

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

ÉTUDE COMPARATIVE DES EFFETS HYPOTENSEURS DE LA BRADYKININE
ET DE L'HÉMOPRESSINE CHEZ LE LAPIN, LE RAT ET LA SOURIS

par

PAUL-ANDRÉ BLAIS

Département de Pharmacologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade
de maître ès sciences (M.Sc.)

Janvier 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-25950-4
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-25950-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	ii
LISTE DES PUBLICATIONS.....	v
LISTE DES COMMUNICATIONS.....	vi
LISTE DES ILLUSTRATIONS.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	x
RÉSUMÉ.....	xiii
INTRODUCTION.....	1
1. L'HÉMOPRESSINE.....	1
1.1. Découverte.....	1
1.2. Mécanisme putatif de la biosynthèse de l'hémopressine.....	3
1.3. La destruction des globules rouges.....	5
1.4. Métabolisme enzymatique.....	7
1.5. Actions vasculaires.....	8
2. LES KININES.....	10
2.1. Biosynthèse.....	10
2.2. Les récepteurs des kinines.....	14
2.3. Métabolisme enzymatique.....	15
2.4. Actions vasculaires.....	16
3. SEPTICÉMIE ET CHOC SEPTIQUE.....	17

4. RATIONNELLE DE L'ÉTUDE.....	18
5. OBJECTIFS.....	19
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	21
6. SYNTHÈSE PEPTIDIQUE.....	21
6.1. Réactifs et solvants.....	21
6.2. Synthèse peptidique en phase solide de type « à débit continu ».....	23
6.3. Clivage du peptide de la résine.....	24
6.4. Purification du peptide.....	24
6.5. Caractérisation du peptide.....	25
7. ESSAIS ENZYMATIQUES.....	26
7.1. Enzyme et substrats utilisés.....	26
7.2. Protocole de digestion.....	26
7.3. Analyse des échantillons.....	26
8. ESSAIS <i>IN VIVO</i>	27
8.1. Animaux utilisés.....	27
8.2. Traitements.....	27
8.3. Protocole expérimental.....	28
8.4. Composés utilisés.....	32
9. ANALYSE STATISTIQUE.....	32
RÉSULTATS.....	33
10. SYNTHÈSE PEPTIDIQUE.....	33

11. ESSAIS ENZYMATIQUES.....	33
11.1. Produits de la digestion de la bradykinine et de l'hémopressine par l'enzyme de conversion de l'angiotensine de poumon de lapin.....	33
11.2. Vitesses initiales de l'enzyme de conversion de l'angiotensine en fonction du substrat utilisé.....	41
12. ESSAIS <i>IN VIVO</i>	49
12.1. Effets hémodynamiques de l'hémopressine et de la bradykinine.....	49
12.2. Activité biologique de l'hémopressine dans divers modèles animaux.....	49
12.3. Inactivation cardiaque/pulmonaire des peptides.....	53
12.4. Activité biologique, chez le lapin, des métabolites de l'hémopressine générés par l'enzyme de conversion de l'angiotensine.....	53
12.5. Effets de divers traitements sur la réponse à l'hémopressine chez le lapin...	54
12.6. Activité biologique des isoformes de l'hémopressine chez le rat et le lapin..	56
DISCUSSION.....	58
CONCLUSION.....	67
PERSPECTIVES.....	68
REMERCIEMENTS.....	69
BIBLIOGRAPHIE.....	70

LISTE DES PUBLICATIONS

BLAIS, P.A., CÔTÉ, J., MORIN, J., LAROUCHE, A., GENDRON, G., FORTIER, A., REGOLI, D., NEUGEBAUER, W., GOBEIL, F. Jr. (2005). Hypotensive effects of hemopressin and bradykinin in rabbits, rats and mice. A comparative study. *Peptides* **26** : 1317-1322.

GOBEIL, F. Jr., HALLÉ, S., BLAIS, P.A., REGOLI, D., (2002). Studies on the angiotensin-converting enzyme and the kinin B₂ receptor in the rabbit jugular vein. Modulation of contractile response to bradykinin. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80** : 153-163

NEUGEBAUER, W., BLAIS, P.A., HALLÉ, S., FILTEAU, C., REGOLI, D., GOBEIL, F. jr. (2002). Kinin B₁ receptors antagonists with multi-enzymatic resistance properties. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **80** : 287-292.

LISTE DES COMMUNICATIONS

- BLAIS, P.A., CÔTÉ, J., MORIN, J., LAROUCHE, A., GENDRON, G., FORTIER, A., NEUGEBAUER, W., REGOLI, D., GOBEIL, F. Jr. (2004).** Comparative analysis of the hypotensive effects between hemopressin and bradykinin in anesthetized animals. Fifth International Symposium on Peptide Receptors: from Gene to Therapy. Program and abstracts, p. 66.
- BLAIS, P-A., GOBEIL, F. Jr., REGOLI, D. (2001).** Angiotensin I-converting enzyme (ACE): Substrates and Inhibitors. An attempt to determine their preferences for catalytic domains. Second International Symposium on Peptide Receptors: from Gene to Therapy: From gene to therapy. Montréal, Canada. Abstract book, p. 82.
- REGOLI, D., BLAIS, P.A., HALLÉ, S., RIZZI, A., GOBEIL, F. (2000).** Involvement of kinins, AT(1-7), AcSDKP in the beneficial therapeutic effects of converting enzyme inhibitors. The American Society of Hypertension (Fifteenth Scientific Meeting).
- BLAIS, P.A., HALLÉ, S., GOBEIL, F. Jr., REGOLI, D. (1999).** Évaluation de l'efficacité d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I mesuré à l'aide de substrats naturels tels la bradykinine et l'angiotensine I. Club de Recherches Cliniques du Québec, 41^e réunion annuelle. Résumé des communications. *Médecine/Sciences* 15 (suppl. 2): 27.

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1.	Comparaison de la structure primaire de la chaîne alpha de l'hémoglobine de diverses espèces de mammifères (humain, lapin, rat et souris)	2
Figure 2.	Schéma hypothétique de la formation de l'hémopressine à partir de l'hémoglobine	4
Figure 3.	Effets hypotenseurs de l'hémopressine (adapté de RIOLI <i>et al.</i> 2003)	9
Figure 4.	Structure primaire des kininogènes de faible et de haut poids moléculaire chez l'homme	11
Figure 5.	Structure primaire du T-kininogène	12
Figure 6.	Formation des kinines à partir des kininogènes	13
Figure 7.	Structure primaire des peptides synthétisés au cours de cette étude	22
Figure 8.	Analyse par HPLC de la purification de la bradykinine, de l'hémopressine de rat et de lapin	34
Figure 9.	Analyse par HPLC de la purification de l'hémopressine de rat (1-7)	36
Figure 10.	Spectrométrie de masse de la bradykinine et de l'hémopressine de rat purifiées	37
Figure 11.	Spectrométrie de masse de l'hémopressine de rat (1-7) et l'hémopressine de lapin purifiées	38
Figure 12.	Analyse des produits de la digestion de la bradykinine, de l'hémopressine de rat et de l'hémopressine de lapin par l'enzyme de conversion de l'angiotensine purifiée de poumon de lapin	39

Figure 13. Analyse des produits de la digestion de la bradykinine, de l'hémopressine de rat et de l'hémopressine de lapin par l'enzyme de conversion de l'angiotensine purifiée de poumon de lapin en présence de captopril.	42
Figure 14. Spectrométrie de masse des peptides correspondants aux pics des chromatogrammes obtenus à la figure 12A	44
Figure 15. Spectrométrie de masse des peptides correspondants aux pics des chromatogrammes obtenus à la figure 12B	45
Figure 16. Détermination de la quantité de substrat hydrolysé par l' enzyme de conversion de l'angiotensine purifiée de poumon de lapin en fonction du temps d'incubation	46
Figure 17. Tracés typiques des effets hypotenseurs d'injections de la bradykinine et de l'hémopressine de rat chez le lapin anesthésié	50
Figure 18. Effets hypotenseurs de la bradykinine et de l'hémopressine de rat administrées à diverses espèces animales	51
Figure 19. Effets hypotenseurs de l'hémopressine de rat, de l'hémopressine de lapin et de la bradykinine chez le lapin et le rat.	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Paramètres hémodynamiques initiaux des animaux utilisés au cours de l'étude.	31
Tableau II. Vitesses initiales de l'hydrolyse de la bradykinine, de l'hémopressine de rat et de l'hémopressine de lapin par l'enzyme de conversion de l'angiotensine purifiée de poumon de lapin	48
Tableau III. Effets de divers traitements sur la réponse à l'hémopressine de rat, la bradykinine et la Lys desArg ⁹ bradykinine chez le lapin anesthésié	55

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ANOVA :	analyse de variance
BK :	bradykinine
Boc :	tert-butyloxycarbonyl
COX :	cyclooxygénase
COX-1 :	isoforme constitutive de la cyclooxygénase
COX-2 :	isoforme inductible de la cyclooxygénase
CPM :	carboxypeptidase M
CPN :	carboxypeptidase N
DBK :	des-Arg ⁹ -bradykinine
DIPEA :	N,N-diisopropyléthylamine
DMF :	N,N-diméthylformamide
ECA :	enzyme de conversion de l'angiotensine I
Fmoc :	fluorenylmethoxycarbonyl
Fmoc-Arg(Pbf)-OH :	N- α -Fmoc-N ^w -(2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-L-arginine
Fmoc-Asn(Trt)-OH :	N- α -Fmoc-N ^g -trityl-L-asparagine
Fmoc-Gly-OH :	N- α -Fmoc-L-glycine
Fmoc-Leu-OH :	N- α -Fmoc-L-leucine
Fmoc-Lys(Boc)-OH :	N- α -Fmoc-N ^e -Boc-L-lysine
Fmoc-Phe-OH :	N- α -Fmoc-L-phenylalanine
Fmoc-Pro-OH :	N- α -Fmoc-L-proline

Fmoc-Ser(tBu)-OH :	N- α -Fmoc-O-t-butyl-L-serine
Fmoc-Val-OH :	N- α -Fmoc-L-valine
Hb :	hémoglobine
<i>hlsHP</i> :	isoforme de l'hémopressine retrouvée chez l'humain, le lapin et la souris
HOE 140 :	icatibant
Hp :	haptoglobine
HP :	hémopressine
HPLC :	chromatographie liquide à haute pression
IL-1 :	interleukine-1
iNOS :	NO synthase inductible
LDBK :	Lys-des-Arg ⁹ -bradykinine
LPS :	lipopolysaccharide
Lys-BK :	Lys-bradykinine (ou kallidine)
MALDI :	"matrix-assisted laser desorption ionization"
MALDI MS :	spectrométrie de type MALDI
NO :	monoxyde d'azote
PAM :	pression artérielle moyenne
P _{dias} :	pression diastolique
PGI ₂ :	prostacycline
PLA ₂ :	phospholipase A ₂
P _{sys} :	pression systolique
<i>rHP</i> :	isoforme de rat de l'hémopressine

TBTU :	O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N,N-tetraméthyluronium tetrafluoroborate
TFA :	acide trifluoroacétique
TIPS :	triisopropyl silane
TNF α :	facteur de nécrose tumorale alpha

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**ÉTUDE COMPARATIVE DES EFFETS HYPOTENSEURS DE LA
BRADYKININE ET DE L'HÉMOPRESSINE CHEZ LE LAPIN, LE RAT ET LA
SOURIS**

par

Paul-André Blais

Département de Pharmacologie
Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

RÉSUMÉ

L'hémopressine (HP), un nonapeptide bioactif dérivé de la chaîne alpha de l'hémoglobine, a été mise en évidence par le groupe de Rioli *et al.* (2003). Lorsque administré par voie intraveineuse chez le rat anesthésié, ce peptide produit un effet hypotenseur semblable à celui de la bradykinine (BK). Il a également été démontré que l'hémopressine était métabolisée *in vitro* et *in vivo* par plusieurs peptidases dont l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). Dans l'étude qui suit, nous avons approfondi les données recueillies par Rioli *et al.* en étudiant notamment i) la cinétique de dégradation de HP et BK par l'ECA purifiée de poumon de lapin et ii) les effets hémodynamiques de HP et BK suite à leur administration intraveineuse (i.v.) et intra-artérielle (i.a.) chez les modèles animaux du lapin, du rat et de la souris. Nos résultats démontrent que l'HP et la BK sont hydrolysées par l'ECA *in vitro* et que leurs vitesses de dégradation sont différentes. La BK (0,1 nmole/kg) et l'HP (10-100 nmoles/kg), engendrent une hypotension transitoire dans tous les modèles animaux étudiés. Cependant, sur une base équimolaire, les réponses à l'HP étaient beaucoup plus faibles (10-200 fois) que celles produites par la BK. De plus, les effets hypotenseurs de l'HP administrée par voie i.v. ou i.a. étaient équivalents, quelle que soit la dose utilisée. Parallèlement, chez le lapin, la réponse à l'HP n'était pas potentialisée par le captopril (100 µg/kg). Cela suggère que, contrairement à la BK, l'HP n'est pas susceptible à l'inactivation cardiaque/pulmonaire. Le prétraitement des lapins avec le HOE 140, un antagoniste spécifique du récepteur B₂ des kinines, n'est pas parvenu à inhiber l'activité biologique de l'HP. Seule l'injection i.v. de lipopolysaccharide (LPS) bactérien, un agent connu pour entraîner une réponse inflammatoire systémique chez l'hôte (cinq heures avant la chirurgie) s'est avéré efficace pour potentialiser l'effet hypotenseur de l'HP. L'hémopressine agirait donc comme un faible agent hypotenseur dont la réponse ne passe pas par l'activation du récepteur B₂ des kinines, mais plutôt par un récepteur dont son expression et/ou celle des composantes de sa voie de signalisation sont augmentées par le LPS.

INTRODUCTION

1. L'HÉMOPRESSINE

1.1. Découverte

Au cours d'une étude visant à identifier les substrats potentiels de l'endopeptidase 24.15 (thimet oligopeptidase ; EC 3.4.24.15) et 24.16 (neurolysine ; EC 3.4.24.16), RIOLI *et al.* (2003) remarquèrent qu'un des peptides isolés produisait une hypotension chez le rat lorsqu'il était administré par voie intraveineuse. Ce dernier faisait partie d'un groupe de peptides isolés à partir d'homogénats de cerveau ou de rate de rat à l'aide d'endopeptidases 24.15 ou 24.16 catalytiquement inactivées par mutation dirigée. La comparaison de la structure primaire de ce peptide, qu'on baptisa hémopressine (HP), aux séquences protéiques contenues dans une banque de données (<http://us.expasy.org/tools/blast/>) permis de déterminer qu'il correspondait aux acides aminés 95 à 103 de la chaîne alpha de l'hémoglobine (RIOLI *et al.*, 2003). À l'aide de la même banque de données, nous avons comparé les structures primaires des formes humaine, de lapin, de rat et de souris de cette même chaîne. Nous avons observé qu'il pouvait y avoir deux isoformes de l'HP. La première correspond à celle que l'on retrouve chez le rat, tandis que la deuxième correspond à une isoforme présente à la fois chez l'humain, le lapin et la souris. Elles diffèrent entre elles par un seul résidu à la position 6 : l'hémopressine de rat (*rHP*) possède une phénylalanine alors que l'hémopressine des autres espèces animales (*h/sHP*) possède une leucine (fig. 1).

1	11	21	31	41	51			
1	VLSPADKTNV	KAAWGKVGAAH	AGEYGAEALE	RMFLSFPTTK	TYFPHFDSLH	GSAQVKGHGK	60	Homme
1	VLSGEDKSNI	KAAWGKIGGH	GAEYGAEALE	RMFASFPTTK	TYFPHFVSH	GSAQVKGHGK	60	Souris
1	VLSPADKTNI	KTAWEKIGSH	GGEYGAEAVE	RMFLGFPTTK	TYFPHFDFTH	GSEQIKAHGK	60	Lapin
1	VLSADDKTNI	KNCWKGIGGH	GGEYGEEALQ	RMFAAFPTTK	TYFSHIDVSP	GSAQVKAHGK	60	Rat
61	KVADALTNAV	AHVDDMPNAL	SALSDLHAHK	LRVDPVNFKL LSH	CLLVTLA	AHLPAEFTPA	120	Homme
61	KVADALASAA	GHLDDLPGAL	SALSDLHAHK	LRVDPVNFKL LSH	CLLVTLA	SHHPADFTPA	120	Souris
61	KVSEALTKAV	GHLDDLPGAL	STLSDLHAHK	LRVDPVNFKL LSH	CLLVTLA	NHHPSEFTPA	120	Lapin
61	KVADALAKAA	DHVEDLPGAL	STLSDLHAHK	LRVDPVNFKE LSH	CLLVTLA	CHHPGDFTPA	120	Rat
121	VHASLDKFLA	SVSTVLTSKY	R					Homme
121	VHASLDKFLA	SVSTVLTSKY	R					Souris
121	VHASLDKFLA	NVSTVLTSKY	R					Lapin
121	MHASLDKFLA	SVSTVLTSKY	R					Rat

Fig. 1. Comparaison de la séquence primaire de la chaîne alpha de l'hémoglobine en fonction de l'espèce.
 Les acides aminés en caractères gras correspondent à la séquence de l'hémopressine.

1.2. Mécanisme putatif de la biosynthèse de l'hémopressine

Le mécanisme de formation de l'HP reste nébuleux. Les gènes des globines peuvent être exprimés dans d'autres types cellulaires que les globules rouges, à savoir les neurones (OHYAGI *et al.*, 1994). Cela pourrait potentiellement permettre la formation *in situ* de l'HP dans d'autres cellules que les érythrocytes. Cependant, la quantité phénoménale d'hémoglobine présente dans le globule rouge en fait le type cellulaire le plus plausible quant à la source de ce peptide. RIOLI *et al.* (2003) ont suggéré que sa formation relevait de l'activité du protéasome. Ce complexe multicatalytique de protéinases, générant des peptides de 3 à 22 acides aminés (KISSELEV *et al.*, 1999), est responsable de la majeure partie de l'activité protéolytique extralysosomiale à l'intérieur de la cellule (ORLOWSKI & WILK, 2000). MATTHEWS *et al.* (1989) ont montré que le protéasome contenu dans les érythrocytes est impliqué dans la dégradation de l'hémoglobine endommagée par les espèces réactives de l'oxygène. La présence de l'HP dans la circulation sanguine pourrait être également reliée au phénomène d'hémolyse. En effet, l'hémoglobine se retrouvant libre dans le sang lors de la destruction des globules rouges serait à la merci des protéases et des peptidases plasmatiques, ces dernières auraient alors la capacité de libérer l'HP de l'hémoglobine. La figure 2 résume les voies hypothétiques menant à la formation de l'HP.

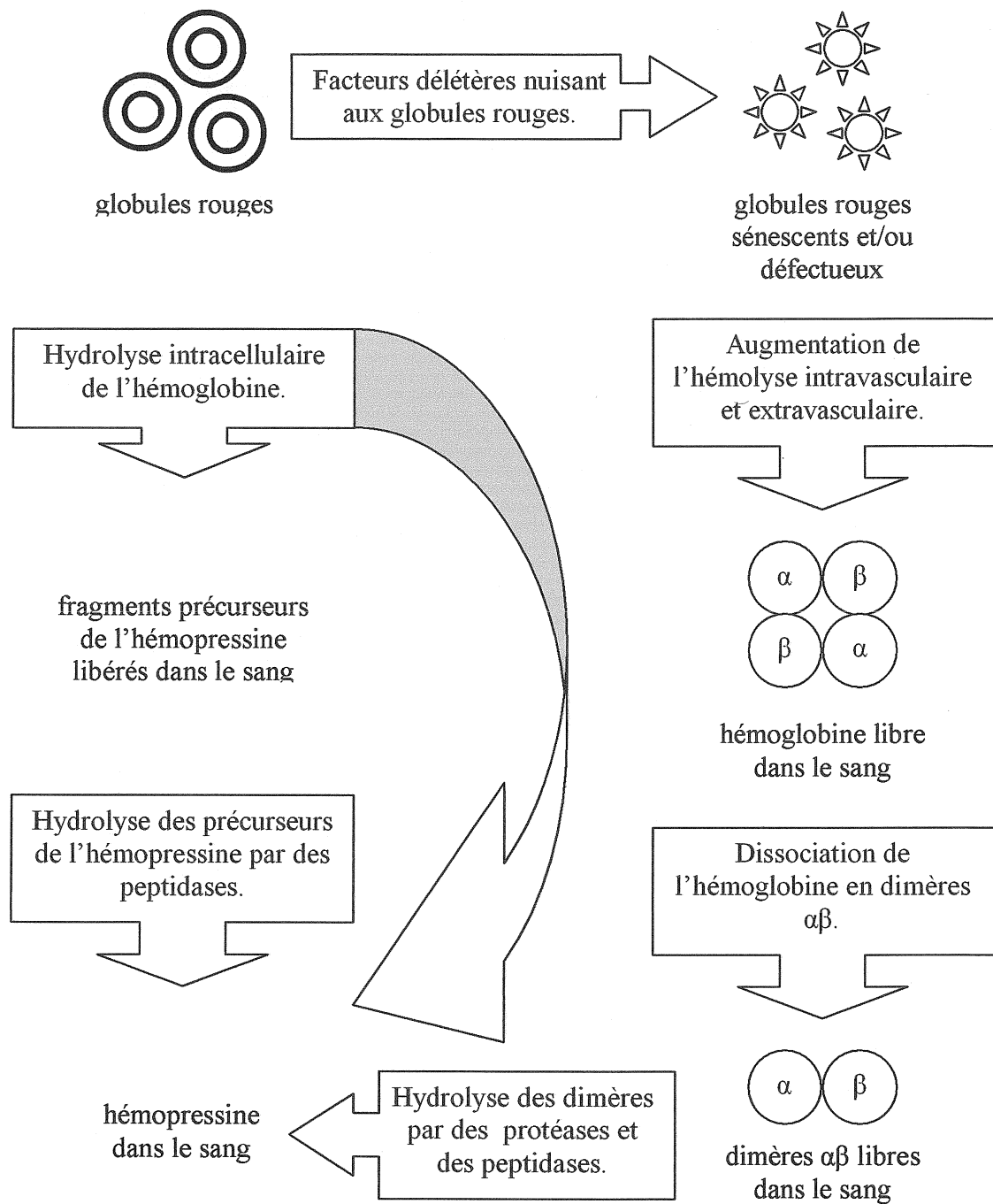


Figure 2. Schéma hypothétique de la formation de l'hémopressine à partir de l'hémoglobine.

1.3. La destruction des globules rouges

Puisqu'ils sont anucléés, les globules rouges ne peuvent synthétiser leurs propres protéines. Par conséquent, il leur est impossible de se réparer et leur durée de vie est ainsi limitée (GLADER, 2004a). La dégradation des globules rouges est un processus essentiel servant à éliminer les érythrocytes sénescents de la circulation sanguine pour faire de la place aux globules rouges plus performants nouvellement générés (HARMENING *et al.*, 2002). De surcroît, cette durée de vie peut être raccourcie de plus belle lorsque les globules rouges perdent leur capacité à faire face aux agressions quotidiennes de leur environnement ou lorsque que celui-ci devient carrément hostile (GLADER, 2004a). Plusieurs facteurs peuvent entraîner une augmentation de la destruction, ou hémolyse, des érythrocytes. Ils peuvent être de nature chimique, infectieuse ou reliés à des stress physiques (JENG & GLADER, 2004), héréditaire ou biochimique (MENTZER & GLADER, 2004 ; GLADER, 2004b) ou auto-immune (NEFF, 2004). Dépendamment des facteurs mis en cause, l'hémolyse pourra être extravasculaire ou intravasculaire (JENG & GLADER, 2004).

Le corps humain adulte contient en moyenne $2 \text{ à } 3 \times 10^{13}$ globules rouges (chacun contenant $2,7 \times 10^8$ molécules d'hémoglobine), dont 3 millions sont dégradés à chaque seconde (PERKINS, 2004). Normalement, cette dégradation est principalement (80-90%) extravasculaire (NOYES & GARBY, 1967) : les globules rouges sénescents sont phagocytés et détruits par les macrophages de la rate, du foie et de la moelle osseuse (ULTMANN & GORDON, 1965). Le reste de la dégradation a lieu de façon

intravasculaire (NOYES & GARBY, 1967). L'hémolyse intravasculaire peut être causée par la lyse osmotique ou la fragmentation. Bien que les globules rouges soient plus sensibles à la lyse osmotique à mesure qu'ils vieillissent, il est très peu probable qu'elle joue un rôle significatif en temps normal. Effectivement, il n'existe aucune région du compartiment vasculaire suffisamment hypotonique pour entraîner la lyse des globules rouges. La fragmentation se caractérise par la perte d'une partie de la membrane d'un érythrocyte, souvent accompagnée par une perte concomitante du contenu cellulaire. Elle est généralement causée par l'interaction des globules rouges avec de l'endothélium altéré, des dépôts de fibrine ou des forces de cisaillement accrues (GLADER, 2004a). En temps normal, la dégradation extravasculaire, contrairement à la dégradation intravasculaire, n'entraîne pas la relâche d'hémoglobine dans le plasma.

L'hémoglobine (Hb) est constituée de quatre sous-unités, deux sous-unités d' α -globine et deux sous-unités de β -globine, contenant chacune un groupe hème (HARMENING *et al.*, 2002). Cet assemblage représente 97% de l'hémoglobine adulte. Les autres formes sont composées de deux sous-unités d' α -globine et de deux autres sous-unités de globine adulte δ (2,5%) ou de globine fœtale γ (< 1%) (TELEN & KAUFMAN, 2004). Quand l'hémoglobine est libérée dans le plasma, elle se dissocie en dimères $\alpha\beta$. En temps normal ces dimères se lient de façon irréversible à une protéine de transport nommée haptoglobine (Hp) (NOYES & GARBY, 1967). Le complexe Hp-Hb est catabolisé par les hépatocytes (HIGA *et al.*, 1981) suite à sa reconnaissance et son internalisation via un récepteur spécifique (KINO *et al.*, 1980).

Quand le taux d'hémoglobine libéré dans le sang est faible, celle-ci est complètement liée à l'haptoglobine. Cependant, lorsque la quantité d'Hb dans le plasma augmente, Hp disparaît beaucoup plus rapidement de la circulation (BRUS & LEWIS, 1959) : cette baisse du taux plasmatique de Hp n'est pas compensée par l'augmentation de sa synthèse (NOYES & GARBY, 1967). On estime que l'hémolyse intravasculaire de 1 à 2 ml de globules rouges est suffisante pour épuiser complètement la réserve de Hp plasmatique (HARMENING *et al.*, 2002). Les dimères $\alpha\beta$ circulent alors librement dans le compartiment vasculaire et peuvent être dégradés par les protéases plasmatiques. Même si la dégradation a lieu de façon extravasculaire, il est parfois possible d'observer une augmentation de la concentration du dimère $\alpha\beta$ libre dans la circulation sanguine (BRUS & LEWIS, 1959). Ce phénomène serait probablement causé par la régurgitation de l'hémoglobine par les macrophages lorsque la phagocytose des érythrocytes par ces derniers atteint une vitesse maximale (GLADER, 2004a).

1.4. Métabolisme enzymatique

L'HP est métabolisée par au moins trois peptidases : l'ECA, l'endopeptidase 24.15 et l'endopeptidase 24.16 (RIOLI *et al.*, 2003). Ces trois métallopeptidases se retrouvent à la surface des cellules endothéliales (NORMAN *et al.*, 2003 ; ERDÖS & SKIDGEL, 1987) et ont la capacité d'hydrolyser une vaste gamme de peptides biologiquement actifs, telles la BK, la substance P et l'angiotensine I (RIOLI *et al.*, 1998 ; JASPARD *et al.*, 1993).

1.5. Actions vasculaires

RIOLI *et al.* (2003) ont observé que l'administration intraveineuse de doses croissantes de HP chez le rat anesthésié entraînait une baisse transitoire, dose dépendante, de la pression sanguine (figure 3). De plus, ils ont testé les effets de deux autres peptides isolés au cours de la même étude et ayant les séquences suivantes : NH₂-FDLTADWPL-COOH et NH₂-LVVYPWTQRY-COOH. Le NH₂-LVVYPWTQRY-COOH possède une séquence semblable aux hémorphines humaines et ne diffère d'elles que par son a.a. en position N-terminal (RIOLI *et al.*, 2003). Selon les auteurs, cette différence serait liée à l'espèce animale à partir de laquelle le peptide a été isolé. Ceux-ci ont également observé que l'administration d'énalapril (2 mg/kg) potentialisait les effets hypotenseurs de l'HP. D'après les auteurs, plusieurs mécanismes pourraient engendrer cette hypotension : inhibition ou activation de canaux ioniques, stimulation de la formation du NO par un récepteur inconnu, inhibition de l'activité de peptidases menant à une élévation des taux circulants de peptides hypotenseurs. Ils rapportèrent également que l'HP ne parvenait pas à contracter des préparations de muscle lisse vasculaire (aorte de cobaye) ou non vasculaire (iléon de cobaye). Ainsi l'HP n'exercerait probablement pas d'action directe sur le muscle lisse vasculaire. À ce jour, le récepteur de l'HP n'a pas été identifié.

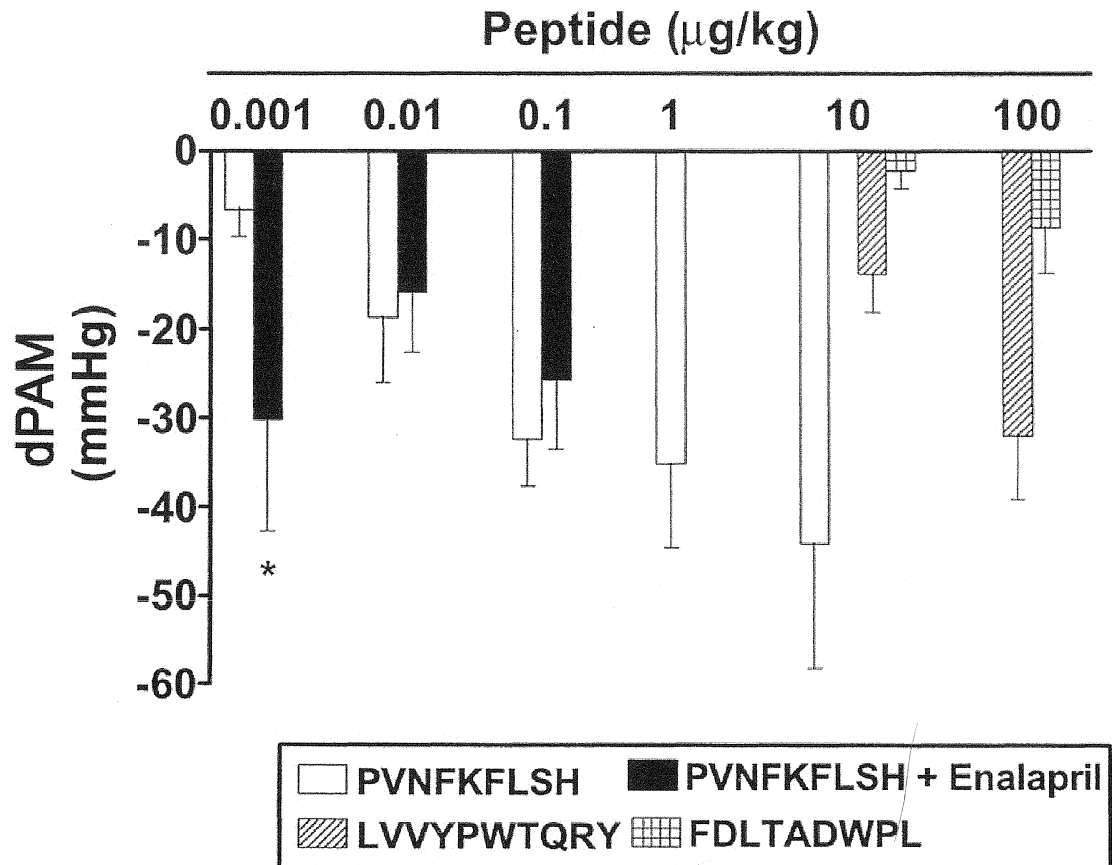


Fig. 3. Effets hypotenseurs des peptides PVNFKFLSH, LVVYPWTQRY, et FDLTADWPL administrés à des rats Wistar mâles, anesthésiés au pentobarbital. Cette figure représente les effets de trois peptides, dont l'hémopressine, testés à différentes doses par le groupe de RIOLI *et al.* Le peptide FDLTADWPL n'entraîne qu'une faible hypotension aux doses utilisées. La réponse à PVNFKFLSH en présence d'énalapril, un inhibiteur de l'ECA, a également été étudiée. dPAM = variation de la pression artérielle moyenne. PVNFKFLSH = hémopressine et LVVYPWTQRY = LVV-hémorphine 7 (isoforme de rat). Les résultats représentent la moyenne \pm E.S. de la variation de la pression artérielle moyenne de 3 à 9 rats. *, $p < 0.05$ comparé à la réponse sans énalapril. Adapté de l'article de RIOLI *et al.* (2003).

2. LES KININES

Les kinines sont des peptides endogènes provenant du clivage enzymatique des kininogènes par les kallibréines. Il existe quatre kinines principales chez l'être humain : la bradykinine (BK), la Lys-bradykinine (Lys-BK), la des-Arg⁹-bradykinine (DBK) et la Lys-des-Arg⁹-bradykinine (LDBK) (LINZ *et al.*, 1995). Ces peptides sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques dont l'inflammation et la régulation de la pression sanguine (BHOOLA *et al.*, 1992).

2.1. Biosynthèse

Les kinines sont issues de précurseurs synthétisés par le foie qu'on retrouve dans la circulation sanguine : les kininogènes. On retrouve deux types de kininogènes chez la plupart des mammifères : le kininogène à haut poids moléculaire et le kininogène à faible poids moléculaire (fig. 4) (MÜLLER-ESTERL, 1989). Le rat fait exception à la règle, car il en possède un troisième type : le T-kininogène (fig. 5) (OKAMOTO & GREENBAUM, 1983). Les kinines peuvent être libérées des kininogènes par des protéases nommées kininogénases (fig. 6) (MÜLLER-ESTERL, 1989). Ce sont soit des protéases peu spécifiques, telles la trypsine, la plasmine et les protéases du venin de serpent (*Bothrops jararaca*), soit des enzymes plus spécifiques comme les kallibréines. Ces dernières forment un groupe de protéases à sérine présentes dans les cellules glandulaires, les neutrophiles et les fluides biologiques ; elles sont impliquées dans la transformation de précurseurs protéiques, d'enzymes et d'hormones (LAZURE *et al.*, 1983 ; SEIDAH *et al.*, 1988).

Kininogène de haut poids moléculaire (Homme) :

	1	11	21	31	41	51	61	
1	QESQSEEIDC	NDKDLFKAVD	AALKKYNSQN	QSNNOFVLYR	ITEATKTVGS	DTFYSEFKYEI	KEGDCPVQSG	70
71	KTWQDCEYKD	AKAATGECT	ATVGKRSSTK	FSVATQTCQI	TPAEGPVVTA	QYDCLGCVHP	ISTQSPDLEP	140
141	ILRHGIQYFN	NNTQHSSLFM	LNEVKRAQRQ	VVAGLNFRIT	YSIVQTNCSK	ENFLFLTPDC	KSLWNGDTGE	210
211	CTDNAYIDIQ	LRIASFQNC	DIYPGKDFVQ	PPTKICVGCP	RDIPTNSPEL	EETLHTITK	LNAENNATFY	280
281	FKIDNVKKAR	VQVAGKKYF	IDFVARETTC	SKESNEELTE	SCETKKGQS	LDCNAEVYVV	PWEKKIYPTV	350
351	NCQPLGMISL	MKRPPGFSPF	R SSRIGEIKE	ETTVSPPTS	MAPAQDEERD	SGKEQGHTRR	HDWGHEKQRK	420
421	HNLGHGHKHE	RDQGHGHQRG	HGLGHGHEQQ	HGLGHGHKFK	LDDDLEHQGG	HVLDHGHKHK	HGHGHGKHKH	490
491	KGKKNKGKNG	WKTEHLASSS	EDSTTPSAQT	QEKTEGPTPI	PSLAKPGVTV	TFSDFQSDSL	IATMMPPISP	560
561	APIQSDDDWI	PDIQTDPNGL	SFNPISDFPD	TTSPKCPGRP	WKSVEINPT	TQMKEYYFD	LTDGLS	

Kininogène de faible poids moléculaire (Homme):

	1	11	21	31	41	51	61	
1	QESQSEEIDC	NDKDLFKAVD	AALKKYNSQN	QSNNOFVLYR	ITEATKTVGS	DTFYSEFKYEI	KEGDCPVQSG	70
71	KTWQDCEYKD	AKAATGECT	ATVGKRSSTK	FSVATQTCQI	TPAEGPVVTA	QYDCLGCVHP	ISTQSPDLEP	140
141	ILRHGIQYFN	NNTQHSSLFM	LNEVKRAQRQ	VVAGLNFRIT	YSIVQTNCSK	ENFLFLTPDC	KSLWNGDTGE	210
211	CTDNAYIDIQ	LRIASFQNC	DIYPGKDFVQ	PPTKICVGCP	RDIPTNSPEL	EETLHTITK	LNAENNATFY	280
281	FKIDNVKKAR	VQVAGKKYF	IDFVARETTC	SKESNEELTE	SCETKKGQS	LDCNAEVYVV	PWEKKIYPTV	350
351	NCQPLGMISL	MKRPPGFSPF	R SSRIGEIKE	ETTSHLRSCE	YKGRPPKAGA	EPASEREVS		

Fig. 4. Structure primaire des kininogènes de faible et de haut poids moléculaire chez l'homme. Les acides aminés encadrés et en caractères gras correspondent aux kinines (TAKAGAKI *et al.*, 1985).

T-kininogène (Rat) :

	1	11	21	31	41	51	61	
1	QEEGAQELNC	NDETVFQAVD	TALKKYNAEL	ESGNQFVLYR	VTEGTTKDG	ETLYSFKYQI	KEGNCSVQSG	70
71	LTWQDCDFKD	AEEAATGECT	TTLGKRENKF	SVATQICNIT	PGKGPKKTEE	DLCVGCFOPI	PMDSSDLKPV	140
141	LKHAVEHFNN	NTKHTHLFAL	TKIKSAHSQV	VAGMNYKIIY	SIVQTNCST	DFPFLREDCV	PLPYGDHGEC	210
211	TGHTHVDIHN	TIAGFSQSCD	LYPGDDLFLS	LPKNCRGCPR	EIPVDSPELK	EALGHSIAQL	NAQHNHIFYF	280
281	KIDTVKKATS	QVVAGVIYVI	EFIARETNCS	KQSKTELTAD	CETKHLGQSL	NCNANVYMRP	WENKVVPTVR	350
351	CQALDMM	ISR PPGFSPFR	LV	QVQETKEGTT	RLSNSCEYKG	RLSKAGAGPA	PDHQAEASTV	TP

Fig. 5. Structure primaire du T-kininogène. Les acides aminés encadrés et en caractères gras correspondent aux kinines (ANDERSON *et al.*, 1989).

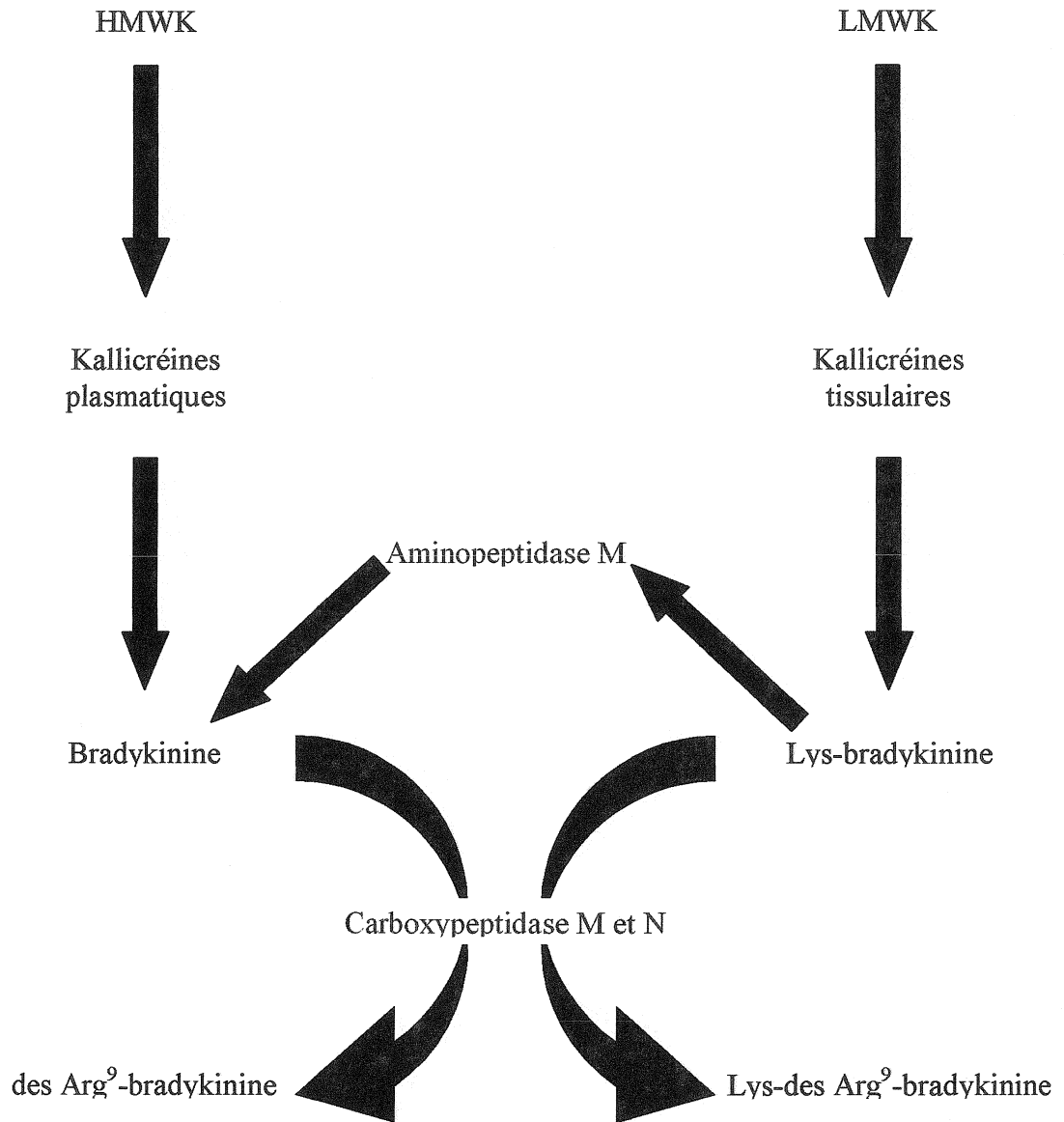


Figure 6. Formation des kinines à partir des kininogènes.

HMWK = kininogène de haut poids moléculaire

LMWK = kininogène de faible poids moléculaire

Les kallibréines sont divisées en deux groupes : la kallibréine plasmatique et la kallibréine tissulaire (BHOOLA *et al.*, 1992). La kallibréine plasmatique forme la BK à partir du kininogène à haut poids moléculaire alors que la kallibréine tissulaire forme la Lys-BK à partir du kininogène de faible poids moléculaire (BHOOLA *et al.*, 1992). La Lys-BK et la LDBK peuvent être converties en BK et DBK sous l'action de l'aminopeptidase M (EC 3.4.11.2) (MARCEAU *et al.*, 1998).

2.2. Les récepteurs des kinines

On connaît deux types de récepteurs des kinines : le récepteur B₂ et le récepteur B₁. Ils appartiennent tous deux à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Lors de la liaison des kinines aux récepteurs, la transduction du signal s'opère notamment via les protéines G α_q et G α_i (LEEB-LUNDBERG *et al.*, 2005). Les protéines G entraînent alors l'activation des phospholipases C (PLC) et A₂ (PLA₂) (BURCH & AXELROD, 1987). Une fois activée, la PLC provoque une augmentation de la concentration intracellulaire d'inositol triphosphate qui augmente à son tour les taux cytosoliques de Ca²⁺ (MATHIS *et al.*, 1996). Cela a pour effet d'accroître la synthèse et la relâche de monoxyde d'azote (NO). La PLA₂ activée libère l'acide arachidonique (AA) des phospholipides membranaires ; ce dernier servira de précurseur dans l'élaboration des éicosanoïdes, dont la prostacycline (PGI₂), un vasodilatateur (McGIFF *et al.*, 1991). L'activation de la PLC provoque également une augmentation de la concentration en diacylglycérol (DAG), résultant ainsi en une augmentation de l'activité de la protéine kinase C (PKC) (BROWN & ROBERTS, 2001). On retrouve les

récepteurs des kinines dans une multitude de types cellulaires, telles les cellules endothéliales, épithéliales, mésangiales et neuronales, les cellules musculaires lisses vasculaires et extravasculaires, les ostéoblastes et certaines cellules immunocompétentes telles les lymphocytes T et les macrophages (GOBEIL, 1998).

Bien que ces deux récepteurs appartiennent à une même famille, ils diffèrent grandement l'un de l'autre. Le récepteur B₂ est exprimé de façon constitutive alors que le récepteur B₁ est induit par plusieurs stimuli, tels l'inflammation, les dégâts tissulaires et certains agents infectieux (DONALDSON *et al.*, 1997). Le récepteur B₂ possède une meilleure affinité pour la BK et la Lys-BK que le récepteur B₁ tandis que celui-ci possède une affinité marquée pour les kinines ayant perdues leur arginine en position C-terminale, la desArg⁹BK et la Lys-desArg⁹BK (DBK et LDBK) (MARCEAU *et al.*, 1998). Finalement, le récepteur B₂ peut être désensibilisé alors que ce n'est pas le cas du récepteur B₁ (REGOLI *et al.*, 1998).

2.3. Métabolisme enzymatique

Plusieurs enzymes sont impliquées dans la dégradation des kinines. Parmi celles-ci, on retrouve les carboxypeptidases M et N (CPM ; EC 3.4.17.12 et CPN ; EC 3.4.17.3), l'ECA (EC 3.4.15.1) et l'endopeptidase neutre 24.11 (ENP 24.11 ; EC 3.4.24.11) (LINZ *et al.*, 1995). Sous l'action de l'ENP 24.11 et de l'ECA, les kinines sont inactivées par le clivage d'un dipeptide carboxyterminal. Dans le plasma, 90% du métabolisme des kinines est due à l'activité des carboxypeptidases N et M ; la forme soluble de l'ECA

étant responsable du reste de la dégradation (REGOLI & BARABÉ, 1980). Par contre, au niveau de la circulation sanguine cardiaque (DUMOULIN *et al.*, 1998) et pulmonaire (REGOLI & BARABÉ, 1980), l'ECA endothéliale est la principale enzyme impliquée dans la dégradation des kinines ; en un seul passage, plus de 90% de la quantité circulante de kinines est inactivé (RYAN, 1982). En condition normale, l'hydrolyse d'une arginine en position 9 de la BK et de la Lys-BK, par la CPM et la CPN, entraîne l'inactivation des kinines. Par contre, en condition pathologique, l'activité biologique des kinines est potentiellement conservée malgré l'action des carboxypeptidases : les peptides ainsi formés (la DBK et la LDBK) sont des agonistes du récepteur B₁ des kinines dont l'expression peut être induite lors de certaines pathologies (HALL, 1992).

2.4. Actions vasculaires

Au niveau des vaisseaux sanguins, les kinines jouent surtout un rôle dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la modulation de la pression sanguine (BASCANDS & GIROLAMI, 1996). L'augmentation de cette perméabilité se produit de deux façons, soit par la formation d'espaces intercellulaires suite à la contraction des cellules endothéliales (GARCIA, 1992 ; MALIK *et al.*, 1989), soit par l'augmentation de la pression intra-capillaire causée par une vasodilatation pré-capillaire et une vasoconstriction post-capillaire (REGOLI & BARABÉ, 1980). Les kinines modulent la pression sanguine via la relâche de médiateurs, tels le NO et le PGI₂, par les cellules endothéliales. Ces derniers diffusent vers les cellules musculaires lisses sous-jacentes et causent leur relaxation (MARCEAU *et al.*, 1995). Cela provoque une diminution de la

résistance périphérique qui entraîne alors une baisse de la pression sanguine (REGOLI *et al.*, 1998).

3. SEPTICÉMIE ET CHOC SEPTIQUE

La septicémie peut-être causée par des agents pathogènes viraux, bactériens ou fongiques (CAILLE, 2004). Les infections se produisent lorsque des microorganismes parviennent à traverser les barrières (peau et muqueuses) de l'hôte. Selon la virulence des microorganismes et l'immunocompétence de l'hôte, les mécanismes de défense locaux de l'hôte peuvent être submergés. La résultante étant l'invasion de la circulation sanguine par les microorganismes (NATANSON *et al.*, 1994). La présence de toxines microbiennes, dont les lipopolysaccharides (LPS), dans le sang active les défenses systémiques de l'hôte.

Ainsi, des facteurs plasmatiques (cascades du complément et de la coagulation) et des composantes cellulaires (neutrophiles, monocytes, macrophages et cellules endothéliales) sont activés. Les cellules activées libèrent ensuite des médiateurs potentiellement délétères (cytokines : TNF et IL-1, kinines, éicosanoïdes, facteur d'activation des plaquettes et NO) qui ont pour effet d'amplifier la réponse inflammatoire (NATANSON *et al.*, 1994). La réaction inflammatoire induit l'expression de certaines protéines, notamment des enzymes (ex. COX-2 et iNOS) (LIU *et al.*, 1996 ; WOLKOW, 1998) et des récepteurs (ex. récepteur B₁ des kinines, NK₁ des tachykinines et A₁ de l'adénosine) (DONALDSON *et al.* 1997). Cette escalade de la réponse immunitaire, de concert avec

les toxines microbiennes, peut entraîner un choc septique, la défaillance de plusieurs organes et la mort (NATANSON *et al.*, 1994).

Les LPS sont des composantes majeures de l'enveloppe externe des bactéries gram négatives. Ils sont responsables des symptômes associés à la septicémie et au choc septique (PÅLSSON-MCDERMOTT & O'NEILL, 2004). Expérimentalement, les conditions de septicémie et de choc septique peuvent être recréées chez des animaux en leur injectant des LPS (FLYNN, 1978).

Une des conséquences intéressantes de la septicémie, en relation à la présente étude, est l'augmentation significative de l'hémolyse. En effet, l'activation de procoagulant qui mène à la formation de dépôts de fibrine et la production d'espèces réactives de l'oxygène par les neutrophiles occasionnent des dommages à l'hémoglobine. Ces dommages peuvent à leur tour augmenter la destruction des globules rouges (JENG & GLADER, 2004 ; GLADER, 2004a).

4. RATIONNELLE DE L'ÉTUDE

L'étude de RIOLI *et al.* (2003) a permis de tirer les conclusions suivantes : a) l'HP est, *in vitro*, un substrat des endopeptidases 24.15 et 24.16 ainsi que de l'ECA, b) l'hémoglobine pourrait bien être le réservoir principal de l'HP et c) le peptide produit un effet hypotenseur chez le rat. Ainsi, nous émettons l'hypothèse que l'HP est bel et bien une hormone peptidique hypotensive dont la durée d'action est limitée par sa protéolyse

par des peptidases ; notamment l'enzyme de conversion de l'angiotensine. Les observations de RIOLI *et al.* (2003) susciterent quelques questions de notre part : 1) y'a-t-il des différences au niveau du métabolisme, *in vitro*, de l'HP par l'ECA comparativement à la BK ? 2) Puisque l'HP est un substrat de l'ECA *in vitro*, est-elle sujette, à l'instar de la BK, à l'inactivation cardiaque/pulmonaire et peut-on potentialiser, *in vivo*, ses effets hypotenseurs à l'aide d'inhibiteurs de l'ECA ? 3) Est-ce que la réponse hypotensive à l'HP peut être inhibée par un antagoniste ? 4) Pouvons-nous observer les effets hypotenseurs de l'HP dans d'autres modèles animaux ? 5) Sachant qu'il est plus que probable que l'HP soit libérée suite à la destruction des érythrocytes, et considérant que cette hémolyse est plus importante au cours de la septicémie, est-ce que la réponse pharmacologique de l'HP est modulée lors de cette situation pathologique ?

5. OBJECTIFS

Afin de tester cette hypothèse, ainsi que de mettre au défi et approfondir les résultats de RIOLI *et al.* (2003), nous nous proposons de répondre aux objectifs suivants :

1. Évaluer, *in vitro*, la susceptibilité de l'HP à l'hydrolyse par l'ECA purifiée de poumon de lapin et la comparer à la BK.
2. Comparer les effets *in vivo* de la BK et de l'HP afin de valider ou d'infirmer l'observation de RIOLI *et al.* (2003) selon laquelle l'HP serait plus puissante que la BK comme agent hypotenseur. Cette affirmation reste ambiguë, puisque ces mêmes auteurs ne présentent aucune donnée comparative chez le rat.

3. Étudier *in vivo* l'influence de l'inactivation cardiaque/pulmonaire sur la réponse à l'HP en comparant ses effets hypotenseurs lorsque administrée par voie intraveineuse (i.v.) ou intra-artérielle (i.a.) et, de façon concomitante, déterminer l'efficacité du captopril à potentialiser la réponse à l'HP administrée par voie i.v.
4. Vérifier les effets hémodynamiques de l'HP chez plusieurs espèces animales.
5. Vérifier si la réponse à l'HP est modulée par un antagoniste sélectif du récepteur B₂ des kinines, le HOE 140, afin de déterminer si l'effet hypotenseur de l'HP passe par la production et la relâche intravasculaire de BK qui, elle, agit via le récepteur B₂ des kinines.
6. Vérifier si la réponse à l'HP est modulée par la pathologie de la septicémie en utilisant un modèle animal traité avec le LPS.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

6. SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

Les abréviations et les structures primaires des peptides synthétisés au cours de cette étude sont présentées à la figure 7.

6.1 Réactifs et solvants

Les acides aminés et les résines ayant leur fonction amine protégée par un groupement flurénylméthoxycarbonyl (Fmoc) proviennent de Chem-Impex International, Inc. (Wood Dale, IL), Novabiochem (San Diego, CA) et Peninsula Laboratories Inc. (San Carlos, CA). Les résines utilisées sont les suivantes : Fmoc-Arg(Pbf)-NovaSyn TGA, Fmoc-Phe-NovaSyn TGA (Novabiochem) et Tentagel S PHB-His(Trt)-Fmoc (Chem-Impex International Inc.). Les acides aminés suivants ont été utilisés pour la synthèse : Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH et Fmoc-Ser(tBu)-OH (tous de Chem-Impex International Inc.) ; Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Pro-OH et Fmoc-Val-OH (tous de Novabiochem) ; Fmoc-Phe-OH (de Peninsula Laboratories Inc.). Les acides aminés utilisés étaient tous de conformation L.

La piperidine, le N,N-diisopropyléthylamine (DIPEA) et le triisopropyl silane (TIPS) provenaient de chez Sigma-Aldrich (Montréal, Qc). Le O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N,N-tetraméthyluronium tétrafluoroborate (TBTU) et l'acide trifluoroacétique (TFA) provenaient de chez Chem-Impex International Inc. (Wood Dale, IL).

Nom	Abréviation	Séquence	Poids moléculaire
Bradykinine	BK	NH ₂ -Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-COOH	1060,2
Hémopressine de rat	<i>r</i> HP	NH ₂ -Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Phe-Leu-Ser-His-COOH	1088,3
Hémopressine (1-7) de rat	<i>r</i> HP(1-7)	NH ₂ -Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Phe-Leu-COOH	864,1
Hémopressine de l'homme/lapin/souris	<i>hls</i> HP	NH ₂ -Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Ser-His-COOH	1054,9

Fig. 7. Structures primaires et poids moléculaires théoriques des peptides synthétisés au cours de cette étude.

L'isopropanol, l'éther et le N,N-diméthylformamide (DMF) provenaient respectivement de chez Anachemia (Montréal, Qc), EMD (San Diego, CA) et Fisher Scientific Ltd. (Nepean, ON). Le N,N-diméthylformamide (DMF) a été entreposé une semaine en présence de tamis moléculaire de 4Å (Sigma-Aldrich) afin d'éliminer toute trace d'amines et d'eau. Les autres produits, de qualité HPLC, ont été utilisés tels quels.

6.2 Synthèse peptidique en phase solide de type « à débit continu »

La bradykinine (BK), l'hémopressine de rat (*rHP*), son fragment 1 à 7 [*rHP*(1-7)] ainsi que l'hémopressine de lapin (*hlsHP*) furent synthétisés à l'aide de la stratégie Fmoc en utilisant la méthode de synthèse sur support solide de type « à débit continu » sur un appareil « Pioneer Peptide Synthesis System » (PerSeptive Biosystems). La LDBK et le HOE 140 (DArg³,Thi⁵,DTic⁷,Oic⁸]BK) ont été fournis par le Dr Witold Neugebauer. Pour les couplages, nous avons utilisé des quantités d'acides aminés et du mélange TBTU:DIPEA quatre fois supérieures à la quantité d'acide aminé liée à la résine.

Lors de la synthèse, l'acide aminé à coupler est d'abord solubilisé dans le DMF. Son groupement carboxyle est ensuite activé en y ajoutant un mélange de TBTU:DIPEA (1:1) également solubilisé dans le DMF. La déprotection du groupement fmoc de l'acide aminé couplé à la résine est réalisée à l'aide d'une solution de pipéridine 20% (v/v) dans le DMF. Après un lavage de la résine à l'isopropanol suivi d'un autre au DMF, l'acide aminé à coupler, maintenant activé, est mélangé à la résine. Finalement, le mélange réactionnel est vidangé et la résine est lavée une dernière fois avec du DMF. Ces étapes sont répétées jusqu'à l'obtention de la séquence désirée.

6.3 Clivage du peptide de la résine

Les peptides furent libérés de la résine en utilisant un protocole standard de clivage et un mélange TFA 95%, TIPS 2,5%, H₂O 2,5%. Brièvement, le peptide lié à la résine est placé dans une fiole de verre et séché quelques minutes au lyophilisateur. Ensuite, le mélange TFA:TIPS:H₂O est ajouté à la résine (5-10 ml de solution par gramme de résine) et on agite le tout (au minimum 60' ; rallonger de 60' pour chacune des arginines contenues dans la séquence peptidique) à l'aide d'un petit barreau magnétique. Finalement, le mélange TFA:TIPS:H₂O est filtré de la résine en la faisant passer dans une pipette pasteur obstruée par de la laine de verre. On lave la résine avec la solution TFA:TIPS:H₂O ou du TFA 100% (deux lavages de 1 ml par gramme de résine). Le filtrat est recueilli directement dans un erlenmeyer contenant de l'éther (50 ml par gramme de résine) agité par un barreau magnétique : le peptide clivé précipitera alors que les résidus organiques de la synthèse seront dissous dans l'éther. Quand la filtration est terminée, on place le précipité et l'éther dans des tubes qu'on centrifuge 5-10 min à 2000g. Après la centrifugation, on décante l'éther et on solubilise le peptide dans de l'eau distillée. Le peptide solubilisé est placé dans un contenant, congelé puis lyophilisé. Une fois la lyophilisation terminée, le peptide est prêt à être purifié.

6.4 Purification du peptide

La purification des peptides bruts a été réalisée par chromatographie liquide à phase inverse sur une colonne C₁₈. Un gradient linéaire d'un mélange eau/acétonitrile

(contenant également 0,05% de TFA) allant de 0% à 40% d'acétonitrile servit à éluer les peptides. Les fractions pures, déterminées par analyse HPLC, furent ensuite combinées et lyophilisées à nouveau.

L'analyse des peptides purifiés a été accomplie à l'aide d'un appareil HPLC analytique à phase inverse et d'une colonne C₁₈ μ Bondapak (CSC-Nucleosil, 100 Å/ODS 5 μ m, 15x 0.46 cm) (Waters Associates). Le gradient linéaire, utilisé à une vitesse d'élution de 1 ml/min, était composé d'un mélange eau/acétonitrile (contenant également 0,05% de TFA) variant de 5% à 65% d'acétonitrile sur une période de 20 min. Des aliquots de 10 μ l furent injectés dans l'appareil afin de déterminer la pureté de chaque fraction collectée ainsi que celle des fractions combinées après purification des peptides bruts. La détection des peptides se fit en mesurant l'absorbance de l'éluat à une longueur d'onde de 214 nm.

6.5 Caractérisation du peptide

L'identité des peptides a été confirmée à l'aide de leur valeur masse/charge (m/z) mesurée par spectrométrie de masse de type MALDI (MALDI MS) sur un appareil Micromass Tof Spec 2F en utilisant une matrice MALDI à faible pH (10 g/l d'acide α -cyano-4 hydroxycinnamique dans un mélange 1:1 d'eau et d'acétonitrile).

7. ESSAIS ENZYMATIQUES

7.1 Enzyme et substrats utilisés

Les études enzymatiques furent réalisées à l'aide d'ECA purifiée de poumon de lapin (Sigma-Aldrich) en utilisant la BK, la *rHP* et la *hlsHP* comme substrats.

7.2 Protocole de digestion

0,012 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ d'enzyme et 100 μM de BK, *rHP* ou *hlsHP* furent incubés à 37°C, sous agitation, dans un volume total de 250 μl de tampon PBS 50 mM, pH 7,5 contenant 300 mM de NaCl et 10 μM de ZnCl_2 . Les temps d'incubation allaient de 0 à 60 minutes. La réaction a été arrêtée en faisant bouillir les échantillons pendant 5 min. Les expériences furent réalisées en triplicata.

7.3 Analyse des échantillons

La disparition du substrat a été quantifiée en utilisant la méthode d'analyse par HPLC mentionnée ci-haut. L'aire sous la courbe des pics correspondants aux substrats fut calculée à l'aide du programme Baseline 810 (Waters) et comparée à la valeur obtenue au temps 0 min afin de déterminer la quantité de substrat hydrolysé. Les vitesses initiales ont été calculées en déterminant la pente de la courbe de la quantité de substrat hydrolysée par l'ECA en fonction du temps. La pente a été obtenue à l'aide de la

régression linéaire de cette courbe. La régression linéaire a été réalisée sur une période de temps où la quantité de substrat dégradée ne dépassait pas 15% de sa quantité initiale. Dans certains cas, les produits correspondants aux différents pics des échantillons analysés par HPLC étaient récupérés, lyophilisés et analysés par spectrométrie de masse. Les valeurs m/z obtenues permirent de déterminer l'identité des fragments générés par l'ECA.

8. ESSAIS *IN VIVO*

8.1. Animaux utilisés

Les animaux utilisés au cours de cette étude sont les suivants : lapins albinos de Nouvelle-Zélande mâles (0,8-1,0 kg) ; rats Wistar mâles (200-225 g) et souris C57/BL6 mâles (20-25 g) (Charles River, Montréal, Canada). Ces animaux ont tous été élevés dans des conditions stériles.

8.2. Traitements

Nous avons évalué l'influence de l'inhibition de l'ECA par le captopril (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$), de l'inhibition sélective du récepteur B_2 des kinines par le HOE 140 (500 nmoles/kg) et l'influence des conditions associées au choc septique sur la réponse à la rHP.

8.3. Protocole expérimental

Deux anesthésiants ont été utilisés pour les expériences. En premier lieu, une série d'expériences fut réalisée sur les lapins, les rats et les souris en utilisant un mélange kétamine/xylazine (44/7 mg/kg, 87/13 mg/kg et 190/29 mg/kg, respectivement) injecté de façon intramusculaire. Ensuite, une autre série d'expériences fut réalisée sur des lapins avec le pentobarbital sodique comme anesthésiant. Ce dernier était administré par voie intraveineuse à une dose de 30 mg/kg. Le pentobarbital a été utilisé dans cette série, car une partie des lapins furent traités au LPS et ceux-ci tolèrent mal le mélange kétamine/xylazine (Gobeil, F. communication personnelle).

La pression sanguine était mesurée de façon continue grâce à la canulation de l'artère fémorale (rats et souris) ou de l'artère carotide gauche (lapins) à l'aide d'un tube de polyéthylène (PE) rempli d'une solution saline héparinisée (1000 U/ml). Cette canule était reliée à un transducteur de pression (modèle TDX-300, Micro-Med Inc., KY, USA), lui-même relié à un appareil d'analyse de la pression sanguine (modèle BPA-400a, Micro-Med Inc., KY, USA). Les données furent recueillies et enregistrées sur un ordinateur branché à l'appareil d'analyse de la pression sanguine. L'interface entre les deux appareils était assurée par le programme DMSI-400 (version 1.4, Micro-Med Inc., KY, USA). L'artère carotide droite et la veine jugulaire gauche ont également été canulées afin de permettre l'injection des peptides et autres composés par voie intraveineuse (i.v.) ou intra-artérielle (i.a.). Cela nous permis d'évaluer la contribution de l'ECA endothéliale à la dégradation de la BK et la α HP dans un même animal. Les produits étaient administrés en

bolus (100 µl) via une valve à trois voies. Avant de commencer l'expérience et après chaque injection, les cathéters étaient purgés de leur contenu avec de la saline isotonique stérile (400 µl). Lors des traitements au captopril ou au HOE 140, ces composés étaient respectivement injectés i.v. 30 min et 2,5 min avant d'administrer la BK, la LDBK ou la rHP, tel que rapporté par GOBEIL *et al.* (1996). Les calibres des tubes de PE utilisés étaient de 90 pour les artères du lapin, de 50 pour la veine jugulaire du lapin et les vaisseaux sanguins du rat et de 10 pour les vaisseaux sanguins de la souris. Les expériences commencèrent dès que la pression sanguine se stabilisa. Le tableau I présente les valeurs des différents paramètres hémodynamiques initiaux des animaux utilisés.

La première série d'expériences visa à évaluer les effets de la rHP dans différents modèles animaux. Nous avons mesuré la réponse à la rHP (1-10-100 nmoles/kg) et à la BK (0,1 et 1,0 nmole/kg) chez le lapin, le rat et la souris. Une deuxième série d'expériences servit à déterminer si les effets de la rHP, chez le lapin, étaient modifiés par différents traitements, dont un reproduisait les conditions pathologiques associées à la septicémie. Nous avons utilisé deux groupes de lapins : un premier groupe traité au lipopolysaccharides (LPS) en utilisant une dose sub létale (50 µg/kg i.v.) 5 heures avant la chirurgie (GOBEIL *et al.*, 1999) et un autre non-traité servant de contrôle. Le traitement au LPS est connu pour reproduire les symptômes associés à la septicémie et induire l'expression de certaines protéines dont la COX-2, la iNOS et le récepteur B₁ des kinines (LIU *et al.*, 1996 ; WOLKOW, 1998 ; DONALDSON *et al.*, 1997). Par contre, à des doses inférieures ou égales à 50 µg/kg, le LPS n'entraîne pas une baisse de la pression sanguine telle qu'observée lors du choc septique (REGOLI *et al.*, 1981 ; GOBEIL *et al.*,

1999). L'efficacité du traitement au LPS à induire l'expression du récepteur B₁ des kinines était évaluée en mesurant l'effet hypotenseur engendré par la LDBK (1 nmole/kg i.v.) chez le groupe de lapins traités comparativement au groupe non-traité. Celle-ci ne produisait aucun effet hypotenseur chez les animaux non-traités, mais engendrait une hypotension de 40 ± 4 mmHg chez les animaux traités. Finalement, une dernière série d'expériences menée chez le rat et le lapin eut pour but de vérifier si les deux isoformes de l'HP étudiées produisaient des effets hypotenseurs plus importants au niveau de leur espèce animale respective.

Les effets hémodynamiques des peptides ont été observés en comparant la pression artérielle moyenne (PAM) avant et après l'administration des composés. L'effet de la saline isotonique (0,9%), le véhicule utilisé pour la solubilisation et la dispersion de nos composés, sur la PAM a également été mesuré au début de chaque expérience ; celui-ci s'est avéré négligeable (-1,0 ± 0,5 mmHg ; n = 34). La PAM est calculée à partir des valeurs des pressions systolique et diastolique en utilisant l'équation suivante :

$$PAM \cong P_{\text{dias}} + 0,45(P_{\text{sys}} - P_{\text{dias}})$$

Où PAM = pression artérielle moyenne, P_{sys} = pression systolique et P_{dias} = pression diastolique.

TABLEAU I

Paramètres hémodynamiques initiaux des animaux utilisés au cours de l'étude.

Animal	PAM (en mmHg)	Pression Systolique (en mmHg)	Pression Diastolique (en mmHg)	Rythme Cardiaque (en bpm)
<u>Éveillé</u>				
Lapin albinos (n = 10) ^a	88 ± 2	113 ± 2	79 ± 2	219 ± 4
Rat Wistar (n = 8) ^b	107 ± 4	122 ± 4	n.d.	386 ± 16
Souris C57BL/6 (n = 8) ^c	98 ± 1	n.d.	n.d.	505 ± 3
<u>Anesthésié à la kétamine/xylazine</u>				
Lapin (n = 12)	47 ± 2	59 ± 2	37 ± 2	173 ± 5
Rat (n = 6)	87 ± 3	103 ± 3	73 ± 3	245 ± 5
Souris (n = 6)	91 ± 2	97 ± 2	82 ± 1	189 ± 4
<u>Anesthésié au pentobarbital</u>				
Lapin non-traité (n = 17)	91 ± 3	103 ± 3	82 ± 3	258 ± 9
Lapin traité au LPS (n = 11)	88 ± 2	104 ± 3	76 ± 2	283 ± 7

Note : les valeurs sont présentées sous forme de moyenne ± E.S.

PAM = Pression artérielle moyenne, bpm = battements par minute ; n.d. = non disponible.

^a tiré de MARANO *et al.* (1996)^b tiré de ZHANG *et al.* (2004)^c tiré de LEE *et al.* (2004)

8.4. Composés utilisés

Les solutions stocks de peptides furent solubilisées dans de l'eau déionisée et bidistillée puis entreposées à - 20°C en attendant d'être utilisées. Les autres composés furent solubilisés dans de la saline isotonique stérile. Le captopril (Squibb, Montréal, Canada) a été préparé la journée même de l'expérience. Le LPS (sérotypage 0127: B8) (Sigma-Aldrich), préparé à 1 mg/ml, était utilisé dans les 48 heures suivant sa préparation.

9. ANALYSE STATISTIQUE

L'analyse statistique des résultats fut réalisée par ANOVA univariée suivie du test de comparaison multiple de Bonferroni. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Une valeur de $P < 0,05$ fut considérée comme statistiquement significative. Les résultats sont présentés sous la forme : moyenne \pm erreur standard.

RÉSULTATS

10. SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

L'analyse HPLC des peptides purifiés par chromatographie liquide (figs. 8 et 9) montre que tous les peptides synthétisés sont purs à 99%. De surcroît, les spectres de masse des peptides purifiés (fig. 10 et 11) présentent tous des pics d'intensité maximale ayant des valeurs m/z correspondant à leurs poids théoriques (voir fig. 7). Ainsi les poids moléculaires mesurés sont : 1060,5 pour la BK ; 1088,6 pour la *rHP* ; 864,6 pour la *rHP(1-7)* et 1052,8 pour la *hlsHP*.

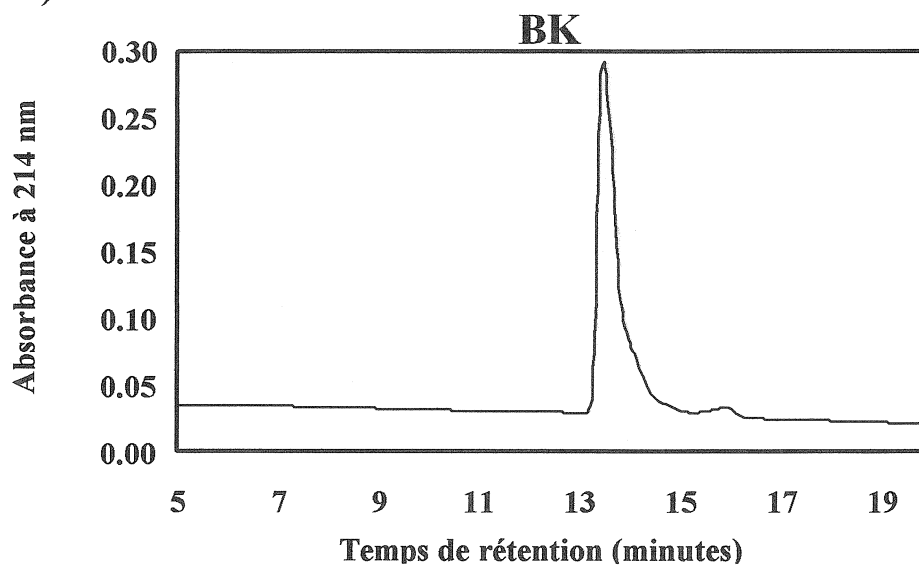
11. ESSAIS ENZYMATIQUES

11.1. Produits de la digestion de BK, *rHP* et *hlsHP* par l'ECA de poumon de lapin

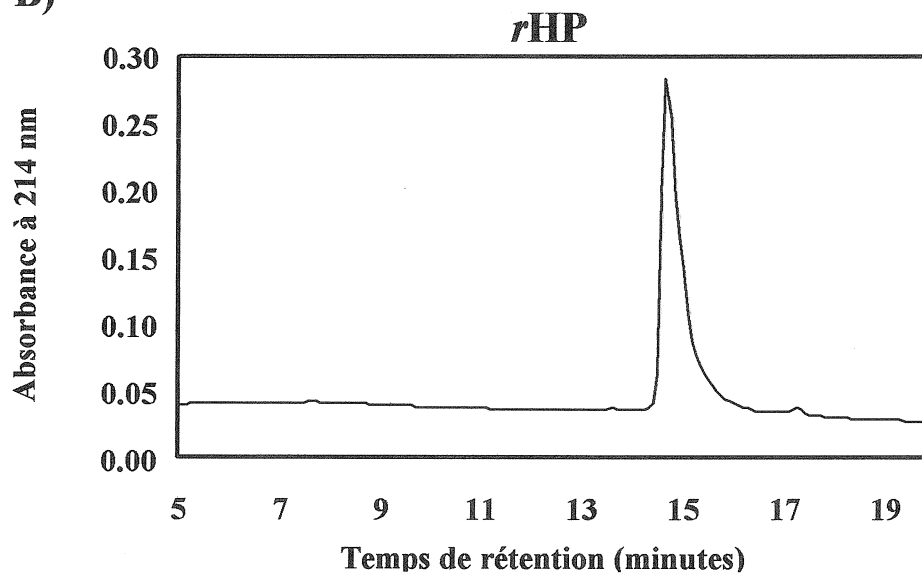
L'étude de la dégradation de ces peptides par l'ECA purifiée de poumon de lapin montre qu'ils sont tous hydrolysés. Après un temps d'incubation de 10 à 15 min en présence d'ECA, un deuxième pic apparaît lors de l'analyse des échantillons par HPLC (fig. 12). La BK (fig. 12A), la *rHP* (fig. 12B) et la *hlsHP* (fig. 12C) ont des temps de rétention respectifs de 14:00, 14:48 et 15:18 min et les produits de la dégradation présentent des temps de rétention de 12:24, 16:18 et 16:48 min respectivement.

Figure 8. Analyse par HPLC de A) la BK, B) la *rHP* et C) la *hlsHP* purifiées par chromatographie liquide sur C₁₈.

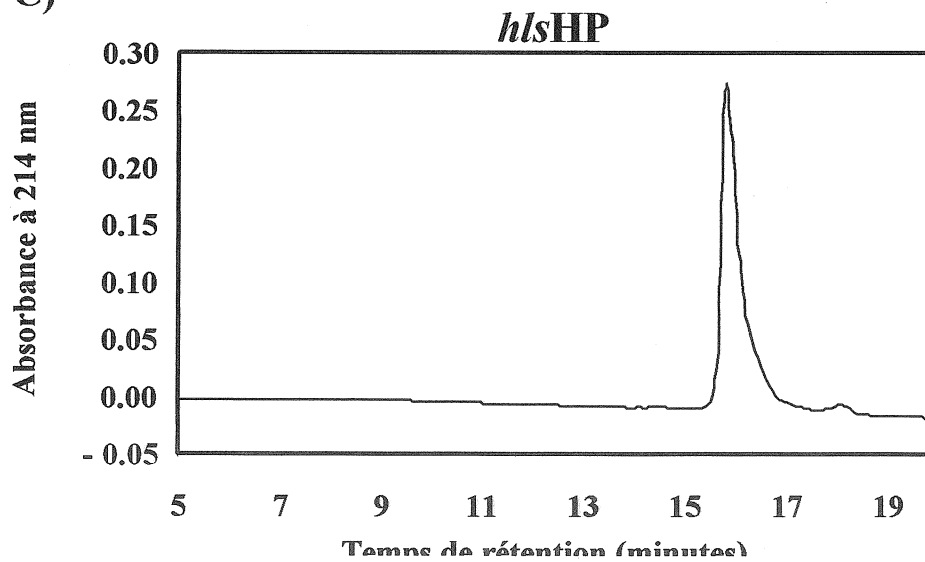
A)



B)



C)



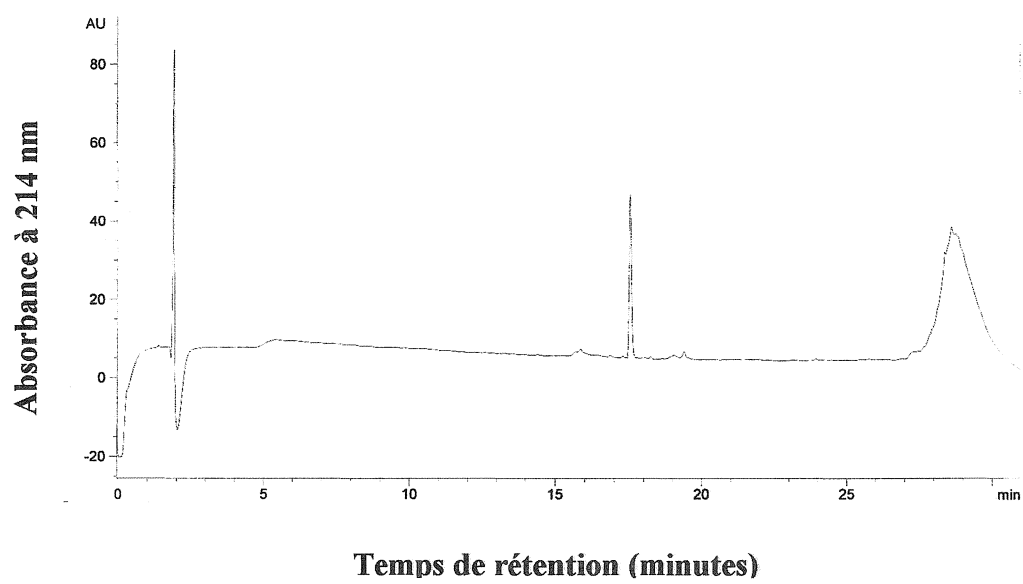


Fig. 9. Analyse par HPLC de la rHP(1-7) purifiée par chromatographie liquide sur C₁₈.

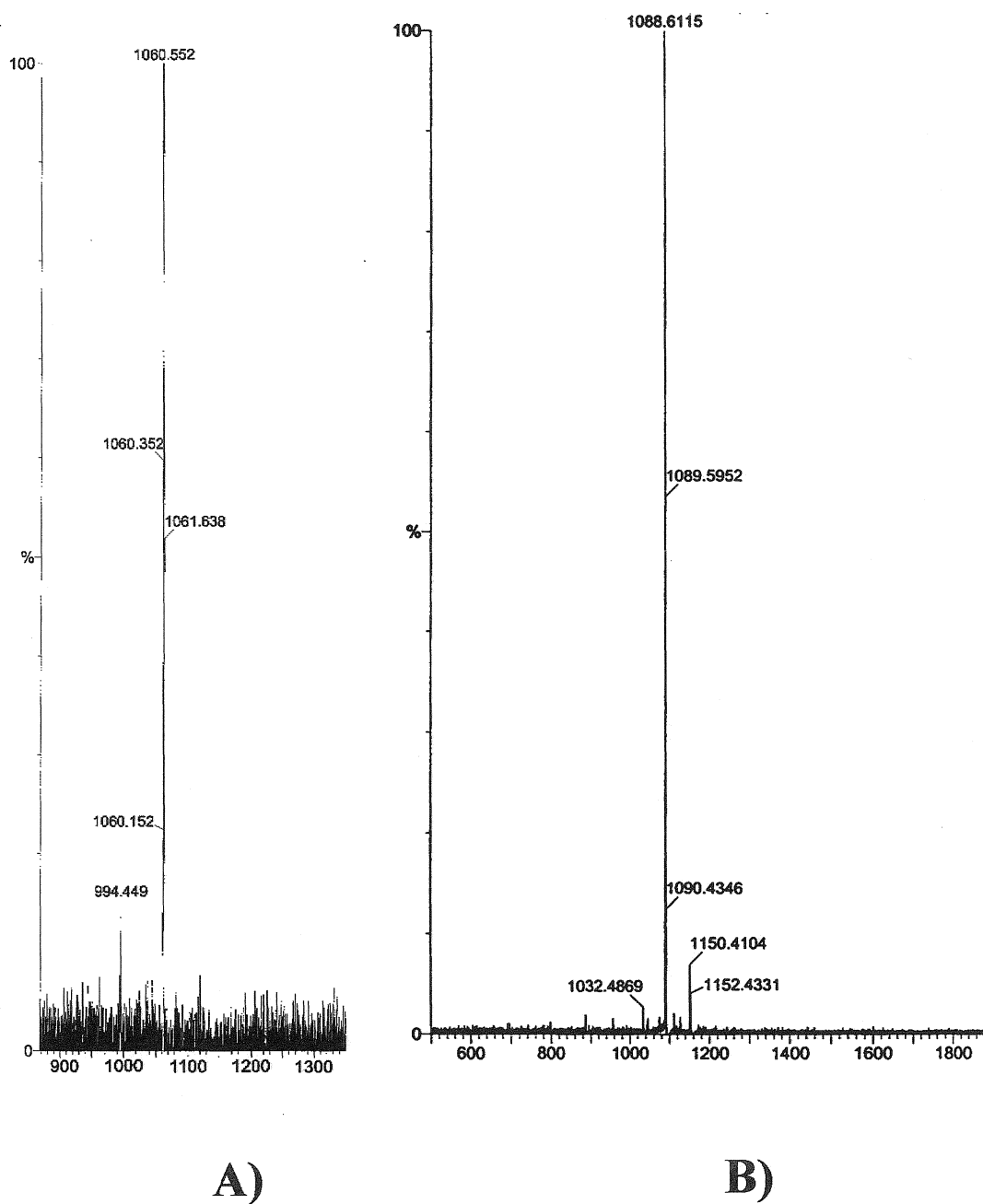


Fig. 10. Analyse par spectrométrie de masse de A) la BK et B) la rHP purifiées par chromatographie liquide sur C₁₈. Abscisse = intensité relative du signal et ordonnée = valeur masse/charge (m/z). n = 1.

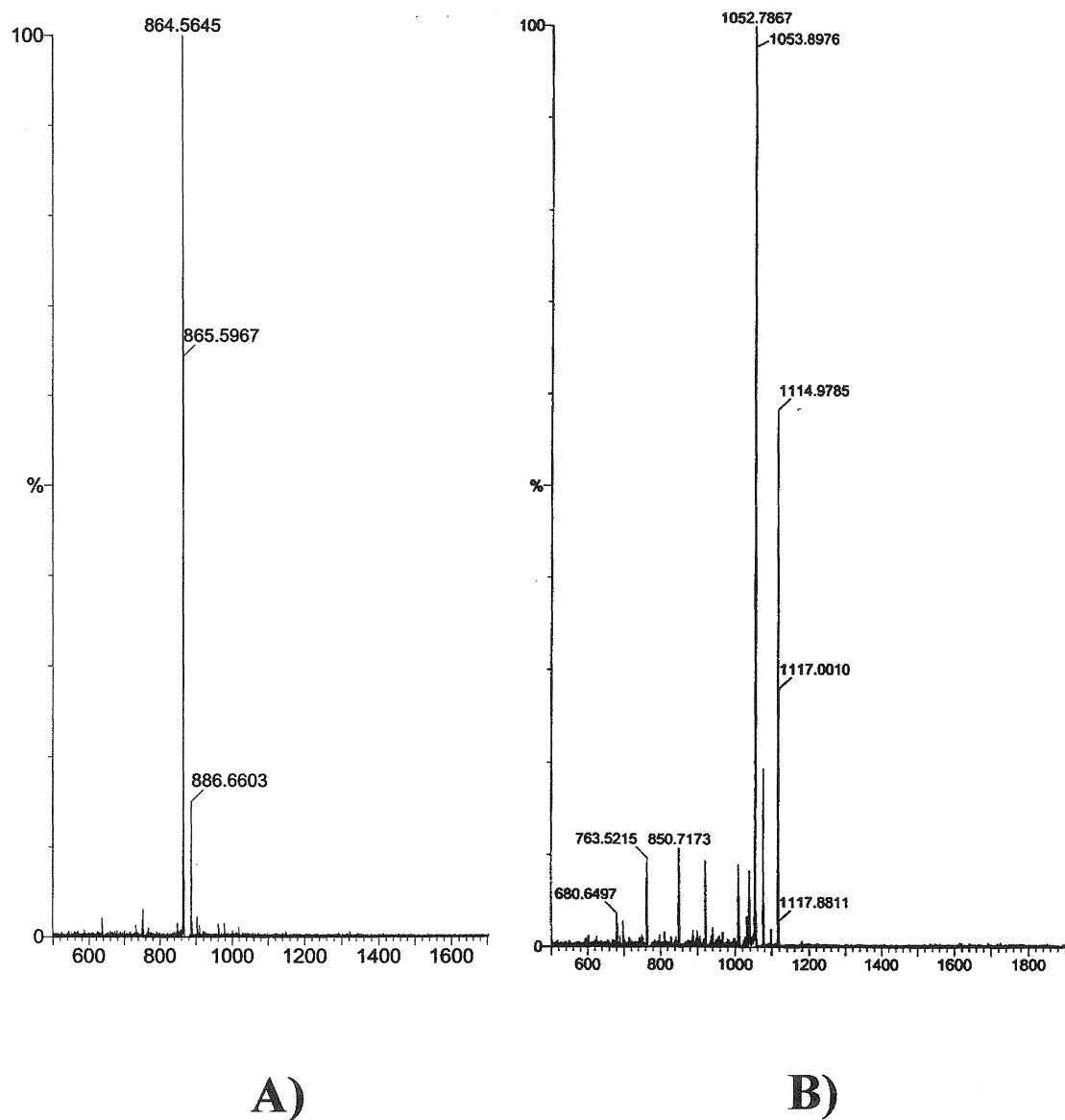
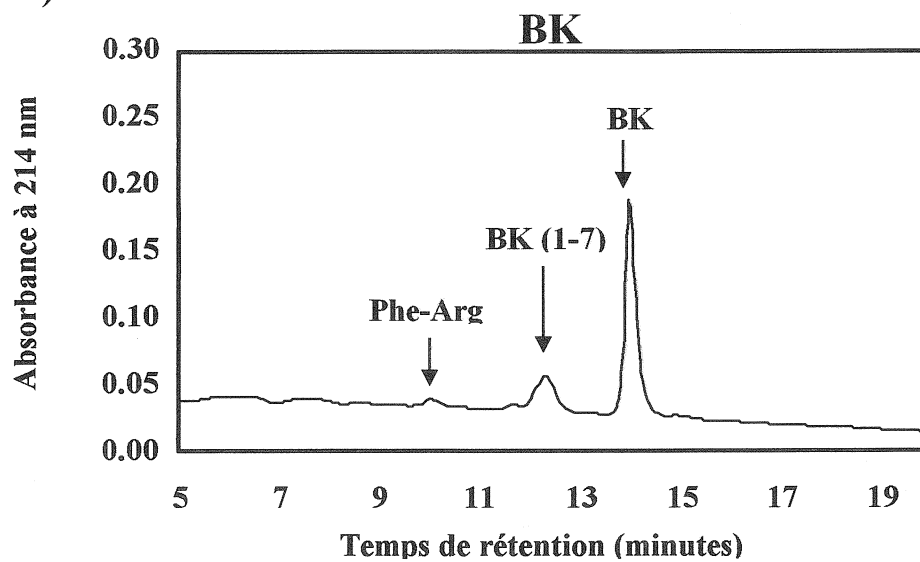


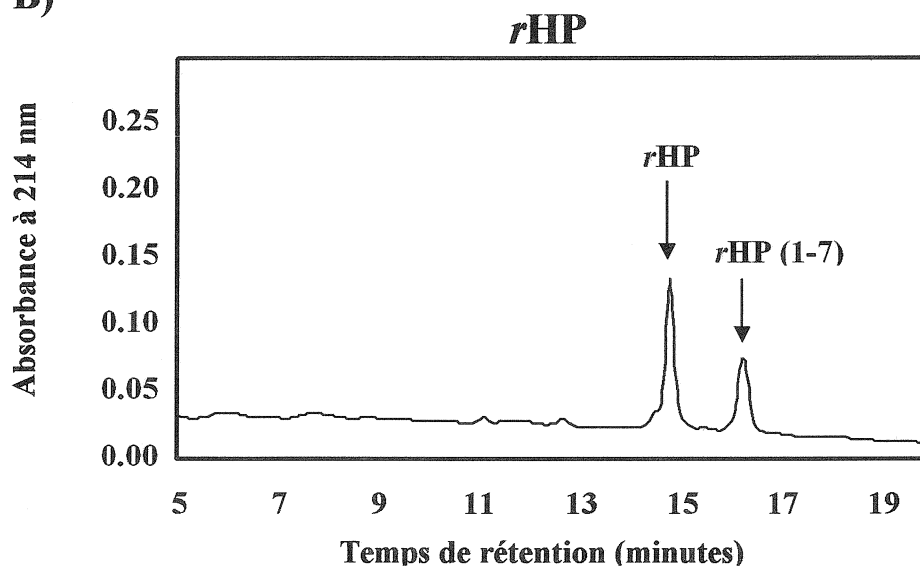
Fig. 11. Analyse par spectrométrie de masse de A) la *rHP*(1-7) et B) la *hlsHP* purifiées par chromatographie liquide sur C_{18} . Abscisse = intensité relative du signal et ordonnée = valeur masse/charge (m/z). $n = 1$.

Figure 12. Analyse HPLC des produits de la digestion de A) la BK, B) la rHP et C) la hlsHP par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) purifiée de poumon de lapin. Brièvement, les substrats furent incubés à 37 ° C pendant 10 à 15 min et analysés par HPLC à phase inverse. Certains pics furent récupérés et analysés par spectrométrie de masse, leur identité confirmée grâce aux valeurs m/z obtenues. Les chromatogrammes sont représentatifs de trois expériences similaires.

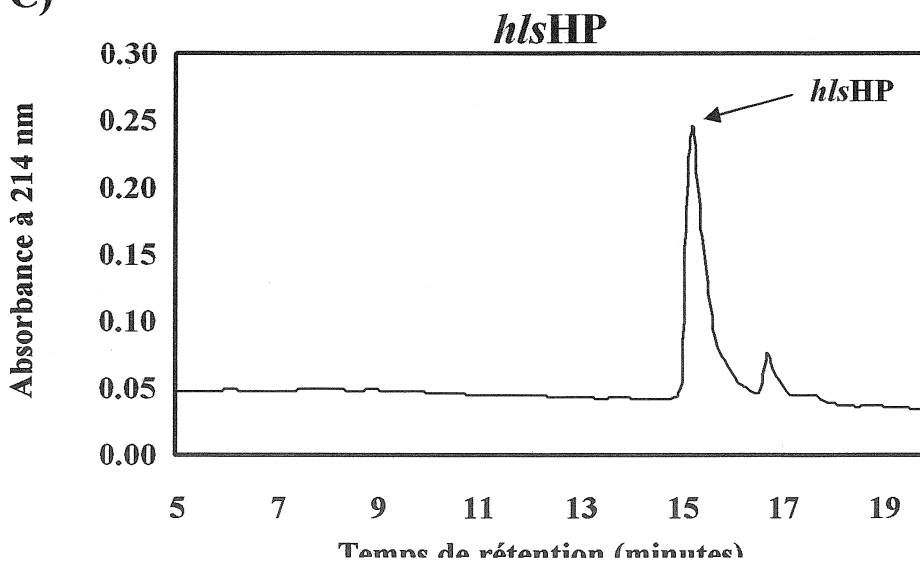
A)



B)



C)



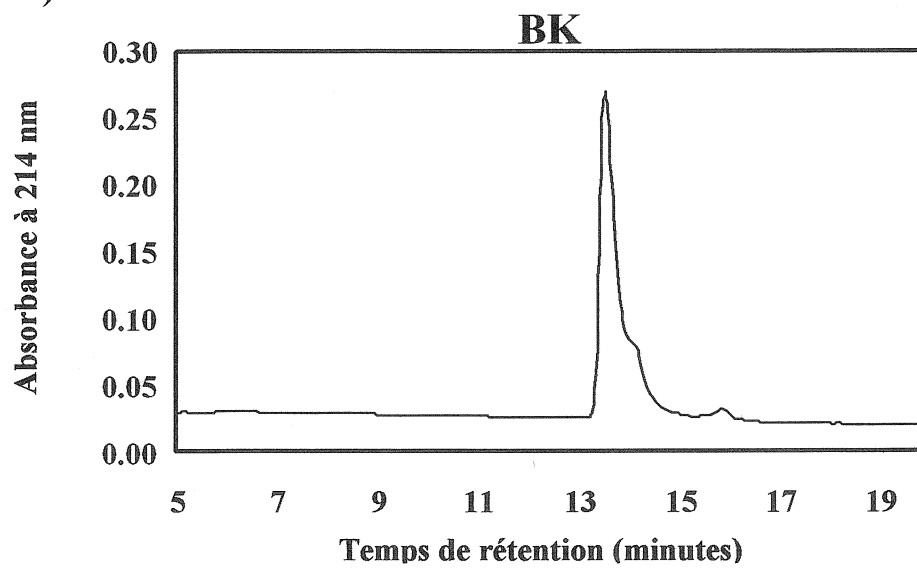
En présence de BK ou de *rHP*, l'ECA génère de la BK(1-7) ($m/z = 757,3$) ou de la *rHP*(1-7) ($m/z = 864,5$) tel que déterminé par l'analyse MALDI MS des pics des chromatogrammes de la figure 8 (fig. 14 et 15). À des temps d'incubation plus longs, la BK(1-7) et la *rHP*(1-7) sont également hydrolysées par l'ECA pour donner la BK(1-5) ($m/z = 573,0$) et la *rHP*(1-5) ($m/z = 604,4$). De plus, la dégradation des peptides par l'ECA est abolie en ajoutant 1 μM de captopril dans les échantillons (fig. 13).

11.2. Vitesses initiales de l'ECA en fonction du substrat utilisé (BK, *rHP* et *hlsHP*)

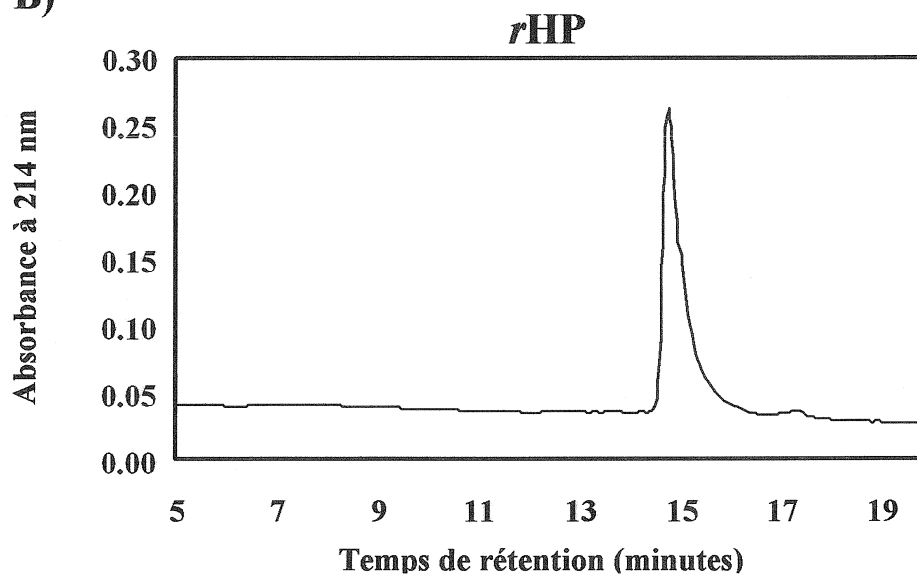
Bien que l'ECA dégrade les trois peptides étudiés et que la BK et la *rHP* soient hydrolysées à plus de 90% après 60 min, l'hydrolyse de la *rHP* a lieu à une vitesse significativement différente ($p < 0,001$) de celle de la BK. En mesurant la quantité de substrat hydrolysé en fonction du temps d'incubation (fig. 16), il a été possible de déterminer la vitesse initiale de l'hydrolyse de BK, *rHP* et *hlsHP* par l'ECA (tableau II). Pour ce faire, la régression linéaire a été réalisée sur la portion de chaque courbe correspondant à une cinétique enzymatique d'ordre zéro. Les valeurs des pentes obtenues correspondent aux vitesses initiales de l'ECA aux conditions expérimentales utilisées. Aux conditions utilisées, la *rHP* est hydrolysée plus rapidement par l'ECA que la BK et la *hlsHP*. Les vitesses de dégradation de la BK et la *hlsHP* ne diffèrent pas significativement entre elles. Des valeurs de R^2 supérieures à 0,99 indiquent une excellente corrélation entre le temps d'incubation et la quantité de substrat hydrolysé.

Figure 13. Analyse HPLC des produits de la digestion de A) la BK, B) la rHP et C) la hlsHP par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) purifiée de poumon de lapin en présence de captopril. Brièvement, les substrats furent incubés en présence d'ECA et de captopril à 37 ° C pendant 60 min et analysés par HPLC à phase inverse. Les chromatogrammes sont représentatifs de trois expériences similaires.

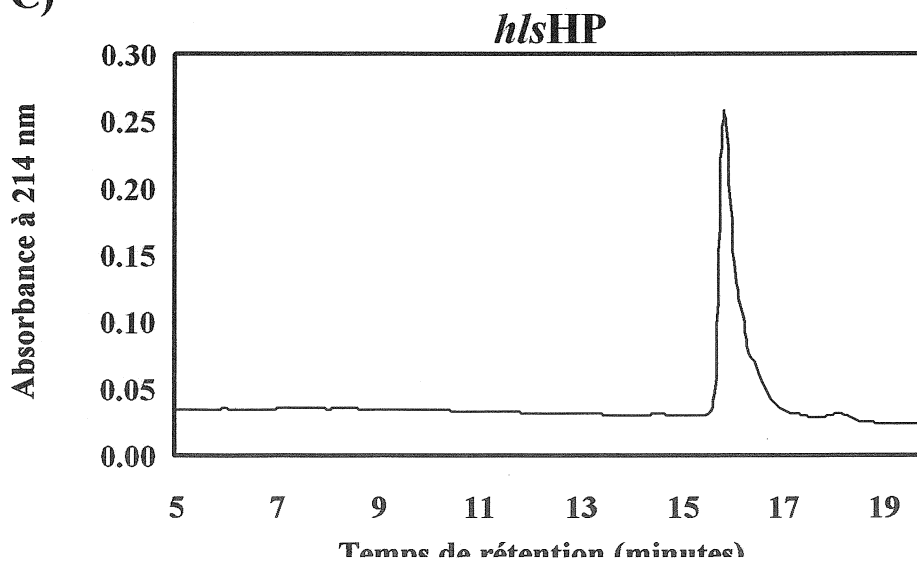
A)



B)



C)



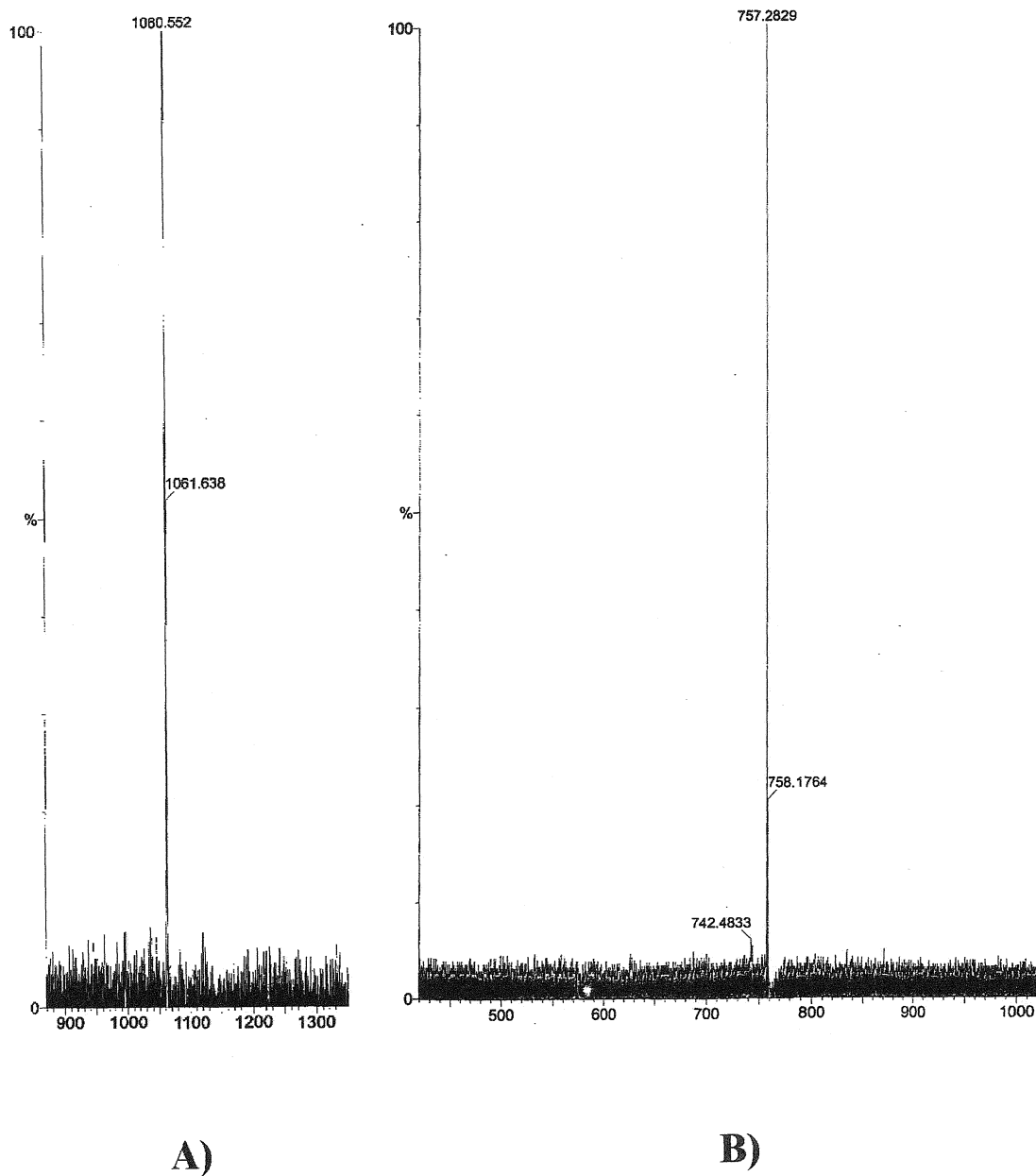


Fig. 14. Spectrométrie de masse des peptides correspondant aux pics des chromatogrammes obtenus à la figure 12A. A) Spectre de masse de la BK intacte. B) Spectre de masse de la BK(1-7). Abscisse = intensité relative du signal et ordonnée = valeur masse/charge (m/z). n = 1

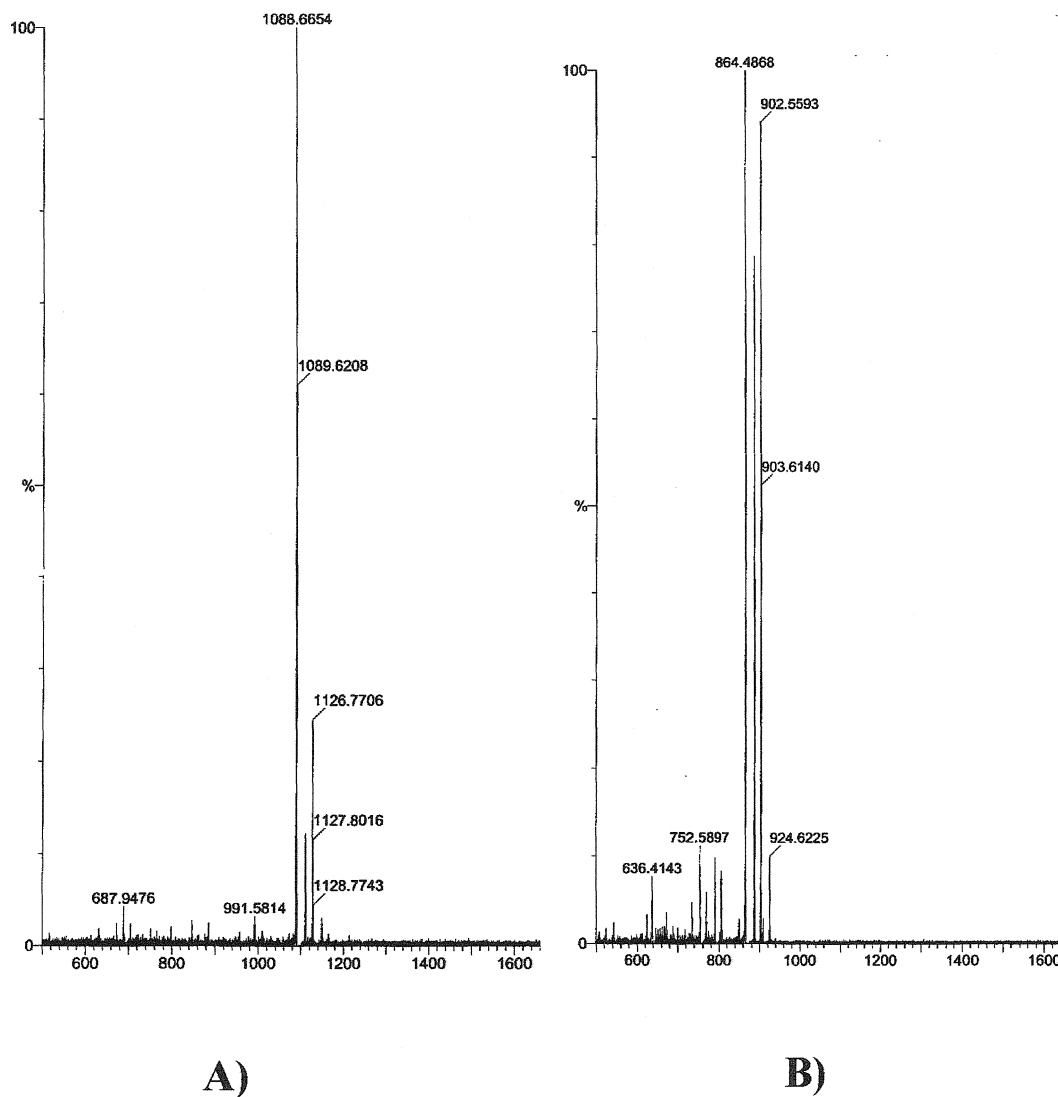


Fig. 15. Spectrométrie de masse des peptides correspondants aux pics des chromatogrammes obtenus à la figure 12B. A) Spectre de masse de la rHP intacte. B) Spectre de masse de la rHP(1-7). Abscisse = intensité relative du signal et ordonnée = valeur masse/charge (m/z). $n = 1$

Figure 16. Détermination de la quantité de substrat hydrolysé par l'ECA purifiée de poumon de lapin en fonction du temps d'incubation. A) BK, B) *rHP* et C) *hlsHP*.

L'hydrolyse des substrats fut analysée par HPLC à phase inverse. Les expériences furent réalisées en triplicata.

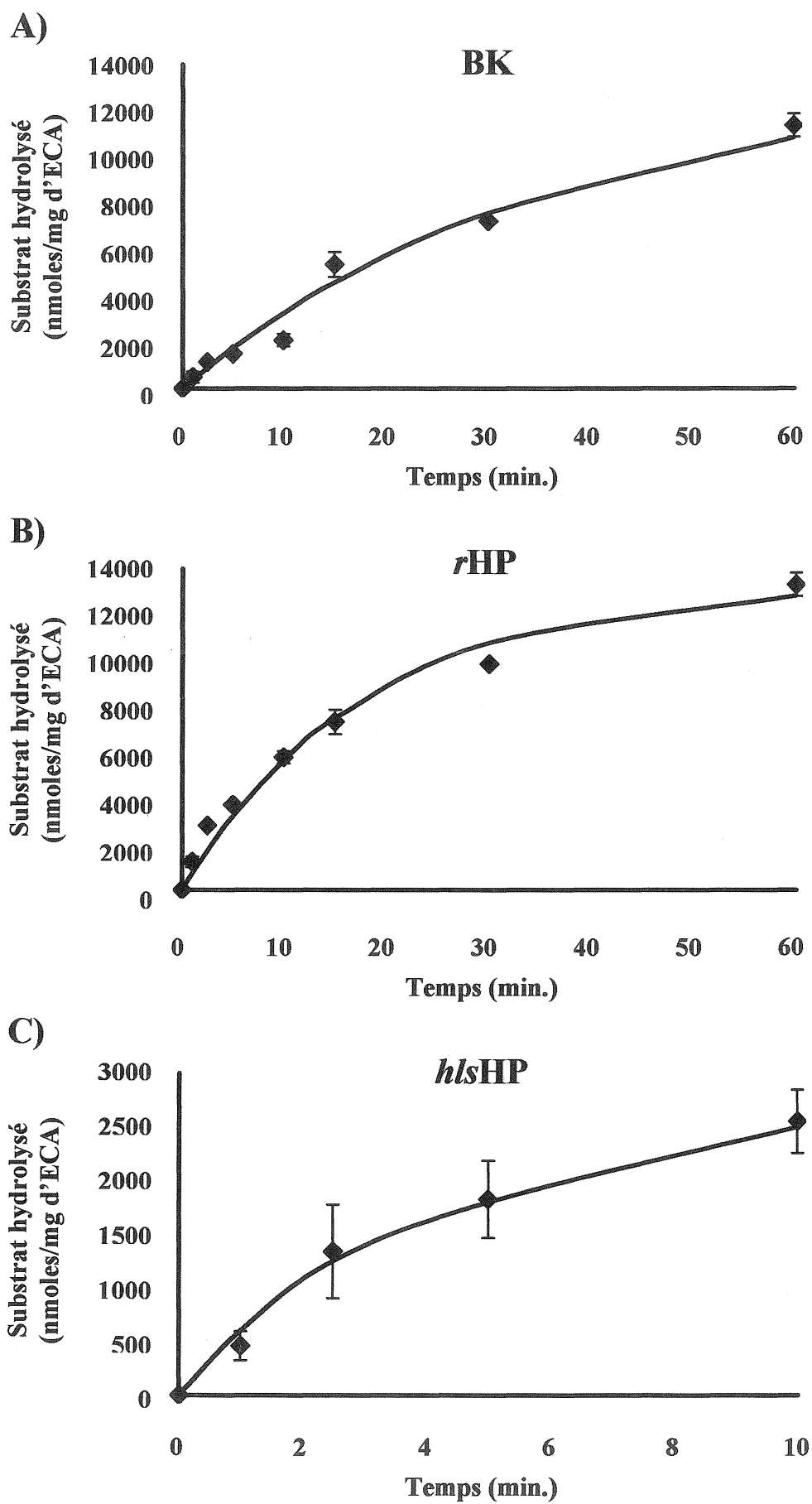


Tableau II

Vitesses initiales de l'hydrolyse de la BK, la *r*HP et la *hls*HP par l'ECA purifiée de poumon de lapin.

Substrat	Vitesse initiale (nmoles/mg d'ECA/min)	R ²
BK	465,2 ± 8,7	0,998
<i>r</i> HP	1142,0 ± 25,4 ^{***}	0,998
<i>hls</i> HP	525,6 ± 18,5	0,995

Note : les valeurs sont présentées sous forme vitesse initiale ± erreur standard. ^{***} p < 0,001 versus BK. n = 3.

12. ESSAIS *IN VIVO*

12.1. Effets hémodynamiques de l'hémopressine et de la bradykinine

La BK et les deux isoformes de l'HP induisent une hypotension transitoire de courte durée. La figure 17 représente les tracés typiques des effets hypotenseurs de la BK (0,1 nmole/kg) et la rHP (100 nmoles/kg) suite à leur administration par voie i.v. ou i.a. chez le lapin anesthésié.

12.2. Activité biologique de l'hémopressine dans divers modèles animaux

Une même série d'expériences a été réalisée chez le lapin, le rat et la souris au cours desquelles les effets hypotenseurs de la BK (1 nmole/kg) et de la rHP (1-10-100 nmoles/kg) injectées par voie i.v. ou i.a. ont été mesurés (fig. 18). Pour la BK, nous n'avons pas dépasser la dose de 1 nmole/kg car, en plus grande quantité, elle pouvait être létale pour les animaux étudiés.

Une fois de plus, ces deux peptides entraînent une baisse de pression transitoire de courte durée, et ce dans tous les modèles animaux étudiés. Sur une base équimolaire, par contre, les réponses à la rHP étaient beaucoup plus faibles (10-200 fois) que les réponses à la BK.

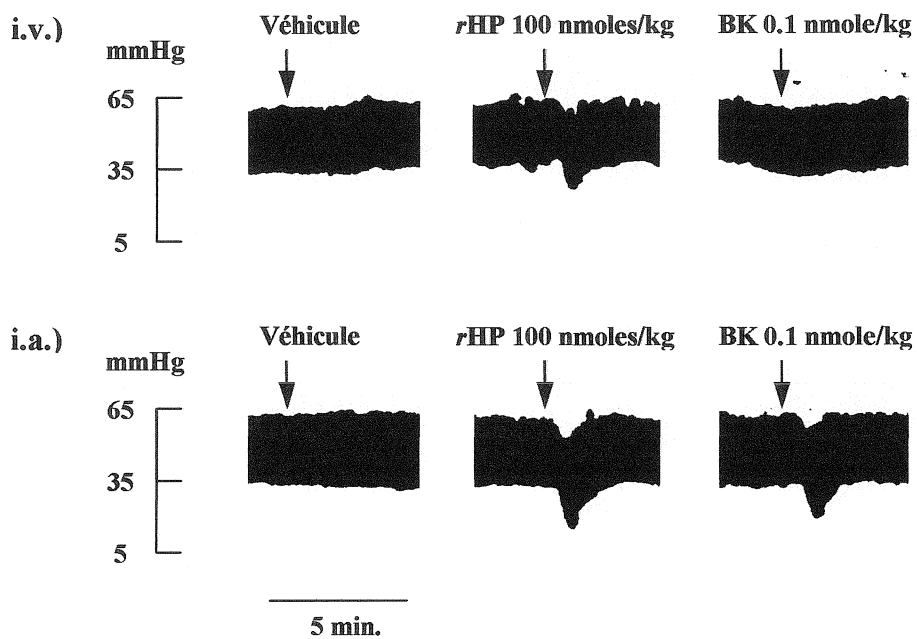
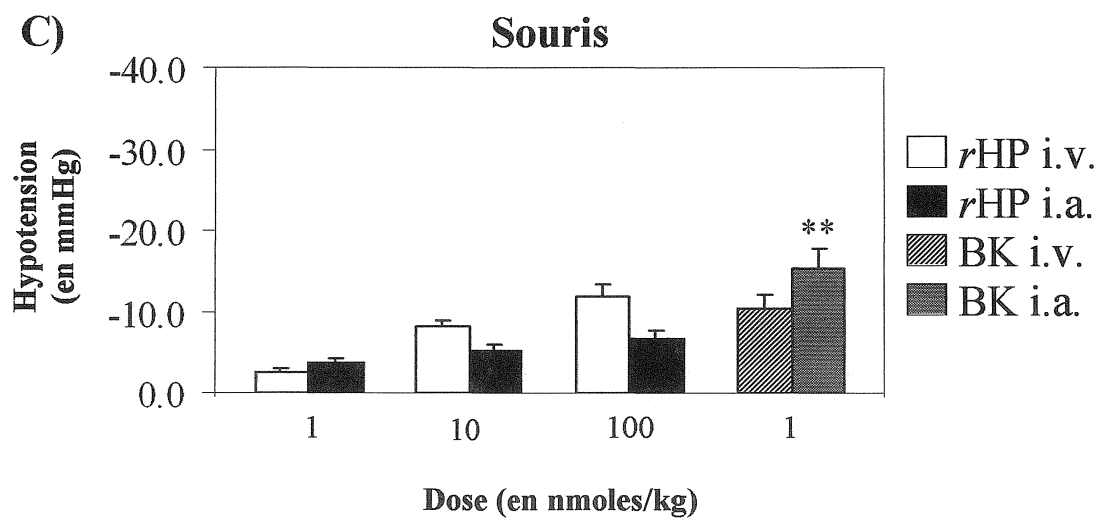
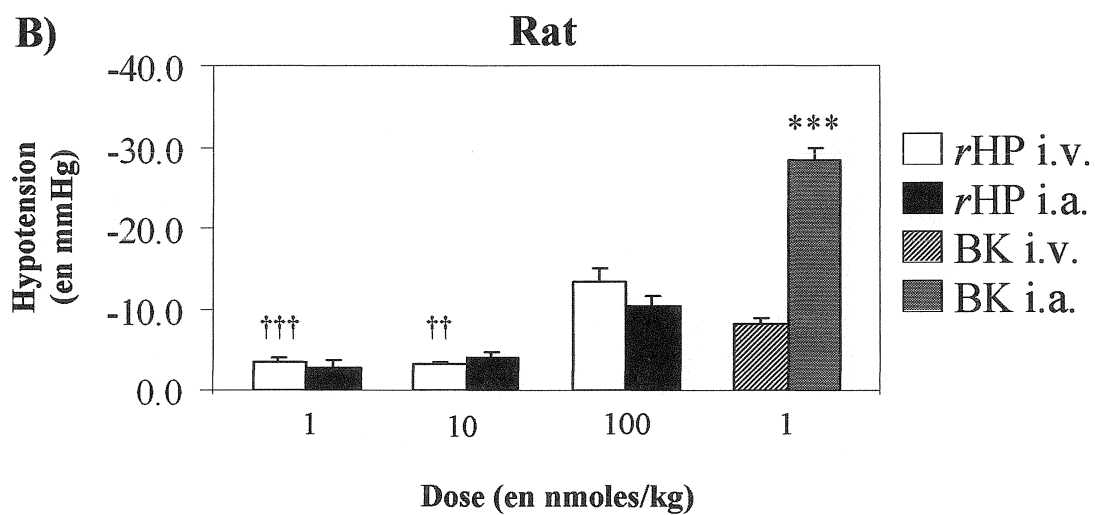
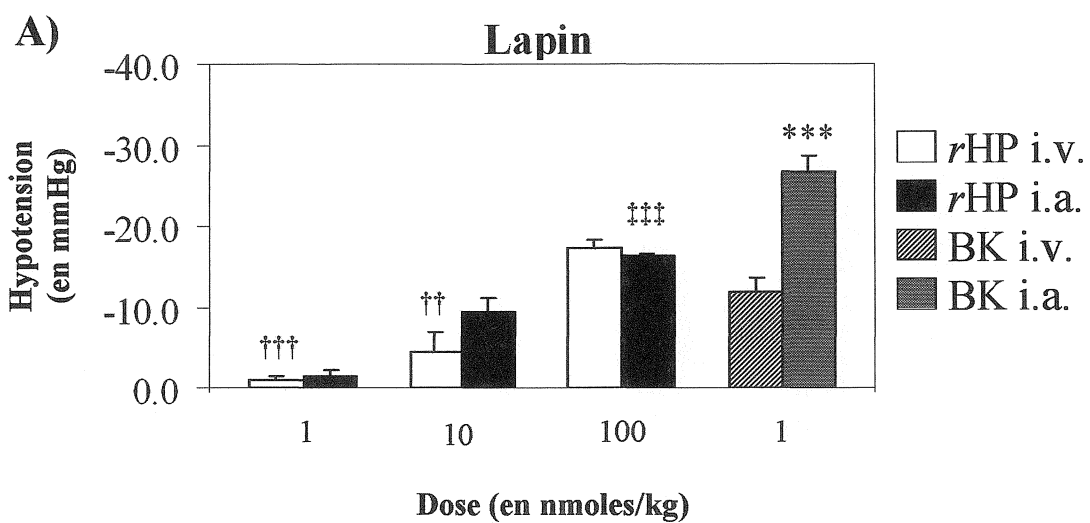


Figure 17. Tracés typiques des effets hypotenseurs de la BK et rHP suite à leur injection par voie intraveineuse (i.v.) et intra-artérielle (i.a.) chez le lapin anesthésié. Des doses de 100 nmoles/kg pour l'rHP et de 0.1 nmole/kg pour la BK furent utilisées. Abscisse: temps (min). Ordonnée: Pression artérielle (mmHg). L'administration des composés est représentée par les flèches. Les résultats sont représentatifs de 5 à 10 expériences.

Figure 18. Effets hypotenseurs de la BK et la rHP administrées par voie intraveineuse (i.v.) ou intra-artérielle (i.a.) chez diverses espèces animales. A) lapin, B) rat et C) souris anesthésiés. n = 5 à 9 expériences différentes. . †† p < 0.01 et ††† p < 0.001 versus rHP 100 i.v. ††† p < 0.001 versus rHP 1 i.a. ** p < 0.01 et * p < 0.001 versus BK i.v.**



12.3. Inactivation cardiaque/pulmonaire des peptides

Comme prévu, l'effet hypotenseur de la BK administrée par voie i.v. est plus faible que celui engendré par une même dose administrée par voie i.a (fig. 17). Cela sous-entend la présence d'un mécanisme d'inactivation cardiaque/pulmonaire auquel la BK est susceptible. En revanche, l'hypotension produite par l'injection de la rHP ne présente aucune différence en fonction de la voie d'administration (voir tableau III). Le mécanisme d'inactivation cardiaque/pulmonaire est présent dans tous les modèles animaux étudiés tel que démontré par une baisse significative ($P < 0,001$ chez le lapin et le rat et $P < 0,01$ chez la souris) de la réponse à la BK injectée par voie i.v. par rapport à l'injection d'une même dose par voie i.a (fig. 18). Contrairement à la BK, la rHP n'est pas susceptible au mécanisme d'inactivation, quel que soit le modèle animal à l'étude.

12.4. Activité biologique du métabolite de la rHP, généré par l'ECA, chez le lapin

Nous savons qu'il existe un mécanisme d'inactivation cardiaque/pulmonaire chez le lapin et que ce dernier est imputable à l'activité de l'ECA présente à la surface des cellules endothéliales de ces deux organes. Nous savons également que l'ECA peut dégrader la rHP, *in vitro*, mais que ce phénomène ne se reflète pas *in vivo*. Par conséquent, nous avons synthétisé et testé *in vivo* le produit de l'hydrolyse de la rHP par l'ECA, à savoir le fragment 1 à 7 de rHP (PVNFKFL). Nous voulions vérifier si le peptide conservait son activité biologique après avoir été dégradé par l'ECA. Malgré les fortes doses utilisées (100 et 1000 nmoles/kg), l'injection i.a. du métabolite ne parvint pas à produire d'effets hypotenseurs ($n = 3$).

12.5. Effets de divers traitements sur la réponse à *r*HP chez le lapin

Les effets des traitements avec le captopril, le LPS et le HOE 140 sur la réponse à la BK (0,1 nmole/kg) et à la *r*HP (100 nmoles/kg) chez le lapin sont présentés au tableau III. Nous constatons que, contrairement à la BK, la *r*HP est non seulement insensible à l'inactivation cardiaque/pulmonaire, mais que l'administration de captopril (100 µg/kg) i.v. ne parvient pas à potentialiser l'effet hypotenseur de ce dernier.

L'injection de HOE 140 (500 nmoles/kg), un antagoniste sélectif du récepteur B₂ des kinines, avant l'administration i.a. de *r*HP n'inhibe pas la réponse hypotensive à ce peptide. La réponse à la BK, au contraire, est complètement supprimée par un tel traitement.

Finalement, on note une potentialisation (2 à 2,6 ×) de l'effet de *r*HP chez les lapins traités au LPS comparativement aux animaux contrôles ($P < 0,001$). De plus, ce traitement semble également potentialiser (2,8 ×) l'effet hypotenseur de la BK injectée par voie i.v. ($P < 0,01$) sans influencer la réponse à une même injection i.a. de BK.

Tableau IIIEffets de divers traitements sur la réponse à *r*HP et BK chez le lapin anesthésié.

Voie d'administration	Hypotension (en mmHg) engendrée par :	
	<i>r</i> HP 100 nmoles/kg	BK 0,1 nmoles/kg
Intraveineuse (i.v.)		
Contrôle	-3,7 ± 0,2	-4,0 ± 0,5
+ Captopril (100 µg/kg i.v.)	-5,7 ± 1,1	-22,4 ± 2,3 ***
+ LPS (50 µg/kg i.v.)	-9,8 ± 1,9 †††	-11,2 ± 2,5 **
+ LPS et Captopril	-7,8 ± 1,4	-20,1 ± 3,7
Intra artérielle (i.a.)		
Contrôle	-3,9 ± 0,4	-23,6 ± 2,1 ***
+ HOE 140 (500 nmoles/kg i.v.)	-5,1 ± 0,7	-1,3 ± 0,4 †††
+ LPS (50 µg/kg i.v.)	-10,5 ± 1,1 †††	-22,4 ± 1,4 **

Note: Les valeurs de la réponse hypotensive correspondent à la moyenne ± E.S. de 3-12 expériences indépendantes. ††† p < 0,001 versus *r*HP contrôle. *** p < 0,001 versus BK i.v. contrôle. ** p < 0,01 versus BK i.v. contrôle. ††† p < 0,001 versus BK i.a. contrôle.

12.6. Activité biologique des isoformes de l'HP chez le rat et le lapin

L'étude comparative de l'activité biologique des différentes isoformes de l'HP étudiées chez le lapin et le rat (fig. 19) ne produisit pas de résultats statistiquement significatifs. Cependant, il semble que les différences entre ces deux isoformes puissent produire une réponse hypotensive plus importante dans l'animal auxquels elles se rattachent. Ainsi, les effets hypotenseurs de la *rHP* étaient trois fois plus grands que ceux de *hlsHP* lorsque ces deux composés étaient administrés chez le rat. Inversement, la *hlsHP* engendrait une réponse trois fois plus forte que la *rHP* quand les deux isoformes étaient administrées à des lapins. D'autres expériences sont à prévoir sur un plus grand nombre d'animaux afin de déterminer si le seuil de significativité statistique ($p < 0,05$) entre les activités biologiques des deux isoformes de l'HP testées peut être atteint.

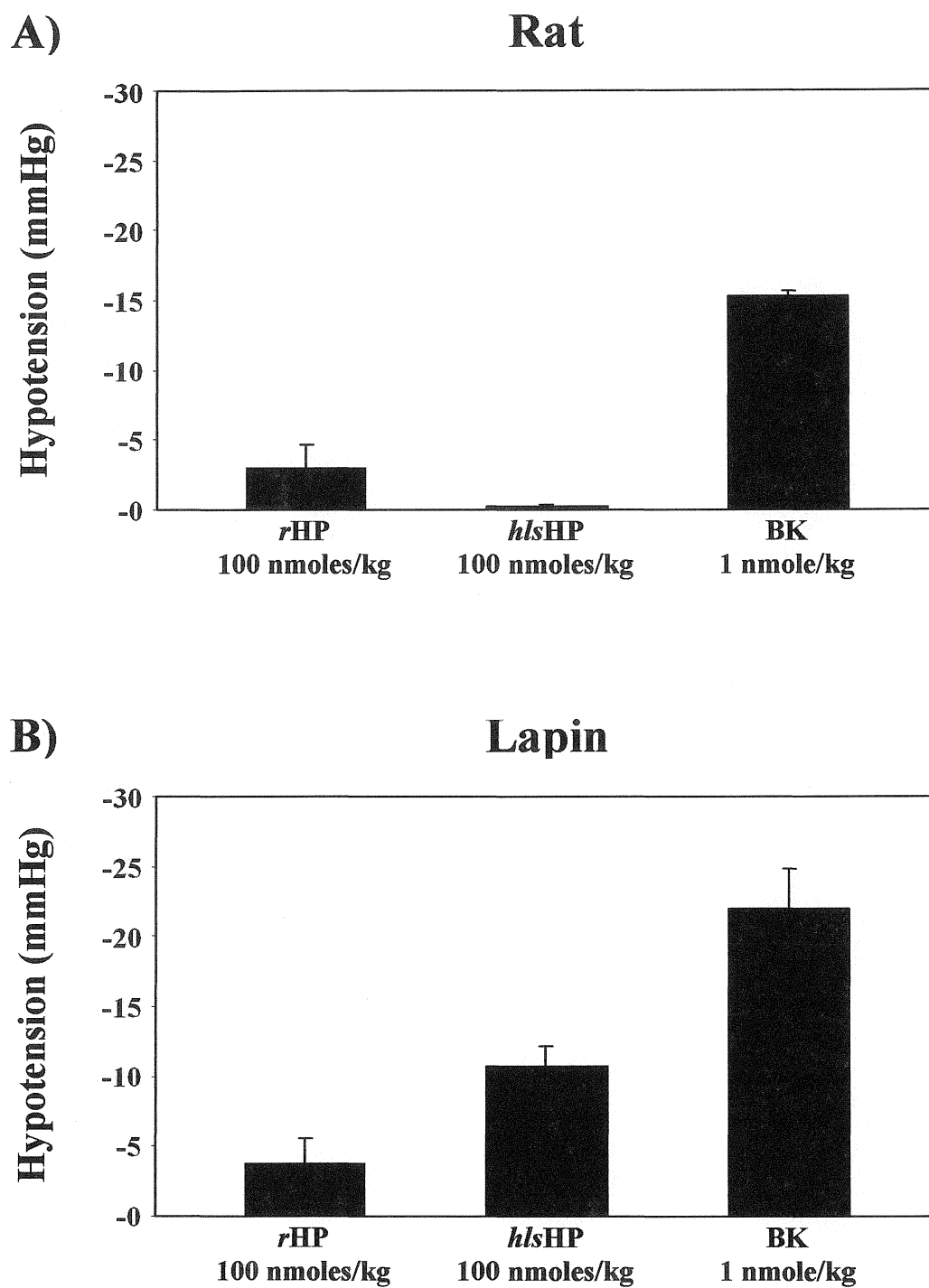


Figure 19. Effets hypotenseurs de la *rHP*, la *hlsHP* et la BK administrées par voie i.v. chez A) le rat et B) le lapin. n = 3.

DISCUSSION

Cette étude apporte de nouveaux arguments en faveur d'un rôle de l'hémoglobine plus grand que celui de simple transporteur d'oxygène et de dioxyde de carbone. De nombreuses études tendent à le démontrer. BRANTL *et al.* (1986) furent parmi les premiers à observer que le traitement de l'hémoglobine bovine avec des protéases entraînait la formation de peptides ayant une activité semblable à celle des opiacés. Ce n'est qu'au début des années 1990 que GLÄMSTA *et al.* (1991 ; 1992 ; 1993) confirmèrent la présence endogène de ces composés chez l'homme. On donna le nom d'hémorphines à ces peptides issus de la dégradation des chaînes β et δ de l'hémoglobine. Finalement, le groupe d'IVANOV *et al.* (1997) postula que l'hémoglobine servirait également de source à divers peptides endogènes biologiquement actifs. Les travaux de ce groupe mirent à jour une pléthore de nouveaux peptides couvrant pratiquement l'entière séquence des chaînes α et β de l'hémoglobine. Plusieurs de ces peptides nouvellement découverts présentaient des activités biologiques distinctes. Selon ces auteurs, l'hémoglobine subirait une première hydrolyse par des protéases entraînant la formation de fragments de 30-60 acides aminés. Ces fragments seraient ensuite hydrolysés soit par des protéases, soit par des carboxy- et aminopeptidases pour former une multitude de peptides (IVANOV *et al.*, 1997). Nous croyons que l'hémopressine est libérée de l' α -hémoglobine par ce même processus. Cependant, les connaissances reliées aux enzymes impliquées dans la formation des peptides dérivés de l'hémoglobine sont encore très limitées. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de pouvoir les identifier clairement.

Grâce à la synthèse en phase solide de type « à débit continu » et à la stratégie Fmoc, il a été possible de synthétiser la BK, les isoformes de l'HP et le métabolite rHP(1-7) sans problèmes. À partir de 0,5 g de résine Tentagel S PHB-His(Trt)-Fmoc substituée à 0,19 méq/g et en utilisant quatre fois plus d'acides aminés pour le couplage, nous avons obtenu environ 70 mg de peptide purifié par synthèse.

L'étude *in vitro* de la dégradation des isoformes de l'HP par l'ECA a permis d'établir, qu'à l'instar de la BK, elles sont toutes deux hydrolysées par l'ECA de poumon de lapin. L'hydrolyse de la rHP par l'ECA entraîne la formation du fragment rHP(1-7), et si on prolonge le temps d'incubation on voit également apparaître le fragment rHP(1-5). Nous avons observé le même phénomène avec la BK, confirmant ainsi les résultats rapportés à mainte reprise dans la littérature (DORER *et al.*, 1974 ; SOFFER *et al.*, 1974 ; JASPARD *et al.*, 1993). Ceci est en accord avec l'activité dipeptidyle carboxypeptidase rapportée pour l'ECA (JASPARD *et al.*, 1993). L'ajout de 1 μ M de captopril au tampon de digestion inhibe complètement la dégradation des trois peptides par l'ECA. En comparant les vitesses auxquelles ces substrats sont métabolisés par l'ECA, on remarque que la rHP est hydrolysée beaucoup plus rapidement que les deux autres peptides. Cette différence dans le métabolisme pourrait s'expliquer par le fait que le site de clivage de la rHP est plus hydrophobe que celui de la BK. Les travaux de FERNANDEZ *et al.* (2004) ont démontré que la liaison du substrat aux sites catalytiques de l'ECA dépend des interactions hydrophobes et du réseau de ponts hydrogène des acides aminés situés de part et d'autre du site de clivage du substrat.

Dans la première série d'expériences réalisées chez le lapin, nous avons utilisé un anesthésiant composé d'un mélange de kétamine et de xylazine. Bien que ce dernier réduise de façon considérable la pression artérielle moyenne de base chez le lapin (voir tableau IV), nous avons tout de même été en mesure d'observer des hypotensions significatives suite à l'injection de la BK et la *rHP* dans cette espèce animale. Des mesures ont été prises afin de minimiser l'impact de l'anesthésiant sur notre étude. Une dose de maintien de kétamine/xylazine était administrée à toutes les 30 min et suivant cette administration, nous attendions que la PAM se stabilise avant d'injecter les composés. Le pentobarbital a un effet moins marqué que le mélange kétamine/xylazine sur les paramètres hémodynamiques comme en témoignent les valeurs du tableau IV. Les données des paramètres hémodynamiques des lapins anesthésiés au pentobarbital, traités ou non avec le LPS, sont très semblables à celles des animaux éveillés et non-traités. Cependant, l'administration des doses de maintien du pentobarbital produisait une hypotension transitoire. Nous avons donc attendu que la PAM revienne à sa valeur de base avant de procéder à l'administration des composés étudiés.

L'analyse comparative des réponses à la BK et aux isoformes de l'HP *in vivo* a démontré que, conformément aux observations de RIOLI *et al.* (2003), la BK et *rHP* sont des agents hypotenseurs et l'intensité des réponses ainsi engendrées dépend de la dose du produit administré. Parallèlement, la *hlsHP* (l'isoforme qu'on retrouve à la fois chez le lapin, la souris et l'homme) entraîne également une hypotension chez le lapin. Cependant, chez le rat, nous avons observé que l'hypotension induite par la *rHP* est beaucoup plus faible que ce qui avait initialement été rapporté par l'équipe de RIOLI *et*

al. (2003). Sur une base équimolaire, l'injection par voie i.v. de *rHP* produisait une réponse hypotensive 10 fois moins forte que celle de la BK et cette différence atteignait un facteur de 200 lorsqu'on comparait les injections de ces mêmes composés par voie i.a. La faible activité de l'HP suggère que ce peptide ne jouerait pas un rôle substantiel dans la régulation de la pression sanguine. Cependant, nous ne devons pas rejeter trop hâtivement l'hypothèse de RIOLI *et al.* (2003). Prenons le cas des hémorphines : leurs affinités pour le récepteur μ des opiacés est de l'ordre du μM , 1000 fois plus faible que celle de la β -endorphine (ZADINA *et al.*, 1997). Cependant, les niveaux plasmatiques d'hémorphine-7, par exemple, sont 1000 fois plus élevés que ceux de la β -endorphine (NYBERG *et al.*, 1997). Ces taux plasmatiques élevés compensent probablement pour la faible affinité des hémorphines sur le récepteur μ des opiacés. En ce qui concerne l'HP, nous serons en mesure d'évaluer l'impact de ce peptide seulement lorsque nous connaîtrons ses taux plasmatiques.

Puisque le groupe de RIOLI *et al.* (2003) tirait des conclusions plutôt larges à partir d'observations réalisées sur un seul modèle animal (le rat), nous avons testé la réponse à la *rHP* sur différentes espèces, à savoir la souris, un rongeur, et le lapin, qui appartient à l'ordre des lagomorphes. En plus de produire une hypotension chez le rat, l'injection i.v. et i.a. de *rHP* provoqua également une hypotension transitoire de courte durée chez le lapin et la souris. Il semblerait donc que ce système peptidergique ne soit pas exclusif aux rongeurs puisqu'on le retrouve également chez le lapin. Le système, présent chez un ancêtre commun, pourrait avoir été conservé au cours de l'évolution des lagomorphes et des rongeurs.

Nous avons ensuite comparé l'efficacité des deux isoformes de l'HP à induire une hypotension chez leur espèce animale respective ainsi que chez l'autre espèce. Cela nous a permis de déterminer si la différence entre les deux isoformes était suffisamment importante pour permettre une spécificité de la *rHP* pour son espèce. Puisque la *rHP* semble produire une réponse hypotensive plus importante chez le rat, il y aurait donc une certaine spécificité de l'isoforme de l'HP en fonction de l'espèce.

Contrairement à ce qui a été rapporté par le groupe de RIOLI *et al.* (2003), nous avons été incapable de mettre en évidence un mécanisme d'inactivation cardiaque/pulmonaire de la *rHP* par l'ECA, quel que soit le modèle animal étudié, alors qu'il était indubitablement présent et actif comme en témoignent les résultats des expériences obtenues avec la BK. La BK est plus active lorsque administrée par voie i.a. plutôt que i.v. (court-circuitement du mécanisme d'inactivation cardiaque/pulmonaire) et elle est également plus active lors de son administration i.v. suivant un traitement au captopril une demie heure plus tôt (inhibition de l'ECA cardiaque et pulmonaire). Cette différence entre le métabolisme de la *rHP in vitro* et *in vivo* aurait pu être due à une équivalence de l'activité biologique de la *rHP* et de son métabolite *rHP(1-7)*. Cette hypothèse était basée sur l'observation de divers systèmes peptidergiques de récepteurs couplés aux protéines G (ex. neurokinines, kinines, peptides opioïdes, nociceptine, angiotensine et CGRP) pour lesquels l'hydrolyse du peptide biologiquement actif par des peptidases peut entraîner la formation de fragments ayant conservé une activité biologique semblable ou différente de celle du peptide initial (HALLBERG *et al.*, 2003). Cependant, comparativement à la *rHP*, *rHP(1-7)* ne produit pas de réponse, *in vivo*, à des doses de 100 et 1000 nmoles/kg.

L'absence d'un métabolisme de l'HP par les peptidases pulmonaires est semblable à ce qui est observé pour l'angiotensine II (VANE, 1968) : il est probable que l'HP soit inactivé dans les lits capillaires périphériques plutôt qu'au niveau du poumon. Il se pourrait aussi que l'HP interagisse avec des protéines plasmatiques *in vivo*, lui conférant une certaine résistance à la dégradation par l'ECA endothéliale. LINEHAN *et al.* (1989) ont observé que le tripeptide synthétique [³H]benzoyl-phenylalanyl-alanyl-proline (BPAP), un substrat de l'ECA, pouvait se lier à l'albumine plasmatique et ainsi échapper partiellement à la dégradation cardiaque/pulmonaire. L'angiotensine II peut, elle aussi, se lier à plusieurs protéines plasmatiques, dont la γ -globuline et l' α 2-macroglobuline (EGGENA *et al.*, 1973), ce qui la protège probablement d'un éventuel métabolisme pulmonaire. Il est toutefois possible que la rHP agisse à la fois de façon directe au niveau de la micro-circulation artérielle et indirecte via des médiateurs, tels le NO et le PGI₂, relâchés par les cellules endothéliales de la micro-circulation pulmonaire. Cela contribuerait à l'effet périphérique global, i.e. une diminution de la résistance périphérique vasculaire. Ce phénomène a déjà été observé pour les kinines par LAMONTAGNE *et al.* (1996). Ceci n'exclut en rien la possibilité qu'une fraction de rHP soit métabolisée par l'ECA cardiaque/pulmonaire. Quant à l'effet de potentialisation de l'énalapril rapporté par l'équipe de RIOLI *et al.* (2003), il est probable qu'il provienne d'une inhibition non-spécifique de plusieurs peptidases par l'énalapril. Les inhibiteurs des peptidases sont habituellement spécifiques à une concentration donnée (généralement faible) et plus on augmente leur concentration, plus on court le risque d'inhiber d'autres peptidases. SKIDGEL (1992) observa que des inhibiteurs de l'ECA pouvaient inhiber d'autres peptidases de façon non-spécifique. La forte dose d'énalapril, 2 mg/kg (i.v.),

utilisée par l'équipe de RIOLI *et al.* (2003) pourrait donner de la crédibilité à cette hypothèse.

L'injection i.v. de HOE 140 2,5 min avant l'administration de *rHP* ne parvint pas à inhiber l'effet hypotenseur de ce peptide. Puisque cet antagoniste est spécifique pour le récepteur B₂ des kinines (WIRTH *et al.*, 1991), nous pouvons en déduire que la réponse à *rHP* ne passe pas par la production endogène et la relâche intravasculaire de BK, laquelle agirait via son récepteur de type B₂. Le traitement des lapins avec le LPS s'avéra efficace pour potentialiser la réponse à la *rHP*. La réponse obtenue était environ deux à trois fois plus forte chez les animaux traités avec le LPS que chez les lapins non-traités. La réponse aux injections i.v. de BK était également potentialisée par le traitement au LPS. *A priori*, on pourrait croire que la potentialisation de la BK par le LPS pouvait être expliquée par le fait que le LPS avait induit l'expression du récepteur B₁ des kinines (REGOLI *et al.*, 1981 ; DONALDSON *et al.*, 1997). Normalement, la conversion de la BK en DBK (un agoniste du récepteur B₁), sous l'action des carboxypeptidases M et N, met un terme à l'effet de la BK sur le récepteur B₂ des kinines et lorsque le récepteur B₁ est exprimé, l'effet de la BK peut dépendre de sa conversion en DBK (HALL, 1992). Cette hypothèse a été écartée puisqu'il aurait fallu que les injections i.a. de BK soient également potentialisées, ce qui n'était pas le cas. Il semblerait donc que le dit mécanisme d'inactivation cardiaque/pulmonaire soit modulé à la baisse suite au traitement avec le LPS. Or SAJONMAA *et al.* (2001b) ont établi que l'expression de l'ECA était modulée à la baisse par l'IL-1 β et le TNF- α , deux cytokines connues pour jouer un rôle au niveau de la septicémie (CAILLE *et al.*, 2004). Qui plus est, certains

produits générés par la COX-2, l'isoforme inductible de la COX, seraient également des modulateurs négatifs de l'expression de l'ECA (SAIJONMAA *et al.*, 2001a). Il se pourrait également que l'augmentation de la production de NO suite à l'induction de la iNOS inhibe directement l'ECA (ACKERMANN *et al.*, 1998) en nitrosylant des résidus cystéine et tyrosine via la formation de peroxy-nitrite.

Puisque la rHP est insensible au mécanisme d'inactivation cardiaque/pulmonaire, la modulation de l'expression de l'ECA ne peut expliquer la potentialisation de ses effets hypotenseurs par le traitement avec le LPS. Il est probable que ce phénomène de potentialisation par le LPS soit la résultante de l'induction du récepteur de la rHP, à l'instar du récepteur B₁ des kinines (MARCEAU *et al.*, 1998). La potentialisation pourrait également être causée par l'induction de la COX-2. L'activation de la PLA₂ suite à l'interaction d'un récepteur couplé aux protéines G avec son ligand entraîne la libération d'acide arachidonique (BROWN & ROBERTS, 2001) qui peut ensuite servir à la synthèse de prostaglandines via la COX-1 et -2 (SIMMONS *et al.*, 2004). Or il a été démontré que la COX-2 était induite suite à un traitement au LPS (LIU *et al.*, 1996). Si cette enzyme est également impliquée dans la cascade de signalisation du récepteur à HP, on peut croire que l'induction de la COX-2, et donc l'augmentation de la quantité de COX présente, engendrerait une synthèse plus importante de PGI₂. Celui-ci est connu pour être le prostanoloïde majeur sécrété par les cellules endothéliales et l'interaction avec son récepteur à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires entraîne une vasodilatation (SIMMONS *et al.*, 2004). Qui plus est, on a remarqué que le NO potentialisait la production de prostaglandines dans les cellules exprimant la COX-2 et la

iNOS de façon concomitante. Ce phénomène a été constaté dans plusieurs cultures cellulaires et modèles *in vivo* (GOODWIN *et al.*, 1999). Cette production accrue de PGI₂ pourrait expliquer pourquoi il y a potentialisation de la réponse à l'HP. L'induction de l'expression de ces protéines pourrait également expliquer la grande divergence entre la puissance des effets hypotenseurs rapportée par RIOLI *et al.* (2003) et celle observée dans la présente étude. Il est possible que les animaux utilisés par ce groupe aient été préalablement sensibilisés par un agent pathogène avant d'être utilisés.

Récemment, DALE *et al.* (2005) ont remarqué que, chez des rats rendus hyperalgésiques par des injections sous-cutanées de carraghénine ou de bradykinine, un traitement avec de l'rHP pouvait prévenir le phénomène d'hyperalgésie. Ceci nous rappelle les hémorphines, des peptides aux actions pléiotropiques provenant également de l'hémoglobine ; ces derniers produisent l'analgésie (BRANTL *et al.*, 1986) et une chute de la tension artérielle (LIEBMAN *et al.* 1989). Ainsi, le rôle principal de l'HP n'est peut-être pas de moduler la pression sanguine, mais plutôt de diminuer la douleur, tel que proposé par DALE *et al.* (2005).

CONCLUSION

Les données présentées dans ce mémoire nous permettent de tirer les conclusions suivantes : 1) L'HP est un agent hypotenseur ; cet effet a été observé dans les trois espèces animales étudiées. Nous avons démontré la faiblesse de l'effet hypotenseur de l'HP en comparaison à celui de la BK. L'impossibilité de reproduire les forts effets hypotenseurs observés par RIOLI *et al.* (2003) chez le rat demeure sans explication. Deux isoformes de l'HP ont été identifiées et testées ; celles-ci semblent montrer des activités biologiques supérieures chez les espèces animales desquelles elles originent. 2) *In vitro*, sous l'effet de l'ECA, l'HP est métabolisée en des fragments inactifs (HP 1-7, HP 1-5), du moins en ce qui concerne l'effet hypotenseur. Cependant, *in vivo*, il n'y a pas de preuves d'un tel métabolisme comme le démontre la comparaison des effets hypotenseurs du peptide administré par voie i.a. et i.v. (comparaison tenant compte de la circulation pulmonaire qui est déterminante pour la dégradation des peptides) chez les trois espèces animales étudiées. De plus, le traitement avec le captopril chez le lapin ne parvient pas à potentialiser les effets de la rHP injectée par voie i.v., contrairement à ce qui est observé avec la BK. 3) La réponse à l'HP ne passe pas par l'activation du récepteur B₂ des kinines, mais elle est potentialisée par le LPS, suggérant que des éléments fonctionnels du système de l'HP sont induits et/ou sensibilisés par cette toxine bactérienne. L'HP pourrait donc avoir un rôle à jouer dans les conditions où l'on retrouve une hémolyse importante associée à une libération de médiateurs pro-inflammatoires. De telles conditions se retrouvent, entre autres, dans certaines maladies infectieuses, dont la septicémie, ainsi que la malaria, les brûlures graves et certains types d'envenimation (JENG & GLADER, 2004).

PERSPECTIVES

Cette étude ne répond seulement qu'à quelques questions à propos des rôles potentiels que pourrait jouer l'HP en physiologie cardiovasculaire ; nous sommes loin d'avoir fait le tour de la question. Il faudrait notamment mesurer les taux plasmatiques de l'HP en conditions normale et pathologique (i.e. lors de septicémie) afin de déterminer s'ils sont suffisamment importants pour moduler la pression sanguine. La détection et la quantification de l'HP pourraient être réalisées à l'aide d'anticorps dirigés contre ce peptide. En utilisant la forme radiomarkée de l'HP, il serait possible de suivre la dégradation de ce peptide *in vivo* en analysant par HPLC des échantillons de sang prélevés à intervalles réguliers. Le séquençage des fractions radioactives nous fournirait sans doute un peu plus d'information sur les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'HP. La mise au point de préparations pharmacologiques vasculaires répondant à l'HP serait déterminante pour identifier et caractériser le récepteur de l'HP. De plus, afin de mieux comprendre le mécanisme d'action par lequel HP diminue la pression sanguine, il serait intéressant d'étudier les seconds messagers tels le NO, les prostaglandines et l'EDHF pouvant être libérés à partir de l'endothélium sous l'effet de l'HP. Ceci pourrait être réalisé grâce à des inhibiteurs commercialement disponibles (ex. : indométacine, L-NAME, etc.).

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier le Dr Domenico Regoli et le Dr Fernand Gobeil jr, mes directeurs de maîtrise, ainsi que le Dr Witold Neugebauer, pour m'avoir encadré et épaulé tout au long de mes recherches. Je les remercie pour la confiance qu'ils m'ont témoignée ainsi que pour la latitude dont ils ont fait preuve à l'égard de mes recherches. Les connaissances et le savoir faire qu'ils m'ont transmis sont pour moi autant de richesses pour lesquels je leur suis éternellement reconnaissant. Je tiens aussi à remercier Dre Danielle Jacques et Dr Robert Day pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Je remercie les Drs Guylain Boulay, Alain Cadieux, Pedro D'Orléans-Juste, Gaétan Guillemette, Klaus Klarskow et Pierre Lavigne pour leurs conseils, leur aide technique ou pour m'avoir permis d'utiliser certains de leurs appareils, ce qui m'a aidé à avancer dans mes recherches et ainsi contribuer à la réussite de ce travail.

Je souhaiterais également remercier Pierrette Perreault et Marie-Reine Lefebvre pour avoir partagé leurs connaissances en chimie et en synthèse peptidique avec moi ainsi que pour tous les services qu'elles m'ont rendus.

Je remercie particulièrement les autres membres du laboratoire : Martin Boussougou, Jérôme Côté, Audrey Fortier, Gabrielle Gendron, Stéphanie Hallée, Annie Larouche, Josée Morin, Stéphan Perron et Leng Hong Pheng avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. Merci aussi à tous mes amis et collègues qui, de quelque façon que ce soit, ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- ACKERMANN, A., FERNÁNDEZ-ALFONSO, M.S., SANCHEZ DE ROJAS, R., ORTEGA, T., PAUL, M., GONZÁLEZ, C. (1998). Modulation of angiotensin-converting enzyme by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* **124** : 291-298.
- ANDERSON, K.P., CROYLE, M.L. et LINGREL, J.B. (1989). Primary structure of a gene encoding rat T-kininogen. *Gene* **81** : 119-128.
- BASCANDS, J.-L. et GIROLAMI, J.-P. (1996). La bradykinine. *médecine / sciences* **12** : 582-592.
- BHoola, K.D., FIGUEROA, C.D. et WORTHY, K. (1992). Bioregulation of kinins : kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.* **44** : 1-80.
- BRANTL, V., GRAMSCH, C., LOTTSPREICH, F., MERTZ, R., JAEGER, K.H., HERZ, A. (1986). Novel opioid peptides derived from hemoglobin: hemorphins. *Eur. J. Pharmacol.* **125** : 309-310.
- BROWN, N.J. et ROBERTS, J. II. Histamine, bradykinin, and their antagonists. Dans J. G. Hardman, L. E. Limbird, A. Goodman Gilman (Éds) : *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. McGraw-Hill, N.Y. (2001) Pp. 645-667.

- BRUS, I. et LEWIS, S.M. (1959). The haptoglobin content of serum in haemolytic anaemia. *Br. J. Haematol.* **5** : 348-355.
- BURCH, R.M. et AXELROD, J. (1987). Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts : evidence for G protein regulation of phospholipase A₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84** : 6374-6378.
- BUTZ, G.M. et DAVISSON, R.L. (2001). Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice : a physiological genomics tool. *Physiol. Genomics* **5** : 89-97.
- CAILLE, V., BOSSI, P., GRIMALDI, D., VIELLARD-BARON, A. (2004). Physiopathologie du sepsis sévère. *Presse Med.* **33** : 256-261.
- DALE, S.C., DE LIMA PAGANO, R., RIOLI, V., HYSLOP, S., GIORGI, R., SNAVINHO FERRO, E. (2005). Antinociceptive action of hemopressin in experimental hyperalgesia. *Peptides* **26** : 431-436.
- DONALDSON, L.F., HANLEY, M.R. et VILLABLANCA, A.C. (1997). Inducible receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **18** : 171-181
- DORER, F.E., KAHN, J.R., LENTZ, K.E., LEVINE, M., SKEGGS, L.T. (1974). Hydrolysis of bradykinin by angiotensin-converting enzyme. *Circ. Res.* **34** : 824-827.

DUMOULIN, M.J., ADAM, A., BLAIS, C. Jr, LAMONTAGNE, D. (1998). Metabolism of bradykinin by the rat coronary vascular bed. *Cardiovasc. Res.* **38** : 229-236.

EGGENA, P., BARRET, J.D. et WIEDEMAN, C.E. (1973). Isolation of angiotensin II binding proteins from normal human plasma by affinity chromatography. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **37** : 588-?.

ERDÖS, E.G. et SKIDGEL, R.A. (1987). The angiotensin I-converting enzyme. *Lab. Invest.* **56** : 345-348.

FLYNN, J.T. (1978). Endotoxic shock in the rabbit: the effects of prostaglandin and arachidonic acid administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **206** : 555-566.

GARCIA, J.G. (1992). Molecular mechanisms of thrombin-induced human and bovine endothelial cell activation. *J. Lab. Clin. Med.* **120** : 513-519.

GLADER, B. Destruction of erythrocytes. Dans J. Greer et al. (Eds) : *Wintrobe's clinical hematology* Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2004a) Pp.249-266.

GLADER, B. Hemolytic anemias due to enzyme disorders. Dans J. Greer et al. (Eds) : *Wintrobe's clinical hematology* Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2004b) Pp.1115-1140.

GLÄMSTA, E.-L., MARKLUND, A., HELLMAN, U., WERNSTEDT, C., TERENIUS, L., NYBERG, F. (1991). Isolation and characterization of a hemoglobin-derived opioid peptide from the human pituitary gland. *Regul. Pept.* **34** : 169-179.

GLÄMSTA, E.-L., MEYERSON, B., SILBERRING, J., TERENIUS, L., NYBERG, F. (1992). Isolation of a hemoglobin-derived opioid peptide from cerebrospinal fluid of patients with cerebrovascular bleedings. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184** : 1060-1066.

GLÄMSTA, E.-L., MORKRID, L., LANTZ, I., NYBERG, F. (1993). Concomitant increase in blood plasma levels of immunoreactive hemorphin-7 and beta-endorphin following long distance running. *Regul. Pept.* **49** : 9-18.

GOBEIL, F., FILTEAU, C., PHENG, L.H., JUKIC, D., NGUYEN-LE, X.K., REGOLI, D. (1996). In vitro and in vivo characterization of bradykinin B₂ receptors in the rabbit and the guinea pig. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **74** : 137-144.

GOBEIL, F. Jr (1998). Caractérisation pharmacologique du récepteur B₁ humain des kinines et de ses antagonistes. Thèse de doctorat, département de pharmacologie, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

- GOBEIL, F., CHARLAND, S., FILTEAU, C., PERRON, S.I., NEUGEBAUER, W., REGOLI, D. (1999). Kinin B₁ receptor antagonists containing α -methyl-L-Phenylalanine : in vitro and in vivo antagonistic activities. *Hypertension* **33** : 823-829.
- GOODWIN, D.C., LANDINO, L.M. et MARNETT, L.J. (1999). Effects of nitric oxide and nitric oxide-derived species on prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin biosynthesis. *FASEB J.* **13** : 1121–1136.
- HALL, J.M. (1992). Bradykinin receptors : pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.* **56** : 131-190.
- HALLBERG, M., et NYBERG, F. (2003). Neuropeptide conversion to bioactive fragments – an important pathway in neuromodulation. *Curr. Protein Pept. Sci.* **4** : 31-44.
- HARMENING, D.M., HUGHES, V.C. et DEL TORO, C. The red blood cell : structure and function. Dans Denise Harmening (Éd.) : *Clinical hematology and fundamentals of hemostasis*. F.A. Davis, Philadelphia (2002). Pp. 58-73.
- HIGA, Y., OSHIRO, S., KINO, K., TSUNOO, H., NAKAJIMA, H. (1981). Catabolism of globin-haptoglobin in liver cells after intravenous administration of hemoglobin-haptoglobin to rats. *J. Biol. Chem.* **256** : 12322-12328.

- JASPARD, E., WEI, L. et ALHENC-GELAS, F. (1993). Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). *J. Biol. Chem.* **268** : 9496-9503.
- JENG, M.R. et GLADER, B. Acquired nonimmune hemolytic disorders. Dans J. Greer et al. (Eds) : *Wintrobe's clinical hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2004) Pp.1223-1246.
- KINO, K., TSUNOO, H., HIGA, Y., TAKAMI, M., HAMAGUCHI, H., NAKAJIMA, H. (1980). Hemoglobin-haptoglobin receptor in rat liver plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **255** : 9616-9620.
- KISSELEV, A.F., AKOPIAN, T.N., WOO, K.M., GOLDBERG, A.L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J. Biol. Chem.* **274** : 3363-3371.
- LAMONTAGNE, D., NAKHOSTINE, N., COUTURE, R., NADEAU, R. (1996). Mechanisms of kinin B₁ receptor-induced hypotension in the anesthetized dog. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **28** : 645-650.
- LAZURE, C., SEIDAH, N.G., PELAPRAT, D., CHRETIEN, M. (1983). Proteases and posttranslational processing of prohormones: a review. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **61** : 501-515.

LEE, D.L., LEITE, R., FLEMING, C., POLLOCK, J.S.; WEBB, R.C., BRANDS, M.W. (2004). Hypertensive response to acute stress is attenuated in interleukin-6 knockout mice. *Hypertension* **44** : 259-263.

LEEB-LUNDBERG, F.L.M., MARCEAU, F., MÜLLER-ESTERL, W., PETTIBONE, D.J., ZURAW, B.L. (2005). International Union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol. Rev.* **57** : 27-77.

LIEBMANN, C., SCHRADER, U. et BRANTL, V. (1989). Opioid receptor affinities of the blood-derived tetrapeptides hemorphin and cytochrophin. *Eur. J. Pharmacol.* **166** : 523-526.

LINEHAN, J.H., DAWSON, C.A., BONGARD, R.D., BRONIKOWSKI, T.A., ROERIG, D.L. (1989). Plasma protein binding and endothelial enzyme interactions in the lung. *J. Appl. Physiol.* **66** : 2617-2628.

LINZ, W., WIEMER, G., GOHLKE, P., UNGER, T., SCHOLKENS, B.A. (1995). Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol. Rev.* **47** : 25-49.

LIU, S.F., NEWTON, R., EVANS, T.W., BARNES P.J. (1996). Differential regulation of cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 gene expression by lipopolysaccharide treatment *in vivo* in the rat. *Clin. Sci.* **90** : 301-306.

- MALIK, A.B., LYNCH, J.J. et COOPER, J.A. (1989). Endothelial barrier function. *J. Invest. Dermatol.* **93**(2 Suppl.) : 62S-67S.
- MARANO, G., GRIGIONI, M., TIBURZI, F., VERGARI, A., ZANGHI, F. (1996). Effects of isoflurane on cardiovascular system and symathovagal balance in New Zealand white rabbits. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **28** : 513-518.
- MARCEAU, F. (1995). Kinin B₁ receptors : a review. *Immunopharmacology* **30** : 1-26.
- MARCEAU, F., HESS, J.F. et BACHVAROV, D.R. (1998). The B₁ receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* **50** : 357-386.
- MATHIS, S.A., CRISCIMAGNA, N.L. et LEEB-LUNDBERG, F.L.M. (1996). B₁ and B₂ kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* **50** : 128-139.
- MATTHEWS, W., TANAKA, K., DRISCOLL, J., ICHIHARA, A., GOLDBERG, A.L. (1989). Involvement of the proteasome in various degradative processes in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86** : 2597-2601.
- McGIFF, J.C., CARROL, M.A. et ESCALENTE, B. (1991). Arachidonate metabolites and kinins in blood pressure regulation. *Hypertension* **18** (suppl. III) : III-150 – III-157.

MENTZER, W.C. et GLADER, B. Hereditary spherocytosis and other anemias due to abnormalities of the red cell membrane. Dans J. Greer et al. (Eds) : Wintrobe's clinical hematology Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2004) Pp.1089-1114.

MÜLLER-ESTERL, W. (1989). Kininogens, kinins and kinships. *Thromb. Haemost.* **61** : 2-6.

NATANSON, C., HOFFMAN, W.D., SUFFREDINI, A.F., EICHACKER, P.Q., DANNER, R.L., (1994). Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann. Intern. Med.* **120** : 771-783.

NEFF, A.T. Autoimmune hemolytic anemias. Dans J. Greer et al. (Eds) : Wintrobe's clinical hematology Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2004) Pp. 1157-1182.

NORMAN, M.U., REEVE, S.B., DIVE, V., SMITH, A.I., LEW, R.A. (2003). Endopeptidases 3.4.24.15 and 24.16 in endothelial cells : potential role in vasoactive peptide metabolism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284** : H1978–H1984.

NOYES, W.D. ET GARBY L. (1967). Rate of haptoglobin in synthesis in normal man. Determinations by the return to normal levels following hemoglobin infusion. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **20** : 33-38.

NYBERG, F., SANDERSON, K. et GLAMSTA, E.L. (1997). The hemorphins: a new class of opioid peptides derived from the blood protein hemoglobin. *Biopolymers*. **43** : 147-156.

OHYAGI, Y., YAMADA, T. et GOTO, I. (1994). Hemoglobin as a novel protein developmentally regulated in neurons. *Brain Res*. **635** : 323-327.

ORLOWSKI, M. et WILK, S. (2000). Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch. Biochem. Biophys*. **383** : 1-16.

PALSSON-MCDERMOTT, E.M. et O'NEILL, L.A. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* **113** : 153-162.

PERKINS, S.L. Appendix A : normal blood and bone marrow values in humans. Dans J. Greer et al. (Eds) : *Wintrobe's clinical hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2004) Pp. 2697-2706.

REGOLI, D. et BARABÉ, J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev*. **32** : 1-46.

REGOLI, D., MARCEAU, F. et LAVIGNE, J. (1981). Induction of B₁-receptors for kinins in the rabbit by bacterial lipopolysaccharide. *Eur. J. Pharmacol*. **71** : 105-115.

REGOLI, D., NSA ALLOGHO, S., RIZZI, A., GOBEIL, F. Jr (1998). Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* **348** : 1-10.

RIOLI, V., GOZZO, F.C., HEIMANN, A.S., LINARDI, A., KRIEGER, J.E., SHIDA, C.S., ALMEIDA, P.C., HYSLOP, S. EBERLIN, M.N. (2003). Novel natural peptide substrate for endopeptidase 24.15, neurolysin, and angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **278** : 8547-8555.

RIOLI, V., KATO, A., PORTARO, F.C.V., CURY, G.K., TE KAAT, K., VINCENT, B., CHECLER, F., CAMARGO, A.C.M., GLUCKSMAN, M.J., ROBERTS, J.L., HIROSE, S., FERRO, E.S. (1998). Neuropeptide specificity and inhibition of recombinant isoforms of the endopeptidase 3.4.24.16 family : comparison with the related recombinant endopeptidase 3.4.24.15. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **250** : 5-11.

RYAN, J. (1982). Processing of the endogenous polypeptides by the lungs. *Annu. Rev. Physiol.* **44** : 241-255.

SAIJONMAA, O., NYMAN, T., KOSONEN, R., FYHRQUIST, F. (2001a). Upregulation of angiotensin-converting enzyme by vascular endothelial growth factor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **280** : H885–H891.

- SAIJONMAA, O., NYMANA T. et FYHRQUIST F. (2001b). Downregulation of angiotensin-converting enzyme by tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in cultured human endothelial cells. *J. Vasc. Res.* **38** : 370–378.
- SEIDAH, N.G., PAQUIN, J., HAMELIN, J., BENJANNET, S., CHRETIEN, M. (1988). Structural and immunological homology of human and porcine pituitary and plasma IRCM-serine protease 1 to plasma kallikrein: marked selectivity for pairs of basic residues suggests a widespread role in pro-hormone and pro-enzyme processing. *Biochimie* **70** : 33-46.
- SIMMONS, D.L., BOTTING, R.M. et HLA, T. (2004). Cyclooxygenase isozymes : the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* **56** : 387–437.
- SKIDGEL, R.A. (1992). Bradykinin-degrading enzymes : structure, function, distribution, and potential roles in cardiovascular pharmacology. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **20** (suppl. 9) : S4 – S9.
- SOFFER, R.L., REZA, R. et CALDWELL, P.R. (1974). Angiotensin-converting enzyme from rabbit pulmonary particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71** : 1720-1724.
- TAKAGAKI, Y., KITAMURA, N. et NAKANISHI, S. (1985) Cloning and sequence analysis of cDNAs for human high molecular weight and low molecular weight prekininogens. Primary structures of two human prekininogens. *J. Biol. Chem.* **260** : 8601-8609.

TELEN, M.J. et KAUFMAN, R.E. The mature erythrocyte. Dans J. Greer et al. (Eds) :
Wintrobe's clinical hematology Vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins,
Philadelphia (2004) Pp. 217-248.

ULTMANN, J.E. et GORDON, C.S. (1965). Life span and sites of sequestration of
normal erythrocytes in normal and splenectomized mice and rats. *Acta Haematol.* **33** :
118-126.

VANE, J.R. (1968). The release and fate of vaso-active hormones in the circulation. *Br.*
J. Pharmacol. **35** : 209-242.

WIRTH, K., HOCK, F.J., ALBUS, U., LINZ, A.W., ALPERMANN, H.G.,
ANAGNOSTOPOULOS, H., HENKE, S., BREIPHOL, G., KÖNIG, W., KNOLLE,
J., SCHÖLKENS, B.A. (1991). Hoe 140 a new potent long acting bradykinin
antagonist : *in vivo* studies. *Br. J. Pharmacol.* **102** : 774-777.

WOLKOW, P.P. (1998). Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock.
Inflammation Res. **47** : 152-166.

ZADINA, J.E., HACKLER, L., GE, L.-J., KASTIN, A.J. (1997). A potent and selective
endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature* **386** : 499-502.

ZHANG, W.-N., MURPHY, C.A., FELDON, J. (2004). Behavioural and cardiovascular responses during latent inhibition of conditioned fear: measurement by telemetry and conditioned freezing. *Behav. Brain Res.* **154** : 199–209.