurs de la BK est à l'origine de diarrhée ou d'inflammation importante du colon⁷⁴.

4.4.4. Application locale de RB2-ag

Dans ce contexte de mortalité élevée, des essais d'application locale du RB2-ag ont été réalisés par l'intermédiaire d'une crème neutre appliquée quotidiennement. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas été satisfaisants. En effet, l'administration par voie locale de RB2-ag est délétère les trois premiers jours de traitement mais cet effet disparaît par la suite. Ceci pourrait être en grande partie expliqué par la formation d'une croûte épaisse qui limite l'absorption de la crème contenant le RB2-ag. Le développement d'une application locale plus adaptée serait donc nécessaire pour continuer ces expérimentations.

4.4.5. Effet d'un antagoniste des RB2 sur la cicatrisation

Au vu des résultats délétères de l'activation des RB2 sur la cicatrisation, nous nous sommes intéressés aux effets du blocage de ces récepteurs. Ainsi, nous avons pu montrer qu'en cas de diabète, l'administration i.p. du RB2-ant, un antagoniste spécifique des RB2, améliore significativement la cicatrisation, rétablissant quasiment une cicatrisation identique à celle d'une souris non-diabétique. Ces résultats ont été confirmés dans deux modèles de diabète : un modèle de DT1 (STZ) et un modèle de DT2 (souris db/db) (cf. article). Le RB2-ant, ou icatibant, pourrait donc devenir un traitement intéressant dans les plaies du pied du diabétique. L'avantage majeur de ce produit est qu'il est déjà commercialisé dans le traitement des crises aiguës d'angioœdème héréditaire chez l'adulte. Ainsi, les études cliniques et d'innocuité¹⁵¹ ont été réalisées pour ce produit et une application locale pourrait être envisagée pour améliorer la cicatrisation chez le patient diabétique.

4.4.6. Voies de signalisation impliquées

La voie de signalisation principalement associée aux effets de l'activation des RB2 sur les kératinocytes est la voie de phosphorylation des Map-kinases (Erk-1/2) (cf. article). Au cours des expérimentations supplémentaires, nous avons montré que la phosphorylation d'Erk-1/2 se produit en aval d'une activation de l'EGFR. Ces résultats sont en accord avec les données précédentes de la littérature décrivant l'implication de l'EGFR dans les phénomènes de migration et de prolifération des kératinocytes et dans la ré-épithélialisation post-lésionnelle^{228, 288, 289}. Cette voie semble donc être fortement associée à la bonne fonctionnalité des kératinocytes.

4.4.7. Limites de cette étude

Les expérimentations *in vitro* représentent les premières limites de cette étude. En effet, par manque de matériel cellulaire ces expériences n'ont pas pu être réalisées sur des cultures primaires. Les études de prolifération et de migration cellulaire ont donc été faites sur des lignées cellulaires de kératinocytes (kératinocytes humains HaCaT) et de fibroblastes (fibroblastes d'origine murine NIH-3T3). Toutefois, les expérimentations supplémentaires ont permis d'obtenir des fibroblastes d'origine primaire à partir de peau de souris C57BL/6 en quantité suffisante pour reproduire les résultats de la prolifération obtenus avec les fibroblastes NIH-3T3 immortalisés. Ceci nous amène à penser que les résultats obtenus à partir des lignées cellulaires sont représentatifs de ceux que nous pourrions obtenir avec des cultures d'origine primaire. Des analyses immunohistologiques sur les prélèvements cutanés de souris traitées ou non, avec le marquage au Ki67 par exemple, pourraient aussi permettre de compléter les résultats d'hyperprolifération des kératinocytes.

Une autre limite de notre étude est le modèle de cicatrisation utilisé : la souris. En effet, alors que des études ont montré que la TK est présente dans la peau humaine en conditions physiologiques^{221 222}, elle ne semble pas être exprimée dans la peau de souris. De plus, les rongeurs possèdent une monocouche de cellules musculaires lisses, située sous la peau et appelée *panniculus carnosus*. Cette couche est responsable d'une contraction importante de la plaie chez la souris qui n'est pas retrouvée chez l'homme. Le principal modèle expérimental de cicatrisation permettant de s'affranchir de ces effets de contraction de la plaie est l'oreille de lapin²⁹⁰. Certaines souches de souris, telles que la souris nude²⁹¹ ou la souris spiny²⁹², permettraient aussi de s'affranchir de cette contraction cutanée. Plus récemment, un modèle impliquant la pose d'un anneau de silicone autour de la biopsie chez le rat a été développé²⁹³. Ainsi, la confirmation des résultats bénéfiques du RB2-ant sur la cicatrisation diabétique chez l'un de ces modèles, bien que plus difficile, pourrait être nécessaire avant de commencer des études chez l'homme.

4.4.8. Conclusions

Bien que l'activation des RB1 n'ait pas d'effet, nous avons montré dans cette étude que les kinines, par l'intermédiaire de l'activation des RB2, jouent un rôle délétère sur la cicatrisation chez la souris, en particulier en cas de diabète. De la même manière, ces récepteurs pourraient aussi être impliqués dans d'autres mécanismes physiopathologiques de pathologies cutanées tels que le psoriasis²⁹⁴ ou les ulcères gingivaux²⁹⁵.

Etude 2 : Rôle du SKK dans la cicatrisation diabétique

Le résultat intéressant de notre étude est que le traitement par l'icatibant, un antagoniste spécifique des RB2, accélère de façon significative la cicatrisation dans deux modèles de diabète, un modèle de DT1 et un de DT2. Aujourd'hui, le traitement des lésions podologiques chez le diabétique est fastidieux et impose aux patients une immobilisation et des soins locaux répétés. Le traitement avec l'icatibant, déjà commercialisé dans une autre indication, est donc très prometteur pour la cicatrisation du pied du diabétique.

5. ETUDE 3 : ROLE DU SKK DANS L'ISCHEMIE CEREBRALE

5.1. Introduction

5.1.1. Accident vasculaire cérébral

5.1.1.1. Définition et épidémiologie

Un accident vasculaire cérébral (AVC) est défini comme un déficit neurologique soudain, focal et d'origine vasculaire. Il correspond à l'obstruction d'un vaisseau cérébral ou à la rupture d'un vaisseau cérébral. On distingue donc deux principaux types d'AVC : les accidents ischémiques (ou infarctus cérébraux) causés par une obstruction artérielle ou une thrombose veineuse cérébrale ; et les accidents hémorragiques causés par une rupture vasculaire cérébrale ou méningée (*Figure 22*). Les AVC ischémiques sont les plus fréquents et représentent environ 80% à 85% des AVC.

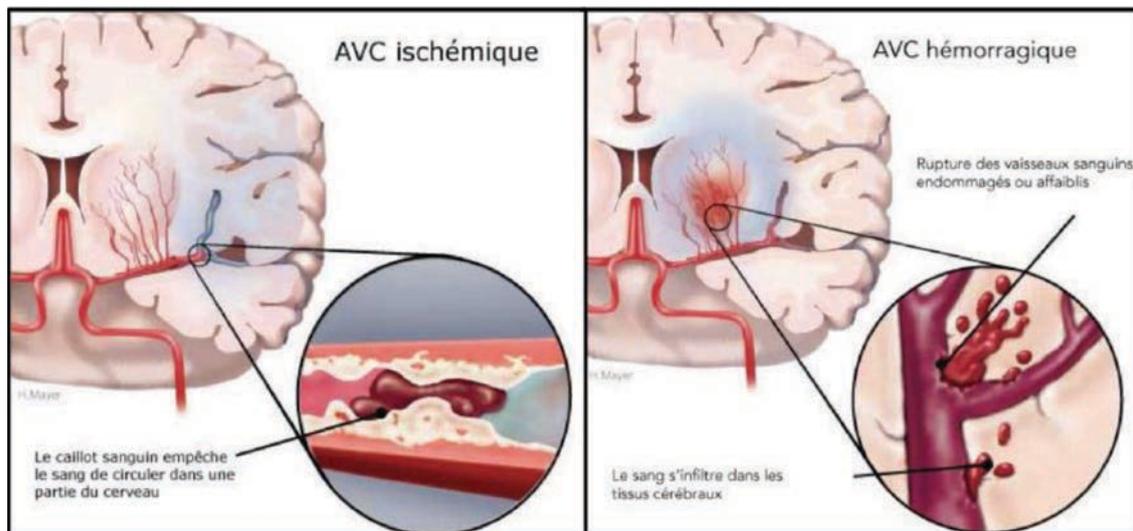


Figure 22 : Les deux principaux types d'AVC (ischémique et hémorragique).

5.1.1.2. Physiopathologie de l'AVC de type ischémique

Dans le cas de l'AVC d'origine ischémique, l'obstruction vasculaire va entraîner une diminution de la perfusion cérébrale. La gravité des séquelles va dépendre de la zone du cerveau atteinte et de la durée de l'ischémie. En périphérie de la zone infarctée, aussi appelée « zone de mort neuronale », on retrouve une zone de souffrance cellulaire, appelée « zone de pénombre ischémique » (*Figure 23*). Cette zone de pénombre peut devenir une zone infarctée suite à l'apparition de lésions neuronales secondaires (cytotoxicité, excitotoxicité, inflammation).

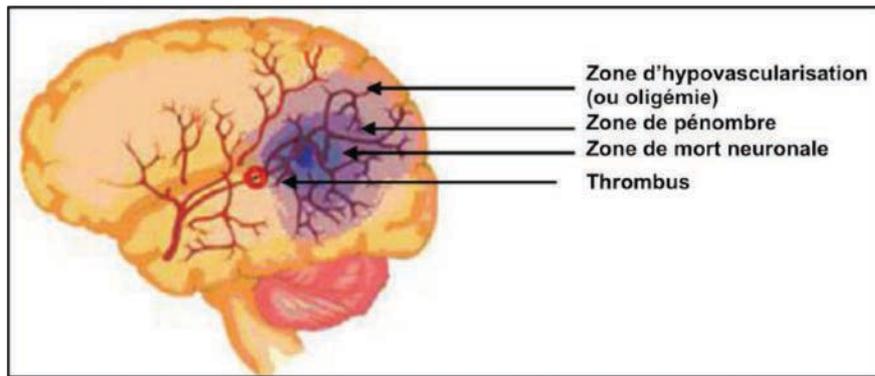


Figure 23 : Zone de mort neuronale et zone de pénombre ischémique.

La physiopathologie de l'AVC ischémique comprend deux phases : la phase aiguë ou précoce, qui se déroule dans les minutes ou heures après l'AVC, et la phase tardive, qui se déroule dans les heures, jours et semaines après l'AVC (Figure 24). La phase précoce de l'AVC comprend principalement la formation de l'œdème cytotoxique, la production de radicaux libres toxiques et la formation de thrombus par dysfonction endothéliale. Ces phénomènes conduisent à une dysfonction de l'unité neurovasculaire et à la rupture de la barrière hémato-encéphalique^{95, 202}. La phase tardive est caractérisée par l'apoptose neuronale. Durant cette phase, des mécanismes de récupération neuronale se mettent en place.

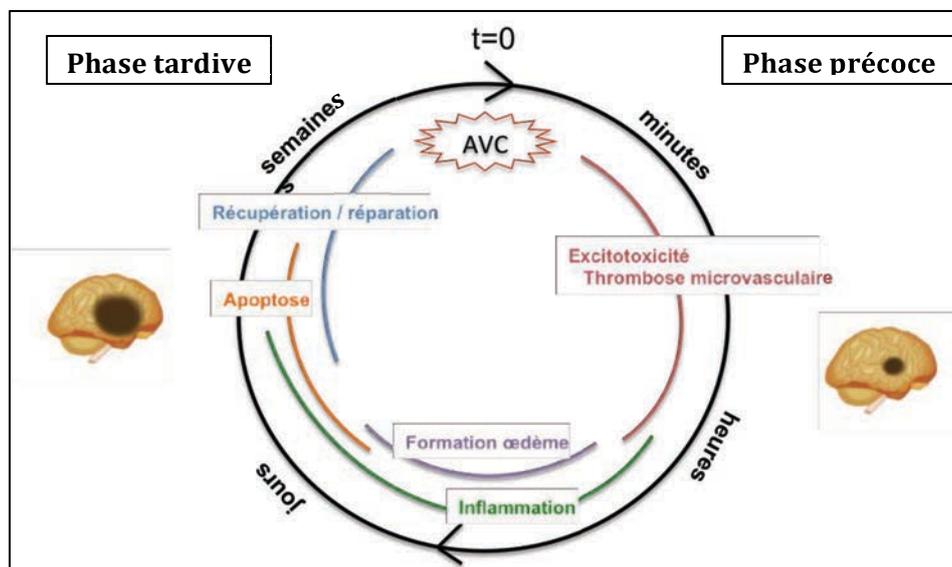


Figure 24 : Cascade des effets physiopathologiques post-ischémiques dans le cerveau.

Le volume infarcté final va dépendre principalement de l'évolution de la zone de pénombre ischémique. La formation de l'œdème cérébral est accompagnée d'une réponse inflammatoire importante entraînant l'infiltration des cellules inflammatoires au site lésé (neutrophiles, cellules T et macrophages). Rapidement après l'apparition de l'AVC, ces réponses inflammatoires vont contribuer aux dommages neuronaux et à la dysfonction vasculaire.

Plus tard, l'inflammation a été associée à des effets bénéfiques comme la réorganisation et la réparation tissulaires. Image issue et adaptée de Albert-Weissenberger *et al.* 2013⁹⁵.

5.1.1.3. Facteurs de risque

L'AVC est une pathologie hétérogène et multifactorielle⁵⁷. Les facteurs de risque de l'AVC sont nombreux : génétique, ethnique, âge, sexe, tabac, alcool, plusieurs pathologies, etc. Cependant, certains de ces facteurs sont plus impliqués que d'autres. En effet, l'étude INTERSTROKE, réalisée dans 22 pays et qui prend en compte tous les types d'AVC, a montré que dix facteurs de risque sont associés à plus de 90% du risque d'AVC. Ces facteurs de risque sont : l'hypertension artérielle, le tabac, le poids, l'alimentation, la sédentarité, le diabète, l'alcool, la dépression, les causes cardiaques et le ratio ApoB/ApoA (hypercholestérolémie)²⁹⁶. Parmi eux, le diabète est un facteur de risque important d'apparition d'AVC et d'aggravation du pronostic du patient (*Chapitre 1*).

5.1.1.4. Traitements

A l'heure actuelle, aucun traitement n'est efficace dans l'AVC à l'exception de la thrombolyse par l'activateur du plasminogène recombinant (rt-PA) qui peut être utilisée chez seulement moins de 5% des patients (fenêtre thérapeutique étroite et risque d'hémorragies secondaires). L'objectif de ce traitement d'urgence est de restaurer la circulation cérébrale afin de préserver de la mort neuronale le tissu lésé de la zone de pénombre²⁹⁷.

Lorsque la revascularisation précoce n'a pas été possible, le traitement de l'AVC reste essentiellement symptomatique. En effet, aujourd'hui, il n'existe pas de traitement neuroprotecteur satisfaisant. Malgré des efforts de recherche fondamentale soutenus, les essais cliniques restent peu concluants, il est donc essentiel de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à diminuer l'ischémie tissulaire, protéger le tissu cérébral mais aussi et surtout améliorer le devenir fonctionnel du patient. De part ses propriétés inflammatoires et vasodilatatrices, le SKK pourrait jouer un rôle important dans les processus de neuroprotection et de récupération neuronale.

5.1.1.5. AVC et SKK

Le rôle du SKK dans l'ischémie cérébrale n'est pas encore bien identifié. Les résultats des quelques études précédemment réalisées sont très contradictoires⁹⁵. En effet, bien que le SKK semble avoir un rôle délétère dans la progression de l'œdème cérébral, son activation pourrait aussi avoir des effets neuroprotecteurs après une ischémie cérébrale et permettrait à long terme d'améliorer le devenir des animaux (*Chapitre 2*).

5.1.2. Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude a donc été de mieux comprendre le rôle du SKK dans les processus mis en place durant la phase précoce et la phase tardive de l'ischémie cérébrale. L'intérêt final a été d'évaluer le potentiel pharmacologique de nos agonistes des RB1 ou des RB2 dans l'ischémie cérébrale chez la souris non-diabétique mais aussi chez la souris diabétique, pour laquelle aucune étude n'a encore été réalisée. Dans un premier temps, cette étude a nécessité la mise en place d'un nouveau modèle au sein du laboratoire.

5.2. Modèle d'ischémie cérébrale

Il est important d'utiliser un modèle animal approprié pour prédire la valeur et les effets thérapeutiques chez l'homme. Dans le cas de l'ischémie cérébrale, il existe de nombreux modèles expérimentaux. Chaque modèle présente ses avantages et ses inconvénients²⁹⁸⁻³⁰². Cependant, à l'heure actuelle aucun modèle n'est vraiment représentatif de la pathologie humaine du fait de son hétérogénéité^{299, 300, 303, 304}. Ces modèles sont toutefois indispensables pour comprendre les mécanismes physiopathologiques de l'ischémie cérébrale et développer de nouvelles stratégies neuroprotectives^{302, 303, 305}.

La plupart des modèles expérimentaux d'AVC ont été développés en provoquant une ischémie dans le territoire de l'artère cérébrale moyenne (ACM)³⁰⁶. Cette ischémie peut être transitoire ou permanente (durée > 3 heures)³⁰⁶. Dans le cas d'une ischémie permanente, les phénomènes de reperfusion post-ischémiques ne sont pas présents. En revanche, les modèles d'ischémie transitoire permettent d'étudier les conséquences de la reperfusion dans le territoire ischémié, et sont donc plus proches de la pathologie humaine. Les mécanismes physiopathologiques et la taille de la lésion dépendent de l'espèce animale, du modèle d'ischémie et de la durée de l'ischémie^{305, 306}. Les principaux modèles murins utilisés dans les études expérimentales sont décrits dans le *Tableau 5*^{299-301, 303, 306}.

Modèle	Méthode	Type ischémie	Utilisation
Electrocoagulation	Electrocoagulation de l'ACM, craniectomie	Permanente	25%
Ligature	Ligature de l'ACM, craniectomie	Permanente	11%
Endovasculaire	Introduction d'un filament dans l'artère carotide commune jusqu'à l'occlusion de l'ACM	Réversible	42%
Thrombo-embolique	Injection de caillots à l'aide d'un microcathéter au niveau de l'origine de l'ACM	Réversible	8%
Autres	Thrombine, prothrombotiques, occlusion pharmacologique par l'entholine-1 etc.		14%

Tableau 5 : Principaux modèles murins d'occlusion de l'ACM.

5.2.1. Choix du modèle

Afin de rechercher les effets de l'activation du SKK dans les deux phases de l'AVC, le choix du modèle dépendait de plusieurs critères : sa fréquence d'utilisation, la facilité de sa mise en place, sa reproductibilité, la présence des effets de la reperfusion et son adaptation aux études de neuroprotection. Ainsi, le modèle d'ischémie-reperfusion par la technique du filament (modèle endovasculaire) a été préféré aux autres modèles puisqu'il remplit l'ensemble de ces critères. En effet, c'est un modèle ne nécessitant pas de matériel particulier et très répandu aujourd'hui pour reproduire les premières lésions mises en place après l'ischémie cérébrale. Ce modèle permet aussi l'étude des phénomènes de mort neuronale, d'activation gliale ainsi que les dommages liés à la rupture de la barrière hémato-encéphalique qui nous intéressent pour notre étude. De plus, dans ce modèle, la présence d'une zone de pénombre ischémique significative après l'occlusion permet des études à plus long terme de neuroprotection³⁰⁵.

5.2.2. Modèle endovasculaire

5.2.2.1. Méthode chirurgicale

Ce modèle a été développé chez le rat en 1986, modifié puis adapté chez la souris³⁰⁵.³⁰⁷ La méthode chirurgicale ne varie que très peu d'une équipe à une autre (*Figure 25*). La technique consiste à introduire un filament, calibré en fonction du poids de la souris, dans la carotide interne. Ce filament est alors avancé jusqu'à obstruer l'ACM et reste en place pendant toute la durée d'occlusion.

Etude 3 : Rôle du SKK dans l'ischémie cérébrale

La souris est anesthésiée. Le cou de la souris est désinfecté à la bétadine puis incisé afin d'atteindre la carotide. Une fois dégagée et séparée du nerf vague, la carotide commune est occluse avec un nœud temporaire. Ensuite, la bifurcation entre la carotide externe et interne est dégagée. La carotide externe est occluse avec un nœud définitif. Un deuxième nœud non serré (nœud temporaire) permettra de maintenir le filament pour la suite de l'opération. La carotide interne est occluse avec un clip pour éviter les saignements (*Figure 24A*). La carotide externe est alors percée entre le nœud définitif et le nœud temporaire. Le filament est introduit, le nœud temporaire serré au-dessus du fil et le clip de la carotide interne retiré. Le filament est alors avancé dans la carotide interne jusqu'à l'ACM (environ 13 mm). Le filament reste en place pendant toute la durée d'occlusion (*Figure 24B*). Il est ensuite retiré, la carotide commune est revascularisée et la souris refermée (*Figure 24C*). Durant toute l'intervention, la température corporelle de la souris est maintenue à 37°C à l'aide d'une sonde rectale. A la fin de l'opération, la souris est placée dans une couveuse à 37°C jusqu'à son réveil et pendant au moins deux heures. Les souris dites « sham » subissent toutes les étapes de la chirurgie. Le filament est avancé dans la carotide interne puis immédiatement retiré. Ce modèle ne nécessite pas de craniectomie.

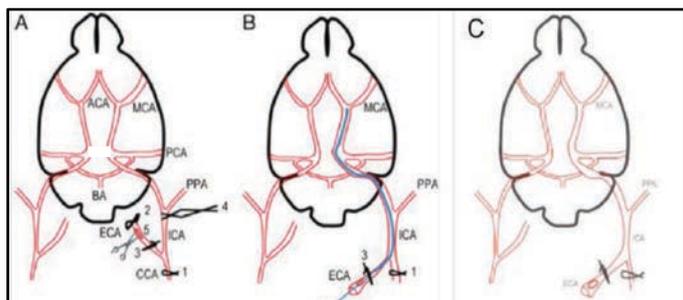
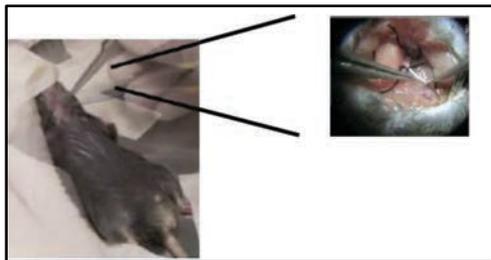


Figure 25 : Méthode chirurgicale d'occlusion de l'ACM par la technique du monofilament.

MCA, artère cérébrale moyenne ; PCA, artère pterygopalatine antérieure ; ACE/ECA, artère carotide externe ; ICA, artère carotide interne ; CCA, artère carotide commune. Images issues de Rousselet *et al.*³⁰⁸.

5.2.2.2. Facteurs de variabilité du modèle

Bien que la méthode chirurgicale soit similaire d'une équipe à une autre, les méthodes d'anesthésie (kétamine/xylazine ou isoflurane), le temps d'occlusion (45 minutes, 60 minutes ou plus), les conditions d'occlusion (réveil de l'animal ou non), les méthodes de suture ou le type de filament utilisé (bout rond brûlé, côté à la poly-L-lysine ou siliconé) peuvent être très variables. Ceci contribue à une grande variabilité dans la taille de la lésion entre les différents laboratoires^{307, 309, 310}.

Dans notre laboratoire, les différents paramètres participant à la variabilité du modèle ont été déterminés après des expérimentations « tests » et des discussions avec des équipes spécialistes du modèle à Paris (Pr. Michel Plotkine et Dr. Nathalie Kubis) et à Caen (Dr. Cyrille Orset et Dr. Benoit Haelewyn).

Ainsi, après avoir réalisé plusieurs séries préliminaires, nous avons déterminé les paramètres suivants qui sont les plus adaptés pour notre étude:

- durée occlusion : 60 minutes ;
- anesthésie : isoflurane 2 % ;
- filament utilisé : filament siliconé réutilisable cinq fois, commandé chez Doccol Corporation, calibré en fonction du poids de l'animal et reproductible (Ref 6021910PK5Re et 7022910PK5Re).

5.2.2.3. Validation du modèle au sein du laboratoire

La mise au point du modèle au sein du laboratoire et sa reproductibilité ont nécessité plusieurs séries d'expérimentations qui sont décrites dans l'*Annexe 3 : Mise en place du modèle d'ischémie cérébrale au laboratoire*. Dans un premier temps, des échelles d'évaluation de l'atteinte fonctionnelle (batterie de tests comportementaux) et de l'atteinte histologique ont été mises en place (*Annexes 4 et 5*). Ensuite, la méthode chirurgicale a dû être maîtrisée. Enfin, la validation du modèle a été réalisée sur plusieurs paramètres : l'atteinte fonctionnelle mesurée par les tests comportementaux, la taille de la zone cérébrale ischémisée mesurée après la coloration au triphényltétrazolium chloride (TTC), le score d'atteinte cérébrale mesurée à l'aide de la coloration à l'hématoxyline et éosine (H&E) et la diminution du flux sanguin au niveau de l'ACM déterminée à l'aide d'une sonde Doppler. Après avoir mis en place les échelles de mesure de l'atteinte cérébrale et avoir obtenu des lésions cérébrales reproductibles et de taille suffisante, l'étude du rôle du SKK dans l'ischémie a été réalisée (*Annexe 6 : Matériels et Méthodes de l'étude 3*).

5.3. Article : Effect of modulation of kallikrein-kinin system on brain damage and mortality in experimental cerebral ischemia in non-diabetic and diabetic mice

Effect of modulation of kallikrein-kinin system on brain damage and mortality in experimental cerebral ischemia in non-diabetic and diabetic mice

Dorinne Desposito^{1,2,3}, Georges Zagigue¹, Christopher Taveau^{1,2,3}, Clovis Adam⁴, Nadine Bouby^{1,2,3}, François Alhenc-Gelas^{1,2,3}, Ronan Roussel^{1,5,6}

¹ INSERM U 1138, Cordeliers Research Center, Paris, France; ² Paris Descartes University, Paris, France; ³ Pierre et Marie Curie University, Paris, France; ⁴ Anatomopathology Department, Kremlin-Bicêtre Hospital, Paris, France; ⁵ Denis Diderot University, Paris, France; ⁶ Diabetology, Endocrinology and Nutrition Department, DHU FIRE, Bichat Hospital, AP-HP, Paris, France

Laboratory address: INSERM U 1138, Centre de Recherches des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France

Keywords: Bradykinin receptors. Type 1 diabetes. Cerebral ischemia. Kallikrein-kinin system.

Short title: Kinins and cerebral ischemia

Corresponding author:

Ronan Roussel

Address: INSERM U 1138, Centre de Recherches des Cordeliers, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006 PARIS, FRANCE

Tel: 33 (0)1 44 27 81 09

Fax: 33 (0)1 44 27 64 21

E-mail: ronan.roussel@gmail.com

Abstract

Stroke is a leading cause of death and disability, and has a poorer prognosis in diabetes. Beside early thrombosis, there is an unmet medical need for alleviating the consequences of stroke. Activation of the kallikrein-kinin system has been shown to enhance cardiac and renal tolerance to ischemia. Regarding the stroke, data are controversial. We tested the effect of pharmacological kinin receptor activation by selective B1R (B1R-ag) or B2R (B2R-ag) agonists, in diabetic (Diab) and non-diabetic (NonDiab) mice, using a model of transient middle cerebral artery occlusion [C57bl6 male, 10 week-old, occlusion 60 min (MCAO)]. The agonists were administered immediately after reperfusion using osmotic minipumps, for 2 days. Neurological deficit (ND) was evaluated at 1 and 2 days using a panel of 8 established tests combined in a 0-30 deficit score. Brain infarction was quantified at day 2 using TTC and haematoxylin-eosin staining. In some mice diabetes was induced by streptozotocin 8 weeks before MCAO.

In NonDiab mice, MCAO induced bradycardia, mild hypotension (mean -11.3 mmHg), ND (21.7 ± 2.4) and resulted in partial brain infarction (24.2 ± 2.0 %), all $p < 0.01$ compared to sham, $n=10$ /group. B2R-ag ($720 \text{ nmol/kg.day}^{-1}$) increased ND to 27.0 ± 1.8 at day 1 and mortality to 60% at day 2 (both $p < 0.05$, $n=10$) which did not provide sufficient data concerning histological lesions. Although B1R mRNA level increased by 2.3 fold in the ischemic, brain B1R-ag had no effect on ND, mortality or brain infarction in NonDiab mice.

In diabetic mice MCAO increased ND (28 ± 1), mortality (25%) and infarct size (40 ± 3 %) more than in non-diabetic mice ($n=8$, $p < 0.05$). As in NonDiab mice, B2R-ag increased mortality to 80% ($p < 0.05$, $n=9$). B1R-ag, tested at two different dosages (720 or 240 nmol/kg.day^{-1} , $n=9$ /group) reduced ND (22 ± 2 at day 2 for the low dosage, $p < 0.05$) and did not increase mortality or alter renal function. B1R-ag reduced infarct size by 66 and 71 %, at the two dosages, respectively ($p < 0.01$).

Thus, B2R activation increases mortality by mechanisms that may involve brain oedema and renal insufficiency. B1R activation has no effect in NonDiab mice but in Diab animals it reduces infarct size and improves ND. Longer follow-up studies are in progress for further evaluating interest and limitation of B1R activation in MCAO.

Abbreviations

B1R : bradykinin B1 receptor

B1R-ag : B1R agonist

B2R : bradykinin B2 receptor

B2R-ag : B2R agonist

Diab : diabetic

Isch : ischemic mice

KKS : kallikrein-kinin system

MCAO : middle cerebral artery occlusion

NonDiab : non-diabetic

NonIsch : sham-opered mice

STZ : streptozotocin

TTC : 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride

Introduction

Acute ischemic stroke is a major cause of mortality (second-leading cause of death) and morbidity (main cause of permanent disability). Moreover, stroke risk is increased and its prognosis is poor in diabetic patients¹⁻³. Stroke causes “acute” (minutes to hours) and “delayed” (hours to days/weeks) injury cascades; both implicated multiple pathological effects like thrombosis, brain oedema, neuron damage, inflammation or recovery^{4, 5}. The complexity of mechanisms involved makes that today there is no effective neuroprotective treatment.

The kallikrein-kinin system (KKS) is implicated in multiple pathological states in different organs⁶⁻⁹ and has been shown to enhance cardiac and renal tolerance to ischemia¹⁰. Kinins are generated following the proteolytic cleavage of precursors, kininogens, by the tissue kallikrein (TK) in several organs and are mainly inactivated in the circulation by the angiotensin I-converting enzyme (ACE/kininase II). Because it plays a role in oedema formation, inflammation and thrombosis, KKS represents an attractive target in stroke⁴. Kinins, the vasoactive peptide of the KKS, activate two receptor subtypes: B1 (B1R) and B2 (B2R). Kinin receptors, as all components of the KKS, have been identified in brain tissue from various species including rodents and humans^{4, 11-16}. B1R expression in the brain is low under normal conditions, but it is upregulated with inflammation and ischemia⁴. By contrast, B2R is constitutively expressed in brain⁴. However, the use of pharmacological blockade (including peptide and non-peptide antagonists) or genetic disruption of these receptors as a neuroprotective strategy has produced contrasting results⁴. Indeed, whereas some studies have shown that KKS blockage reduced infarct size and neuronal damage after transient middle cerebral artery occlusion (MCAO)¹⁷⁻²¹; other studies suggest that a lack or a blockade of B2R in acute stroke aggravates ischemic brain damage²¹⁻²⁴. The beneficial *versus* detrimental effects of kinins and their receptors are likely depending on the stage of infarct development^{4, 24}. More recently, a study has shown that bradykinin postconditioning, if used in a limited time window, can prevent the process of delayed neuronal death and ameliorate focal cerebral ischemia in rat²⁴. Therefore, the roles of B1R and B2R in the different stages of brain ischemia remain to be elucidated. Involvement of KKS in cerebral ischemia in the setting of diabetes remains undocumented.

The aim of the present study was to evaluate effects of potent selective pharmacological B1R or B2R agonists in cerebral ischemia in mice, diabetic or not. The present study shows that a) MCAO induced bradycardia, mild hypotension, neurological deficit, and resulted in partial brain infarction in non-diabetic mice; b) TK deficiency reduced neurological deficit and infarct size at day 2; c) B2R agonist, at a high dose, increased neurological deficit and mortality at day 2; d) B1R agonist, tested at two different dosages, significantly reduced neurological deficit and infarct size in diabetic mice for which neurological deficit, mortality and infarct size were increased compared to non-diabetic mice.

Material and methods

Animals and treatments

Effects of B1R or B2R agonists on transient focal cerebral ischemia were studied, in both non-diabetic (NonDiab) and diabetic (Diab) mice. All mice were housed with a 12 h light/dark cycle and had free access to standard mice chow and water. All experimental procedures were approved by the local Ethics Committee for Animal Experiment Charles Darwin and performed in accordance with European legislation for the care and use of laboratory animals (L 358-86/609/EEC).

Transient focal cerebral ischemia

Transient focal cerebral ischemia was induced by MCAO using the intraluminal filament technique previously described by Rousselet *et al.* 2012²⁹. Briefly, mice were anesthetised with 3.5% isoflurane in an anaesthetic chamber and maintained during surgery at 2% isoflurane using a rodent mask. Body temperature was maintained at $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ with a heating blanket throughout the entire experimental procedure. MCAO was carried out for 60 min by inserting a calibrated monofilament according to mice weight (Doccol Corporation, USA) *via* the right external carotid artery into the internal carotid artery to block the origin of the MCA. Sham-operated controls were treated similarly to the ischemic mice, but the filament was not inserted. After surgery and before returned to their cages, animals were placed for 4 hours in a heating incubator at 37°C .

Experimental protocols

Protocol 1: effect of tissue kallikrein deficiency after transient cerebral ischemia First series of mice was dedicated to test the role of TK after cerebral ischemia in NonDiab mice using mice with targeted disruption of the TK gene²⁰. At 48h after transient MCAO, neurological deficits and brain infarction were determined on three dedicated groups of mice (TK^{+/+}, TK^{+/-} and TK^{-/-} mice; n=8-10/group).

Protocol 2: effect of B1R or B2R agonist treatments after transient cerebral ischemia

All experiments of this protocol were performed on male C57BL/6J mice, 10 weeks old (JanvierLabs, France). Some mice are rendered diabetic by 5 daily i.p. injections of streptozotocin (STZ) (Sigma-Aldrich, France) (50 mg/kg body weight in 0.05 mol/L^{-1} sodium citrate, pH 4.5)^{25,26}. After 8 weeks of confirmed diabetes (fasting blood glucose >250 mg/dl), transient focal cerebral ischemia was induced as described above. Treatment with the selective B1R agonist SarLys[Hyp3, Igl5, DPhe8]desArg9-bradykinin (B1R-ag)²⁷ or the selective B2R agonist [Hyp(3),Thi(5),(N)Chg(7),Thi(8)]-bradykinin (B2R-ag)²⁸ was started at reperfusion, using osmotic minipumps (Alzet 1007D, Charles River Laboratories, France). Two different dosages were used $720\text{ nmol/kg}\cdot\text{day}^{-1}$ ²⁵ and $240\text{ nmol/kg}\cdot\text{day}^{-1}$. Control mice were received saline infusion. Five sets of experiments were done.

Series 1 and 2 were dedicated to test the effect of B1R-ag or B2R-ag on neurological deficit and ischemic volume in NonDiab mice (series 1: 720 nmol/kg.day⁻¹ and series 2: 240 nmol/kg.day⁻¹). At 48h after transient MCAO, neurological deficits and brain infarction were determined on four dedicated groups of mice (NonIsch : sham-opered mice, Isch : ischemic mice treated with saline, Isch+B1R-ag : ischemic mice treated with B1R-ag, Isch+B2R-ag : ischemic mice treated with B2R-ag; n=8-10/group). Same protocol was performed in series 3 and 4 dedicated to test the effect of B1R-ag or B2R-ag in Diab mice (series 3: 720 nmol/kg.day⁻¹ and series 4: 240 nmol/kg.day⁻¹; Diab-NonIsch, Diab-Isch, Diab-Isch+B1R-ag, Diab-Isch+B2R-ag; n=9-11/group).

Series 5 was dedicated to test the effect of B1R-ag (720 nmol/kg.day⁻¹) on cerebral oedema in Diab mice 24h after transient MCAO, by measuring the brain water content (BWC) as previously described^{30,31}. Briefly, mice were killed and brains were removed. After dissection of infarct areas in ischemic mice and from corresponding areas in sham-operated mice, brains were weighed (wet weight) and dried at 110°C for 24h. After weighed again brain (dry weight), BWC was calculated as followed: BWC (%) = (wet weight - dry weight) / wet weight x100. Three dedicated groups of mice were performed (Diab-NonIsch, Diab-Isch, Diab-Isch+B1R-ag; n=5-6/group).

Evaluation of neurological deficits

Neurological deficit was assessed in each animal on a numerical scale of 0-30 before ischemia and at day 1 and 2 after ischemia depending on protocol. The score was obtained using a series of behavioural tests including the grip test, the scotch test, the tail suspension test, the beam test, the wire hang test, the circles tests and comportment into home cage³²⁻³⁴. Higher scores indicate a greater functional impairment. Each experiment was conducted randomly and blindly.

Determination of infarct volume

Two days after reperfusion and after neurological score evaluation, a blood sample was withdrawn from the eye of mice and then mice were decapitated. The brains were rapidly removed and sectioned into six coronal sections, 2 mm thick, using a mice brain matrix. Coronal brain sections were stained by incubating them in a solution of 0.5% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma-Aldrich, France) for 30 min at 37°C in the dark³⁵ and fixed in 10% formalin (Sigma-Aldrich, France) during two hours prior to analysis. Photographs of the sections were obtained using digital camera attached to microscope (Nikon SMZ800, Italie). The infarction area, outlined in white, and the entire section area were measured on the anterior surface of each section in a blinded manner using Image Analyzer Software (ImageJ, NIH). For each section, infarction area was reported to the entire section area. For each animal, results were expressed by doing the mean of the six sections.

Haematoxylin and eosin staining

Brain sections were fixed in 10% formalin during 24h, embedded in paraffin, cut into 6- μ m section and stained with haematoxylin and eosin according to the manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich, France). Photomicrographs were obtained using digital camera attached to light microscope (Leica DM 4000B and LAS v3.8 software). Histological lesions were assessed in a blinded manner using a numerical scale of 0-3 for each animal. Higher scores indicate presence of important histological lesions.

Count of blood cells

Peripheral blood samples were collected in EDTA-coated tubes. For each mouse, blood cells (platelets, red cells and white blood cells) were counted immediately after the blood removal using an automated veterinary haematological counter ScilVet abc (SCIL GmbH, Germany). Haematocrit levels were also determined.

Real-time PCR

Total RNA was isolated from the brain, ischemic (day 0, 1, 3 and 7) or not, using TRIzol (Invitrogen, France) and reverse transcribed with superscript II reverse transcriptase as previously described²⁵. The cDNAs were amplified and quantified using TaqMan Universal Master Mix and Assays-on-Demand Gene Expression Probes for gene of B1R and B2R (Applied Biosystems, France) in an ABI PRISM-7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, France). Each sample was tested in triplicate. Data were normalized to 18S rRNA. Changes in the target gene were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ comparative method for each sample³⁷.

Data expression and statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. The effect of surgical procedure was first evaluated by comparing sham-operated group (NonIsch) *versus* the non-operated group using a one-way ANOVA. Comparisons between NonIsch group and Isch group were evaluated by one-way ANOVA. For comparing effects of diabetes and treatment, one-way ANOVA were used. When measures were repeated (neurologic deficit), data were analysed by a two-way ANOVA. ANOVA was followed by ad-hoc multiple comparison tests. When there were only two groups, data were analysed by a Mann-Whitney test. Statistical significance was accepted at *p-value* less than 0.05.

Results

Effect of ischemia on B1R and B2R mRNA levels

B1R and B2R were identified in brain tissue. Their mRNA levels were not influenced by diabetes (data not shown). B2R mRNA level was not modified at day 1, 3 and 7 after ischemia in our model (Fig.1). By contrast, 24h after transient MCAO B1R mRNA level was increased roughly by 2.35 fold in the affected hemispheres ($p<0.05$) before returned to basal values (Fig.1).

Effect of transient cerebral ischemia in mice

Transient MCAO did not affect body weight, glycaemia and plasma creatinine in NonDiab and Diab mice (data not shown). In NonDiab mice, transient MCAO induced an important bradycardia (Isch : 382.1 ± 14.7 bpm *vs* NonIsch : 655.2 ± 13.8 bpm, $p<0.01$) and a mild hypotension at 24h (Isch : 100.9 ± 2.1 mmHg *vs* NonIsch : 112.8 ± 1.5 mmHg, $p=0.055$). At 48h after transient MCAO, the neurological score reflected a severe impairment of sensorimotor function in Isch mice *versus* NonIsch mice ($p<0.001$) and an infarct was developed in cerebral cortex and the striatum (TTC staining : 24.1 ± 2.0 %, $p<0.01$ *vs* NonIsch).

Diabetes increased neurological deficits and mortality at 48h when compared to NonDiab mice (both $p<0.05$, Fig.2A/B). Moreover, infarct size was severely increased in Diab mice compare to NonDiab mice (TTC staining : 40.24 ± 2.64 %, $p<0.01$, Fig.2C).

Effect of TK deficiency after transient cerebral ischemia

In NonDiab conditions, TK^{-/-} mice had better outcome after transient MCAO, compared to TK^{+/+} and TK^{+/-} mice. Indeed, TK deficiency improved neurological deficit and decreased infarct volume at 48 hours after transient MCAO (both $p<0.05$, Fig.3).

Effect of B2R agonist treatment in mice after transient cerebral ischemia

B2R-ag treatment significantly increased mortality to 60% in NonDiab mice and to 80% in Diab mice 48h after ischemia ($p<0.05$, Fig.4), which did not provide sufficient data concerning neurological deficits and histological lesions.

Effect of B1R agonist treatment in mice after transient cerebral ischemia

Effects of B1R-ag in non-diabetic mice

B1R-ag treatment had no additional effect on physiological and metabolic parameters measured (data not shown), neurological deficit and mortality in NonDiab mice (Fig.5A/B). Moreover, B1R-ag treatment had no effect on infarct volume and histological score (Fig.5C).

Effects of B1R-ag in diabetic mice

In Diab mice, B1R-ag tested at two different dosages (240 or 720 nmol/kg.day⁻¹) improved neurological score and did not influence mortality at 48h, compared to Diab-Isch group (Fig.6A/B). These beneficial effects of B1R-ag were associated with a decrease of infarct size by 66 and 71 % at the two different dosages respectively ($p < 0.01$) (Fig.7A). These results were confirmed with the histological score, which is decreased in Diab-Isch+B1R-ag group (720 nmol/kg.day⁻¹) (Fig.7B). Moreover, B1R-ag at a dose of 720 nmol/kg.day⁻¹ did not affect the BWC after cerebral ischemia compared to Diab-Isch group (Diab-Isch+B1R-ag : 82.3 ± 0.27 % vs Diab-Isch : $83,2 \pm 0.82$ %, $p=0,58$).

Discussion

In the present study, we evaluated effects of modulation of KKS in mice submitted to transient focal cerebral ischemia diabetic or not. In a first time, we show that TK deficiency improved neurological deficit and decreased infarct volume at 48 hours after transient MCAO. B2R agonist administration was associated with a high mortality after transient MCAO in non-diabetic and in diabetic mice. The main findings of this study are that treatment with a selective B1R agonist, tested at two different dosages, reduced the infarct volume and the neurological deficit in diabetic mice after transient MCAO. By contrast, B1R agonist treatment had no effect in non-diabetic mice after cerebral ischemia.

Previous studies indicated that B1R and B2R are present in brain tissue from various species including rodents and human^{4, 11-15}. We show here that both receptors were present in murine brain and their expressions were not influenced by diabetes mellitus. Whereas B2R level was not modified, B1R level was increased 24h after transient MCAO which is in line with expectation, given that B1R expression is induced during inflammation⁴¹.

In non-diabetic conditions, the mechanism by which bradykinin plays a role in the development of ischemic brain damage remains unclear. We show in the present study that TK deficiency had beneficial effect after transient cerebral ischemia decreasing neurological deficit and infarct volume. Previous studies that investigated the differential role of B1R or B2R in cerebral ischemia^{4, 18, 19, 24, 42} showed that B2R was implicated in neurological deficit, mortality and infarct volume, while B1R was apparently not involved. The present study is in agreement with these findings. First, B1R agonist treatment had no effect on mortality, neurological deficit and infarct volume after transient MCAO. By contrast, B2R activation severely increased neurological deficit at day 1 and mortality at day 2. Numerous studies have shown that B2R antagonist administration or B2R deficiency were accompanied with an amelioration of neurological deficit and a decreased of mortality after MCAO in rodents^{17, 18, 42, 43}. Until now the mechanisms of bradykinin-induced brain damage and mortality have been explained mainly by the formation of brain oedema through increase of cerebrovascular permeability. Indeed the role of B2R in brain oedema formation and blood brain barrier permeability is now well established^{15, 41}. However, in our study, functional impairment and mortality related to B2R-ag treatment may not only due to brain oedema formation but maybe

also due to a severe hypotension leading to renal insufficiency (data not shown), although this remains to be confirmed.

As expected, diabetes increased neurological deficit, mortality and infarct size in mice after transient MCAO. Interestingly, in this study we have shown for the first time that B1R activation, when administered at the time of reperfusion, was associated with a decrease of neurological deficit and infarct volume in diabetic mice submitted to transient focal cerebral ischemia. So, in diabetic mice B1R activation seems to have neuroprotective effect after cerebral ischemia. Mechanisms remain unclear but it seems that B1R was not implicated in brain oedema formation.

Author contributions

D.D., F.A-G., R.R., N.B. made substantial contribution to the design and have drafted the manuscript script.. D.D., G.Z., C.T., C.A. made substantial contribution to acquisition and analysis of data. All authors have reviewed and approved the final version.

Acknowledgments

The authors thank the crew of the Functional Exploration Center (Cordeliers Research Center, Paris) for technical assistance and support in mice studies.

Funding

This work was supported by Institut National de la Santé Et de la Recherche Medicale, Paris-Descartes University, Pierre and Marie Curie University.

Duality of interest

The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

References

1. Allen CL, Bayraktutan U. Risk factors for ischaemic stroke. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*. 2008;3:105-116
2. Karsito, Soeatmadji DW. Diabetes and stroke. *Acta medica Indonesiana*. 2008;40:151-158
3. Ergul A, Kelly-Cobbs A, Abdalla M, Fagan SC. Cerebrovascular complications of diabetes: Focus on stroke. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2012;12:148-158
4. Albert-Weissenberger C, Siren AL, Kleinschnitz C. Ischemic stroke and traumatic brain injury: The role of the kallikrein-kinin system. *Progress in neurobiology*. 2013;101-102:65-82
5. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008;55:310-318
6. Costa-Neto CM, Dillenburg-Pilla P, Heinrich TA, Parreiras-e-Silva LT, Pereira MG, Reis RI, et al. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. *International immunopharmacology*. 2008;8:135-142
7. Sharma JN, Al-Sherif GJ. Pharmacologic targets and prototype therapeutics in the kallikrein-kinin system: Bradykinin receptor agonists or antagonists. *TheScientificWorldJournal*. 2006;6:1247-1261
8. Rhaleb NE, Yang XP, Carretero OA. The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function. *Comprehensive Physiology*. 2011;1:971-993
9. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. Xlv. Classification of the kinin receptor family: From molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacological reviews*. 2005;57:27-77
10. Alhenc-Gelas F, Bouby N, Richer C, Potier L, Roussel R, Marre M. Kinins as therapeutic agents in cardiovascular and renal diseases. *Current pharmaceutical design*. 2011;17:2654-2662
11. Kizuki K, Suzuki T, Kudo M, Noguchi T. Immunohistochemical demonstration of tissue kallikrein in the neurons of rat brain. *Brain research*. 1994;634:305-309
12. Walker K, Perkins M, Dray A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochemistry international*. 1995;26:1-16; discussion 17-26
13. Raidoo DM, Bhoola KD. Kinin receptors on human neurones. *Journal of neuroimmunology*. 1997;77:39-44
14. Ongali B, Campos MM, Bregola G, Rodi D, Regoli D, Thibault G, et al. Autoradiographic analysis of rat brain kinin b1 and b2 receptors: Normal distribution and alterations induced by epilepsy. *The Journal of comparative neurology*. 2003;461:506-519

15. Trabold R, Eros C, Zweckberger K, Relton J, Beck H, Nussberger J, et al. The role of bradykinin b(1) and b(2) receptors for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30:130-139
16. Raidoo DM, Ramchurren N, Naidoo Y, Naidoo S, Muller-Esterl W, Bhoola KD. Visualisation of bradykinin b2 receptors on human brain neurons. *Immunopharmacology*. 1996;33:104-107
17. Groger M, Lebesgue D, Pruneau D, Relton J, Kim SW, Nussberger J, et al. Release of bradykinin and expression of kinin b2 receptors in the brain: Role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005;25:978-989
18. Ding-Zhou L, Margaille 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. *British journal of pharmacology*. 2003;139:1539-1547
19. Relton JK, Beckey VE, Hanson WL, Whalley ET. Cp-0597, a selective bradykinin b2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1997;28:1430-1436
20. Klasner B, Lumenta DB, Pruneau D, Zausinger S, Plesnila N. Therapeutic window of bradykinin b2 receptor inhibition after focal cerebral ischemia in rats. *Neurochemistry international*. 2006;49:442-447
21. Austinat M, Braeuninger S, Pesquero JB, Brede M, Bader M, Stoll G, et al. Blockade of bradykinin receptor b1 but not bradykinin receptor b2 provides protection from cerebral infarction and brain edema. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2009;40:285-293
22. Chao J, Chao L. Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease. *Experimental physiology*. 2005;90:291-298
23. Xia CF, Smith RS, Jr., Shen B, Yang ZR, Borlongan CV, Chao L, et al. Postischemic brain injury is exacerbated in mice lacking the kinin b2 receptor. *Hypertension*. 2006;47:752-761
24. Danielisova V, Gottlieb M, Bonova P, Nemethova M, Burda J. Bradykinin postconditioning ameliorates focal cerebral ischemia in the rat. *Neurochemistry international*. 2014;72:22-29
25. Desposito D, Potier L, Chollet C, Gobeil F, Jr., Roussel R, Alhenc-Gelas F, et al. Kinin receptor agonism restores hindlimb postischemic neovascularization capacity in diabetic mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2015;352:218-226
26. Johnson MS, Ryals JM, Wright DE. Early loss of peptidergic intraepidermal nerve fibers in an stz-induced mouse model of insensate diabetic neuropathy. *Pain*. 2008;140:35-47

27. Cote J, Savard M, Bovenzi V, Belanger S, Morin J, Neugebauer W, et al. Novel kinin b1 receptor agonists with improved pharmacological profiles. *Peptides*. 2009;30:788-795
28. Belanger S, Bovenzi V, Cote J, Neugebauer W, Amblard M, Martinez J, et al. Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin b2 receptor. *Peptides*. 2009;30:777-787
29. Rousselet E, Kriz J, Seidah NG. Mouse model of intraluminal mcao: Cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012
30. Hatashita S, Hoff JT, Salamat SM. Ischemic brain edema and the osmotic gradient between blood and brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1988;8:552-559
31. Zweckberger K, Eros C, Zimmermann R, Kim SW, Engel D, Plesnila N. Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *Journal of neurotrauma*. 2006;23:1083-1093
32. Balkaya M, Krober JM, Rex A, Endres M. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2013;33:330-338
33. Schallert T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2006;3:497-504
34. Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, Hadingham SJ, et al. Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology*. 2000;39:806-816
35. Joshi CN, Jain SK, Murthy PS. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain research. Brain research protocols*. 2004;13:11-17
36. Mazzachi BC, Peake MJ, Ehrhardt V. Reference range and method comparison studies for enzymatic and jaffe creatinine assays in plasma and serum and early morning urine. *Clinical laboratory*. 2000;46:53-55
37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods*. 2001;25:402-408
38. Wei G, Dawson VL, Zweier JL. Role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in nitric oxide generation in the brain following cerebral ischemia. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1455:23-34
39. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide in neuronal degeneration. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine*. 1996;211:33-40
40. Plotkine M, Margail I. [no synthases: New pharmacological targets in cerebrovascular accident?]. *Therapie*. 2002;57:548-553

41. Dobrivojevic M, Spiranec K, Sindic A. Involvement of bradykinin in brain edema development after ischemic stroke. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2015;467:201-212
42. Su J, Cui M, Tang Y, Zhou H, Liu L, Dong Q. Blockade of bradykinin b2 receptor more effectively reduces postischemic blood-brain barrier disruption and cytokines release than b1 receptor inhibition. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;388:205-211
43. Lumenta DB, Plesnila N, Klasner B, Baethmann A, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, et al. Neuroprotective effects of a postischemic treatment with a bradykinin b2 receptor antagonist in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. *Brain research*. 2006;1069:227-234
44. Bovenzi V, Savard M, Morin J, Cuerrier CM, Grandbois M, Gobeil F, Jr. Bradykinin protects against brain microvascular endothelial cell death induced by pathophysiological stimuli. *Journal of cellular physiology*. 2010;222:168-176
45. Martins AH, Alves JM, Perez D, Carrasco M, Torres-Rivera W, Eterovic VA, et al. Kinin-b2 receptor mediated neuroprotection after nmda excitotoxicity is reversed in the presence of kinin-b1 receptor agonists. *PloS one*. 2012;7:e30755
46. Torres-Rivera W, Perez D, Park KY, Carrasco M, Platt MO, Eterovic VA, et al. Kinin-b2 receptor exerted neuroprotection after diisopropylfluorophosphate-induced neuronal damage. *Neuroscience*. 2013;247:273-279
47. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. Nitric oxide in the central nervous system: Neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature reviews. Neuroscience*. 2007;8:766-775

Figure legends

Fig.1: B1R mRNA level was increased 24h after transient MCAO.

Kinin receptors mRNA levels in non-diabetic mice brain measured at day 0 (D0), 1 (D1), 3 (D3) and 7 (D7) after transient MCAO, by RT-qPCR. Data are mean±SEM, n=5/group.

Fig.2: Diabetes increased neurological impairment, mortality and infarct size 48h after transient MCAO.

(A) Neurological score (0-30) measured in NonDiab and Diab mice at day 0, 1 and 2 after transient MCAO. (B) Survival curve of NonDiab and Diab mice after transient MCAO. (C) Ischemic area measured at 48h after transient MCAO using TTC staining. NonIsch : grey with black stripes, NonDiab-Isch : black, Diab-Isch : white. Data are mean±SEM, n=8-10/group.

Fig.3: TK deficiency decreased neurological impairment and infarct size 48h after transient MCAO in non-diabetic mice.

(A) Neurological score (0-30) measured in TK-deficient mice at day 0, 1 and 2 after transient MCAO. (B) Survival curve of TK-deficient mice after transient MCAO. (C) Ischemic area measured at 48h after transient MCAO using TTC staining. TK^{+/+} : black, TK^{+/-} : grey with black stripes, TK^{-/-} : white with black stripes. Data are mean±SEM, n=8-10/group.

Fig.4: B2R-ag was associated with an increase of mortality after transient MCAO in mice.

(A) Survival curve of NonDiab mice after transient MCAO. (B) Survival curve of Diab mice after transient MCAO. Data are mean±SEM, n=8-10/group.

Fig.5: B1R-ag had no supplemental effect on neurological impairment, mortality and infarct size 48h after transient MCAO in non-diabetic mice.

(A) Neurological score (0-30) measured in non-diabetic mice at day 0, 1 and 2 after transient MCAO. (B) Survival curve of non-diabetic mice after transient MCAO. (C) Ischemic area measured at 48h after transient MCAO using TTC staining. NonIsch : grey with black stripes, Isch : black, Isch+B1R-ag (720 nmol/kg.day⁻¹) : grey. Data are mean±SEM, n=8-10/group.

Fig.6: B1R-ag, tested at two different dosages (720 or 240 nmol/kg.day⁻¹), reduced neurological score at 48h in diabetic mice.

(A) Neurological score (0-30) measured in diabetic mice at day 0, 1 and 2 after transient MCAO. (B) Survival curve of diabetic mice after transient MCAO. NonIsch : grey with black stripes, Diab-Isch : white, Diab-Isch+B1R-ag (720 nmol/kg.day⁻¹) : grey, Diab-Isch+B1R-ag (240 nmol/kg.day⁻¹) : grey with white stripes. Data are mean±SEM, n=8-10/group.

Fig.7: B1R-ag at the two dosages (720 or 240 nmol/kg.day⁻¹) significantly reduced infarct size 48h after transient MCAO in diabetic mice.

(A) Ischemic area measured at 48h after transient MCAO using TTC staining and representative photographs. (B) Histological score (0-3) measured at 48h after transient MCAO using hematoxylin and eosin staining. Diab-NonIsch : grey with black stripes, Diab-Isch : black, Diab-Isch+B1R-ag (720 nmol/kg.day⁻¹) : grey, Diab-Isch+B1R-ag (240 nmol/kg.day⁻¹) : grey with white stripes. Data are mean±SEM, n=5-7/group.

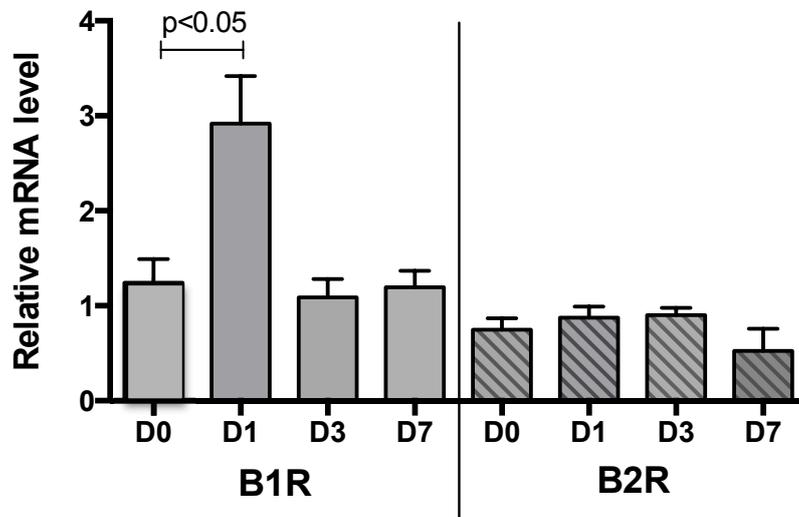


Fig.1: B1R mRNA level was increased 24h after transient MCAO. Kinin receptors mRNA levels in non-diabetic mice brain measured at day 0 (D0), 1 (D1), 3 (D3) and 7 (D7) after transient MCAO, by RT-qPCR. Data are mean \pm SEM, n=5/group.

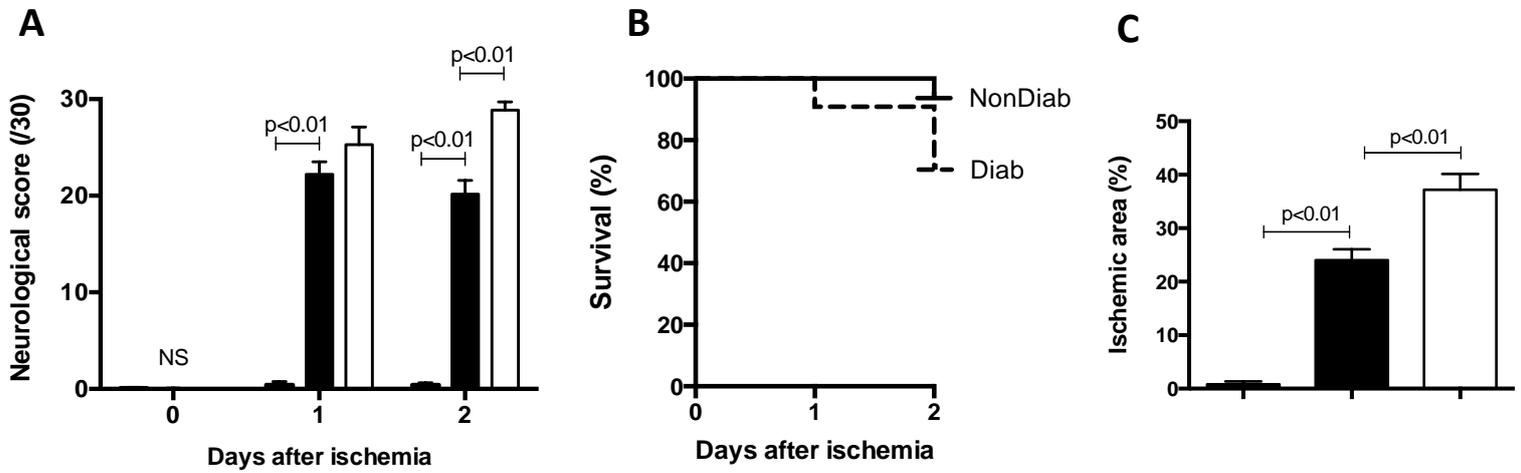


Fig.2: Diabetes increased neurological impairment, mortality and infarct size 48h after transient MCAO. (A) Neurological score (0-30) measured in NonDiab and Diab mice at day 0, 1 and 2 after transient MCAO. (B) Survival curve of NonDiab and Diab mice after transient MCAO. (C) Ischemic area measured at 48h after transient MCAO using TTC staining. NonIsch : grey with black stripes, NonDiab-Isch : black, Diab-Isch : white. Data are mean±SEM, n=8-10/group.

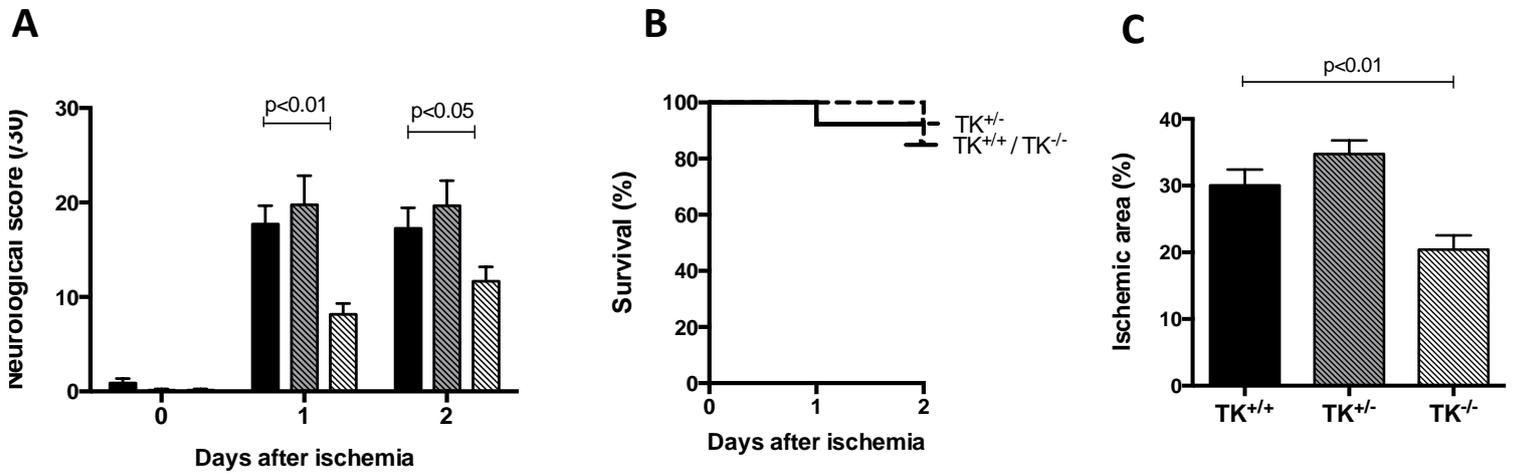


Fig.3: TK deficiency decreased neurological impairment and infarct size 48h after transient MCAO in non-diabetic mice.

(A) Neurological score (0-30) measured in TK-deficient mice at day 0, 1 and 2 after transient MCAO.

(B) Survival curve of TK-deficient mice after transient MCAO. (C) Ischemic area measured at 48h after transient MCAO using TTC staining.

TK^{+/+} : black, TK^{+/-} : grey with black stripes, TK^{-/-} : white with black stripes. Data are mean±SEM, n=8-10/group.

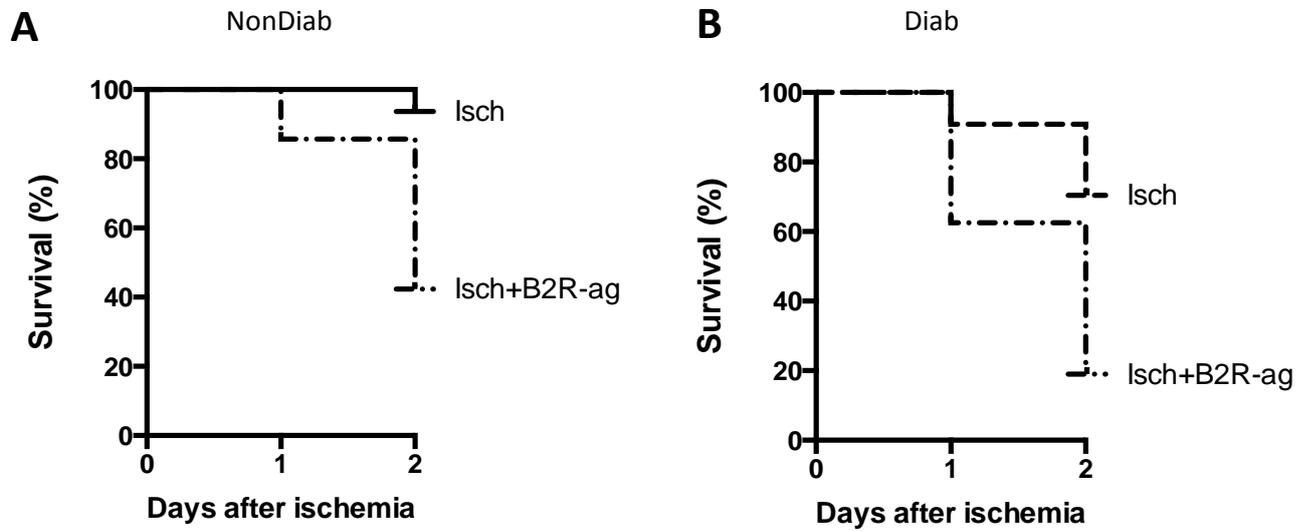


Fig.4: B2R-ag was associated with an increase of mortality after transient MCAO in mice. (A) Survival curve of NonDiab mice after transient MCAO. (B) Survival curve of Diab mice after transient MCAO. Data are mean±SEM, n=8-10/group.

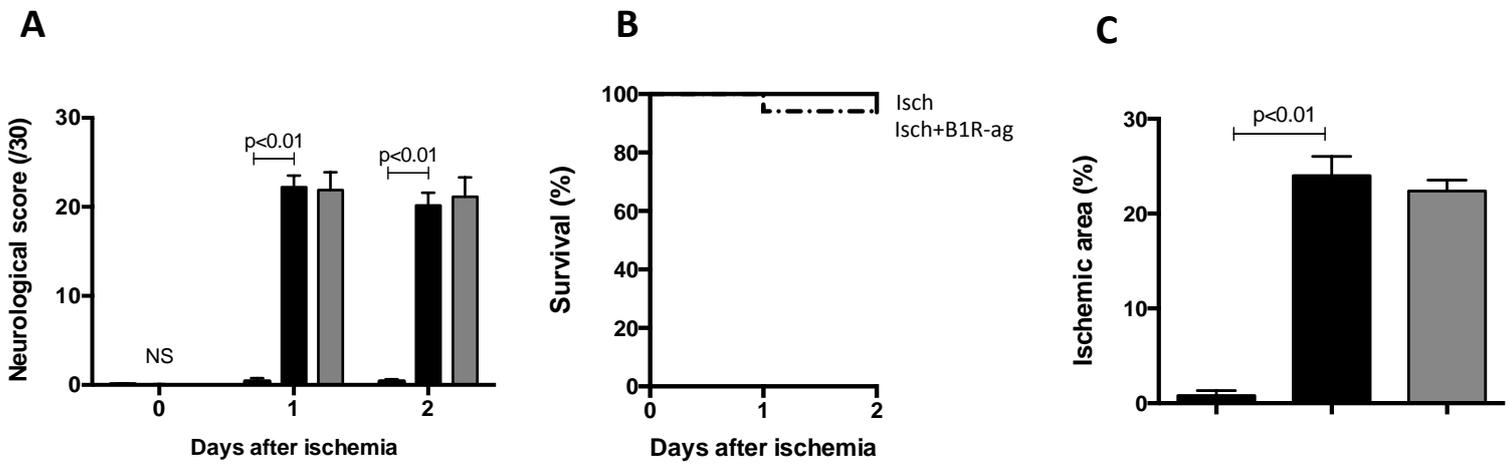


Fig.5: B1R-ag had no supplemental effect on neurological impairment, mortality and infarct size 48h after transient MCAO in non-diabetic mice.

(A) Neurological score (0-30) measured in non-diabetic mice at day 0, 1 and 2 after transient MCAO.

(B) Survival curve of non-diabetic mice after transient MCAO. (C) Ischemic area measured at 48h after transient MCAO using TTC staining.

NonIsch : grey with black stripes, Isch : black, Isch+B1R-ag (720 nmol/kg.day⁻¹) : grey. Data are mean ±SEM, n=8-10/group.

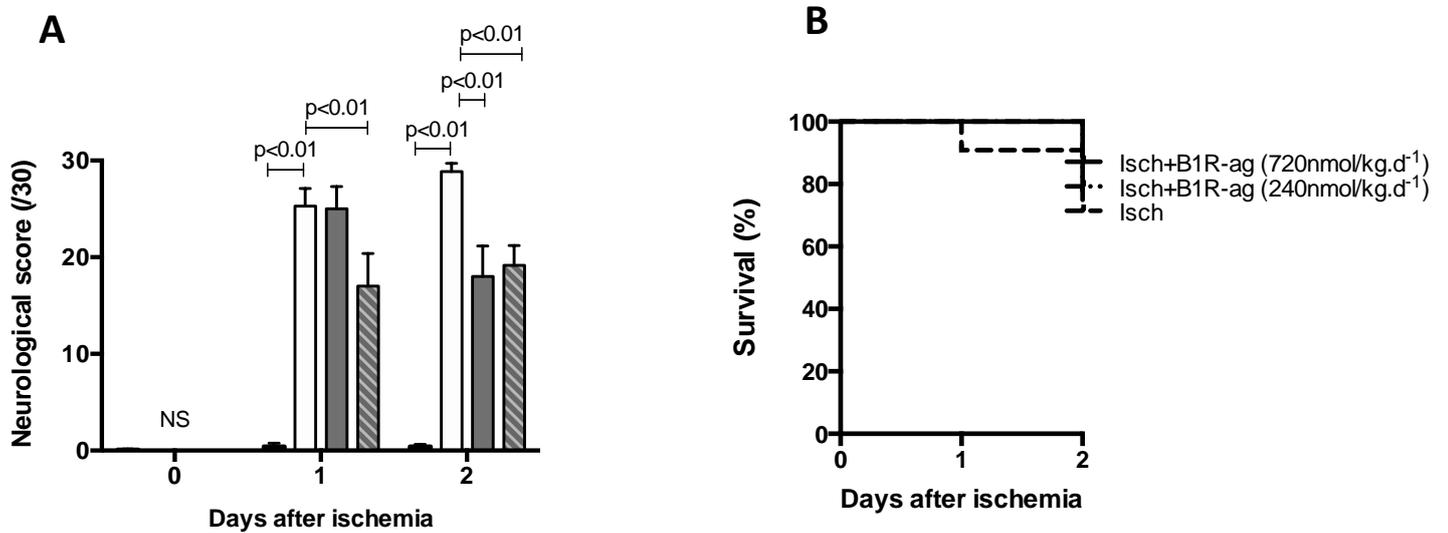


Fig.6: B1R-ag, tested at two different dosages (720 or 240 nmol/kg.day⁻¹), reduced neurological score at 48h in diabetic mice.

(A) Neurological score (0-30) measured at day 0, 1 and 2 after transient MCAO. (B) Survival curve of diabetic mice after transient MCAO. Diab-NonIsch : grey with black stripes, Diab-Isch : black, Diab-Isch+B1R-ag (720 nmol/kg.day⁻¹) : grey, Diab-Isch+B1R-ag (240 nmol/kg.day⁻¹) : grey with white stripes. Data are mean±SEM, n=8-11/group.

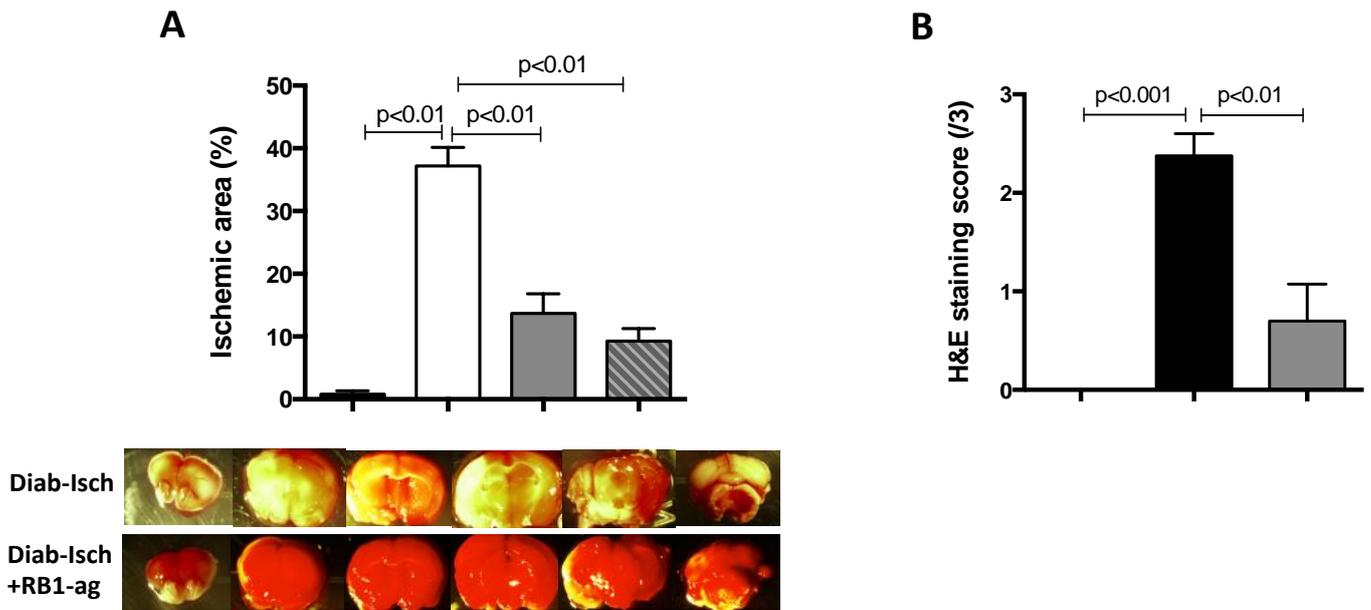


Fig.7: B1R-ag at the two dosages (720 or 240 nmol/kg.day⁻¹) significantly reduced infarct size 48h after transient MCAO in diabetic mice.

(A) Ischemic area measured at 48h after transient MCAO using TTC staining and representative photographs. (B) Histological score (0-3) measured at 48h after transient MCAO using hematoxylin and eosin staining.

Diab-NonIsch : grey with black stripes, Diab-Isch : black, Diab-Isch+B1R-ag (720 nmol/kg.day⁻¹) : grey, Diab-Isch+B1R-ag (240 nmol/kg.day⁻¹) : grey with white stripes. Data are mean±SEM, n=5-7/group.

5.4. Discussion

Au cours de cette étude nous nous sommes intéressés aux effets de la modulation du SKK dans l'ischémie cérébrale chez la souris non-diabétique mais aussi chez la souris présentant un diabète de type 1. Pour cela, nous avons utilisé une approche génétique en utilisant des souris déficientes en TK et une approche pharmacologique en administrant un agoniste spécifique des RB1 (RB1-ag) ou des RB2 (RB2-ag).

5.4.1. Effets de l'activation des RB1 et des RB2 après une ischémie cérébrale chez la souris non-diabétique

L'activation des RB1 n'a pas d'effet chez la souris non-diabétique ayant subi une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne. En effet, le traitement par le RB1-ag n'influence ni le score neurologique, ni la taille de la lésion dans notre modèle d'ischémie cérébrale transitoire. Les RB1 ne semblent donc pas jouer de rôle majeur dans l'ischémie cérébrale en condition non-diabétique. En revanche, l'activation des RB2 est associée à une forte mortalité qui a limité l'étude pour ce groupe. Ces résultats sont toutefois en accord avec certaines études décrites dans la littérature et montrant que la déficience en RB2 diminue la mortalité dans un modèle murin d'ischémie cérébrale⁹⁵.

5.4.2. Mécanismes neuroprotecteurs *versus* neurotoxiques de l'activation des RB2 après une ischémie cérébrale

Le rôle de la BK dans la progression de l'œdème cérébral est aujourd'hui bien établi^{199, 200} et explique les effets neurotoxiques des RB2 dans certaines études^{95, 205}. Dans des résultats préliminaires nous montrons que les effets délétères de la bradykinine et de l'activation des RB2 ne semblent pas seulement liés à leurs rôles dans la formation et la progression de l'œdème cérébral. En effet, les animaux ayant subi une ischémie et mis sous traitement avec le RB2-ag développent une hypotension importante associée à une insuffisance rénale aiguë pouvant expliquer l'atteinte fonctionnelle et la mortalité retrouvées dans ce groupe (résultats non montrés, *Annexe 7*).

Aujourd'hui, il a aussi été montré que la bradykinine a des effets neuroprotecteurs après une ischémie cérébrale notamment en prévenant la mort des cellules endothéliales, en diminuant la toxicité neuronale liée au glutamate et en favorisant la survie et la migration des cellules gliales^{209, 211, 212, 214}. De plus, l'administration de BK après la reperfusion semble

améliorer la prolifération, la migration et la différenciation des neuroblastes au niveau de la zone de pénombre et favorise la neurogénèse et la neuroprotection chez la souris^{86, 196, 209, 210}. Des résultats préliminaires non décrits dans cette étude nous laissent penser que le traitement par le RB2-ag pourrait réduire la taille de la zone ischémisée et ces effets seraient associés à une diminution des niveaux de nNOS post-ischémiques. Ainsi, l'activation des RB2 pourrait avoir un effet neuroprotecteur en limitant la production de NO cytotoxique après une ischémie^{311, 312}. Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour confirmer et approfondir ces résultats et notamment rechercher les effets de RB2-ag sur les autres NOS (iNOS et eNOS) qui jouent aussi un rôle important après une ischémie cérébrale³¹². En effet, d'après les résultats obtenus par Xia et *al.*, l'activation des RB2 pourrait aussi avoir des effets neuroprotecteurs en augmentant la production de NO neuroprotecteur *via* la eNOS²⁰⁹.

De plus, l'étude des paramètres inflammatoires pourrait aussi aider à la compréhension des mécanismes post-ischémiques impliqués. Une étude a, en effet, montré que la bradykinine avait des effets neuroprotecteurs en diminuant la libération de cytokines pro-inflammatoires dont notamment l'interleukine 1 β et le TNF- α ³¹³.

5.4.3. Effets de l'activation des RB1 après une ischémie cérébrale chez la souris diabétique

Le traitement par le RB1-ag améliore la récupération fonctionnelle et diminue la taille de la lésion cérébrale chez la souris diabétique après deux jours de traitement. Les mécanismes associés à ces effets ne sont pas encore mis en évidence mais il semblerait que les RB1 ne jouent pas de rôle dans la formation de l'œdème cérébral. Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes neuroprotecteurs impliqués après l'activation des RB1 chez la souris diabétique. De plus, les effets bénéfiques post-ischémiques de l'administration de RB1-ag chez la souris diabétiques nécessitent des études à plus long terme qui sont actuellement en cours au laboratoire.

5.4.4. Conclusions

Le rôle des récepteurs des kinines dans les mécanismes physiopathologiques intervenant après une ischémie cérébrale est certain ; mais il reste encore mal compris. Après une ischémie cérébrale, les RB2 semblent être impliqués aussi bien dans des effets neurotoxiques que des effets neuroprotecteurs ce qui pourrait expliquer pourquoi leur rôle est très controversé dans la littérature. En effet, son rôle dans la formation de l'œdème est

aujourd'hui bien mis en évidence, toutefois, les RB2 pourraient aussi intervenir dans la régulation de mécanismes cytotoxiques post-ischémiques tels que la formation de NO cytotoxique, la neurotoxicité glutamate dépendante, l'inflammation ou la régulation de la mort des cellules neuronales et/ou gliales. Chez la souris non-diabétique, le RB1 ne semble pas jouer de rôle majeur après une ischémie cérébrale. Toutefois, son activation est associée à des effets neuroprotecteurs chez la souris diabétique soumise à une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne. Des études supplémentaires sont nécessaires à la compréhension des mécanismes impliqués dans les effets neuroprotecteurs et neurotoxiques de l'activation des RB2 chez la souris non-diabétique mais aussi et surtout de l'activation des RB1 chez la souris diabétique qui pourrait représenter une nouvelle stratégie neuroprotectrice intéressante.

CONCLUSION GENERALE / PERSPECTIVES

Le SKK est un système peptidique impliqué dans de nombreux effets physiopathologiques. Les principaux constituants de ce système sont : les kalllicréines, les kininogènes et les kinines. La kalllicréine tissulaire, enzyme activatrice, clive le kininogène en kinines vasoactives. Les kinines vont alors activer deux types de récepteur : RB1 et RB2. Le RB2 est constitutif dans la plupart des tissus et est connu pour être responsable de la majeure partie des effets des kinines. Le RB1, lui, est induit dans certaines conditions pathologiques, et en particulier en cas d'ischémie et/ou de diabète. Aujourd'hui, son rôle est moins connu que celui des RB2. L'enzyme de conversion de l'angiotensine, ou kininase II, est la principale voie de dégradation des kinines. Le rôle du SKK dans le développement d'anomalies métaboliques conduisant au diabète et dans certaines de ses complications micro- et macroangiopathiques a largement été démontré. La plupart de ces données expérimentales ont été obtenues grâce à l'utilisation de modèles d'inactivation génétique et/ou pharmacologique, ou grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion, ce qui limite les connaissances sur le rôle spécifique de l'activation de chaque récepteur. En effet, l'inactivation d'un récepteur induit une régulation compensatrice de l'autre récepteur limitant l'interprétation des résultats. Ainsi, le développement récent de nouveaux agonistes peptidiques spécifiques de chaque récepteur (RB1 ou RB2) a permis d'obtenir de nouveaux outils importants dans l'étude des différents rôles du SKK et représente des nouvelles options thérapeutiques.

Dans notre laboratoire, nous nous intéressons aux complications du diabète et en particulier aux différents rôles du SKK dans ces complications. Le but de mon travail de thèse a été de rechercher le rôle du SKK dans certaines complications du diabète pour lesquelles très peu d'études ont été réalisées : le pied du diabétique et l'ischémie cérébrale. Pour chaque étude, l'objectif a été de mieux comprendre le rôle de chaque récepteur des kinines et d'évaluer le potentiel thérapeutique des agonistes des RB1 ou des RB2 dans ces complications. Ainsi, ce travail de thèse a été composé de trois études indépendantes.

SKK et pied du diabétique

Les données de la littérature sont en faveur d'un rôle majeur du SKK dans la néovascularisation post-ischémique chez la souris non-diabétique. Toutefois, son rôle chez la souris diabétique restait inconnu. Dans la première partie de cette thèse, nous avons pu montrer que l'administration d'un agoniste des RB1 ou d'un agoniste des RB2 restaure les processus de néovascularisation post-ischémique chez la souris présentant un diabète de type 1. Ces effets sont principalement expliqués par une augmentation des paramètres inflammatoires qui a lieu dès les premiers jours de traitement avec les agonistes. La voie MCP-1, bien connue dans les processus de néovascularisation post-ischémique, semble être la principale voie impliquée dans les effets de l'activation des RB2. Toutefois, dans cette étude nous n'avons pas pu mettre en évidence la voie de signalisation impliquée dans les effets de l'agoniste des RB1.

L'administration de l'agoniste des RB1 ou de l'agoniste des RB2 pourrait donc représenter une stratégie thérapeutique intéressante pour les patients diabétiques pour lesquels le risque d'artériopathie des membres inférieurs est élevé.

Par ailleurs, la présence d'une artériopathie des membres inférieurs chez les patients diabétiques est associée à un fort risque de développer des troubles trophiques du pied et des retards de cicatrisation importants. L'ensemble de ces troubles conduit à un fort risque d'amputation chez ces patients.

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au rôle du SKK dans un modèle de cicatrisation cutanée chez la souris. Nous avons montré que bien que l'agoniste des RB2 favorise la néovascularisation post-ischémique, il a des effets très délétères dans la cicatrisation. En effet, l'administration chronique de l'agoniste des RB2 entraîne une désorganisation des couches cutanées et un retard important de cicatrisation chez la souris diabétique mais aussi chez la souris non-diabétique. Les différentes études *in vitro* réalisées nous ont amenés à penser que l'activation des RB2 entraînerait un déséquilibre dans la prolifération et la migration des fibroblastes et des kératinocytes. Ceci conduirait à une désorganisation des différentes phases de la cicatrisation et donc à une désorganisation des tissus cutanés et à un retard de cicatrisation apparaissant dès les premiers jours de traitement. Les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans les effets d'augmentation de la prolifération et la migration des kératinocytes sont la voie des Map kinases ERK1/2 qui se

produit en aval de l'activation de l'EGFR. Ces voies ont préalablement été impliquées dans les principales fonctions des kératinocytes et semblent donc jouer un rôle majeur dans les kératinocytes. En revanche, l'agoniste des RB1 n'a pas d'effet sur la cicatrisation chez la souris non-diabétique et chez la souris diabétique.

Dans notre étude, nous avons aussi pu montrer que l'administration d'un antagoniste spécifique des RB2 améliore la cicatrisation dans deux modèles de souris diabétiques, un proche du diabète de type 1 (souris injectées à la streptozotocine) et un proche du diabète de type 2 (souris déficientes pour le gène du récepteur de la leptine). En effet, chez les souris diabétiques traitées par l'antagoniste des RB2, la vitesse de cicatrisation est similaire à celle d'une souris non-diabétique. Le blocage des RB2 semble donc être une piste intéressante pour favoriser la cicatrisation du patient diabétique.

SKK et ischémie cérébrale en cas de diabète

L'expression des RB1 est fortement induite dans la plupart des organes en cas de diabète. L'activation des RB1 a donc potentiellement des effets multiples en cas de diabète. Dans la troisième partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle de l'activation des RB1 ou des RB2 dans l'ischémie cérébrale chez la souris diabétique. Du fait d'un fort taux de mortalité chez les animaux diabétiques traités par l'agoniste des RB2, nous n'avons pas pu mettre en évidence le rôle de ces récepteurs dans l'ischémie cérébrale en cas de diabète. Cependant, nous avons pu montrer que l'agoniste des RB1 semble avoir des effets neuroprotecteurs chez la souris diabétique. En effet, l'administration de l'agoniste des RB1 diminue les déficits neurologiques et la taille de la zone infarctée dès le deuxième jour de traitement chez des souris diabétiques ayant subi une ischémie cérébrale transitoire. Dans notre étude, nous n'apportons pas d'explication sur les mécanismes neuroprotecteurs impliqués dans ces effets. Cependant, au vu de l'implication des RB1 dans les processus inflammatoires, les effets neuroprotecteurs de l'activation des RB1 pourraient être médiés par une modulation des cytokines pro-inflammatoires libérées après une ischémie cérébrale. Cette hypothèse reste à confirmer. Cette étude fournit des résultats préliminaires intéressants pour le développement d'une nouvelle cible thérapeutique dans l'ischémie cérébrale en cas de diabète.

SKK : Nouvelle cible thérapeutique dans le traitement des complications du diabète

Les résultats de la première et de la deuxième étude nous permettent d'envisager une nouvelle stratégie thérapeutique dans la prise en charge du « pied du diabétique ». Cette stratégie comprendrait un agoniste des RB1 qui favoriserait la néovascularisation post-ischémique et ceci sans effet sur la cicatrisation ; associé à un antagoniste des RB2 administré par voie locale afin de favoriser et normaliser la cicatrisation du patient. L'antagoniste des RB2 est déjà commercialisé dans une autre application, ainsi les études de sécurité du produit chez l'homme ont déjà été réalisées. Il est donc facile d'imaginer que ce produit puisse être adapté sous une forme topique. Cependant, l'utilisation de l'agoniste des RB1 en clinique nécessite une évaluation rigoureuse de l'ensemble des effets potentiellement associés à l'administration de ce produit.

En effet, bien que beaucoup moins étudiés que les RB2 jusqu'à présent, les RB1 semblent jouer des rôles multiples en cas de diabète. Ainsi, l'activation chronique des RB1 pourrait avoir des effets contradictoires en fonction des organes et des pathologies. Des études ont, par exemple, montré que les RB1 sont impliqués dans la progression de la rétinopathie diabétique et pourraient aussi avoir des effets délétères dans la néphropathie diabétique. Des travaux réalisés au sein du laboratoire ont aussi pu identifier que l'agoniste des RB1 avait des effets cardioprotecteurs dans un modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque chez la souris diabétique. De plus, la troisième étude de cette thèse met aussi en évidence un potentiel rôle neuroprotecteur de l'activation des RB1 dans un modèle de souris diabétiques après une ischémie cérébrale. La compréhension des mécanismes impliqués et la recherche des effets associés à l'administration d'un agoniste des RB1, tel que le RB1-ag utilisé tout au long de cette thèse, permettront de trouver des nouvelles solutions thérapeutiques pour les patients diabétiques à haut risque de développer des complications multiples. Le développement d'agonistes des récepteurs des kinines représente donc une cible thérapeutique intéressante dans les complications du diabète, et en particulier en cas d'ischémie. De plus, ces agonistes sont des outils pharmacologiques précieux dans la meilleure compréhension du rôle du SKK dans divers processus physiopathologiques.

SKK et pathologies non diabétiques

En conditions physiologiques « non-diabétiques », les kinines ont été impliquées dans de nombreux effets physiopathologiques conduisant à des pathologies cardiaques, cérébrales, intestinales ou inflammatoires, etc. Au cours de cette thèse, en parallèle des effets de l'agoniste des RB1 et des RB2 chez la souris diabétique, nous nous sommes aussi intéressés à leurs effets dans nos différents modèles pathologiques chez les souris non-diabétiques.

De façon surprenante, bien que le plus souvent induits en conditions pathologiques telles que l'ischémie, les RB1 ne semblent pas jouer de rôle majeur en condition non-diabétique dans les différents modèles étudiés. En effet, chez la souris non-diabétique, l'administration d'un agoniste de RB1 n'a pas d'effet ni sur la cinétique de fermeture de la plaie dans un modèle de cicatrisation cutanée ; ni sur la taille de la lésion cérébrale et le déficit neurologique dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire. Au sein du laboratoire, des études précédemment réalisées avaient montré que l'activation des RB1 ne présente pas d'effet dans un modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque chez la souris non-diabétique.

En revanche, les RB2 sont impliqués dans de multiples rôles chez la souris non-diabétique. En effet, de nombreuses données dans la littérature montrent que les principaux rôles physiopathologiques attribués au SKK sont majoritairement liés à l'activation des RB2. Les RB2 ont ainsi été impliqués dans la régulation de la pression artérielle et de la fonction rénale, mais aussi dans les fonctions cardiaques, les fonctions cérébrales, les fonctions gastro-intestinales, l'angiogenèse, la douleur et l'inflammation. Nous avons montré au cours de cette thèse que les RB2 sont aussi impliqués dans les processus de cicatrisation cutanée. De plus, chez les souris non-diabétiques, le traitement chronique par l'agoniste des RB2 à l'aide d'une minipompe implantée en intrapéritonéale est associé à une mortalité importante. Cette mortalité reste pour le moment inexpliquée. L'ensemble des données conduit à l'hypothèse que le traitement intrapéritonéal par l'agoniste des RB2 est associé à une inflammation intestinale et/ou du colon. En effet, nous avons pu observer dans l'étude 1 que le même traitement administré en sous-cutané n'a pas d'effet sur la survie des animaux. De plus, de nombreuses données de la littérature sont en faveur d'un rôle délétère de l'activation des RB2 au niveau des fonctions intestinales. Au cours de ce travail de thèse, nous avons aussi pu montrer que les RB2 sont impliqués dans la régulation de la pression artérielle et l'ischémie

cérébrale. Chez les souris non-diabétiques soumises à ischémie cérébrale transitoire, le traitement par l'agoniste des RB2 semble conduire à une hypotension sévère et une insuffisance rénale dès le premier jour de traitement. Ces effets sont associés à une forte mortalité. Toutefois, l'activation des RB2 semble aussi avoir des effets neuroprotecteurs sur la taille de la lésion dans ce modèle d'ischémie cérébrale transitoire de souris non-diabétiques. Ces résultats préliminaires restent toutefois à confirmer avec des études supplémentaires.

Ainsi, l'ensemble des données de la littérature et les résultats obtenus au cours de cette thèse, nous permettent d'affirmer que l'activation des RB2 joue des rôles physiopathologiques multiples en particulier en conditions pathologiques. Ces effets semblent contradictoires en fonction des organes et des pathologies étudiées. Aujourd'hui, les effets de l'activation des RB2 sont utilisés en thérapeutique notamment dans le contrôle de la pression artérielle à travers les inhibiteurs de l'enzyme de conversion. Cependant, il n'existe aucun traitement activant spécifiquement les RB2. La principale raison est que l'utilisation des ligands naturels du RB2 est difficile du fait de leur grande labilité. Le nouvel agoniste spécifique des RB2, RB2-ag utilisé tout au long de cette thèse, représente donc un outil pharmacologique important pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques associés au SKK, mais aussi pour le développement de nouvelle stratégie thérapeutique dans certaines pathologies et notamment en cas d'ischémie. Bien évidemment, l'utilisation d'un tel agoniste devra être justifiée par une balance bénéfique/risque améliorée par rapport aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion qui potentialisent déjà les kinines. Toutefois, les premiers résultats obtenus au sein du laboratoire montrent que l'administration de RB2-ag est associée à des effets cardioprotecteurs dans un modèle d'ischémie-reperfusion cardiaque, angiogéniques dans un modèle d'ischémie de la patte et potentiellement neuroprotecteurs dans un modèle d'ischémie-reperfusion cérébrale. Cependant, comme pour le RB1-ag chez la souris diabétique, la recherche des effets secondaires associés à l'administration du RB2-ag est indispensable avant de développer des nouveaux traitements dans ces différentes pathologies. La recherche de ces effets secondaires est d'autant plus importante que l'accumulation des kinines est suspectée d'être responsable de certains effets secondaires des inhibiteurs de l'enzyme de conversion tels que le risque de toux ou d'angiooedème.

REFERENCES

1. Roden M. [diabetes mellitus: Definition, classification and diagnosis]. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2012;124 Suppl 2:1-3
2. Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert C, Goldenberg R, Punthakee Z. Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. *Canadian journal of diabetes*. 2013;37 Suppl 1:S8-11
3. Druet C, Bourdel-Marchasson I, Weill A, Eschwege E, Penfornis A, Fosse S, et al. Type 2 diabetes in france: Epidemiology, trends of medical care, social and economic burden. *Presse Med*. 2013;42:830-838
4. Kirtland KA, Burrows NR, Geiss LS. Diabetes interactive atlas. *Preventing chronic disease*. 2014;11:130300
5. Linnenkamp U, Guariguata L, Beagley J, Whiting DR, Cho NH. The idf diabetes atlas methodology for estimating global prevalence of hyperglycaemia in pregnancy. *Diabetes research and clinical practice*. 2014;103:186-196
6. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. Idf diabetes atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*. 2011;94:311-321
7. Patterson CC, Gyurus E, Rosenbauer J, Cinek O, Neu A, Schober E, et al. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in europe during 1989-2008: Evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia*. 2012;55:2142-2147
8. Philips JC, Radermecker RP. [type 1 diabetes: From genetic predisposition to hypothetical environmental triggers]. *Revue medicale de Liege*. 2012;67:319-325
9. Eringsmark Regnell S, Lernmark A. The environment and the origins of islet autoimmunity and type 1 diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2013;30:155-160
10. Steck AK, Rewers MJ. Genetics of type 1 diabetes. *Clinical chemistry*. 2011;57:176-185
11. Steck AK, Winter WE. Review on monogenic diabetes. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2011;18:252-258
12. Noble JA, Erlich HA. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012;2:a007732
13. Noble JA, Valdes AM. Genetics of the hla region in the prediction of type 1 diabetes. *Current diabetes reports*. 2011;11:533-542
14. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 2010;464:1293-1300
15. Group SfdiYS, Liese AD, D'Agostino RB, Jr., Hamman RF, Kilgo PD, Lawrence JM, et al. The burden of diabetes mellitus among us youth: Prevalence estimates from the search for diabetes in youth study. *Pediatrics*. 2006;118:1510-1518
16. Ito H. [epidemiology of diabetes mellitus in the elderly]. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*. 1997;55 Suppl:558-562
17. Kato N. Insights into the genetic basis of type 2 diabetes. *Journal of diabetes investigation*. 2013;4:233-244
18. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444:840-846
19. Standards of medical care in diabetes--2013. *Diabetes care*. 2013;36 Suppl 1:S11-66

20. Chen D, Wang MW. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2005;7:307-317
21. Duhault J, Koenig-Berard E. [diabetes mellitus and its animal models]. *Thérapie*. 1997;52:375-384
22. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2005;22:359-370
23. Chatzigeorgiou A, Halapas A, Kalafatakis K, Kamper E. The use of animal models in the study of diabetes mellitus. *In vivo*. 2009;23:245-258
24. Heinonen SE, Genove G, Bengtsson E, Hubschle T, Akesson L, Hiss K, et al. Animal models of diabetic macrovascular complications: Key players in the development of new therapeutic approaches. *Journal of diabetes research*. 2015;2015:404085
25. Wilson GL, Leiter EH. Streptozotocin interactions with pancreatic beta cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Current topics in microbiology and immunology*. 1990;156:27-54
26. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2005;52:313-320
27. Bunner AE, Chandrasekera PC, Barnard ND. Knockout mouse models of insulin signaling: Relevance past and future. *World journal of diabetes*. 2014;5:146-159
28. Baudry A, Leroux L, Jackerott M, Joshi RL. Genetic manipulation of insulin signaling, action and secretion in mice. Insights into glucose homeostasis and pathogenesis of type 2 diabetes. *EMBO reports*. 2002;3:323-328
29. Tochino Y. The nod mouse as a model of type i diabetes. *Critical reviews in immunology*. 1987;8:49-81
30. Cheta D. Animal models of type i (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*. 1998;11:11-19
31. Alpers CE, Hudkins KL. Mouse models of diabetic nephropathy. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2011;20:278-284
32. Leiter EH. The genetics of diabetes susceptibility in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1989;3:2231-2241
33. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in b cells of the rat pancreas. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2001;50:537-546
34. Bodin S, Chollet C, Goncalves-Mendes N, Gardes J, Pean F, Heudes D, et al. Kallikrein protects against microalbuminuria in experimental type i diabetes. *Kidney Int*. 2009;76:395-403
35. Kim JH, Nishina PM, Naggert JK. Genetic models for non insulin dependent diabetes mellitus in rodents. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*. 1998;9:325-345
36. Wua J, Wang HM, Li J, Men XL. [the research applications of db/db mouse]. *Sheng li ke xue jin zhan [Progress in physiology]*. 2013;44:12-18
37. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (ukpds 35): Prospective observational study. *Bmj*. 2000;321:405-412
38. Schlienger JL. [type 2 diabetes complications]. *Presse Med*. 2013;42:839-848
39. Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: Mechanisms of injury and protective factors. *Cell metabolism*. 2013;17:20-33

40. Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. *The New England journal of medicine*. 2012;366:1227-1239
41. Kimmelstiel P, Wilson C. Inter-capillary lesions in the glomeruli of the kidney. *The American journal of pathology*. 1936;12:83-98 87
42. Reidy K, Kang HM, Hostetter T, Susztak K. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124:2333-2340
43. Couchoud C, Stengel B, Landais P, Aldigier JC, de Cornelissen F, Dabot C, et al. The renal epidemiology and information network (rein): A new registry for end-stage renal disease in france. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2006;21:411-418
44. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: Epidemiology, pathophysiology, and management. *Jama*. 2002;287:2570-2581
45. Delbin MA, Trask AJ. The diabetic vasculature: Physiological mechanisms of dysfunction and influence of aerobic exercise training in animal models. *Life sciences*. 2014;102:1-9
46. Ruiters MS, van Golde JM, Schaper NC, Stehouwer CD, Huijberts MS. Diabetes impairs arteriogenesis in the peripheral circulation: Review of molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 2010;119:225-238
47. Saydah SH, Eberhardt MS, Loria CM, Brancati FL. Age and the burden of death attributable to diabetes in the united states. *American journal of epidemiology*. 2002;156:714-719
48. Melchior T, Kober L, Madsen CR, Seibaek M, Jensen GV, Hildebrandt P, et al. Accelerating impact of diabetes mellitus on mortality in the years following an acute myocardial infarction. Trace study group. Trandolapril cardiac evaluation. *European heart journal*. 1999;20:973-978
49. Cosson E, Guimfack M, Paries J, Paycha F, Attali JR, Valensi P. Prognosis for coronary stenoses in patients with diabetes and silent myocardial ischemia. *Diabetes care*. 2003;26:1313-1314
50. Romon I, Fosse S, Eschwege E, Simon D, Weill A, Varroud-Vial M, et al. Prevalence of macrovascular complications and cardiovascular risk factors in people treated for diabetes and living in france: The entred study 2001. *Diabetes & metabolism*. 2008;34:140-147
51. Ergul A, Kelly-Cobbs A, Abdalla M, Fagan SC. Cerebrovascular complications of diabetes: Focus on stroke. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2012;12:148-158
52. Fosse S, Hartemann-Heurtier A, Jacqueminet S, Ha Van G, Grimaldi A, Fagot-Campagna A. Incidence and characteristics of lower limb amputations in people with diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2009;26:391-396
53. Krempf M, Parhofer KG, Steg PG, Bhatt DL, Ohman EM, Rother J, et al. Cardiovascular event rates in diabetic and nondiabetic individuals with and without established atherothrombosis (from the reduction of atherothrombosis for continued health [reach] registry). *The American journal of cardiology*. 2010;105:667-671
54. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: The framingham study. *Circulation*. 1979;59:8-13

55. Miettinen H, Lehto S, Salomaa V, Mahonen M, Niemela M, Haffner SM, et al. Impact of diabetes on mortality after the first myocardial infarction. The finmonica myocardial infarction register study group. *Diabetes care*. 1998;21:69-75
56. Verges B, Zeller M, Dentan G, Beer JC, Laurent Y, Janin-Manificat L, et al. Impact of fasting glycemia on short-term prognosis after acute myocardial infarction. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2007;92:2136-2140
57. Allen CL, Bayraktutan U. Risk factors for ischaemic stroke. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*. 2008;3:105-116
58. Ergul A, Li W, Elgebaly MM, Bruno A, Fagan SC. Hyperglycemia, diabetes and stroke: Focus on the cerebrovasculature. *Vascular pharmacology*. 2009;51:44-49
59. Pulsinelli WA, Levy DE, Sigsbee B, Scherer P, Plum F. Increased damage after ischemic stroke in patients with hyperglycemia with or without established diabetes mellitus. *The American journal of medicine*. 1983;74:540-544
60. Oppenheimer SM, Hoffbrand BI, Oswald GA, Yudkin JS. Diabetes mellitus and early mortality from stroke. *British medical journal*. 1985;291:1014-1015
61. Bornstein NM, Brainin M, Guekht A, Skoog I, Korczyn AD. Diabetes and the brain: Issues and unmet needs. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2014;35:995-1001
62. Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Effect of blood pressure and diabetes on stroke in progression. *Lancet*. 1994;344:156-159
63. Karsito, Soeatmadji DW. Diabetes and stroke. *Acta medica Indonesiana*. 2008;40:151-158
64. Kent TA, Soukup VM, Fabian RH. Heterogeneity affecting outcome from acute stroke therapy: Making reperfusion worse. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2001;32:2318-2327
65. Hawkins BT, Lundeen TF, Norwood KM, Brooks HL, Egleton RD. Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: Contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases. *Diabetologia*. 2007;50:202-211
66. Kumari R, Willing LB, Krady JK, Vannucci SJ, Simpson IA. Impaired wound healing after cerebral hypoxia-ischemia in the diabetic mouse. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007;27:710-718
67. Marso SP, Hiatt WR. Peripheral arterial disease in patients with diabetes. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47:921-929
68. Aggarwal S, Loomba RS, Arora R. Preventive aspects in peripheral artery disease. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*. 2012;6:53-70
69. Kellicut DC, 3rd, Sidawy AN, Arora S. Diabetic vascular disease and its management. *Seminars in vascular surgery*. 2003;16:12-18
70. Benhamou AC, Dadon M, Emmerich J, Fontaine P, Got I, Guillausseau PJ, et al. [arteriopathy of the lower limb in the diabetic patient. Recommendations of alfediam (french language association for the study of diabetes and metabolic diseases)]. *Diabetes & metabolism*. 1997;23:541-548
71. Gibbons GW, Shaw PM. Diabetic vascular disease: Characteristics of vascular disease unique to the diabetic patient. *Seminars in vascular surgery*. 2012;25:89-92

72. Silvestre JS, Levy BI. [diabetes and peripheral arterial occlusive disease: Therapeutic potential and pro-angiogenic strategies]. *Annales de cardiologie et d'angiologie*. 2006;55:100-103
73. Jude EB, Oyibo SO, Chalmers N, Boulton AJ. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: A comparison of severity and outcome. *Diabetes care*. 2001;24:1433-1437
74. Sharma JN, Al-Sherif GJ. Pharmacologic targets and prototype therapeutics in the kallikrein-kinin system: Bradykinin receptor agonists or antagonists. *TheScientificWorldJournal*. 2006;6:1247-1261
75. Stattin P, Bjor O, Ferrari P, Lukanova A, Lenner P, Lindahl B, et al. Prospective study of hyperglycemia and cancer risk. *Diabetes care*. 2007;30:561-567
76. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117:1219-1222
77. Le NN, Rose MB, Levinson H, Klitzman B. Implant healing in experimental animal models of diabetes. *Journal of diabetes science and technology*. 2011;5:605-618
78. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet*. 2005;366:1736-1743
79. Boulton AJ, Vileikyte L, Ragnarson-Tennvall G, Apelqvist J. The global burden of diabetic foot disease. *Lancet*. 2005;366:1719-1724
80. Fosse S, Hartemann-Heurtier A, Jacqueminet S, Mouquet MC, Oberlin P, Fagot-Campagna A. Evolution of the incidence of lower limb amputations among diabetics, and 3 years of becoming diabetic amputees people, according to data from the pmsi. *Diabetes Metab*. 2010;36:A26-A26
81. Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Pandini G, Vigneri R. Diabetes and cancer. *Endocrine-related cancer*. 2009;16:1103-1123
82. Gariani K, Tran C, Philippe J. [diabetes and cancer: An injurious association]. *Revue medicale suisse*. 2010;6:1193-1194, 1196-1198
83. Kasper JS, Giovannucci E. A meta-analysis of diabetes mellitus and the risk of prostate cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2006;15:2056-2062
84. Abelous JE, Bardier E. Hipotensive substances of normal human urine. *Cr Soc Biol*. 1909;66:511-512
85. Alhenc-Gelas F, Bouby N, Richer C, Potier L, Roussel R, Marre M. Kinins as therapeutic agents in cardiovascular and renal diseases. *Current pharmaceutical design*. 2011;17:2654-2662
86. Chao J, Chao L. Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease. *Experimental physiology*. 2005;90:291-298
87. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: Kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological reviews*. 1992;44:1-80
88. Adam A, Blais C, Jr., Loute G. [kinins: Their nature and their potential role in the cardiovascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors]. *Nephrologie*. 2000;21:163-172
89. Adam A, Albert A, Calay G, Closset J, Damas J, Franchimont P. Human kininogens of low and high molecular mass: Quantification by radioimmunoassay and determination of reference values. *Clinical chemistry*. 1985;31:423-426
90. Lalmanach G, Naudin C, Lecaille F, Fritz H. Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors. *Biochimie*. 2010;92:1568-1579

91. Beaubien G, Rosinski-Chupin I, Mattei MG, Mbikay M, Chretien M, Seidah NG. Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry*. 1991;30:1628-1635
92. Griffon C, Boehm N, Allegrini J, Mitermique A, Alhenc-Gelas F, Hudlett P, et al. [gene transfers of kallikrein, bradykinin receptor b2 and a mutated b2 receptor stimulate neoangiogenesis in peripheral ischemia]. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux*. 2005;98:825-829
93. Yousef GM, Diamandis EP. The new human tissue kallikrein gene family: Structure, function, and association to disease. *Endocrine reviews*. 2001;22:184-204
94. Mason AJ, Evans BA, Cox DR, Shine J, Richards RI. Structure of mouse kallikrein gene family suggests a role in specific processing of biologically active peptides. *Nature*. 1983;303:300-307
95. Albert-Weissenberger C, Siren AL, Kleinschnitz C. Ischemic stroke and traumatic brain injury: The role of the kallikrein-kinin system. *Prog Neurobiol*. 2013;101-102:65-82
96. Duncan AM, Kladis A, Jennings GL, Dart AM, Esler M, Campbell DJ. Kinins in humans. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2000;278:R897-904
97. Murphey LJ, Malave HA, Petro J, Biaggioni I, Byrne DW, Vaughan DE, et al. Bradykinin and its metabolite bradykinin 1-5 inhibit thrombin-induced platelet aggregation in humans. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;318:1287-1292
98. Kuoppala A, Lindstedt KA, Saarinen J, Kovanen PT, Kokkonen JO. Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase n in human plasma. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2000;278:H1069-1074
99. Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin i-converting enzyme (kininase ii). Studies with bradykinin and other natural peptides. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268:9496-9503
100. Ishida H, Scicli AG, Carretero OA. Contributions of various rat plasma peptidases to kinin hydrolysis. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1989;251:817-820
101. Vianna RM, Calixto JB. Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-arg9-bk in mouse pleurisy. *British journal of pharmacology*. 1998;123:281-291
102. Murphey LJ, Hachey DL, Oates JA, Morrow JD, Brown NJ. Metabolism of bradykinin in vivo in humans: Identification of bk1-5 as a stable plasma peptide metabolite. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2000;294:263-269
103. Hasan AA, Warnock M, Nieman M, Srikanth S, Mahdi F, Krishnan R, et al. Mechanisms of arg-pro-pro-gly-phe inhibition of thrombin. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2003;285:H183-193
104. Morinelli TA, Webb JG, Jaffa AA, Privitera PJ, Margolius HS. A metabolic fragment of bradykinin, arg-pro-pro-gly-phe, protects against the deleterious effects of lipopolysaccharide in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2001;296:71-76

105. Bernstein KE, Sayeski PP, Doan T, Farmer PK, Ali MS. Signal transduction pathways of angiotensin ii in the kidney. *Contributions to nephrology*. 2001;16-33
106. Ura N, Carretero OA, Erdos EG. Role of renal endopeptidase 24.11 in kinin metabolism in vitro and in vivo. *Kidney international*. 1987;32:507-513
107. Sheikh IA, Kaplan AP. Studies of the digestion of bradykinin, lys-bradykinin, and des-arg9-bradykinin by angiotensin converting enzyme. *Biochemical pharmacology*. 1986;35:1951-1956
108. Ward PE, Chow A, Drapeau G. Metabolism of bradykinin agonists and antagonists by plasma aminopeptidase p. *Biochemical pharmacology*. 1991;42:721-727
109. Erdos EG, Skidgel RA. Human neutral endopeptidase 24.11 (nep, enkephalinase); function, distribution and release. *Advances in experimental medicine and biology*. 1988;240:13-21
110. Marceau F, Gendreau M, Barabe J, St-Pierre S, Regoli D. The degradation of bradykinin (bk) and of des-arg9-bk in plasma. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1981;59:131-138
111. Sheikh IA, Kaplan AP. Studies of the digestion of bradykinin, lysyl bradykinin, and kinin-degradation products by carboxypeptidases a, b, and n. *Biochemical pharmacology*. 1986;35:1957-1963
112. Skidgel RA. Basic carboxypeptidases: Regulators of peptide hormone activity. *Trends in pharmacological sciences*. 1988;9:299-304
113. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. Xlv. Classification of the kinin receptor family: From molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*. 2005;57:27-77
114. Spillmann F, Altmann C, Scheeler M, Barbosa M, Westermann D, Schultheiss HP, et al. Regulation of cardiac bradykinin b1- and b2-receptor mrna in experimental ischemic, diabetic, and pressure-overload-induced cardiomyopathy. *International immunopharmacology*. 2002;2:1823-1832
115. Schremmer-Danninger E, Offner A, Siebeck M, Roscher AA. B1 bradykinin receptors and carboxypeptidase m are both upregulated in the aorta of pigs after lps infusion. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;243:246-252
116. Figueroa CD, Marchant A, Novoa U, Forstermann U, Jarnagin K, Scholkens B, et al. Differential distribution of bradykinin b(2) receptors in the rat and human cardiovascular system. *Hypertension*. 2001;37:110-120
117. Tropea MM, Gummelt D, Herzig MS, Leeb-Lundberg LM. B1 and b2 kinin receptors on cultured rabbit superior mesenteric artery smooth muscle cells: Receptor-specific stimulation of inositol phosphate formation and arachidonic acid release by des-arg9-bradykinin and bradykinin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1993;264:930-937
118. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: Current and future pharmacological targets. *Journal of pharmacological sciences*. 2005;99:6-38
119. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The b1 receptors for kinins. *Pharmacological reviews*. 1998;50:357-386
120. Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, Gavras H. Vasoactive potential of the b(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circulation research*. 2001;88:275-281

121. Duka I, Duka A, Kintsurashvili E, Johns C, Gavras I, Gavras H. Mechanisms mediating the vasoactive effects of the b1 receptors of bradykinin. *Hypertension*. 2003;42:1021-1025
122. 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. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2001;297:19-26
123. Blaukat A. Structure and signalling pathways of kinin receptors. *Andrologia*. 2003;35:17-23
124. Marceau F, Adam A, Houle S, Bouthillier J, Bachvarova M, Bachvarov DR. Ligand-mediated regulation of kinin receptors in the rabbit. *Biological chemistry*. 2001;382:131-133
125. Kakoki M, Smithies O. The kallikrein-kinin system in health and in diseases of the kidney. *Kidney international*. 2009;75:1019-1030
126. Mathis SA, Criscimagna NL, Leeb-Lundberg LM. B1 and b2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Molecular pharmacology*. 1996;50:128-139
127. 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. *The American journal of physiology*. 1999;277:R1568-1578
128. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Warnock M, Homeister JW, Srikanth S, Krijanovski Y, et al. Bradykinin b2 receptor knockout mice are protected from thrombosis by increased nitric oxide and prostacyclin. *Blood*. 2006;108:192-199
129. Zhang X, Tan F, Brovkovich V, Zhang Y, Skidgel RA. Cross-talk between carboxypeptidase m and the kinin b1 receptor mediates a new mode of g protein-coupled receptor signaling. *J Biol Chem*. 2011;286:18547-18561
130. Su JB. Different cross-talk sites between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2014;15:319-328
131. Martorana PA, Kettenbach B, Breipohl G, Linz W, Scholkens BA. Reduction of infarct size by local angiotensin-converting enzyme inhibition is abolished by a bradykinin antagonist. *European journal of pharmacology*. 1990;182:395-396
132. Linz W, Scholkens BA. Role of bradykinin in the cardiac effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1992;20 Suppl 9:S83-90
133. Mukae S, Aoki S, Itoh S, Iwata T, Ueda H, Katagiri T. Bradykinin b(2) receptor gene polymorphism is associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor-related cough. *Hypertension*. 2000;36:127-131
134. Meneton P, Bloch-Faure M, Hagege AA, Ruetten H, Huang W, Bergaya S, et al. Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:2634-2639
135. Trabold F, Pons S, Hagege AA, Bloch-Faure M, Alhenc-Gelas F, Giudicelli JF, et al. Cardiovascular phenotypes of kinin b2 receptor- and tissue kallikrein-deficient mice. *Hypertension*. 2002;40:90-95
136. Waeckel L, Potier L, Richer C, Roussel R, Bouby N, Alhenc-Gelas F. Pathophysiology of genetic deficiency in tissue kallikrein activity in mouse and man. *Thrombosis and haemostasis*. 2013;110:476-483

137. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA, Jr., Walther T, et al. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin b1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:8140-8145
138. Xu J, Carretero OA, Sun Y, Shesely EG, Rhaleb NE, Liu YH, et al. Role of the b1 kinin receptor in the regulation of cardiac function and remodeling after myocardial infarction. *Hypertension*. 2005;45:747-753
139. Borkowski JA, Ransom RW, Seabrook GR, Trumbauer M, Chen H, Hill RG, et al. Targeted disruption of a b2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270:13706-13710
140. Regoli D, Barabe J, Park WK. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1977;55:855-867
141. Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ. Bradykinin receptors and their antagonists. *European journal of pharmacology*. 1998;348:1-10
142. Sharma JN. Basic and clinical aspects of bradykinin receptor antagonists. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques*. 2014;69:1-14
143. Altamura M, Meini S, Quartara L, Maggi CA. Nonpeptide antagonists for kinin receptors. *Regulatory peptides*. 1999;80:13-26
144. Hock FJ, Wirth K, Albus U, Linz W, Gerhards HJ, Wiemer G, et al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: In vitro studies. *British journal of pharmacology*. 1991;102:769-773
145. Wirth K, Hock FJ, Albus U, Linz W, Alpermann HG, Anagnostopoulos H, et al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: In vivo studies. *British journal of pharmacology*. 1991;102:774-777
146. Feletou M, Germain M, Thurieau C, Fauchere JL, Canet E. Agonistic and antagonistic properties of the bradykinin b2 receptor antagonist, hoe 140, in isolated blood vessels from different species. *British journal of pharmacology*. 1994;112:683-689
147. Bachvarov DR, Saint-Jacques E, Larrivee JF, Levesque L, Rioux F, Drapeau G, et al. Cloning and pharmacological characterization of the rabbit bradykinin b2 receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1995;275:1623-1630
148. Jarnagin K, Bhakta S, Zuppan P, Yee C, Ho T, Phan T, et al. Mutations in the b2 bradykinin receptor reveal a different pattern of contacts for peptidic agonists and peptidic antagonists. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271:28277-28286
149. Charignon D, Spath P, Martin L, Drouet C. Icatibant , the bradykinin b2 receptor antagonist with target to the interconnected kinin systems. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2012;13:2233-2247
150. Cole SW, Lundquist LM. Icatibant for the treatment of hereditary angioedema. *The Annals of pharmacotherapy*. 2013;47:49-55
151. Cruden NL, Newby DE. Therapeutic potential of icatibant (hoe-140, je-049). *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2008;9:2383-2390
152. Cyr M, Lepage Y, Blais C, Jr., Gervais N, Cugno M, Rouleau JL, et al. Bradykinin and des-arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2001;281:H275-283

153. Rhaleb NE, Drapeau G, Dion S, Jukic D, Rouissi N, Regoli D. Structure-activity studies on bradykinin and related peptides: Agonists. *British journal of pharmacology*. 1990;99:445-448
154. Cote J, Savard M, Bovenzi V, Belanger S, Morin J, Neugebauer W, et al. Novel kinin b1 receptor agonists with improved pharmacological profiles. *Peptides*. 2009;30:788-795
155. 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. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1997;280:6-15
156. Drapeau G, deBlois D, Marceau F. Hypotensive effects of lys-des-arg⁹-bradykinin and metabolically protected agonists of b1 receptors for kinins. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1991;259:997-1003
157. Drapeau G, Chow A, Ward PE. Metabolism of bradykinin analogs by angiotensin i converting enzyme and carboxypeptidase n. *Peptides*. 1991;12:631-638
158. Cote J, Savard M, Neugebauer W, Fortin D, Lepage M, Gobeil F. Dual kinin b1 and b2 receptor activation provides enhanced blood-brain barrier permeability and anticancer drug delivery into brain tumors. *Cancer biology & therapy*. 2013;14:806-811
159. Cote J, Bovenzi V, Savard M, Dubuc C, Fortier A, Neugebauer W, et al. Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin b1 receptor agonist in a glioma rat model. *PloS one*. 2012;7:e37485
160. Potier L, Waeckel L, Vincent MP, Chollet C, Gobeil F, Jr., Marre M, et al. Selective kinin receptor agonists as cardioprotective agents in myocardial ischemia and diabetes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2013;346:23-30
161. Heitsch H. The therapeutic potential of bradykinin b2 receptor agonists in the treatment of cardiovascular disease. *Expert opinion on investigational drugs*. 2003;12:759-770
162. Belanger S, Bovenzi V, Cote J, Neugebauer W, Amblard M, Martinez J, et al. Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin b2 receptor. *Peptides*. 2009;30:777-787
163. Savard M, Labonte J, Dubuc C, Neugebauer W, D'Orleans-Juste P, Gobeil F, Jr. Further pharmacological evaluation of a novel synthetic peptide bradykinin b2 receptor agonist. *Biological chemistry*. 2013;394:353-360
164. Rhaleb NE, Yang XP, Carretero OA. The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function. *Comprehensive Physiology*. 2011;1:971-993
165. el-Dahr SS. Ontogeny of the intrarenal kallikrein-kinin system: Proposed role in renal development. *Microscopy research and technique*. 1997;39:222-232
166. Margolis HS, Geller R, Pisano JJ, Sjoerdsma A. Altered urinary kallikrein excretion in human hypertension. *Lancet*. 1971;2:1063-1065
167. Katori M, Majima M. Role of the renal kallikrein-kinin system in the development of hypertension. *Immunopharmacology*. 1997;36:237-242
168. Cervenka L, Harrison-Bernard LM, Dipp S, Primrose G, Imig JD, El-Dahr SS. Early onset salt-sensitive hypertension in bradykinin b(2) receptor null mice. *Hypertension*. 1999;34:176-180

169. Madeddu P, Varoni MV, Demontis MP, Chao J, Simson JA, Glorioso N, et al. Kallikrein-kinin system and blood pressure sensitivity to salt. *Hypertension*. 1997;29:471-477
170. Costa-Neto CM, Dillenburg-Pilla P, Heinrich TA, Parreiras-e-Silva LT, Pereira MG, Reis RI, et al. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. *International immunopharmacology*. 2008;8:135-142
171. Kakoki M, McGarrah RW, Kim HS, Smithies O. Bradykinin b1 and b2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104:7576-7581
172. Sharma JN. The kinin system in hypertensive pathophysiology. *Inflammopharmacology*. 2013;21:1-9
173. Chao J, Bledsoe G, Yin H, Chao L. The tissue kallikrein-kinin system protects against cardiovascular and renal diseases and ischemic stroke independently of blood pressure reduction. *Biological chemistry*. 2006;387:665-675
174. Pons S, Griol-Charhbili V, Heymes C, Fornes P, Heudes D, Hagege A, et al. Tissue kallikrein deficiency aggravates cardiac remodelling and decreases survival after myocardial infarction in mice. *European journal of heart failure*. 2008;10:343-351
175. Bledsoe G, Chao L, Chao J. Kallikrein gene delivery attenuates cardiac remodeling and promotes neovascularization in spontaneously hypertensive rats. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2003;285:H1479-1488
176. Messadi-Laribi E, Griol-Charhbili V, Gaies E, Vincent MP, Heudes D, Meneton P, et al. Cardioprotection and kallikrein-kinin system in acute myocardial ischaemia in mice. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. 2008;35:489-493
177. Ito H, Hayashi I, Izumi T, Majima M. Bradykinin inhibits development of myocardial infarction through b2 receptor signalling by increment of regional blood flow around the ischaemic lesions in rats. *British journal of pharmacology*. 2003;138:225-233
178. Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circulation research*. 1995;77:611-621
179. Bell RM, Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: The role of pi3k, akt and enos. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2003;35:185-193
180. Griol-Charhbili V, Messadi-Laribi E, Bascands JL, Heudes D, Meneton P, Giudicelli JF, et al. Role of tissue kallikrein in the cardioprotective effects of ischemic and pharmacological preconditioning in myocardial ischemia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19:1172-1174
181. Hartman JC, Wall TM, Hullinger TG, Shebuski RJ. Reduction of myocardial infarct size in rabbits by ramiprilat: Reversal by the bradykinin antagonist hoe 140. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1993;21:996-1003
182. Madeddu P, Emanuelli C, El-Dahr S. Mechanisms of disease: The tissue kallikrein-kinin system in hypertension and vascular remodeling. *Nature clinical practice. Nephrology*. 2007;3:208-221
183. Emanuelli C, Minasi A, Zacheo A, Chao J, Chao L, Salis MB, et al. Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation*. 2001;103:125-132

184. Colman RW. Regulation of angiogenesis by the kallikrein-kinin system. *Current pharmaceutical design*. 2006;12:2599-2607
185. Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger CM, Levy BI. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin b(2) receptor pathway. *Circulation research*. 2001;89:678-683
186. Li P, Kondo T, Numaguchi Y, Kobayashi K, Aoki M, Inoue N, et al. Role of bradykinin, nitric oxide, and angiotensin ii type 2 receptor in imidapril-induced angiogenesis. *Hypertension*. 2008;51:252-258
187. Emanuelli C, Salis MB, Stacca T, Gaspa L, Chao J, Chao L, et al. Rescue of impaired angiogenesis in spontaneously hypertensive rats by intramuscular human tissue kallikrein gene transfer. *Hypertension*. 2001;38:136-141
188. Smith RS, Jr., Gao L, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein and kinin infusion promotes neovascularization in limb ischemia. *Biological chemistry*. 2008;389:725-730
189. Emanuelli C, Madeddu P. Targeting kinin receptors for the treatment of tissue ischaemia. *Trends in pharmacological sciences*. 2001;22:478-484
190. Emanuelli C, Bonaria Salis M, Stacca T, Pintus G, Kirchmair R, Isner JM, et al. Targeting kinin b(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation*. 2002;105:360-366
191. Spinetti G, Fortunato O, Cordella D, Portararo P, Krankel N, Katare R, et al. Tissue kallikrein is essential for invasive capacity of circulating proangiogenic cells. *Circulation research*. 2011;108:284-293
192. Stone OA, Richer C, Emanuelli C, van Weel V, Quax PH, Katare R, et al. Critical role of tissue kallikrein in vessel formation and maturation: Implications for therapeutic revascularization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29:657-664
193. Emanuelli C, Madeddu P. Renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems coordinately modulate angiogenesis. *Hypertension*. 2002;39:e29
194. Krankel N, Katare RG, Siragusa M, Barcelos LS, Campagnolo P, Mangialardi G, et al. Role of kinin b2 receptor signaling in the recruitment of circulating progenitor cells with neovascularization potential. *Circulation research*. 2008;103:1335-1343
195. Ward MR, Lavoie J, Stewart DJ. "B2 or not b2?": Kinin receptors and endothelial progenitor cell dysfunction. *Circulation research*. 2008;103:1202-1203
196. Austinat M, Braeuninger S, Pesquero JB, Brede M, Bader M, Stoll G, et al. Blockade of bradykinin receptor b1 but not bradykinin receptor b2 provides protection from cerebral infarction and brain edema. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2009;40:285-293
197. Lu J, Zhang Y, Shi J. Effects of intracerebroventricular infusion of angiotensin-(1-7) on bradykinin formation and the kinin receptor expression after focal cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Brain research*. 2008;1219:127-135
198. Groger M, Lebesgue D, Pruneau D, Relton J, Kim SW, Nussberger J, et al. Release of bradykinin and expression of kinin b2 receptors in the brain: Role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005;25:978-989
199. Kamiya T, Katayama Y, Kashiwagi F, Terashi A. The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1993;24:571-575; discussion 575-576

200. Dobrivojevic M, Spiranec K, Sindic A. Involvement of bradykinin in brain edema development after ischemic stroke. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2015;467:201-212
201. Albert-Weissenberger C, Mencl S, Hopp S, Kleinschnitz C, Siren AL. Role of the kallikrein-kinin system in traumatic brain injury. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:345
202. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008;55:310-318
203. Shichita T, Ito M, Yoshimura A. Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:319
204. Chiba T, Umegaki K. Pivotal roles of monocytes/macrophages in stroke. *Mediators of inflammation*. 2013;2013:759103
205. 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. *British journal of pharmacology*. 2003;139:1539-1547
206. Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N, Baethmann A. Therapeutical efficacy of a novel non-peptide bradykinin b2 receptor antagonist on brain edema formation and ischemic tissue damage in focal cerebral ischemia. *Acta neurochirurgica. Supplement*. 2003;86:205-207
207. Klasner B, Lumenta DB, Pruneau D, Zausinger S, Plesnila N. Therapeutic window of bradykinin b2 receptor inhibition after focal cerebral ischemia in rats. *Neurochemistry international*. 2006;49:442-447
208. Relton JK, Beckey VE, Hanson WL, Whalley ET. Cp-0597, a selective bradykinin b2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1997;28:1430-1436
209. Xia CF, Yin H, Yao YY, Borlongan CV, Chao L, Chao J. Kallikrein protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and inflammation and promoting angiogenesis and neurogenesis. *Human gene therapy*. 2006;17:206-219
210. Danielisova V, Gottlieb M, Bonova P, Nemethova M, Burda J. Bradykinin postconditioning ameliorates focal cerebral ischemia in the rat. *Neurochemistry international*. 2014;72:22-29
211. Martins AH, Alves JM, Perez D, Carrasco M, Torres-Rivera W, Eterovic VA, et al. Kinin-b2 receptor mediated neuroprotection after nmda excitotoxicity is reversed in the presence of kinin-b1 receptor agonists. *PloS one*. 2012;7:e30755
212. Danielisova V, Gottlieb M, Nemethova M, Kravcukova P, Domorakova I, Mechirova E, et al. Bradykinin postconditioning protects pyramidal ca1 neurons against delayed neuronal death in rat hippocampus. *Cellular and molecular neurobiology*. 2009;29:871-878
213. Su J, Cui M, Tang Y, Zhou H, Liu L, Dong Q. Blockade of bradykinin b2 receptor more effectively reduces postischemic blood-brain barrier disruption and cytokines release than b1 receptor inhibition. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;388:205-211
214. Trabold R, Eros C, Zweckberger K, Relton J, Beck H, Nussberger J, et al. The role of bradykinin b(1) and b(2) receptors for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30:130-139

215. Naffah-Mazzacoratti Mda G, Gouveia TL, Simoes PS, Perosa SR. What have we learned about the kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in neurological disorders? *World journal of biological chemistry*. 2014;5:130-140
216. Unterberg A, Dautermann C, Baethmann A, Muller-Esterl W. The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 3: Inhibition of the kallikrein-kinin system in traumatic brain swelling. *Journal of neurosurgery*. 1986;64:269-276
217. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *European journal of pharmacology*. 2001;429:161-176
218. Duchene J, Lecomte F, Ahmed S, Cayla C, Pesquero J, Bader M, et al. A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: Role for the kinin b1 receptor and the chemokine cxcl5. *J Immunol*. 2007;179:4849-4856
219. Walker K, Perkins M, Dray A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochemistry international*. 1995;26:1-16; discussion 17-26
220. Chao J, Shen B, Gao L, Xia CF, Bledsoe G, Chao L. Tissue kallikrein in cardiovascular, cerebrovascular and renal diseases and skin wound healing. *Biological chemistry*. 2010;391:345-355
221. Schremmer-Danninger E, Naidoo S, Neuhof C, Valeske K, Snyman C, Sander C, et al. Visualisation of tissue kallikrein, kininogen and kinin receptors in human skin following trauma and in dermal diseases. *Biological chemistry*. 2004;385:1069-1076
222. Poblete MT, Reynolds NJ, Figueroa CD, Burton JL, Muller-Esterl W, Bhoola KD. Tissue kallikrein and kininogen in human sweat glands and psoriatic skin. *The British journal of dermatology*. 1991;124:236-241
223. Schremmer-Danninger E, Hermann A, Fink E, Fritz H, Roscher AA. Identification and occurrence of mrnas for components of the kallikrein-kinin system in human skin and in skin diseases. *Immunopharmacology*. 1999;43:287-291
224. Matus CE, Ehrenfeld P, Pavicic F, Sarmiento JM, Astroza A, Sanchez T, et al. Activation of kinin b receptor triggers differentiation of cultured human keratinocytes. *The British journal of dermatology*. 2008;159:792-803
225. Vidal MA, Astroza A, Matus CE, Ehrenfeld P, Pavicic F, Sanchez T, et al. Kinin b2 receptor-coupled signal transduction in human cultured keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology*. 2005;124:178-186
226. Coutant KD, Ryder NS. Bradykinin upregulates immediate-early gene mrna in human keratinocytes. *Archives of dermatological research*. 1996;288:2-6
227. Ran LW, Tan WM, Tan SS, Zhang R, Cao ZP, Lei XB. [effects of bradykinin on the proliferation, apoptosis and differentiation of human keratinocytes]. *Zhonghua shao shang za zhi = Zhonghua shaoshang zazhi = Chinese journal of burns*. 2005;21:289-292
228. Gao L, Chao L, Chao J. A novel signaling pathway of tissue kallikrein in promoting keratinocyte migration: Activation of proteinase-activated receptor 1 and epidermal growth factor receptor. *Experimental cell research*. 2010;316:376-389
229. da Costa PL, Sirois P, Tannock IF, Chammas R. The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities. *Cancer letters*. 2014;345:27-38
230. Gabra BH, Couture R, Sirois P. [functional duality of kinin receptors in pathophysiology]. *Medecine sciences : M/S*. 2003;19:1101-1110
231. Kashuba E, Bailey J, Allsup D, Cawkwell L. The kinin-kallikrein system: Physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers.

- Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals.* 2013;18:279-296
232. Chao J, Bledsoe G, Chao L. Tissue kallikrein-kinin therapy in hypertension and organ damage. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques.* 2014;69:37-57
233. Campos MM, Ongali B, De Souza Buck H, Schanstra JP, Girolami JP, Chabot JG, et al. Expression and distribution of kinin b1 receptor in the rat brain and alterations induced by diabetes in the model of streptozotocin. *Synapse.* 2005;57:29-37
234. Sharma JN, Narayanan P. The kallikrein-kinin pathways in hypertension and diabetes. *Prog Drug Res.* 2014;69:15-36
235. Zuccollo A, Cueva F, Frontera M, Navarro M, Catanzaro O. The role of the kallikrein-kinin system in type i diabetes (insulinitis). *Immunopharmacology.* 1996;33:349-350
236. Wicklmayr M, Rett K, Baldermann H, Dietze G. The kallikrein/kinin system in the pathogenesis of hypertension in diabetes mellitus. *Diabete & metabolisme.* 1989;15:306-310
237. Kakoki M, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, Oh SS, Hua K, et al. Lack of both bradykinin b1 and b2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in akita diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2010;107:10190-10195
238. Regoli D, Plante GE, Gobeil F, Jr. Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacology & therapeutics.* 2012;135:94-111
239. Damas J, Garbacki N, Lefebvre PJ. The kallikrein-kinin system, angiotensin converting enzyme inhibitors and insulin sensitivity. *Diabetes/metabolism research and reviews.* 2004;20:288-297
240. Couture R, Girolami JP. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *European journal of pharmacology.* 2004;500:467-485
241. Duka I, Shenouda S, Johns C, Kintsurashvili E, Gavras I, Gavras H. Role of the b(2) receptor of bradykinin in insulin sensitivity. *Hypertension.* 2001;38:1355-1360
242. Araujo RC, Mori MA, Merino VF, Bascands JL, Schanstra JP, Zollner RL, et al. Role of the kinin b1 receptor in insulin homeostasis and pancreatic islet function. *Biological chemistry.* 2006;387:431-436
243. Barros CC, Haro A, Russo FJ, Schadock I, Almeida SS, Ribeiro RA, et al. Altered glucose homeostasis and hepatic function in obese mice deficient for both kinin receptor genes. *PLoS one.* 2012;7:e40573
244. Tomiyama H, Kushiro T, Abeta H, Ishii T, Takahashi A, Furukawa L, et al. Kinins contribute to the improvement of insulin sensitivity during treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor. *Hypertension.* 1994;23:450-455
245. Kolodka T, Charles ML, Raghavan A, Radichev IA, Amatya C, Ellefson J, et al. Preclinical characterization of recombinant human tissue kallikrein-1 as a novel treatment for type 2 diabetes mellitus. *PLoS one.* 2014;9:e103981
246. Potier L, Waeckel L, Fumeron F, Bodin S, Fysekidis M, Chollet C, et al. Tissue kallikrein deficiency, insulin resistance, and diabetes in mouse and man. *The Journal of endocrinology.* 2014;221:297-308
247. Damas J, Bourdon V, Lefebvre PJ. Insulin sensitivity, clearance and release in kininogen-deficient rats. *Experimental physiology.* 1999;84:549-557

248. Zuccollo A, Navarro M, Frontera M, Cueva F, Carattino M, Catanzaro OL. The involvement of kallikrein-kinin system in diabetes type i (insulinitis). *Immunopharmacology*. 1999;45:69-74
249. Ardaillou N, Blaise V, Costenbader K, Vassitch Y, Ardaillou R. Characterization of a b2-bradykinin receptor in human glomerular podocytes. *The American journal of physiology*. 1996;271:F754-761
250. Tomita H, Sanford RB, Smithies O, Kakoki M. The kallikrein-kinin system in diabetic nephropathy. *Kidney international*. 2012;81:733-744
251. Buleon M, Allard J, Jaafar A, Praddaude F, Dickson Z, Ranera MT, et al. Pharmacological blockade of b2-kinin receptor reduces renal protective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in db/db mice model. *American journal of physiology. Renal physiology*. 2008;294:F1249-1256
252. Tan Y, Keum JS, Wang B, McHenry MB, Lipsitz SR, Jaffa AA. Targeted deletion of b2-kinin receptors protects against the development of diabetic nephropathy. *American journal of physiology. Renal physiology*. 2007;293:F1026-1035
253. Gurley SB, Clare SE, Snow KP, Hu A, Meyer TW, Coffman TM. Impact of genetic background on nephropathy in diabetic mice. *American journal of physiology. Renal physiology*. 2006;290:F214-222
254. Ma JX, Song Q, Hatcher HC, Crouch RK, Chao L, Chao J. Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues. *Experimental eye research*. 1996;63:19-26
255. Abdouh 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. *British journal of pharmacology*. 2003;140:33-40
256. Pinna A, Emanuelli C, Dore S, Salvo M, Madeddu P, Carta F. Levels of human tissue kallikrein in the vitreous fluid of patients with severe proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmologica. Journal internationale d'ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde*. 2004;218:260-263
257. Pruneau D, Belichard P, Sahel JA, Combal JP. Targeting the kallikrein-kinin system as a new therapeutic approach to diabetic retinopathy. *Current opinion in investigational drugs*. 2010;11:507-514
258. Bhat M, Pouliot M, Couture R, Vaucher E. The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques*. 2014;69:111-143
259. Phipps JA, Feener EP. The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy: Lessons for the kidney. *Kidney international*. 2008;73:1114-1119
260. Savvatis K, Westermann D, Schultheiss HP, Tschöpe C. Kinins in cardiac inflammation and regeneration: Insights from ischemic and diabetic cardiomyopathy. *Neuropeptides*. 2010;44:119-125
261. Westermann D, Walther T, Savvatis K, Escher F, Sobirey M, Riad A, et al. Gene deletion of the kinin receptor b1 attenuates cardiac inflammation and fibrosis during the development of experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*. 2009;58:1373-1381
262. Emanuelli C, Graiani G, Salis MB, Gadau S, Desortes E, Madeddu P. Prophylactic gene therapy with human tissue kallikrein ameliorates limb ischemia recovery in type 1 diabetic mice. *Diabetes*. 2004;53:1096-1103

263. Ebrahimian TG, Tamarat R, Clergue M, Duriez M, Levy BI, Silvestre JS. Dual effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on angiogenesis in type 1 diabetic mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25:65-70
264. Desposito D, Potier L, Chollet C, Gobeil F, Jr., Roussel R, Alhenc-Gelas F, et al. Kinin receptor agonism restores hindlimb postischemic neovascularization capacity in diabetic mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2015;352:218-226
265. Criqui MH. Peripheral arterial disease--epidemiological aspects. *Vasc Med*. 2001;6:3-7
266. Ostchega Y, Paulose-Ram R, Dillon CF, Gu Q, Hughes JP. Prevalence of peripheral arterial disease and risk factors in persons aged 60 and older: Data from the national health and nutrition examination survey 1999-2004. *Journal of the American Geriatrics Society*. 2007;55:583-589
267. Muller MD, Reed AB, Leuenberger UA, Sinoway LI. Physiology in medicine: Peripheral arterial disease. *J Appl Physiol (1985)*. 2013;115:1219-1226
268. Weitz JI, Byrne J, Clagett GP, Farkouh ME, Porter JM, Sackett DL, et al. Diagnosis and treatment of chronic arterial insufficiency of the lower extremities: A critical review. *Circulation*. 1996;94:3026-3049
269. Shanmugasundaram M, Ram VK, Luft UC, Szerlip M, Alpert JS. Peripheral arterial disease--what do we need to know? *Clinical cardiology*. 2011;34:478-482
270. Criqui MH, Langer RD, Fronek A, Feigelson HS, Klauber MR, McCann TJ, et al. Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *The New England journal of medicine*. 1992;326:381-386
271. Katsilambros NL, Tsapogas PC, Arvanitis MP, Tritos NA, Alexiou ZP, Rigas KL. Risk factors for lower extremity arterial disease in non-insulin-dependent diabetic persons. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 1996;13:243-246
272. Ito M, Nihei Z, Sugihara K. [arteriosclerosis obliterans in diabetes mellitus]. *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine*. 1997;55 Suppl:772-776
273. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A, et al. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in cd4-knockout mice. *Circulation*. 2003;108:205-210
274. Stabile E, Kinnaird T, la Sala A, Hanson SK, Watkins C, Campia U, et al. Cd8+ t lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting cd4+ mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation*. 2006;113:118-124
275. Tamarat R, Silvestre JS, Durie M, Levy BI. Angiotensin ii angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2002;82:747-756
276. Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimian TG, Le-Roux A, Clergue M, Emmanuel F, et al. Vascular endothelial growth factor-b promotes in vivo angiogenesis. *Circulation research*. 2003;93:114-123
277. Waltenberger J. Vegf resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. *Biochemical Society transactions*. 2009;37:1167-1170
278. Carr CL, Qi Y, Davidson B, Chadderdon S, Jayaweera AR, Belcik JT, et al. Dysregulated selectin expression and monocyte recruitment during ischemia-

- related vascular remodeling in diabetes mellitus. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31:2526-2533
279. Tchaikovski V, Olieslagers S, Bohmer FD, Waltenberger J. Diabetes mellitus activates signal transduction pathways resulting in vascular endothelial growth factor resistance of human monocytes. *Circulation*. 2009;120:150-159
 280. Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101:40-50
 281. Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, et al. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2002;283:H2411-2419
 282. Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, et al. Human endothelial cells express ccr2 and respond to mcp-1: Direct role of mcp-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood*. 2000;96:34-40
 283. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology*. 2007;25:9-18
 284. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American journal of surgery*. 2004;187:11S-16S
 285. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *The New England journal of medicine*. 1999;341:738-746
 286. Mendonca RJ, Coutinho-Netto J. Cellular aspects of wound healing. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2009;84:257-262
 287. Komatsu N, Takata M, Otsuki N, Toyama T, Ohka R, Takehara K, et al. Expression and localization of tissue kallikrein mrnas in human epidermis and appendages. *The Journal of investigative dermatology*. 2003;121:542-549
 288. Pastore S, Mascia F, Mariani V, Girolomoni G. The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *The Journal of investigative dermatology*. 2008;128:1365-1374
 289. Li Z, Rivera CA, Burns AR, Smith CW. Hindlimb unloading depresses corneal epithelial wound healing in mice. *J Appl Physiol (1985)*. 2004;97:641-647
 290. Gawronska-Kozak B, Grabowska A, Kopcewicz M, Kur A. Animal models of skin regeneration. *Reproductive biology*. 2014;14:61-67
 291. Wang X, Ghasri P, Amir M, Hwang B, Hou Y, Khalili M, et al. Topical application of recombinant type vii collagen incorporates into the dermal-epidermal junction and promotes wound closure. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2013;21:1335-1344
 292. Seifert AW, Kiama SG, Seifert MG, Goheen JR, Palmer TM, Maden M. Skin shedding and tissue regeneration in african spiny mice (acomys). *Nature*. 2012;489:561-565
 293. Trujillo AN, Kesl SL, Sherwood J, Wu M, Gould LJ. Demonstration of the rat ischemic skin wound model. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2015
 294. Marshman G, Burton JL, Archer CB. Comparison of the actions of kallidin and bradykinin in the skin of normal and psoriatic subjects. *Clinical and experimental dermatology*. 1996;21:112-115
 295. Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: Current concepts. *Journal of periodontology*. 1992;63:338-355
 296. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the interstroke study): A case-control study. *Lancet*. 2010;376:112-123

297. Taussky P, Tawk RG, Daugherty WP, Hanel RA. Medical therapy for ischemic stroke: Review of intravenous and intra-arterial treatment options. *World neurosurgery*. 2011;76:S9-15
298. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2003;44:85-95
299. Graham SM, McCullough LD, Murphy SJ. Animal models of ischemic stroke: Balancing experimental aims and animal care. *Comparative medicine*. 2004;54:486-496
300. Howells DW, Porritt MJ, Rewell SS, O'Collins V, Sena ES, van der Worp HB, et al. Different strokes for different folks: The rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30:1412-1431
301. Macrae IM. Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia. *British journal of pharmacology*. 2011;164:1062-1078
302. Krafft PR, Bailey EL, Lekic T, Rolland WB, Altay O, Tang J, et al. Etiology of stroke and choice of models. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*. 2012;7:398-406
303. Durukan A, Tatlisumak T. Ischemic stroke in mice and rats. *Methods in molecular biology*. 2009;573:95-114
304. Kwiecien TD, Sy C, Ding Y. Rodent models of ischemic stroke lack translational relevance... Are baboon models the answer? *Neurological research*. 2014;36:417-422
305. Canazza A, Minati L, Boffano C, Parati E, Binks S. Experimental models of brain ischemia: A review of techniques, magnetic resonance imaging, and investigational cell-based therapies. *Frontiers in neurology*. 2014;5:19
306. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2007;87:179-197
307. Zhao H, Mayhan WG, Sun H. A modified suture technique produces consistent cerebral infarction in rats. *Brain research*. 2008;1246:158-166
308. Rousselet E, Kriz J, Seidah NG. Mouse model of intraluminal mcao: Cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012
309. Durukan A, Tatlisumak T. Animal models of ischemic stroke. *Handbook of clinical neurology*. 2009;92:43-66
310. Shimamura N, Matchett G, Tsubokawa T, Ohkuma H, Zhang J. Comparison of silicon-coated nylon suture to plain nylon suture in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Journal of neuroscience methods*. 2006;156:161-165
311. Wei G, Dawson VL, Zweier JL. Role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in nitric oxide generation in the brain following cerebral ischemia. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1455:23-34
312. Plotkine M, Margail I. [no synthases: New pharmacological targets in cerebrovascular accident?]. *Therapie*. 2002;57:548-553
313. Noda M, Kariura Y, Pannasch U, Nishikawa K, Wang L, Seike T, et al. Neuroprotective role of bradykinin because of the attenuation of pro-

- inflammatory cytokine release from activated microglia. *Journal of neurochemistry*. 2007;101:397-410
314. Silvestre JS, Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, et al. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circulation research*. 2000;87:448-452
315. Emanuelli C, Salis MB, Pinna A, Stacca T, Milia AF, Spano A, et al. Prevention of diabetes-induced microangiopathy by human tissue kallikrein gene transfer. *Circulation*. 2002;106:993-999
316. Waeckel L, Mallat Z, Potteaux S, Combadiere C, Clergue M, Duriez M, et al. Impairment in postischemic neovascularization in mice lacking the cxc chemokine receptor 3. *Circulation research*. 2005;96:576-582
317. Ebrahimian TG, Squiban C, Roque T, Lugo-Martinez H, Hneino M, Buard V, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 controls bone marrow-derived cells therapeutic effect through mmp9 signaling: Role in physiological and pathological wound healing. *Stem Cells*. 2012;30:1436-1446
318. Balaji S, LeSaint M, Bhattacharya SS, Moles C, Dhamija Y, Kidd M, et al. Adenoviral-mediated gene transfer of insulin-like growth factor 1 enhances wound healing and induces angiogenesis. *The Journal of surgical research*. 2014;190:367-377
319. Balkaya M, Krober JM, Rex A, Endres M. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2013;33:330-338
320. Schallert T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2006;3:497-504
321. Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, Hadingham SJ, et al. Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology*. 2000;39:806-816
322. Berthet C, Xin L, Buscemi L, Benakis C, Gruetter R, Hirt L, et al. Non-invasive diagnostic biomarkers for estimating the onset time of permanent cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2014;34:1848-1855
323. Iida S, Baumbach GL, Lavoie JL, Faraci FM, Sigmund CD, Heistad DD. Spontaneous stroke in a genetic model of hypertension in mice. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 2005;36:1253-1258
324. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 1986;17:1304-1308
325. Joshi CN, Jain SK, Murthy PS. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain research. Brain research protocols*. 2004;13:11-17
326. Tureyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Dempsey RJ. Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: A comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. *Journal of neuroscience methods*. 2004;139:203-207

ANNEXES

Annexe 1 : Matériels et Méthodes de l'étude 1

1. Modèle d'ischémie de la patte

Dans ce modèle expérimental, l'ischémie de la patte (ou ischémie périphérique) est induite chirurgicalement par ligature de l'artère fémorale droite, comme décrit dans la littérature³¹⁴⁻³¹⁶. La patte gauche sert de contrôle non-ischémique pour chaque animal et les résultats sont exprimés par rapport à cette patte non-ischémique tout au long de l'étude.

2. Modèle de diabète

Le modèle de diabète utilisé est le modèle de DT1 induit par injection de STZ. Les souris ont été considérées comme diabétiques lorsque leur glycémie à jeun était supérieure à 250 mg/dl et ont été incluses dans l'étude après cinq semaines de diabète.

3. Traitements

3.1. Choix de la dose d'administration

Des études préliminaires, de mesure de pression artérielle par pléthysmographie à la queue ou par télémetrie, ont été réalisées au laboratoire afin de rechercher la dose non-hypotensive maximale pour chaque agoniste. Ces études, réalisées par Ludovic Waeckel et Nadine Bouby, ont permis de déterminer la dose efficace de $720 \text{ nmol/kg.jour}^{-1}$ pour les deux agonistes. A cette dose, aucun effet sur la pression artérielle n'a été observé chez la souris non-diabétique et chez la souris diabétique.

3.2. Mise en place du traitement

Les traitements par le RB1-ag ou le RB2-ag ont été mis en place immédiatement après la ligature. L'agoniste des RB1 (RB1-ag ; SarLys[Hyp³,Igl⁵,DPhe⁸]desArg⁹-BK) et l'agoniste des RB2 (RB2-ag ; [Hyp³,Thi⁵,(N)Chg⁷,Thi⁸]desArg⁹-BK) ont été administrés à l'aide de minipompes osmotiques (Alzet, model 1002, Charles River, France). Implantées en sous-cutané au niveau du dos des souris, ces minipompes ont permis une délivrance continue de la dose non-hypotensive de $720 \text{ nmol/kg.jour}^{-1}$, déterminée au cours des études préliminaires. Les agonistes, sous forme de poudre, ont été préalablement dilués dans du PBS avant d'être insérés dans la minipompe.

4. Analyses de néovascularisation post-ischémique

Quatorze jours après l'ischémie et la mise en place du traitement, l'activité pro-angiogénique et le potentiel de néovascularisation post-ischémique ont été évalués par trois différentes méthodes de mesure clinique: le score angiographique par micro-angiographie, la densité capillaire par quantification histochimique et la perfusion sanguine en surface du pied par mesure de l'index de perfusion par laser Doppler ³¹⁶.

Annexe 2 : Matériels et Méthodes de l'étude 2

1. Modèle de cicatrisation

Le modèle expérimental de cicatrisation utilisé est un modèle bien décrit dans la littérature^{317, 318}. La souris est endormie à l'isoflurane (1,5 % dans de l'O₂). Le dos de la souris est épilé et nettoyé avec une solution de bétadine. Ensuite, la souris est basculée sur le côté et une lésion cutanée de 8 millimètres de diamètre est réalisée dans son dos à l'aide d'un punch de biopsie (Kai medical, Japan). Après la lésion et à 24 heures, une injection de Buprénorphine (0,05 mg/kg de poids corporel) permet de limiter la douleur.

2. Modèle de diabète

2.1. DT1

Le modèle de diabète utilisé est le modèle de DT1 induit par injection de STZ. Les souris ont été considérées comme diabétiques lorsque leur glycémie à jeun était supérieure à 250 mg/dl et ont été incluses dans l'étude après cinq semaines de diabète.

2.2. DT2

Les souris db/db ont été obtenues du laboratoire Janvier Labs à l'âge de 8 semaines avec une glycémie à jeun > 250 mg/dl. Les souris ont été incluses dans les expérimentations après 4 semaines de diabète confirmé par des mesures hebdomadaires de la glycémie à la queue (glycémie à jeun > 300 mg/dl).

3. Traitements

3.1. Choix de la dose d'administration

Comme pour la première étude, la dose non-hypotensive de 720 nmol/kg.jour⁻¹ a été utilisée pour les deux agonistes.

3.2. Mise en place du traitement

Comme pour l'étude 1, les traitements par le RB1-ag ou le RB2-ag ont été mis en place immédiatement après l'induction de la plaie. Les agonistes ont été administrés à l'aide de minipompes osmotiques (Alzet, model 1002, Charles River, France). Implantées en i.p., ces minipompes ont permis une délivrance continue de la dose non-hypotensive de 720 nmol/kg.jour⁻¹.

4. Analyses

L'évolution de la fermeture de la plaie a été suivie quotidiennement par la prise de photographies et la mesure de l'aire de la plaie. Les résultats ont été exprimés en pourcentage par rapport à l'aire de la plaie à J0. Après 11 jours, les souris ont été sacrifiées et la cicatrice a été prélevée afin de réaliser des études histologiques.

Annexe 3 : Mise en place du modèle d'ischémie cérébrale au laboratoire

1. Reproductibilité de la méthode chirurgicale

La méthode chirurgicale du modèle endovasculaire a été réalisée comme décrite dans la thèse. Dans un premier temps, l'expérimentation a été réalisée sur des souris anesthésiées à l'isoflurane pendant toute la durée de l'occlusion. Le score comportemental était gradué de 0 à 3 et comprenait :

- le test d'agrippement : la souris est agrippée à une grille à l'envers au-dessus d'une cage (50-60 cm de hauteur). Le comportement de la souris est observé (utilisation de la queue, déplacement en cercle, utilisation des pattes, etc.) et le temps d'agrippement mesuré (temps maximal de 120 secondes).

- le test de suspension par la queue: la souris est suspendue par la queue au-dessus d'un plan de travail (environ 30 cm de hauteur). La position des pattes et celle du thorax sont observées (rotation, déséquilibre droite/gauche, etc.).

- le comportement au sol : le comportement de la souris dans sa cage est observé. Tout déplacement « anormal » est quantifié (déplacement en cercle, prostration, rolling, etc.).

Les atteintes fonctionnelles ont été mesurées avant l'ischémie (J0), le lendemain de l'ischémie (J1) et trois jours après l'ischémie (J3).

La taille de la lésion, elle, était déterminée 72 heures après l'ischémie par la coloration au triphényltétrazolium chloride (TTC). Cette coloration est une procédure simple et rapide réalisée sur des coupes fraîches de cerveau. C'est une coloration vitale qui permet de quantifier les zones ischémisées non colorées par opposition au tissu viable rouge (*Annexe 4*).

Une fois la technique chirurgicale maîtrisée, deux séries ont été réalisées pour observer la reproductibilité de la lésion et caractériser les atteintes fonctionnelles et histologiques (*Tableau A3-1*).

		SERIE n°1		SERIE n°2	
		Sham	Ischémie	Sham	Ischémie
Nombre d'animaux		8	12	8	11
Mortalité		0	1	0	0
Score comportemental	J0	0,13 ± 0,05	0,08 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,02
	J1	0,14 ± 0,04	2 ± 0,08 *	-	-
	J3	0,56 ± 0,01	2,2 ± 0,09 *	0,25 ± 0,09	2,27 ± 1,0 **
Coloration TTC (%)		0,59 ± 0,3	6,78 ± 2,0 **	0,30 ± 0,25	3,9 ± 0,66 **
% de souris sans lésion		87%	28%	85,7 %	18%
Reproductibilité de la lésion (localisation)		60% des lésions localisées dans la même zone		Améliorée (90% des lésions dans la même zone)	

Tableau A3-1 : Résultats obtenus lors de la mise au point du modèle (séries n°1 et n°2).

* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; t-test suivi d'un test de comparaison des variances.

Les résultats obtenus dans les deux séries sont comparables. Les souris ayant subi une ischémie cérébrale pendant 60 minutes présentent des signes d'atteintes comportementales importants. Ces déficits fonctionnels sont corrélés à la présence de zones ischémiques à la coloration au TTC. Dans la série n°2, la taille des lésions et leurs localisations sont reproductibles et des différences significatives sont observées entre le groupe sham et le groupe ischémié (atteintes comportementales et taille de la lésion).

Cependant, après discussions avec le Dr. Clovis Adam et le Dr. Benoit Haelewyn, nous avons pris conscience que : 1) une échelle comportementale plus précise était nécessaire pour mieux caractériser l'atteinte comportementale ; 2) la taille de la lésion obtenue était trop petite pour observer des différences histologiques éventuelles après administration d'un traitement pharmacologique.

2. Amélioration des paramètres mesurés

2.1. Echelle comportementale

De nombreux tests comportementaux existent dans la littérature³¹⁹⁻³²¹. Afin d'obtenir rapidement une batterie d'évaluation de l'atteinte fonctionnelle, nous avons choisi des tests simples et faciles à mettre en place. Cette batterie de tests est composée de huit tests qui sont principalement des tests sensorimoteurs (*Figure A3-1*). Ceci a permis d'augmenter le score de mesure à 30 points, et de ce fait, d'améliorer la sensibilité de la mesure de l'atteinte fonctionnelle (*Figure A3-2A ; Annexe 5*).

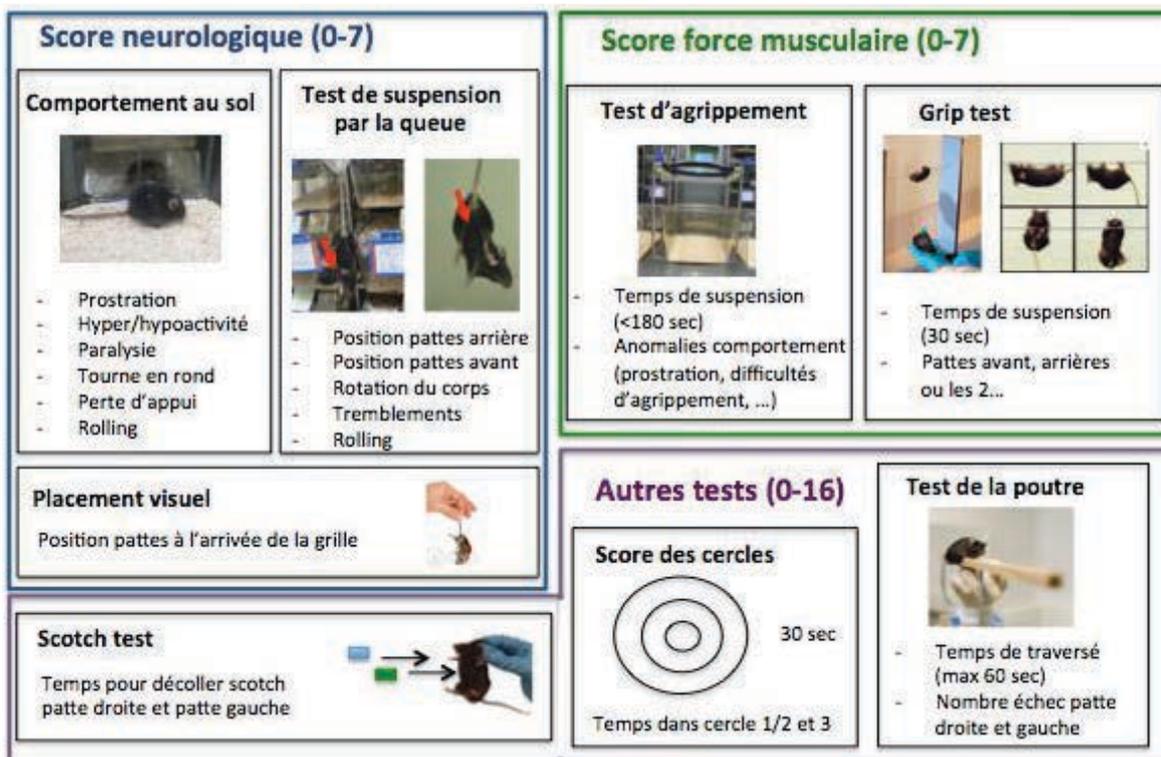


Figure A3-1 : Batterie de tests comportementaux.

Le score neurologique (0 à 7) comprend trois tests comportementaux : le comportement au sol (identique à celui réalisé dans les séries n°1 et 2), le test de suspension par la queue (identique à celui réalisé dans les séries n°1 et 2) et le placement visuel. Le test du placement visuel consiste à suspendre par la queue la souris au-dessus d'une table et à l'approcher doucement vers cette table ; le placement des pattes antérieures à l'approche de la table est observé et quantifié. Le score de force musculaire (0 à 7) comprend deux tests : le test d'agrippement (identique à celui réalisé dans les séries n°1 et 2) et le grip test ou test de la tige. Pour le test de la tige, la souris est placée au milieu d'une tige métallique horizontale de manière à ce que ses pattes antérieures soient au contact de la tige.

Le comportement de la souris (utilisation des 4 pattes, de 2 pattes, etc.) et le temps d'agrippement sont notés. Trois tests supplémentaires sont réalisés. Le test de la poutre quantifie de 0 à 3 le comportement de la souris pour traverser une poutre (1 cm de large, 35 cm de long) : stimuli nécessaire ou non, fautes d'appui, etc. Le score des cercles mesure le temps que met la souris pour sortir de trois cercles concentriques (score 0 à 10). Le dernier test, le test du scotch, mesure la différence de sensibilité de la souris au niveau de ses pattes antérieures. Un morceau de scotch (0,5cm x 0,5cm) est posé sur chacune des pattes antérieures de la souris et le temps que met la souris pour les enlever est mesuré (score 0 à 3).

2.2. Augmentation de la taille de la lésion

Afin d'augmenter la taille de la lésion, le paramètre le plus facilement modifiable était : les conditions d'occlusion. Ainsi, nous avons réalisé le même protocole expérimental que précédemment, la seule différence étant le réveil de l'animal pendant la durée de l'occlusion. Les souris ont été placées dans une couveuse à 37°C pendant les 60 minutes d'occlusion. Après une série « test », deux séries de mise au point de la reproductibilité du modèle ont été réalisées. Les résultats obtenus sont donnés dans le *Tableau A3-2*.

		SERIE n°3		SERIE n°4	
		Sham	Ischémie	Sham	Ischémie
Nombre d'animaux		15	15	6	9
Mortalité		0	3	0	1
Score comportemental	J0	1,33 ± 0,6	1,53 ± 0,8	0,25 ± 0,01	1,33 ± 0,4
	J1	5,07 ± 1,04	21,86 ± 5,2 **	0,5 ± 0,2	18 ± 4,1 **
	J3	3,93 ± 0,9	15,32 ± 2,3 **	0,5 ± 0,09	17 ± 2,5 **
Perte de poids		1%	14%	0%	20%
Coloration TTC (%)		0,81 ± 0,53	24,23 ± 4,0 **	0,26 ± 0,19	19,52 ± 4,2 **
% de souris sans lésion		93%	8%	90 %	12%
Reproductibilité de la lésion (localisation)		75% des lésions localisées dans la même zone		Améliorée (85% des lésions dans la même zone)	

Tableau A3-2 : Résultats obtenus lors de la mise au point du modèle (séries n°3 et n°4).

* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; vs sham, t-test suivi d'un test de comparaison des variances.

La reproductibilité des lésions (taille et localisation) est très satisfaisante dans les deux séries et améliorée dans la série n°4. Dans ces deux séries (séries n°3 et n°4), la taille de la lésion est augmentée de 3,5 à 5 fois par rapport aux séries précédentes (séries n°1 et n°2) (Tableau A3-2, Figure A3-2B). Dans ce modèle des zones impliquées dans la thermogénèse et la satiété sont atteintes ce qui entraîne une perte de poids chez ces animaux (20% en moyenne dans la série n°4). Afin de limiter cette perte de poids, et la mortalité pouvant être associée à celle-ci, les séries réalisées par la suite ont été injectées en i.p. avec du sérum physiologique (500 μ L) après la reperfusion et à 24 heures. De plus, de la nourriture gélatinisée a été ajoutée dans la cage des souris après l'opération pour faciliter leur alimentation.

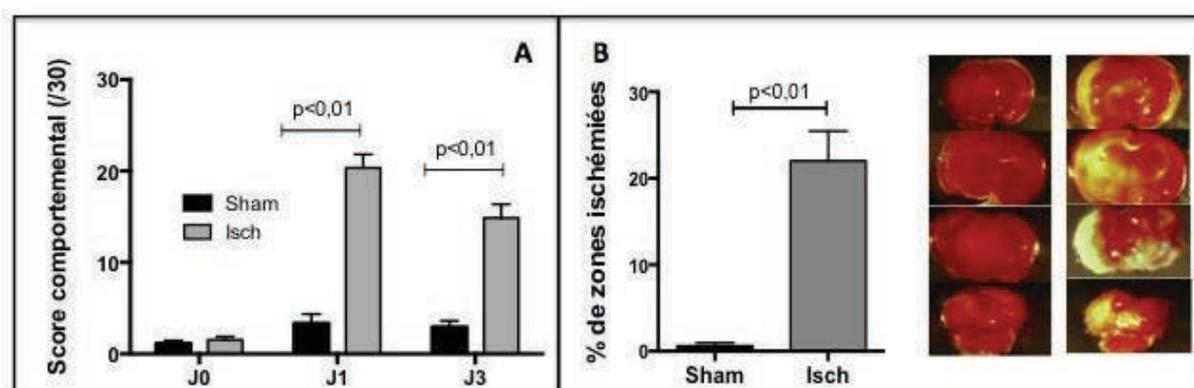


Figure A3-2 : (A) Score comportemental des souris ischémisées vs souris sham (série n°4); (B) pourcentage de zones ischémisées à la coloration au TTC de ces souris (série n°4).

t-test suivi d'un test de comparaison des variances.

Ainsi, les séries n°3 et n°4 nous ont permis de : 1) améliorer notre échelle de mesure de l'atteinte comportementale ; 2) augmenter la taille de la lésion.

2.3. Validation du modèle

2.3.1. Mesure du flux sanguin cérébral

La mesure de la diminution du flux sanguin au niveau de l'ACM à l'aide d'une sonde Doppler permet de vérifier que l'occlusion est suffisante. Dans le modèle choisi, l'induction d'une ischémie par le filament est considérée comme réussie si le flux sanguin au niveau de l'ACM diminue d'au moins 80% par rapport à la valeur de départ³²². Au laboratoire, nous ne disposons pas de laser Doppler en permanence, nous n'avons donc pas pu mesurer de manière systématique la chute du flux sanguin à la pose du filament. Cependant, afin de nous aider à mettre en place le modèle au laboratoire, le Dr. Nathalie Kubis nous a prêtés un appareil de mesure (moorVMS-LDF1, Moor Instruments, France). Une série supplémentaire de mise au point du modèle, la série n°5, a été dédiée à la mesure du flux sanguin au niveau de l'ACM. Une chute du flux sanguin d'au moins 75-80% a été considérée comme satisfaisante pour induire une ischémie cérébrale.

SERIE n°5		Sham	Ischémie
		Nombre d'animaux	5
Mortalité		0	0
Flux sanguin moyen de départ		-	341,4 PU
Flux sanguin moyen après pose du filament		-	62,2 PU
Chute du flux sanguin (%)		-	80,2%
Score comportemental	J0	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,2
	J1	3,58 ± 1,3	25,2 ± 2,4 **
	J3	2,3 ± 1,1	16,6 ± 4,1 **
Perte de poids		-	21,3%
Coloration TTC (%)		1,28 ± 0,85	23,4 ± 6,0 **
% de souris sans lésion		84%	0%
Reproductibilité de la lésion (localisation)		91% des lésions localisées dans la même zone	

Tableau A3-3 : Résultats obtenus lors de la mise au point du modèle (série n°5).

* : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; vs sham, t-test suivi d'un test de comparaison des variances.

Les résultats obtenus dans la série n°5 (score comportemental et coloration au TTC) sont comparables à ceux obtenus dans les séries n°3 et n°4 et attestent donc de la reproductibilité de l'expérimentation et du modèle au laboratoire. Dans la série n°5, sur les sept souris initiales, une souris avait une chute du flux sanguin de 63% et a été exclue au début de l'étude (non prise en compte dans les résultats du *Tableau A3-3*). Chez cette souris, la lésion observée à la coloration au TTC était quasi-nulle (1,6%). Ainsi, une occlusion

insuffisante peut probablement expliquer l'absence de lésion chez 12 à 18% des animaux dans les séries précédentes (n°3 et n°4). Ce facteur limitant devra être pris en compte dans les études suivantes pour lesquelles la mesure du flux sanguin ne pourra être réalisée.

2.3.2. Coloration à l'hématoxyline & éosine (H&E)

La coloration à l'H&E est plus longue à réaliser que la coloration au TTC mais elle permet une analyse plus tardive et plus spécifique de la lésion. Elle permet aussi de localiser avec précision la lésion et de différencier les zones œdémateuses, des zones de nécrose et des zones hémorragiques³²³. Cette coloration a permis de valider les résultats obtenus après la coloration au TTC et par conséquent de valider le modèle. Ainsi, après avoir été colorées à la coloration au TTC, les coupes de cerveau ont été incluses dans la paraffine, coupées à 6 µm et colorées à la coloration à l'H&E (*Annexe 4*). Les analyses histologiques ont été réalisées par le Dr. Clovis Adam, anatomopathologiste à l'hôpital Kremlin-Bicêtre. Les résultats de la coloration à l'H&E ont été exprimés en fonction d'un score d'atteinte compris entre 0 et 3.

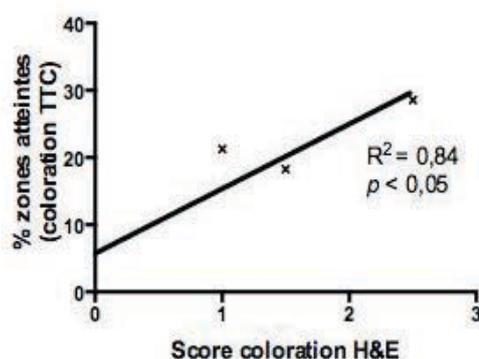


Figure A3-3 : Corrélation entre le pourcentage de zones ischémisées mesuré après la coloration au TTC et le score d'atteinte histologique quantifié à partir de la coloration à l'H&E.

Dans la série n°5, le pourcentage de zone ischémisée à la coloration au TTC est corrélé au score d'atteinte histologique à la coloration à l'H&E. Ceci nous a permis de valider d'une part le modèle, et d'autre part la coloration au TTC.

Les résultats obtenus lors de la mesure de la diminution du flux sanguin et du score d'atteinte à la coloration à l'H&E ont fourni les derniers éléments nécessaires à la validation du modèle au sein du laboratoire et à sa reproductibilité.

Annexe 4 : Coloration au TTC et à l'H&E

1. Coloration au TTC

1.1. Définition

La coloration au TTC est une procédure simple et rapide réalisée sur des coupes fraîches de cerveau. C'est une coloration vitale qui permet de quantifier les zones ischémiées. Le TTC est réduit en formazan rouge par les enzymes membranaires des mitochondries (en particulier la succinate déshydrogénase). Ainsi, les tissus viables sont colorés en rouge alors que les zones infarctées ne sont pas colorées (blanches)³²⁴⁻³²⁶. Le principal avantage de cette coloration est qu'elle est facile à réaliser et les analyses sont très rapides. Cependant, au-delà de 48-72 heures après l'ischémie, cette technique est très peu spécifique et la taille de la lésion est largement sous-estimée.

1.2. Protocole

Le cerveau est prélevé et divisé en six coupes de 2 mm d'épaisseur à l'aide d'une matrice de Bregma. Les coupes de cerveau obtenues sont incubées dans une solution de TTC (0,5% dans PBS 1X) pendant 30 minutes à 37°C, puis fixées dans une solution de formol 10%. Elles sont ensuite photographiées à la loupe et analysées. Pour chaque coupe le rapport : zone ischémiée/zone totale est mesuré. Une moyenne est ensuite réalisée sur les six coupes du même cerveau.

2. Coloration à l'H&E

2.1. Définition

La coloration à l'H&E est plus longue à réaliser que la coloration au TTC mais elle permet une analyse plus tardive de la lésion. Elle permet aussi de localiser avec précision la lésion et de différencier les zones œdémateuses, des zones de nécrose et des zones hémorragiques³²³. Elle est souvent réalisée sur les coupes de cerveau précédemment colorées au TTC pour compléter les informations obtenues.

2.2. Protocole

Après avoir été fixées dans une solution de formol à 10%, les six coupes de cerveau sont incluses en paraffine, coupées à 6 µm d'épaisseur et colorées. L'analyse des lames a été réalisée en collaboration avec le Dr Clovis Adam.

Préparation des solutions d'Eosine Y:

Solution mère Eosine Y (1%):

Eosine Y ----- 2 g
 Eau distillée ----- 40 ml
 Ethanol 95% ----- 160 ml
 Mélanger jusqu'à dissolution et conserver à température ambiante

Solution de travail Eosine Y (0.25%):

Solution mère Eosine Y (1%) ----- 50 ml
 80% Ethanol ----- 150 ml
 Acide acétique glacial (concentré) ----- 1 ml
 Mélanger jusqu'à dissolution et conserver à température ambiante

Solution Hématoxyline (Mayer):

Déjà préparée (Sigma-Aldrich, France)

Protocole de la coloration:

1. 2 x 10 min dans xylène (deparaffinize sections).
2. 2 x 5 min dans alcool 100% (réhydratation).
3. 2 x 2 min alcool 95% et 2 x 2 min alcool 70%.
4. Laver rapidement dans un bain d'eau distillée (2 min).
5. Coloration : 10 min dans Hématoxyline Mayer.
6. Laver dans eau du robinet (8 min).
7. Rincer dans eau distillée (2 min).
8. Rincer dans alcool 95% (10 bains de 2 sec dans même bac).
9. 2^{ème} coloration : Solution de travail Eosine Y (1 min).
10. 2 x 5 min alcool 95% et 2 x 5 min alcool 100% (déshydratation).
11. 2 x 5 min dans xylène.
12. Monter avec un milieu de montage à base de xylène (pertex).

Annexe 5 : Echelle d'évaluation de l'atteinte comportementale après un AVC

Pour les différents tests suivants, le score est d'autant plus élevé que le déficit est grand (score 0-30).

1. Score neurologique (0-7)

Flexion de la patte et du thorax :

La souris est suspendue par la queue au-dessus d'un plan de travail (environ 30 cm de hauteur). La position des pattes et du thorax est observée.

Score	Critères
0	Pas de flexion des pattes ou de torsion du thorax
1	Pattes antérieures et/ou postérieures non parallèles
2	Torsion du corps des 2 cotés, pattes tordues

Placement visuel:

La souris est suspendue par la queue au-dessus d'un plan de travail (environ 20 cm de hauteur) et est approchée doucement vers le bord d'une table. La position des pattes est observée.

Score	Critères
0	La souris met les 2 pattes antérieures en même temps
1	La souris met la patte gauche puis la droite
2	La souris ne met pas la patte droite

Comportement au sol:

La souris est observée dans sa cage.

Score	Critères
0	La souris a un comportement normal
1	La souris se déplace en faisant de grands cercles ; est légère hypoactive
2	La souris est prostrée dans un coin ; se déplace en faisant des petits cercles (tourne en rond)
3	La souris est amorphe ; fait du rolling

2. Score de force musculaire / agrippement (0-7)

Agrippement à une grille:

La souris est agrippée à une grille à l'envers au-dessus d'une cage (50-60 cm de hauteur). Le comportement de la souris et le temps d'agrippement sont mesurés (temps maximum 120 secondes). Le temps d'agrippement est noté.

Score	Critères
0	La souris a un comportement normal et reste suspendue > 120 sec
1	La souris se déplace en faisant de cercles mais reste agrippée > 120 sec
2	La souris a des difficultés à rester agrippée, lâche une de ses pattes plusieurs fois mais reste agrippée > 120 sec
3	La souris tombe < 120 sec

Agrippement à une tige :

La souris est placée au milieu d'une tige métallique horizontale (60 cm de long, 3 mm de diamètre) au-dessus d'une cage (40 cm de hauteur) de manière à ce que ses pattes antérieures soient au contact de la tige. Le comportement de la souris et le temps d'agrippement sont mesurés (temps maximum 30 secondes). Le temps d'agrippement est noté.

Score	Critères
0	La souris se balade sur la barre en utilisant ces 4 pattes
1	La souris reste accrochée avec ses 4 pattes > 5 sec
2	La souris reste accrochée avec ses 4 pattes < 5 sec
3	La souris reste accrochée sans jamais utiliser ses 4 pattes simultanément
4	La souris chute dans les 30 sec

3. Score des cercles (0-10)

La souris est placée au centre de cercles concentriques de 15, 30 et 45 cm de diamètres sur le plan de travail. Ce test est quantifié en fonction de la capacité et de la rapidité de la souris à sortir des cercles pendant un temps maximum de 30 secondes.

Score	Critères
0	La souris sort du grand cercle (45cm) en 10 sec
1	La souris sort du grand cercle (45cm) en 20 sec
2	La souris sort du grand cercle (45cm) en 30 sec
3	La souris sort du moyen cercle (30cm) en 10 sec
4	La souris sort du moyen cercle (30cm) en 20 sec
5	La souris sort du moyen cercle (30cm) en 30 sec
6	La souris sort du petit cercle (15cm) en 10 sec
7	La souris sort du petit cercle (15cm) en 20 sec
8	La souris sort du petit cercle (15cm) en 30 sec
9	La souris reste dans le petit cercle (15cm)
10	La souris ne bouge pas

4. Scotch test (0-3)

La souris est entraînée la veille (matin et soir) et le jour de l'ischémie. L'animal est isolé dans une boîte transparente pendant 30 secondes puis l'expérimentateur place deux scotch de 0,25 cm² (0,5 x 0,5cm) sur les pattes antérieures (un bleu et un vert à alterner). Les temps pour enlever l'adhésif de la patte gauche et de la droite sont mesurés (temps maximal 120 secondes). La différence temps (droite-gauche) est calculée.

Score	Critères
0	La souris enlève les 2 scotch immédiatement et simultanément
1	La différence est < 90 sec
2	La différence est > 90 sec
3	La souris n'enlève pas le scotch de droite

5. Test de la poutre (0-3)

La souris est placée à l'extrémité d'une poutre (largeur 1 cm, longueur 35 cm) située à 30 cm de hauteur et doit atteindre l'autre extrémité.

Score	Critères
0	La souris traverse la poutre sans stimulus
1	La souris ne traverse qu'avec un stimulus tactile
2	La souris traverse avec une patte pendante ou en faisant > 3 fautes d'appui
3	La souris ne tient pas sur la poutre ou ne bouge pas

Annexe 6 : Matériels et Méthodes de l'étude 3

1. Modèle d'ischémie cérébrale

Le modèle expérimental d'ischémie cérébrale utilisé est le modèle endovasculaire décrit dans la thèse.

2. Modèle de diabète

Le modèle de diabète utilisé est le modèle de DT1 induit par injection de STZ. Les souris ont été considérées comme diabétiques lorsque leur glycémie à jeun était supérieure à 250 mg/dl et ont été incluses dans l'étude après cinq semaines de diabète.

3. Traitements

3.1. Choix de la dose d'administration

Comme pour la première étude, la dose non-hypotensive de 720 nmol/kg.jour⁻¹ a été utilisée pour les deux agonistes. Au vu des résultats des effets de l'agoniste des RB2, notamment sur la déficience rénale, une deuxième dose plus faible de 240 nmol/kg.jour⁻¹ a aussi été utilisée.

3.2. Mise en place du traitement

Les traitements par le RB1-ag ou le RB2-ag ont été mis en place soit immédiatement après la reperfusion soit 48 heures après en fonction du protocole réalisé. Les agonistes ont été administrés à l'aide de minipompes osmotiques (Alzet, model 1007, Charles River, France). Implantées en sous-cutané dans le dos des souris, ces minipompes ont permis une délivrance continue de la dose non-hypotensive de 720 nmol/kg.jour⁻¹ ou 240 nmol/kg.jour⁻¹.

4. Analyses

Les effets des traitements ont été observés sur la récupération fonctionnelle à J0, J1, J2, J3 et/ou J7 en fonction du protocole réalisé, sur la pression artérielle et sur les atteintes histologiques à J2 ou J7 (*Annexes 4 et 5*).

Annexe 7 : Tableau récapitulatif des résultats de l'étude 3

Souris non-diabétiques									
	Poids (g)	Glycémie (mg/dl)	Créatinine Plasmatique ($\mu\text{mol/l}$)	Pression artérielle systolique	Fréquence cardiaque (bpm)	Déficits neurologiques à 48 heures	Mortalité à 48 heures	Taille de la lésion à 48 heures	
Isch vs NonIsch	→	→	→	↘ (NS)	↘↘	↗↗	Faible	↗↗	
Isch+ B1R-ag vs Isch	→	→	→	Non mesuré	Non mesuré	→	→	→	
Isch+ B2R-ag vs Isch (240 nmol/kg.j^{-1})	→	→	Non mesuré	↘↘	→	→	→	→	
Isch+ B2R-ag vs Isch (720 nmol/kg.j^{-1})	→	→	↗↗	↘↘	→	↗	↗↗	↘	
Souris diabétiques									
	Poids (g)	Glycémie (mg/dl)	Créatinine Plasmatique ($\mu\text{mol/l}$)	Pression artérielle systolique	Fréquence cardiaque (bpm)	Déficits neurologiques à 48 heures	Mortalité à 48 heures	Taille de la lésion à 48 heures	
D-Isch vs Isch	→	↗↗	→	Non mesuré	Non mesuré	↗	↗	↗↗	
D-Isch+ B1R-ag vs D-Isch (240 nmol/kg.j^{-1})	→	→	→	Non mesuré	Non mesuré	↘↘	→	↘↘	
D-Isch+ B1R-ag vs D-Isch (720 nmol/kg.j^{-1})	→	→	→	Non mesuré	Non mesuré	↘↘	→	↘↘	
D-Isch+ B2R-ag vs D-Isch	→	Non mesuré	Non mesuré	Non mesuré	Non mesuré	Non mesuré	↗↗↗	Non mesuré	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Régulation de la glycémie chez l'individu sain et chez le patient diabétique.....	8
Figure 2 : Incidence et prévalence du diabète dans le monde.....	9
Figure 3 : Physiopathologie du DT1.....	11
Figure 4 : Physiopathologie du DT2.	13
Figure 5 : Complications du diabète et organes cibles.....	17
Figure 6 : Systèmes kallibréine-kinine (SKK) et rénine-angiotensine (SRA).....	26
Figure 7 : Formation des kinines.....	27
Figure 8 : Formation (a) et dégradation (b) des kinines.....	30
Figure 9 : Catabolisme des kinines.....	32
Figure 10 : Récepteurs des kinines.....	33
Figure 11 : Voies de signalisation de l'activation des RB2 au niveau de l'endothélium.....	36
Figure 12 : Formule développée et séquence peptidique de l'icatibant (ou HOE-140).....	40
Figure 13 : Formule développée de RB1-ag (SarLys[Hyp ³ ,Igl ⁵ ,DPhe ⁸]desArg ⁹ -BK).....	41
Figure 14 : Formule développée de RB2-ag ([Hyp ³ ,Thi ⁵ , ^N Chg ⁷ ,Thi ⁸]desArg ⁹ -BK).....	43
Figure 15 : Rôles du SKK dans les fonctions cardiovasculaires, rénales et cérébrales.....	44
Figure 16 : Evolution de la plaque d'athérome.....	60
Figure 17 : Les quatre phases de la cicatrisation et les principaux types de cellules impliqués.....	74
Figure 18 : Cinétique d'évolution de la cicatrisation chez la souris TK ^{-/-} non-diabétique et diabétique.....	102
Figure 19 : Cinétique de cicatrisation après une application locale de RB1-ag ou de RB2-ag.....	102
Figure 20 : Prolifération des fibroblastes de culture primaire.....	105
Figure 21 : Phosphorylation de l'EGFR mesurée par Western-Blot.....	105
Figure 22 : Les deux principaux types d'AVC (ischémique et hémorragique).....	110
Figure 23 : Zone de mort neuronale et zone de pénombre ischémique.....	111
Figure 24 : Cascade des effets physiopathologiques post-ischémiques dans le cerveau.....	111
Figure 25 : Méthode chirurgicale d'occlusion de l'ACM par la technique du monofilament.....	115

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux modèles expérimentaux de diabète.....	15
Tableau 2 : Principales kinines actives chez l'homme et leurs récepteurs.....	29
Tableau 3 : Rôles des récepteurs des kinines dans les cellules cérébrales.....	48
Tableau 4 : Récapitulatif de la mortalité des souris en fonction des séries étudiées.....	102
Tableau 5 : Principaux modèles murins d'occlusion de l'ACM.....	112

Rôle du système kallibréine-kinine(s) dans les complications du diabète

Dorinne Desposito

Le système kallibréine-kinine(s) (SKK) est un système peptidique vasomoteur avec des effets multiples et complexes qui dépendent principalement du tissu et des pathologies étudiés. Le SKK a notamment été impliqué dans le développement d'anomalies métaboliques conduisant au diabète mais aussi dans certaines de ses complications telles que la néphropathie diabétique, la rétinopathie diabétique ou les pathologies cardiaques liées au diabète. Les kinines, les métabolites vasoactifs de ce système, activent deux types de récepteurs : le récepteur B1 (RB1) et le récepteur B2 (RB2). **L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle de ce système dans certaines complications associées au diabète chez la souris.** Pour cela, nous avons utilisé des approches pharmacologiques en utilisant des nouveaux agonistes spécifiques des RB1 ou des RB2 et un antagoniste spécifique des RB2.

Dans la première partie de ce travail, nous avons pu montrer que les récepteurs des kinines (RB1 et RB2) sont fortement impliqués dans les processus de néovascularisation post-ischémique chez la souris présentant un diabète de type 1. En effet, l'administration chronique d'un agoniste spécifique des RB1 ou des RB2 corrige entièrement le défaut de néovascularisation post-ischémique observé chez la souris diabétique notamment en augmentant les paramètres inflammatoires dans la circulation sanguine et dans la zone ischémisée. L'administration de ces nouveaux agonistes représente donc une nouvelle cible thérapeutique intéressante dans le cas des artérites diabétiques.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle du SKK dans les processus de cicatrisation cutanée. L'activation des RB1 n'a pas d'effet dans la cicatrisation chez la souris. En revanche, l'activation des RB2 entraîne une désorganisation des couches cutanées et un épaissement de l'épiderme qui sont associés à un retard important de cicatrisation chez la souris non-diabétique et chez la souris diabétique. Le résultat intéressant de cette étude est que le traitement par l'icatibant, un antagoniste spécifique des RB2, accélère de façon significative la cicatrisation dans deux modèles de diabète, un modèle proche du diabète de type 1 et un modèle proche du diabète de type 2. Le traitement avec l'icatibant, déjà commercialisé dans une autre indication, est donc très prometteur pour la cicatrisation du pied du diabétique.

Pour finir, nous avons tenté de clarifier le rôle du SKK dans l'ischémie cérébrale. L'activation des RB2 augmente la mortalité et l'atteinte fonctionnelle dans un modèle de souris non-diabétiques d'ischémie-reperfusion cérébrale. Les mécanismes délétères de l'activation des RB2 semblent impliquer le développement d'un œdème cérébral et d'une insuffisance rénale rapidement après une ischémie cérébrale. Les RB1 ne semblent pas jouer de rôle majeur après une ischémie cérébrale chez les souris non diabétiques ; mais chez les souris diabétiques, l'activation des RB1 réduit la taille de l'infarctus et les déficits neurologiques sans effet négatif sur la fonction rénale et la survie des animaux.

Pour conclure, nous avons pu montrer au cours de ces travaux que le SKK a des effets contradictoires en fonction des organes étudiés. L'étude des nouveaux agonistes des récepteurs des kinines ouvre des nouvelles voies thérapeutiques dans les complications du diabète, toutefois une évaluation rigoureuse de l'ensemble des effets potentiellement associés est nécessaire.