

Université de Sherbrooke

**Caractérisation d'analogues des kinines comme agents perméabilisant la barrière
hémato-encéphalique dans un modèle expérimental de cancer du cerveau**

par

Jérôme Côté

Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en sciences des radiations et
imagerie biomédicale

Sherbrooke, Québec, Canada

Janvier 2013

Membres du jury d'évaluation

Brigitte Guérin, Présidente du jury, Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Martin Lepage, Co-directeur, Sciences des radiations et imagerie biomédicale

David Fortin, Co-directeur, Département de Chirurgie

Fernand Gobeil jr, Co-directeur, Département de Pharmacologie

Pedro d'Orleans-Juste, Département de Pharmacologie

Elvire Vaucher, École d'Optométrie, Université de Montréal

© Jérôme Côté 2013



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-96327-2

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-96327-2

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.

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

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

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

Canada

RÉSUMÉ

Caractérisation d'analogues des kinines comme agents perméabilisant la barrière hémato-encéphalique dans un modèle expérimental de cancer du cerveau

par

Jérôme Côté

Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en Sciences des radiations et imagerie biomédicale, Université de Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La barrière hémato-encéphalique (BHE) représente un obstacle physiologique à l'acheminement de molécules thérapeutiques dans le traitement des tumeurs cérébrales. Une approche afin de faciliter le transport au-delà de la BHE implique l'activation des récepteurs des kinines. Notre objectif était de caractériser la perméabilisation pharmacologique de la BHE avec des analogues synthétiques stables des récepteurs B1 et B2 des kinines (rB1 et rB2) chez le rat Fischer implanté d'un gliome F98. Pour ce faire, une série de peptides agonistes a été développée et synthétisée dans nos laboratoires. Les meilleurs candidats ont ensuite été sélectionnés pour leur affinité et activité envers leur récepteur spécifique, ainsi que leur durée d'action et leur résistance au métabolisme enzymatique. Nous avons ensuite caractérisé l'expression du rB1 et du rB2 dans notre modèle animal. Les deux sous-types de récepteurs ont été détectés sur les cellules tumorales et les cellules endothéliales de la vascularisation tumorale (RT-PCR et immunohistochimie). Nous avons évalué la perméabilité de la BHE avant et après l'infusion (i.a. ou i.v.) des différents agonistes choisis à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) dynamique avec des agents de contraste de différents poids moléculaire (Magnevist™ 0,5 kDa et Gadomer™ 17 kDa). Les images pondérées T_1 ont été analysées pour la présence ou l'absence d'augmentation du contraste à l'intérieur et aux environs de la tumeur et traitées mathématiquement pour obtenir le volume de distribution de l'agent de contraste (CADV). Ces CADV ont ensuite été comparés pour mettre en évidence une perméabilisation vasculaire induite par les agonistes. Nos résultats montrent que les agonistes du rB1 (NG29) et du rB2 (R523) augmentent, de façon dose-dépendante, les CADV du Gd-DTPA et du Gadomer. L'augmentation du CADV induite par le NG29 a été annulée par l'antagoniste sélectif du rB1 R892 et l'inhibiteur des cyclooxygénases méclofénamate, alors que celle induite par le R523 a été annulée par l'antagoniste sélectif du rB2 HOE140 et l'inhibiteur des NO synthases L-NA. Enfin, nous avons évalué l'impact d'une co-stimulation des deux récepteurs sur la perméabilité de la BHE. Cette double activation a été faite soit par co-injection des agonistes rB1 et rB2, ou à l'aide d'un nouvel agoniste rB1/rB2 hétérodimérique, développé dans nos laboratoires. Ces différentes approches ont un effet additif sur la perméabilité de la BHE. L'ensemble de nos résultats soutiennent l'utilisation des agonistes synthétiques des rB1 et rB2 (administrés seuls ou en combinaison) afin d'améliorer l'acheminement de macromolécules thérapeutiques aux tumeurs cérébrales.

Mots clés : Barrière hémato-encéphalique, gliome, imagerie par résonance magnétique, kinines, perméabilité vasculaire.

Pour mon fils Tom Walter

"I'll play with it first and tell you what it is later"

Miles Davis

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES PUBLICATIONS	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
Introduction	1
<i>Chapitre I</i>	2
La barrière hémato-encéphalique	
1.1 Les gliomes : pathologie et traitements actuels	2
1.2 La BHE: historique et caractéristiques	6
1.3 Stratégies pour déjouer la BHE	12
1.3.1 Osmotique	12
1.3.2 Ultra-sons	13
1.3.3 Administration locale	13
1.3.4 Formulation liposomale	14
1.3.5 Pharmacologique	15
<i>Chapitre 2</i>	17
Les kinines	
2.1 Système kalllicréine-kinine	17
2.2. Métabolisme des kinines	18
2.3. Le récepteur B2	22
2.4. Le récepteur B1	23
<i>Chapitre 3</i>	27
Perméabilité vasculaire et imagerie	
3.1 Néovascularisation	27
3.2 L'imagerie par résonance magnétique	29

3.3 L'IRM dynamique rehaussée par un agent de contraste	32
<i>Chapitre 4</i>	35
Hypothèse et objectifs	
4.1 Objectifs du manuscrit 1	35
4.2 Objectifs du manuscrit 2	36
4.3 Objectifs du manuscrit 3	36
4.4 Objectifs du manuscrit 4	37
<i>Chapitre 5</i>	38
Manuscrit 1	
<i>Chapitre 6</i>	65
Manuscrit 2	
<i>Chapitre 7</i>	95
Manuscrit 3	
<i>Chapitre 8</i>	140
Manuscrit 4	
<i>Chapitre 9</i>	157
Discussion	
9.1 Manuscrit 1	157
9.2. Manuscrit 2	163
9.3. Manuscrit 3	173
9.4. Manuscrit 4	179
9.5. Perspectives et conclusion	182
BIBLIOGRAPHIE	188
ANNEXE 1	213
ANNEXE 2	222
ANNEXE 3	228

LISTE DES PUBLICATIONS

Pour cette thèse* :

- Côté J, Savard M, Bovenzi V, Bélanger S, Morin J, Neugebauer W, Larouche A, Dubuc C, Gobeil F Jr. (2009)** Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles. *Peptides* **30(8)**:788-795.
- Côté J, Savard M, Bovenzi V, Dubuc C, Tremblay L, Tsanaclis AM, Fortin D, Lepage M, Gobeil F Jr. (2010)** Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe⁸ψ(CH₂NH)Arg⁹]-BK in a F98 glioma rat model: a MRI study. *Neuropeptides* **44**:177-185.
- Côté J, Bovenzi V, Savard M, Dubuc C, Fortier A, Neugebauer W, Tremblay L, Müller-Esterl W, Tsanaclis AM, Lepage M, Fortin D, Gobeil F Jr. (2012)** Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model. *PLOS ONE* **7(5)**: 1-17.
- Côté J, Savard M, Neugebauer W, Fortin D, Lepage M, Gobeil F Jr. (2013)** Dual kinin B1 and B2 receptor activation provides enhanced blood-brain barrier permeability and anticancer drug delivery to brain tumors. Soumis à *Cancer Biology and Therapy*.

* Les autres publications et communications de l'auteur se retrouvent à l'annexe 3.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Principaux agonistes et antagonistes peptidiques des kinines

p. 21

LISTE DES FIGURES

Figure I - Représentation schématique de la croissance typique d'un GBM	p. 4
Figure II - Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique	p. 9
Figure III - Métabolisme des kinines par diverses peptidases	p. 20
Figure IV - Procédures d'IRM	p. 32
Figure V - CADV calculés à partir des images obtenues sur un rat porteur d'un gliome, avec injection de Gd-DTPA ou de Gadomer à la 3e image	p. 167
Figure VI – Effet perméabilisant de l'agoniste du récepteur B2 R523 sur les vaisseaux sanguins périphériques	p. 171
Figure VII - Mesure directe de la concentration de Gd-DTPA et de carboplatin par ICP-MS dans un modèle de tumeur prostatique LnCAP	p. 176

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC : *ATP binding cassette*
Ang : Angiotensine
Am : Aminopeptidase
BHE: Barrière hémato-encéphalique
BK : Bradykinine
CADV : Volume de distribution de l'agent de contraste
CED : *Convection-enhanced delivery*
CPM : Carboxypeptidase M
CPN : Carboxypeptidase N
DAG: Diacylglycérol
DBK : desArg⁹-BK
DCE-MRI : IRM dynamique rehaussée par un agent de contraste
ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine
EGF : Facteur de croissance épithélial
EPN : Endopeptidase neutre
eNOS: NO synthase endothélial
GABA : Acide γ -aminobutyrique
GBM : Glioblastome multiforme
Gd-DTPA: Acide diéthylènetriamine penta-acétique de gadolinium
GPCR : Récepteur couplé aux protéines G
GRK : Kinase de GPCR
HK : Kininogène de Haut Poids Moléculaire
i.a. : Intra-artériel
i.v. : Intraveineux
Il: Interleukine
iNOS : NO synthase inductible
IP₃: Inositol 1,4,5-triphosphate
IRM : Imagerie par résonance magnétique
JAK : *Janus-associated kinase*
JAM : *Junctional adhesion molecule*
KD : Kallidine
Kp : Kallibréine plasmatique
Kt : Kallibréine tissulaire
LDBK : Lys-desArg⁹-BK
LK : Kininogène de Bas Poids Moléculaire
LCR : Liquide céphalo-rachidien
LPS: Lipopolysaccharide (E. Coli)
MRgFUS : *Magnetic resonance guided focused ultra-sound*
NF- κ B : Facteur nucléaire kappa-B

NO : Monoxyde d'azote
OMS : Organisation mondiale de la santé
PAM : Pression artérielle moyenne
PG : Prostaglandine
P-gp : Glycoprotéine-P
PHG : Phénylglycine
PI: Phosphatidylinositol
PKC : Protéine kinase C
PLA₂ : Phospholipase A₂
PLC : Phospholipase C
rB1 : Récepteur B1 des kinines
rB2 : Récepteur B2 des kinines
RMN : Résonance magnétique nucléaire
RMP-7 : *Receptor-mediated permeability*
ROS: Espèces réactives de l'oxygène
RT : Radiothérapie
SNC : Système nerveux central
SKK : Système Kallicréine-Kinine
STAT : *Signal transducers and activators of transcription*
TE : Temps d'écho
TMZ : Temozolomide
TR : Temps de répétition
VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Introduction

Cette thèse est le fruit d'une étroite et rare collaboration entre trois disciplines phares en recherche à la faculté de médecine de l'Université de Sherbrooke : la pharmacologie, l'oncologie et l'imagerie médicale. Trois directeurs de recherche exerçant leur profession dans une de ces disciplines sont d'ailleurs réunis pour superviser ce projet : Fernand Gobeil jr du département de pharmacologie (IPS: Institut de pharmacologie de Sherbrooke; CIMS: Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke); David Fortin, neuro-oncologue au département de chirurgie (CNS: Centre des neurosciences de Sherbrooke); et Martin Lepage, spécialiste en imagerie par résonance magnétique au département de médecine nucléaire et radiobiologie (CNS et CIMS). L'auteur de cette thèse a choisi de dédier un chapitre d'introduction à chacune de ces disciplines, qui vont cohabiter par la suite dans les quatre articles scientifiques présentés. Le chapitre premier traitera des gliomes et de la barrière hémato-encéphalique, le chapitre second, des kinines, alors que l'imagerie sera discutée dans le troisième.

Chapitre I

La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE) a un rôle primordial à jouer pour l'homéostasie cérébrale. Il n'en reste pas moins que, pour le clinicien qui tente d'éradiquer la tumeur intracrânienne, la BHE représente bel et bien un obstacle de taille, un problème majeur. Dans cette section, nous décrirons les gliomes, la BHE, ainsi que les différentes techniques pour la contourner.

1.1 Les gliomes : pathologie et traitements actuels

Les cellules gliales (du grec *glue* ou colle) forment un tissu cérébral traditionnellement connu pour apporter des nutriments, de l'oxygène et un support mécanique aux neurones, en plus des fonctions immunes et d'élimination des déchets. Elles sont le principal constituant de la neuroglie, d'abord décrite par Rudolf Virchow comme formant le tissu connectif qui lie les éléments nerveux ensemble (Virchow, 1858). Les cellules gliales sont d'étroits partenaires des neurones, puisqu'elles sont en plus impliquées dans des processus complexes tels que la transduction de signal, la plasticité neuronale et la neurotransmission (Parpura et al., 2012). On dénote dans cette famille les astrocytes, les plus abondants, mais aussi les oligodendrocytes et les épendymocytes. Dans le cerveau humain, pour chaque neurone, on dénombre plus ou moins une cellule gliale, et de ces dernières émergent la majorité des lésions intracrâniennes.

Les tumeurs cérébrales peuvent être sommairement décrites comme primaires ou secondaires, les premières émanant directement du système nerveux central (SNC) et les secondes résultant de la migration de cellules d'un autre organe. Les tumeurs primaires, appelées gliomes de par leur origine, sont classées par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) sous quatre grades (I, II, III et IV) et sont nommées en accord avec les cellules gliales auxquelles elles ressemblent le plus, soit astrocytome (astrocyte),

l'oligodendrogliome (oligodendrocyte), l'épendymome (épendymocyte) ou encore, l'oligoastrocytome (type mixte). Le grade I correspond à une lésion bénigne et relativement circonscrite avec une vitesse de prolifération lente. Il inclut l'un des gliomes les plus fréquents chez l'enfant, l'astrocytome pilocytaire. Ces lésions contiennent déjà des altérations génétiques et peuvent en accumuler d'autres, ce qui peut mener à la progression vers un grade plus élevé. Les tumeurs de grade II ont aussi une vitesse de prolifération lente et un haut degré de différenciation cellulaire (non-anaplasique), mais contrairement à l'astrocytome pilocytaire, ce sont des tumeurs qui diffusent à travers le parenchyme sain et ont une plus grande probabilité de progresser vers un stade malin. Le grade III est caractérisé par une forte densité cellulaire et la présence de cellules atypiques (anaplasiques) et mitotiques, auxquelles s'ajoutent, pour le grade IV, davantage de néovascularisation et une zone nécrotique (DeAngelis, 2001; Wen et Kesari, 2008). L'astrocytome de grade IV, aussi appelé glioblastome multiforme (GBM), est la tumeur cérébrale primaire la plus fréquente (50%) (Ohgaki et al., 2007), en plus d'être parmi les tumeurs les plus agressives. La majorité (80-90%) des GBM sont primaires (*de novo*) tandis que la proportion restante provient de la progression d'un astrocytome de plus bas grade (DeAngelis, 2001). Il présente un degré élevé d'hétérogénéité, tant entre les tumeurs avec le même diagnostic qu'entre les cellules appartenant à une même tumeur. Cette hétérogénéité morphologique, cellulaire et moléculaire est probablement causée par une variation des combinaisons de mutations génétiques qui ont eu lieu durant le développement de la lésion. Un autre contributeur à cette hétérogénéité pourrait être l'origine cellulaire du gliome, qui reste à ce jour inconnue (Wen et Kesari, 2008), et qui représente actuellement un point d'intérêt pour de nombreux groupes de recherche. En plus de cette inconnue, s'ajoute celle des événements moléculaires initiateurs de la formation des gliomes ainsi que des déterminants moléculaires de la progression du gliome de bas grade (se développant lentement) au gliome anaplasique de haut grade (se développant rapidement). Nul besoin de convaincre qui que ce soit dans le domaine de la neuro-oncologie que des réponses à ces questions clés permettraient de mieux comprendre la pathologie (contexte neurobiologique) et de développer des stratégies thérapeutiques mieux adaptées.

L'obstacle principal au succès de l'éradication des GBM est sa réapparition à proximité de la zone de résection ou la formation de tumeurs dites satellites (secondaires) dans des zones éloignées du cerveau, tous deux démontrant la nature infiltrante de ces tumeurs. Ce phénotype d'invasion fait en sorte que la tumeur est entremêlée avec le tissu cérébral sain, rendant les contours mal définis (figure I). Typiquement, les routes de dispersion sont les fibres nerveuses myélinisées, le long de la lame basale des vaisseaux sanguins, ou encore, entre la membrane des cellules gliales et la pie-mère (Bellail et al., 2004; Zagzag et al., 2008).

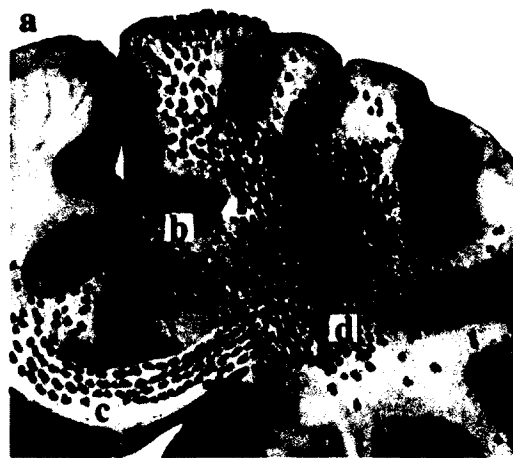


Figure I – Représentation schématique de la croissance typique d'un GBM. (b) Croissance sous-piale de cellules tumorales (en bleu) et satellites péri-neuronales (en vert); (c) migration dans le corps calleux; (d) zone nécrotique (gris foncé) avec palissade de cellules tumorales et prolifération micro-vasculaire (en rouge).

(Reproduit avec permission de Claes et al., 2007)

Le traitement multimodal de première instance préconisé pour un GBM nouvellement diagnostiqué consiste en une chirurgie cytoréductive optimale, suivie de chimio-radiothérapie concomitante et de chimiothérapie adjuvante avec l'agent alkylant temozolomide (TMZ/RT puis TMZ). Il a été démontré que l'ajout rapide du TMZ à la radiothérapie était bénéfique comparé à la radiothérapie seule (Stupp et al., 2005; Stupp et al., 2009), se traduisant par une augmentation de la survie médiane de 12,1 mois à 14,6 mois, et des taux de survie à 2 ans et à 5 ans de 11% vers 27%, et 2% vers 11%

respectivement. Cette faible amélioration est considérée comme une avancée majeure des dernières années, considérant que le pronostic associé aux GBM ne s'est autrement pas amélioré. Dès lors, si cette première phase de traitement s'avère être un échec, d'autres approches thérapeutiques pourront être tentées (p. ex. le traitement PVC (procarbazine, CCNU et vincristine), l'inhibiteur de la topoisomérase I irinotecan, l'anti-VEGF bevacizumab, les nitrosurées CCNU, BCNU et ACNU).

Tel que mentionné précédemment, il est clair que le profil hautement infiltrant des GBM est une limitation thérapeutique majeure. Toutefois, d'autres limitations sont à combattre, d'abord en lien avec l'efficacité de la radiothérapie et de la chimiothérapie. La radiothérapie est le pilier thérapeutique actuel pour les patients atteints d'un GBM. L'utilité des radiations a été clairement établie dès 1979 par le groupe de Walker qui a pu démontrer une survie prolongée lorsqu'un traitement avec des radiations était comparé avec les meilleurs soins de soutien de l'époque (Walker et al., 1979). Cette extension est toutefois modeste, et l'index thérapeutique est relativement petit au SNC. Alors que le type de radiation utilisé n'a pas changé substantiellement depuis des décennies, l'habileté à minimiser les doses de radiations aux tissus environnants s'est quant à elle grandement améliorée. Par conséquent, le temps de survie des patients traités en radiothérapie n'est pas plus long qu'à l'époque, mais les effets indésirables découlant de l'atteinte des tissus sains ont diminué et ainsi, la qualité de vie est augmentée. La résistance des GBM aux radiations est par surcroît problématique. Des avancées dans la compréhension de la génétique de ces tumeurs pourront probablement guider les traitements afin de contrer cette importante limitation.

D'autre part, l'efficacité de la chimiothérapie est limitée par deux facteurs: premièrement, la BHE restreint la pénétration de la majorité des agents thérapeutiques; deuxièmement, dû au génotype instable des GBM, ils sont composés d'une population cellulaire hautement hétérogène qui est souvent caractérisée comme hautement résistante à la chimiothérapie. De plus, des différences régionales à l'intérieur d'une même tumeur, en ce qui concerne l'oxygénation et l'apport en nutriment par exemple, peuvent entraîner une sélection supplémentaire pour la genèse de cellules encore plus résistantes (Brat et

Mapstone, 2003). Dans ce contexte, il a été démontré que seulement 20% à 30% des patients porteurs d'un GBM répondent au traitement de chimiothérapie (Weller et al., 1998). Depuis, bon nombre de nouveaux agents ont été développés afin d'améliorer l'avenir des patients (p. ex. TMZ, l'inhibiteur de la topoisomérase I irinotecan, l'anti-VEGF bevacizumab). Même si de nouvelles molécules thérapeutiques se montrent efficaces, il faut garder en tête que la BHE protège le SNC de ces molécules, et qu'il faut donc trouver un moyen d'en augmenter la distribution à la tumeur (Pardridge, 2002; Calabria et Shusta, 2006). L'efficacité supérieure du TMZ par rapport à d'autres agents de chimiothérapie (p. ex. carboplatin) peut d'ailleurs s'expliquer par sa relativement bonne biodisponibilité au SNC (Patel et al., 2003; Ostermann et al., 2004).

Plusieurs modèles pré-cliniques de tumeurs cérébrales sont disponibles pour l'étude de nouvelles approches thérapeutiques. Toutefois, le modèle syngénique Fischer-F98 (ATCC # CRL-2397) a été retenu pour nos études considérant ses grandes similitudes avec le GBM humain. Parmi celles-ci, notons l'invasion du tissu sain contigu avec de nombreuses tumeurs satellites à différentes distances de la masse tumorale, la plupart formant des grappes cellulaires péri-vasculaires (Mathieu et al., 2007). De plus, la tumeur F98 est caractérisée par un centre nécrotique, une faible immunogénicité en plus d'être réfractaire à bon nombre de modalités thérapeutiques, tel que la chimiothérapie systémique avec le paclitaxel et le carboplatin (von Eckardstein et al., 2005). Notons que le taux de prise d'implant pour ce modèle est de près de 100%, ce qui est non négligeable considérant les coûts associés à l'achat des animaux. Enfin, le choix du modèle F98 a également permis d'écarter certaines faiblesses associées à d'autres modèles, comme par exemple, la croissance circonscrite et la forte immunogénicité des modèles C6 et 9L (Benda et al., 1971).

1.2 La BHE: historique et caractéristiques

Les premières évidences de l'existence de la BHE ont été décrites il y a plus d'un siècle par le récipiendaire du prix Nobel Paul Ehrlich, aujourd'hui considéré comme le père de la chimiothérapie (Ehrlich, 1885). À l'époque, il avait noté qu'une administration

systémique d'un colorant hydrosoluble marquait tous les organes à l'exception du cerveau et de la moelle épinière. Des expériences effectuées par un de ses étudiants ont ensuite confirmé l'existence d'une sorte de barrière entre le SNC et la circulation sanguine. En effet, le bleu trypan injecté directement dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) se trouvait confiné dans le SNC, ne marquant que les cellules du cerveau, sans pénétrer la périphérie (Goldmann, 1913). Le terme barrière hémato-encéphalique (*bluthirnschranke*) a été utilisé pour la première fois par Lewandowsky dans une étude sur la perméabilité vasculaire publiée à la toute fin du XIX^e siècle (Lewandowsky, 1900). Toutefois, c'est seulement vers la fin des années 60 que les premières bases anatomiques de la BHE furent élucidées dans les travaux de Reese, Karnovsky et Brightman (Reese et Karnovsky, 1967; Brightman et Reese, 1969). Bien que le concept de la BHE ait continué de se raffiner au cours des dernières décennies, la compréhension actuelle de sa structure de base est toujours construite à partir de ces travaux.

La fonction première de la BHE est de maintenir un environnement interne contrôlé dans le cerveau en régulant l'accès aux composantes de la circulation sanguine, afin de protéger le SNC contre tout agent potentiellement toxique (à l'image d'un poste frontalier). Elle limite également les fluctuations en nutriments, en hormones et autres constituants sanguins, tout en retirant les métabolites du compartiment cérébral. Originellement caractérisée comme étanche, elle est aujourd'hui décrite comme hautement sélective, jouant un rôle vital dans l'homéostasie du SNC en régulant finement les échanges avec la circulation sanguine (Cecchelli et al., 2007). Ainsi, la BHE a aussi un rôle clé dans les pathologies du SNC, en limitant entre autre l'accès aux agents thérapeutiques. Et même si certains médicaments, rares sont-ils, sont en mesure de traverser la BHE, la plupart seront immédiatement retirés du SNC par des pompes à efflux (Szakacs et al., 2006; Abbott et al., 2006). Parmi ces dernières, notons l'impact majeur de P-glycoprotéine (P-gp), un transporteur à efflux multispécifique membre de la famille ABC (pour ATP binding cassette). La P-gp a d'abord été identifiée dans des cellules tumorales où elle conférerait une résistance multidrogue, et elle est exprimée à la membrane luminale des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Juliano et al., 1976; Cordon-Cardo et al., 1989; Thiébaud et al., 1989). D'autres transporteurs de type ABC sont également exprimés au

niveau des capillaires cérébraux, dont certains membres de la famille MRP (*multidrug resistance protein*). Tout comme P-gp, ces pompes à efflux sont multispécifiques et ATP-dépendante, et peuvent jouer un rôle critique dans la résistance cellulaire à plusieurs agents de chimiothérapie (Glavinas et al., 2004; Szakacs et al., 2006).

Plusieurs types cellulaires participent à la structure et aux fonctions de la BHE, déployant différents mécanismes physiques et métaboliques (Bernacki et al., 2008) en particulier, les cellules endothéliales qui constituent la paroi des vaisseaux sanguins, ainsi que les péricytes et les astrocytes, qui en tapissent l'extérieur (figure II). Les cellules endothéliales du cerveau diffèrent de celles de la périphérie de part le fait qu'en plus des jonctions cellules-cellules classiques, un assemblage complexe de protéines forment des jonctions serrées qui arriment efficacement les membranes cellulaires les unes aux autres, restreignant le transport paracellulaire (Kniesel et Wolburg, 2000). Les protéines transmembranaires identifiées comme principales contributrices aux jonctions serrées sont les occludines (Furuse et al., 1993), les claudines (Furuse et al., 1998) et les JAMs (*junctional adhesion molecules*) (Palmeri et al., 2000) (figure II-C). Ces jonctions serrées font du cerveau une structure pratiquement inatteignable pour des molécules polaires, à moins qu'elles soient transférées d'un côté vers l'autre par un mécanisme de transport spécialisé régulant le micro-environnement cérébral. Ces différents mécanismes de transport sont décrits dans l'excellente revue de Abbott et co-auteurs, et comprennent les transporteurs protéiques (p. ex. pour le glucose, les acides aminés et les nucléotides), la transcytose via un récepteur (insuline et transferrine) et la transcytose absorptive (albumine et autres protéines plasmatiques) (Abbott et al., 2006). Toutefois, aucun transporteur ne prend en charge les molécules exogènes telles que les agents chimiothérapeutiques, si ce n'est des pompes à efflux, qui travaillent à contre-sens tel que discuté précédemment. Anatomiquement, les cellules endothéliales du SNC se distinguent également par un nombre élevé de mitochondries, pointant vers un métabolisme énergétique considérable. Cet excès apparent d'activité métabolique peut être relié à la maintenance du différentiel ionique entre le plasma sanguin et le liquide extra-cellulaire cérébral ou encore la gestion énergétique des caractéristiques structurelles uniques de la BHE (Oldendorf et al., 1977). Enfin, d'autres différences sont notables, telles que l'absence de fenestration

(Fenstermacher et al., 1988) et très peu de transport par pinocytose (Sedlakova et al., 1999), accentuant davantage l'étanchéité de la barrière.

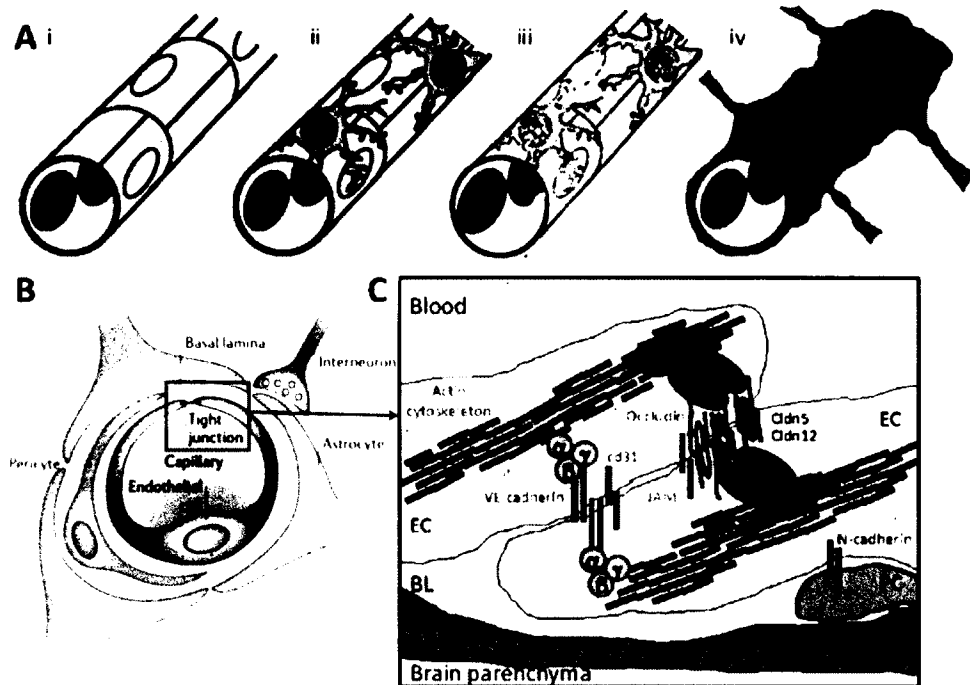


Figure II – Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique. (A) Principaux types cellulaires des capillaires formant la BHE. (i) Cellules endothéliales (EC); (ii) Péricytes (PC); (iii) Membrane basale (BL); (iv) Pieds astrocytaires (AE). (B) Coupe transverse d'un capillaire de la BHE, montrant les astrocytes qui entourent complètement le tube de cellules endothéliales. (C) Représentation schématique des jonctions serrées reliant les cellules endothéliales des capillaires entre elles.

(Adapté avec permissions de Abbott et al., 2006 et de Daneman, 2012)

Les péricytes sont attachés à intervalles irréguliers à la membrane abluminale des cellules endothéliales (Tagami et al., 1990), le tout gainé par la matrice extracellulaire de la lame basale et les projections podocytaires astrocytaires (figure II), qui entourent presque entièrement les vaisseaux sanguins intraparenchymaux (Maynard et al., 1957; Jones, 1970). La contribution particulière de chacune de ces espèces cellulaires dans les fonctions de la BHE est encore aujourd'hui une question ouverte. Selon des données récentes, les

péricytes auraient un rôle important à jouer dans la genèse de la BHE, puisqu'elles seraient les premières cellules recrutées par l'endothélium immature, et ce avant les astrocytes (Daneman et al., 2010). De plus, il a été démontré qu'une déplétion en péricyte cause une augmentation de la perméabilité vasculaire attribuable à la transcytose (Armulik et al., 2010). Les astrocytes auraient quant à eux une implication notable dans l'induction de plusieurs caractéristiques de la BHE, notamment les jonctions serrées, les systèmes enzymatiques, ainsi que l'expression et la localisation des transporteurs (Roux et al., 1994; Hayashi et al., 1997; Abbott, 2002). Récemment, les connaissances en lien avec les interactions endothéliales-astrocytaires se sont raffinées, avec notamment l'étude de la forte densité en pores perméables à l'eau Aquaporin-4 (AQP4) et en canaux potassiques Kir4.1, permettant une fine régulation volumique et ionique. Cette forte densité en AQP4/Kir4.1 corrèle d'ailleurs avec l'accumulation d'agrins, un protéoglycan de la membrane basale. Il apparaît désormais évident que les pieds astrocytaires recouvrant l'ensemble du réseau vasculaire cérébral forment non seulement une barrière physique, mais permettent également un contrôle rapproché des fonctions de la BHE. Enfin, la communication entre les neurones et les cellules endothéliales pourrait réguler non seulement le flot sanguin, mais la perméabilité de la BHE (Lee et al., 1999). Malgré de nombreuses études sur leurs rôles via divers neurotransmetteurs, notamment la noradrénaline (Cohen et al., 1997), la sérotonine (Cohen et al., 1996), et l'acide γ -aminobutyrique (GABA) (Vaucher et al., 2000), davantage de recherche est nécessaire dans ce domaine.

La plupart des agents de chimiothérapie utilisés actuellement dans le traitement des gliomes ne sont pas sélectivement transportés par la BHE saine et ne sont pas non plus en mesure de traverser par diffusion passive à travers les membranes lipidiques des cellules endothéliales. De plus, les quelques molécules qui parviennent à passer sont soit rapidement métabolisées, ou chassées du SNC par les pompes à efflux (Glavinas et al., 2004 ; Chen et al., 2004 ; Loscher et Potschka, 2005 ; Szakàca, 2006). Il en va de même pour les médicaments désignés pour le traitement d'autres pathologies du SNC. Bien entendu, la distribution de ces molécules est vitale, puisqu'aucun médicament ne peut être efficace s'il n'atteint pas d'abord sa cible en quantité suffisante. Certains facteurs sont

déterminants pour la capacité d'une molécule à traverser au delà de la BHE. D'abord, la molécule se doit d'être liposoluble afin de percer la bicouche lipidique des membranes cellulaires endothéliales. Beaucoup de moyens sont d'ailleurs déployés par l'industrie pharmaceutique pour convertir des médicaments hydrosolubles qui ne traversent pas la BHE, en molécules liposolubles qui pourraient la traverser. Autrement, des transporteurs lipidiques sont attachés à des molécules hydrosolubles (Bodor, 1992). Il est possible de prédire l'accessibilité d'une molécule au SNC de par sa propension à former des ponts-H (un nombre de ponts-H supérieurs à 8 est généralement un indicateur d'échec) (Diamond et Wright, 1969; Pardridge et Mietus, 1979). Un autre facteur d'importance est la taille de la molécule. Il est admis qu'une molécule dont le poids moléculaire excède 400 Da ne pourra pas aisément traverser la BHE par diffusion passive (Fischer et al., 1998). Ceci serait dû principalement à la taille très fine des pores formés par la bicouche phospholipidiques de la BHE. C'est donc 98% des agents thérapeutiques à petit poids moléculaire et la totalité de ceux à haut poids moléculaire qui seront exclus du SNC lorsque la BHE est saine et fonctionnelle (Pardridge, 2005, 2007 ; de Boer et Gaillard, 2007). D'excellentes revues de littérature retracent d'ailleurs l'acheminement tissulaire des différents agents antinéoplasiques utilisés en clinique dans le traitement des tumeurs cérébrales primaires et secondaires, et ce, en fonction de leurs différentes caractéristiques moléculaires (Muldoon et al., 2007; Pitz et al., 2011).

Nonobstant ces faits, il est admis que l'intégrité de la BHE est souvent altérée en présence d'une tumeur de haut grade (Rapoport et al., 1972; Bellavance et al., 2008). Les capillaires y sont beaucoup plus perméables que ceux des tissus cérébraux sains. Ceci est dû en partie à l'induction de l'angiogenèse par les gliomes afin de combler leur besoin élevé en oxygène et en nutriments (voir chapitre 3). Ces nouveaux vaisseaux irréguliers, campés dans la région tumorale, sont caractérisés par une fenestration endothéliale, facilitant le passage paracellulaire. À ajouter à cela les différents phénomènes dont la perte de signaux inductifs, la libération de facteurs perméabilisants par les cellules tumorales (p. ex. facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), monoxyde d'azote (NO)), la structure podocytaire astrocytaire déficiente ou encore la répression de l'expression de protéines comme les claudines, essentielles à l'intégrité des jonctions serrées (Liebner et al.,

2000; Wolburg et al., 2003; Lee et al., 2009). Il ne faut toutefois pas croire que les agents antinéoplasiques s'accumulent davantage dans les gliomes en raison de ces quelques caractéristiques. La perméabilité des nouveaux vaisseaux est en effet grandement variable selon la localisation au sein d'une même tumeur, et la rétention des agents dans l'interstitium tumoral est faible (Kratz et al., 2008). De plus, de par le caractère hautement infiltrant de ces lésions, de nombreuses cellules tumorales pourront exister dans le parenchyme sain, à distance du foyer tumoral, tout en étant protégé de la chimiothérapie par une BHE régionalement saine et intacte (Fortin, 2004). Le caractère infiltrant des GBM s'entérine donc comme une contrainte thérapeutique évidente.

1.3 Stratégies pour déjouer la BHE

1.3.1 Osmotique

L'ouverture osmotique transitoire de la BHE peut être effectuée par l'infusion intra-artérielle (i.a.) d'un agent hyperosmolaire, tel que le mannitol (Neuwelt et al., 1979; Neuwelt, 2004). Suite à l'injection du mannitol, une partie de l'eau contenue à l'intérieur des cellules quittera rapidement vers l'extérieur par diffusion (suivant le gradient de concentration), causant un rétrécissement de ces dernières, et ainsi une séparation des jonctions serrées de la BHE (Rapoport, 1970; Rapoport et al., 1971). Plusieurs autres solutions hypertoniques peuvent être utilisés, tel que l'arabinose, la lactamide, l'urée et la saline, mais le mannitol (Osmitrol™ et génériques) demeure le plus couramment utilisé pour perméabiliser la BHE chez l'animal et chez l'humain (Fortin et al., 2007; Blanchette et al., 2009), puisque son utilisation clinique fut approuvée bien avant le développement de cette technique. En effet, le mannitol, de par son effet diurétique, fut d'abord utilisé pour traiter (et prévenir) l'insuffisance rénale aigüe, pour traiter les oedèmes cérébraux et pour stimuler l'excrétion urinaire de substances toxiques (Ostrow et al., 1981; Osman et al., 1984; vanValenberg et al., 1987; Rosenberg et al., 1988). Malgré une efficacité relative démontrée, l'ouverture osmotique de la BHE comporte son lot d'inconvénients (Bellavance et al., 2008). Parmi ceux-ci, notons la nécessité d'anesthésier le patient, les complications reliées à l'installation d'un cathéter intra-artériel, la non-spécificité de l'ouverture de la

BHE, ainsi que certains effets indésirables implicites à la procédure, tels que les convulsions et l'hernie cérébrale causée par l'augmentation de la pression intracrânienne (Doolittle et al., 2000). Ces complications sont rares (incidence inférieure à 5%), mais certaines d'entre elles peuvent être mortelles. Malgré cela, l'ouverture osmotique est considérée sécuritaire et efficace, en plus d'être la seule technique actuellement utilisée en clinique pour favoriser l'acheminement d'agents de chimiothérapie aux gliomes.

1.3.2 Ultra-sons

Rendre la BHE perméable sur une grande surface avec le mannitol peut être dommageable, en partie en raison de la pénétration d'un important volume de liquide au SNC. Afin de prévenir les effets indésirables potentiels, une méthode focalisée menant à une perméabilisation sélective, tout en préservant l'intégrité de la BHE des régions non-ciblées serait souhaitable. Elle consiste en l'application focale d'ultra-sons, guidé par IRM (MRgFUS) (Hynynen et al., 2001; Clement et Hynynen, 2002). Cette technique s'est montrée efficace pour induire une perméabilité vasculaire locale et réversible en moins de 24 heures, sans induire de dommages tissulaires. Toutefois, les ultra-sons sont fortement atténués et déviés par l'os crânien, principalement chez les grands mammifères, rendant la procédure incertaine (Alongi et al., 2011). Cette technique bénéficierait sans doute de la création d'une fenêtre dans l'os avant d'appliquer le traitement, ou encore l'optimisation du type de faisceaux à utiliser (principalement la fréquence des ultra-sons) afin de limiter l'atténuation et la diffusion.

1.3.3 Administration locale

Les traitements habituels pour les gliomes impliquent généralement l'administration d'agents thérapeutiques par voie systémique. De grandes quantités de médicaments sont souvent nécessaires afin d'obtenir une concentration adéquate à la tumeur, ce qui a pour conséquence d'augmenter les risques de toxicité systémique. C'est pourquoi l'administration locale semble un choix évident pour s'assurer que les médicaments sont acheminés au bon endroit. Les principales approches expérimentales en ce sens sont l'implantation de polymères biodégradables préalablement imprégnés d'agents antinéoplasiques (Brem et al.,

1991; Walter et al., 1995), l'utilisation de différents systèmes de cathéters pour l'injection intra-cavitaire post-résection (Mamelak et al., 2006), ainsi que, plus récemment, le *convection-enhanced delivery* (CED) (Bobo et al., 1994; Vogelbaum, 2005). Le concept sous-jacent aux polymères est de permettre une distribution continue, contrôlée, un peu à la manière des comprimés d'acétaminophène à libération prolongée. Toutefois, les désavantages de cette technique sont nombreux et incluent les risques accrus de toxicité locale, une mauvaise cicatrisation de la plaie post-résection, mais surtout, une faible distribution au delà de la cavité de résection, résultant en l'échec d'obtenir une concentration thérapeutique aux cellules tumorales ayant infiltrées le parenchyme cérébral. Ce même problème est associé à l'implantation d'un cathéter lors de la chirurgie résectionnelle, auquel s'ajoutent les risques d'infection et l'occlusion du cathéter. Le CED, qui consiste en une injection continue sous un gradient de pression positif, semble plus prometteur. Un ou plusieurs cathéters sont implantés stéréotaxiquement à travers un trou de trépan dans la tumeur ou dans une région adjacente. Une pompe d'infusion est utilisée pour obtenir un flot sous pression, avec une concentration d'agent thérapeutique, un débit et une durée d'injection prédéterminés. Cette technique a aussi ses défauts, incluant la distribution variable (dépendant d'une multitude de facteurs) et les possibilités de reflux le long du ou des cathéters, augmentant les risques de neurotoxicité. Une excellente revue du sujet écrite par Vogelbaum permet d'obtenir davantage d'informations sur cette technique en développement (Vogelbaum, 2005).

1.3.4 Formulation liposomale

Les liposomes sont des vésicules artificielles formées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques entourant un compartiment aqueux pouvant contenir, par exemple, une substance pharmacologique ou un segment d'ADN. Ils appartiennent à la famille des transporteurs colloïdaux, qui regroupent également les micelles, les émulsions et les nanoparticules (Garcia-Garcia et al., 2005 ; Torchilin, 2006). De part leur composition lipidique similaire aux membranes cellulaires, les liposomes sont utilisés dans le but d'accroître la biodisponibilité de leur contenu en facilitant sa diffusion (Drummond et al., 1999 ; Langner et Kral, 1999 ; Mamot et al., 2003 ; Waterhouse et al., 2005 ; Sapro et al., 2005). De plus, ils permettent de protéger les molécules encapsulées d'une éventuelle

dégradation enzymatique et d'une prise en charge par les pompes à efflux (Pinto-Alphandary et al., 2000 ; Mamot et al., 2003 ; Torchilin, 2005 ; Brasnjevic et al., 2009). Les propriétés physico-chimiques des liposomes, tels que la taille, la charge, la composition lipidique et la quantité de cholestérol, permettent de contrôler la distribution, l'absorption tissulaire et la libération du contenu (Garcia-Garcia et al., 2005; Bellavance, 2010). Les liposomes peuvent être cationiques pour l'encapsulation de matériel génétique, ou pégylés afin d'en prolonger la durée de vie plasmatique et d'en réduire la clairance par le système réticulo-endoplasmique (Garcia-Garcia et al., 2005). Une formulation liposomale pégylée contenant l'agent antinéoplasique doxorubine (Caelyx®) est utilisée en clinique pour le traitement des GBM et des métastases cérébrales (Koukourakis et al., 2000 ; Hau et al., 2004). Du ciblage actif est également possible en conjuguant les liposomes avec un anticorps ou un ligand qui reconnaîtra un récepteur à la surface des cellules dans le tissu ciblé. À ce sujet, des anticorps monoclonaux ont été attachés à des liposomes pégylés pour faire traverser les liposomes au delà de la BHE, en ciblant des mécanismes de transports comme les récepteurs insuline et transferrine (Zhang et al., 2004; Boado et Pardridge, 2011).

1.3.5 Pharmacologique

Deux observations initiales ont mené au développement d'approches pharmacologiques pour manipuler sélectivement la BHE: (1) l'augmentation de la perméabilité vasculaire causée par des molécules vasoactives; (2) l'identification de ces molécules dans la tumeur et l'oedème péri-tumoral, notamment les leucotriènes (Black et al., 1986), les prostaglandines et autres eicosanoïdes (Gaetani et al., 1991; Constantini et al., 1993), l'histamine (Inamura et al., 1994b) ainsi que la bradykinine (BK) et ses analogues (Unterberg et Baethmann, 1984; Raymond et al., 1986; Inamura et Black, 1994). Les analogues de la bradykinine sont ceux qui ont attiré l'attention du plus grand nombre de groupe de recherche (ce sujet sera présenté en détail dans le chapitre suivant). L'utilisation de la bradykinine serait moins invasive et plus fiable que, par exemple, l'ouverture osmotique, principalement du fait qu'elle affecterait d'abord la vascularisation tumorale. Elle augmente la perméabilité paracellulaire par ouverture des jonctions serrées en activant

les récepteurs B2 (rB2) à la surface des cellules endothéliales. À cet effet, un peptide agoniste analogue à la BK a été développé, puis nommé RMP-7 (pour *receptor-mediated permeability-7*, aussi appelé Labradimil ou Cereport; [Hyp³, Thi⁵, 4-Me-Tyr⁸ψ(CH₂NH)Arg⁹]-BK) et étudié dans différents modèles précliniques de gliome, en combinaison avec des agents antinéoplasiques (Inamura et Black, 1994; Bartus et al., 1996). Suite aux résultats convaincants de ces études en matière d'efficacité et de sécurité, quelques études cliniques ont été menées avec des patients atteints de gliomes (Ford et al., 1998; Gregor et al., 1999; Warren et al., 2001; Prados et al., 2003; Packer et al., 2005; Warren et al., 2006). Les études cliniques initiales utilisant l'infusion intra-artérielle de RMP-7, procédure qui s'est avérée efficace et spécifique dans des modèles expérimentaux (Inamura et Black, 1994; Inamura et al., 1994; Nomura et al., 1994; Black, 1995; Rainov et al., 1995; Matsukado et al., 1996), ont ici révélé une augmentation de la biodistribution des agents antinéoplasiques dans les tumeurs (d'environ 46%) sans atteinte aux tissus cérébraux sains, en plus d'une efficacité chez la moitié des patients sur le plan de la réduction du volume tumoral (Black et al., 1997; Cloughesy et al., 1999). Toutefois, comme la voie d'administration intra-carotidienne est moins commode que la voie d'administration intraveineuse, cette dernière a été préférée pour les études en phase I et II. Ces essais cliniques ont cependant donné des résultats mitigés sur l'efficacité du RMP-7. Le dosage et la durée d'infusion du RMP-7 sont probablement à l'origine de ces différences. De plus, l'efficacité de la chimiothérapie en combinaison avec le RMP-7 était moindre chez les patients ayant déjà reçu des traitements en chimiothérapie avant l'étude ou chez les patients atteints de certains types de métastases (Gregor et al., 1999). Dans ces cas particuliers, la raison de cette piètre efficacité serait plutôt reliée avec la résistance acquise ou intrinsèque des cellules tumorales envers l'agent de chimiothérapie utilisé plutôt qu'à l'inefficacité du RMP-7.

Chapitre 2

Les kinines

Les kinines sont des peptides endogènes, souvent considérés comme proinflammatoires ou cardioprotecteurs, impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Ces effets sont médiés par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) spécifiques, B1 et/ou B2, qui sont reliés à différents mécanismes de transduction biochimique. Les kinines sont reconnues, entre autres, pour leur rôle dans la perméabilité vasculaire. Dans cette section seront décrits les kinines et leurs récepteurs.

2.1 Système kallibréine-kinine

L'histoire des kinines commence il y a plus d'un siècle lorsque Abelous et Barbier démontrent les effets hypotenseurs de l'urine humaine (Abelous et Bardier, 1909), dans laquelle se retrouvent des métabolites actifs des kinines suite à leur élimination. Depuis ce temps, elles font l'objet de recherches intensives, qui ont mené à ce jour à plus de 35 000 publications répertoriées dans PubMed. Le terme "kinine" fait grossièrement référence au nonapeptide bradykinine (BK: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg), au décapeptide kallidine (KD: Lys-BK), ainsi qu'à leurs métabolites actifs desArg⁹BK (DBK) et Lys-desArg⁹BK (LDBK). Chez l'humain, ces derniers peuvent également subir des modifications post-transcriptionnelles en position 3, résultant en la [Hyp³]desArg⁹BK et la Lys[Hyp³]desArg⁹BK. Ces peptides endogènes participent à de nombreux processus physiologiques (p. ex. régulation de la pression artérielle, des fonctions rénales et cardiaques) et pathologiques (p. ex. inflammation) de par leur habileté à activer les cellules endothéliales, menant entre autres à la production de NO et la mobilisation de l'acide arachidonique, à la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

Le système kallibréine-kinine représente globalement une cascade métabolique qui, lorsqu'activée, déclenche la libération des kinines vasoactives. Ce système multi-protéique inclut des protéases à sérine, nommées kallibréine tissulaire (Kt) et kallibréine plasmatique (Kp), qui catalysent la dégradation de protéines multi-domaines nommées kininogènes de haut et de bas poids moléculaire (HK et LK) en kinines (figure III). Plus spécifiquement, HK (88 à 120 kDa), le précurseur de la BK, est une protéine circulant dans le plasma, alors que LK (50 à 68 kDa), le précurseur de la Lys-BK, est distribué dans les tissus et les fibroblastes (Bhoola et al., 1992). Le gène humain du kininogène a été cartographié sur le chromosome 3 (3q26-3qter), qui code pour l'expression des deux types de kininogènes, par épissage alternatif (Fong et al., 1991).

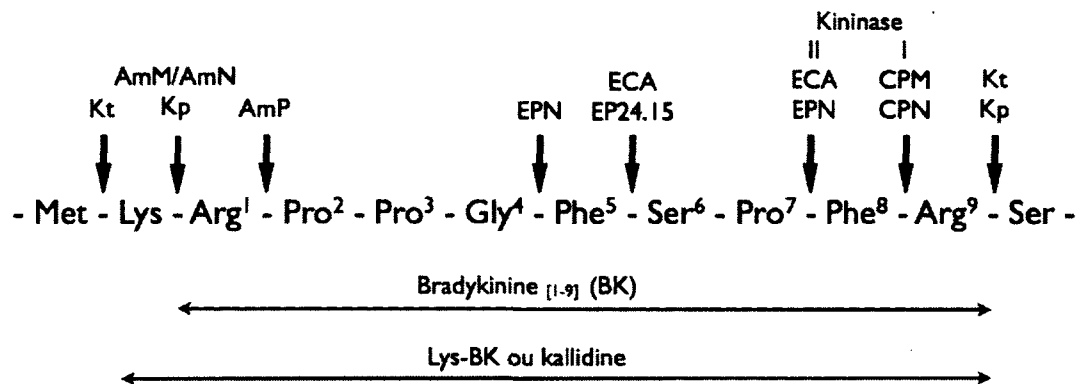
Toutes les composantes nécessaires à la synthèse des kinines sont non seulement présentes, mais surexprimées en contexte inflammatoire. À titre d'exemples, la kallibréine plasmatique, responsable de la libération de la BK à partir de HK, est surexprimée dans un modèle d'ischémie-reperfusion, alors que les niveaux de DBK y sont augmentés de deux à quatre fois (Lamontagne et al., 1995). La kallibréine tissulaire, précurseur de la Lys-BK du LK, a été retrouvée dans les sécrétions nasales de sujets atteints d'une rhinite virale ou allergique (Proud et al., 1983), alors qu'il y a augmentation des niveaux de ligands (les métabolites des Arg⁹) du récepteur B1 (rB1) dans un modèle de sepsis, le tout relié à l'expression accrue de la kininase I (Raymond et al., 1995; Schremmer-Danninger et al., 1998). Il a également été démontré que la kallibréine tissulaire est surexprimée dans certains cancers, dont les carcinomes mammaires (Hermann et al., 1995; Rehbock et al., 1995), les adénomes sécrétant de la prolactine ou des hormones de croissance (Jones et al., 1990; Jones et al., 1992), en plus d'être retrouvée en plus grande quantité dans le plasma de patients cancéreux (Matsumura et al., 1991). Il est donc clair que le système kallibréine-kinine est impliqué dans de nombreuses conditions pathologiques, dont le cancer.

2.2. Métabolisme des kinines

Une grande variété de peptidases est capable de métaboliser les kinines (Skidgel, 1997). Toutefois, quelques métallopeptidases sont responsables de la quasi-totalité de ce

métabolisme: l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), l'aminopeptidase P (AmP), l'endopeptidase neutre (EPN) ainsi que les carboxypeptidases M et N (CPM et CPN; toutes deux communément appelées kininase I) et les aminopeptidases M et N (AmP et AmN). Ces enzymes sont toutes dépendantes du zinc, et pour la plupart liées aux membranes cellulaires. L'importance du rôle de chacune de ces enzymes dépend de l'espèce animale, de l'approche analytique, de l'organe et du contexte pathophysiologique. Certaines caractéristiques de ces enzymes méritent d'être soulevées, et les sites de clivage de chacune sont illustrés à la figure III. D'abord, l'ECA, également appelée kininase II en raison de son affinité élevée pour la bradykinine (K_m : 0.18 μM), catalyse la conversion du décapeptide inactif Angiotensine I (Ang I; K_m : 16 μM) en Angiotensine II (Ang II), un puissant vasoconstricteur (Erdos, 1990). L'ECA a donc un rôle excessivement important dans la régulation de la pression artérielle, étant responsable de la formation d'un agent vasoconstricteur (Ang II) et de la dégradation d'un agent vasodilatateur (BK) (Turner et Hooper, 2002). De plus, les carboxypeptidases M et N sont responsables de la transformation de la BK et de la KD en DBK et LDBK, deux métabolites actifs sur le rB1. Toutefois, l'activité de la kininase I constitue une voie métabolique mineure, à moins que l'ECA ne soit inhibée (Skidgel, 1988). Finalement, l'EPN inactive la BK en retirant séquentiellement le dipeptide Phe⁸-Arg⁹ puis le tripeptide Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷, résultant en BK[1-4], un métabolite inactif. L'AmP est également responsable de l'inactivation de la BK et de la DBK dans le plasma, retirant le premier acide aminé (N-terminal) du peptide.

En somme, le métabolisme des kinines est rapide et efficace, rendant la durée d'action de ces peptides excessivement courte. La demi-vie de la bradykinine est inférieure à 30 secondes (Erdos, 1990), alors que celle de la DBK est de quelques minutes au niveau plasmatique (Decarie et al., 1996). Les kinines endogènes sont d'ailleurs reconnues pour leur activité autocrine ou paracrine (Moreau et al., 2005), en lien avec cette dégradation enzymatique rapide. Au cours des dernières années, plusieurs peptides de synthèse, agonistes comme antagonistes, ont été développés afin d'améliorer leurs caractéristiques pharmacologiques et leur stabilité face à la dégradation enzymatique. Les principaux analogues d'agonistes et d'antagonistes peptidiques des rB1 et rB2 utilisés dans ce projet de recherche sont décrits dans le tableau 1.



Peptide initial	Peptidase	Métabolite résultant	Activité
BK	AmP	BK _{2-9}	Inactif
BK	EPN (24.11)	BK _{1-4}	Inactif
BK	ECA	BK _{1-5}	Inactif
BK	EP24.15	BK _{1-5}	Inactif
BK	CPM/CPN	desArg ⁹ -BK	Actif sur le rB1
Lys-BK	CPM/CPN	Lys-desArg ⁹ -BK	Actif sur le rB1
Lys-BK	AmM/AmN	BK	Actif sur le rB2

Figure III - Métabolisme des kinines par diverses peptidases. Le site de clivage pour chacune des peptidases est indiqué par une flèche.

Tableau I - Principaux agonistes et antagonistes peptidiques des kinines

Ligand	Structure	Sélectivité	Référence
<u>Agonistes</u>			
R838	Sar[D ⁸ Phe ⁸]desArg ⁹ -BK	B1	Rhaleb et al., 1990 Cardoso et al., 2004
NG29	Sar-Lys[D ⁸ Phe ⁸]desArg ⁹ -BK	B1	Côté, 2007 Côté et al., 2010
R523	[Phe ⁸ ψ(CH ₂ NH)Arg ⁹]-BK	B2	Drapeau et al., 1988
RMP-7 (Labradimil, Cereport)	[Hyp ³ , Thi ⁵ , 4-Me-Tyr ⁸ ψ(CH ₂ NH)Arg ⁹]-BK	B2	Inamura et al., 1994 Sanovich et al., 1995
NG291	[Hyp ³ , Thi ⁵ , NChg ⁵ , Thi ⁸]-BK	B2	Bélangier, 2008 Bélangier et al., 2009 Savard et al., 2013
<u>Antagonistes</u>			
R715	Ac-Lys-[DβNal ⁷ , Ile ⁸]desArg ⁹ -BK	B1	Gobeil et al., 1996a
R892	Ac-Lys-[(αMe)Phe ⁵ , DβNal ⁷ , Ile ⁸]desArg ⁹ -BK	B1	Gobeil et al., 1999
R954	Ac-Orn-[Oic ² , (αMe)Phe ⁵ , DβNal ⁷ , Ile ⁸]desArg ⁹ -BK	B1	Filteau, 1999 Neugebauer et al., 2002
[desArg ¹⁰]-HOE140	DArg-[Hyp ³ , Thi ⁵ , DTic ⁷ , Oic ⁸]-desArg ⁹ BK	B1/B2	Wirth et al., 1991 Rhaleb et al., 1992 Gobeil, 1993
HOE 140 (Icatibant)	DArg-[Hyp ³ , Thi ⁵ , DTic ⁷ , Oic ⁸]-BK	B2	Hock et al., 1991

2.3. Le récepteur B2

Deux types de GPCR sont responsables des effets biologiques des kinines (Regoli et Barabé, 1980). Chez l'homme, les récepteurs B1 (Menke et al., 1994) et B2 (Hess et al., 1992) sont codés par deux gènes distincts. Les maints effets pharmacologiques des kinines, incluant la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la contraction des muscles lisses et la stimulation des connexions neuronales sensibles et sympathiques, dépendent directement de la présence de ces récepteurs sur une multitude de types cellulaires.

Le rB2 fait partie de la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (cette même famille de protéines dont l'étude fut récompensée en 2012 par un prix Nobel de chimie aux professeurs Lefkowitz et Kobilka). Ce récepteur spécifique véhicule la majorité des effets pharmacologiques des kinines en condition physiologique. Sa distribution est ubiquitaire, notamment sur les cellules endothéliales et épithéliales, musculaires lisses et striées, les fibroblastes, les neurones et certaines cellules hématopoïétiques (Bhoola, 1992). Plus précisément, le rB2 est généralement décrit comme associé à une protéine $G\alpha_q$ (Gutowski et al., 1991; LaMorte et al., 1993; Jones et al., 1995), même s'il peut interagir avec plusieurs autres protéines G incluant $G\alpha_i$ (Ewald et al., 1989), $G\alpha_s$ (Liebmann et al., 1996) et $G\alpha_{12/13}$ (Gohla et al., 1999). La protéine $G\alpha_q$, une fois stimulée suite à la liaison de la BK au rB2, active la phospholipase C (PLC), menant à l'hydrolyse du phosphatidyl inositol (PI) ainsi qu'à l'augmentation du calcium libre intracellulaire (Yano et al., 1985; Tilly et al., 1987; Fasolato et al., 1988; Byron et al., 1992). De plus, l'activation de différentes isoenzymes de la protéine kinase C (PKC) a été démontrée dans les fibroblastes (Tippmer et al., 1994) et les cellules endothéliales (Ross et Joyner, 1997). L'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire médiée par la BK entraîne la stimulation des enzymes *nitric oxide synthase* endothéliale (eNOS) et phospholipase A₂ (PLA₂), respectivement responsable de la production de NO par les cellules endothéliales (Busse et Flemming, 1995) et de la dégradation de l'acide arachidonique en différents prostanoides (p. ex. prostaglandines et leucotriènes) (Burch et al., 1987; Xing et al., 1997). En plus de ces voies classiques,

certain auteurs suggèrent que le rB2 pourrait activer des protéines kinases cytoplasmiques (Velarde et al., 1999) ainsi que la voie de transcription de gènes JAK/STAT dans les cellules endothéliales (Ju et al., 2000). Finalement, la bradykinine, toujours via le rB2, active de multiples facteurs de transcription qui régulent à leur tour l'induction de nombreuses cytokines impliquées dans l'inflammation et les dommages tissulaires, en plus d'induire l'expression du rB1. Elle stimule aussi l'activation du facteur nucléaire- κ B (NF- κ B), via $G\alpha_i$, menant à l'expression du gène de l'interleukine 1 (Il-1) (Pan et al., 1996). L'expression d'autres cytokines, tel que l'Il-6 et l'Il-8, est également stimulée par la bradykinine (Hayashi et al., 2000).

La stimulation du récepteur B2 par un ligand comme la BK entraîne sa désensibilisation (Faussner et al., 1998). Le mécanisme sous-jacent cette désensibilisation implique la phosphorylation réversible, par des kinases ciblant les GPCR (GRK), de résidus Ser et Tyr spécifiques au niveau du domaine C-terminal (Blaukat et al., 1996; Blaukat et al., 2001), ce qui diminue l'affinité pour les protéines G, affectant ultimement le couplage avec ces dernières. La phosphorylation peut également affecter l'endocytose (l'internalisation), le recyclage et le transport des récepteurs. En lien avec ces informations, la signalisation médiée par le rB2 est transitoire plutôt que soutenue.

Comme la grande majorité des résultats rapportés dans cette thèse sont en lien avec le récepteur B1 (trois des quatre manuscrits), davantage d'informations en lien avec celui-ci seront discutés dans cette thèse. Toutefois, le lecteur qui voudrait approfondir ses connaissances du rB2 est invité à consulter les articles de revue de Regoli & Barabé (1980), de Bhoola (1982), et de Leeb-Lundberg et al. (2005), traitant des aspects biochimiques, moléculaires et fonctionnels de ce récepteur.

2.4. Le récepteur B1

Malgré une séquence en acides aminés bien distincte, le récepteur B1 ressemble de plusieurs façons à son homologue rB2. D'abord, il fait lui aussi partie de la famille des GPCRs, en plus d'avoir un système de signalisation intra-cellulaire fort semblable à celui

du rB2, engendrant des fonctions physiologiques équivalentes (Regoli et Gobeil, 2012). Suite à la liaison d'un agoniste, le rB1 interagit directement avec G_q et G_i (Austin et al., 1997), via lesquelles seront activées différentes voies de signalisation, dont l'hydrolyse de l'inositol phosphate (PI) (Tropea et al., 1993), l'augmentation de la concentration de calcium intra-cellulaire (Bascands et al., 1993; Smith et al., 1995), la production d'eicosanoïdes (notamment PGI₂) à partir de l'acide arachidonique (Tropea et al., 1993; Levesque et al., 1995b), ainsi que l'activation de la eNOS et la production de NO (Tsutsui et al., 2000). De plus, à l'instar du rB2, le rB1 est omniprésent (lorsqu'induit) dans plusieurs types cellulaires tels que les cellules endothéliales (D'Orleans-Juste et al., 1989), les muscles lisses vasculaires ou extravasculaires (Galizzi et al., 1994; Levesque et al., 1995b), les cellules épithéliales (Galizzi et al., 1994; Cuthbert et Teather, 1997), les neurones (Segond von Banchet et al., 1996), les fibroblastes (Goldstein et Wall, 1984), certaines cellules immunocompétentes (lympocytes et macrophages) (Burch et al., 1989; McFadden et Vickers, 1989), en plus d'être retrouvés dans plusieurs cellules tumorales, dont celles de type astrocytaire (Raidoo et al., 1999; Wu et al., 2002; Taub et al., 2003).

Malgré une signalisation intracellulaire similaire entre les deux types de récepteurs, certaines différences méritent notre attention. Dans les cellules musculaires lisses vasculaires, la stimulation du rB2 mène à l'augmentation transitoire de l'hydrolyse du PI, avec peu de dépendance au Ca^{2+} extracellulaire, alors que la stimulation du rB1 est plus soutenue et définitivement dépendante du Ca^{2+} extracellulaire. En outre, l'augmentation de calcium intracellulaire post-stimulation est transitoire pour le rB2 et soutenue pour le rB1 (Bascands et al., 1993; Tropea et al., 1993; Smith et al., 1995; Mathis et al., 1996). L'hypothèse retenue pour expliquer ces différences est celle de l'assujettissement de ces récepteurs à une régulation à court terme, incluant la désensibilisation et l'internalisation, tel que discuté précédemment pour le rB2. Le rB1 diffère également du rB2 puisqu'il n'est que très peu désensibilisé suite à son activation (Bascands et al., 1993; Smith et al., 1995; Mathis et al., 1996). Au niveau de sa structure moléculaire, le rB1 a une queue C-terminale tronquée, ne possédant entre autre pas les sérines et thréonines qui peuvent être phosphorylées par des GRKs et la PKC. En résulte une absence de phosphorylation significative, et ce, qu'il soit en présence ou en absence d'agonistes (Blaukat et al., 1999).

Une autre différence, primordiale dans le contexte de ce manuscrit, est le caractère inductible de l'expression du rB1. C'est grâce à des essais contractiles sur des segments d'aorte de lapin que cette caractéristique a d'abord pu être observée par Regoli et ses collaborateurs (Regoli et al., 1977). Cette observation, menant à la théorie de l'induction, est que l'effet contractile que les kinines exogènes exercent sur le muscle lisse vasculaire se développe avec le temps d'incubation en bains d'organes, suite au prélèvement du tissu (Bouthillier et al., 1987). L'induction *ex vivo* est également observée sur d'autres types de préparations tissulaires et chez d'autres espèces, tels que la veine ombilicale humaine (Gobeil et al., 1996b; Côté et al., 2009), la trachée et la vessie de souris (Trevisani et al., 1999), l'endothélium vasculaire et l'épithélium intestinal (Drummond et Cocks, 1995; Cuthbert et Teather, 1997). Les dommages tissulaires engendrés par le prélèvement du tissu en question seraient responsables de l'initiation du mécanisme d'induction du rB1. L'utilisation d'inhibiteurs biochimiques viennent supporter la théorie de l'induction post-prélèvement du rB1; l'inhibition de la synthèse d'ARN (avec l'actinomycine D), de la synthèse des protéines (avec la cycloheximide) et de la maturation des protéines (avec la brefeldine A) prévient le développement de ces effets contractiles, de manière spécifique, sans entraîner d'effets secondaires sur d'autres types de réponses (Sardi et al., 1998; Sardi et al., 1999). Les essais de contractilité aortique ont également servi à démontrer l'influence des cytokines (pro-inflammatoires) et des glucocorticoïdes (anti-inflammatoires) sur le caractère inductible du rB1. Certaines cytokines (Il-1 β , Il-2 et le facteur de croissance épidermale (EGF)) augmentent le taux de sensibilisation du rB1, alors que les glucocorticoïdes (dexaméthasone et autres) ont plutôt l'effet inverse (Bouthillier et al., 1987; deBlois et al., 1988; deBlois et al., 1989; Levesque et al., 1995b). Ces résultats suggèrent une régulation génique par des cytokines inflammatoires.

Le caractère inductible du rB1 a également été documenté *in vivo*. On dénote en effet des réponses hypotensives dose-dépendantes à la DBK ou la LDBK exogène chez des lapins préalablement injecté avec une dose intraveineuse sous-léthale de lipopolysaccharide (LPS) (Regoli et al., 1981; Drapeau et al., 1991). En comparaison, les animaux contrôles ne répondent pas aux kinines exogènes et le prétraitement au LPS ne modifie pas les réponses

hypotensives associées à la BK (médiées par le rB2) ou à quelconque autre agoniste. De plus, les effets hypotenseurs médiés par le rB1 sont tardifs, indiquant la nécessité de la synthèse et la maturation protéique. Le LPS est un puissant inducteur de la synthèse de cytokines inflammatoires par les leucocytes et autres types cellulaires, mais d'autres activateurs de cytokines (p. ex. muramyl-dipeptide) peuvent être utilisés (ou l'Il-1 β directement), afin d'activer la production du rB1 (Bouthillier et al., 1987; deBlois et al., 1991). En somme, l'induction de ce GPCR est étroitement dépendante des cytokines inflammatoires, particulièrement de l'Il-1 β , et ce tant *in vitro* qu'*in vivo*.

Les gliomes de bas grade et de haut grade, tout comme plusieurs autres tumeurs solides d'ailleurs, sont accompagnés d'une zone d'inflammation dans laquelle on peut retrouver une quantité importante d'Il-1 β (Black et al., 1992; Maeda et al., 1996; Sasaki et al., 1998). Basé sur les observations relatées ci-haut, nous avons émis l'hypothèse que cette cytokine amène l'expression du rB1 en présence d'un gliome (voir l'introduction du manuscrit #3). Cette hypothèse est en cohérence avec des observations cliniques préliminaires qui démontrent que les cellules endothéliales et les cellules gliales provenant de spécimens de gliomes malins humains présentent une immunoréactivité au rB1 (Raidoo et al., 1999; Fortier et al., 2006). Toutefois, le rôle que pourrait jouer le rB1 pour les gliomes reste incertain.

Chapitre 3

Perméabilité vasculaire et imagerie

Dans les tumeurs primaires intra-axiales, la BHE peut être compromise dû principalement à néovascularisation et, à moindre échelle, à des dommages directement induits par la tumeur (Kido et al., 1991; Schneider et al., 2004). Il existe traditionnellement deux approches pour imager la néovascularisation : celle qui exploite les anomalies physiologiques des nouveaux vaisseaux sanguins tumoraux et celle qui cible directement des marqueurs endothéliaux spécifiques à l'angiogenèse. Pour notre étude, qui visait à évaluer le niveau de perméabilité des vaisseaux sanguins, nous nous sommes inspirés de l'imagerie par résonance magnétique rehaussée par un agent de contraste (ou *DCE-MRI* pour *Dynamic Contrast Enhanced-MRI*). Les agents de contraste IRM ne sont pas en mesure de diffuser du sang vers les tissus cérébraux en situation normale (Bart et al., 2000; Neuwelt, 2004). En présence d'une tumeur, cette vérité n'en est plus une.

3.1 Néovascularisation

Initialement décrit simplement comme un processus de germination des capillaires pré-existants (angiogenèse), la néovascularisation, le processus par lequel les gliomes augmentent leur approvisionnement en sang pour fournir leur expansion rapide, est désormais reconnu comme complexe et multi-événementiel. En plus de l'angiogenèse, au moins quatre mécanismes de néovascularisation entreraient en jeu, soit la co-option vasculaire (condition par laquelle la tumeur s'alimente des vaisseaux sanguins pré-existants pour croître), la vasculogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins dès suite d'une mobilisation, d'une différenciation et d'un recrutement des cellules de la moelle osseuse), le mimétisme vasculaire (l'habileté des cellules tumorales à former un réseau circulatoire fonctionnel) et la transdifférenciation cellulaire (différenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales) (Holash et al., 1999; Lyden et al., 2001; Yue et Chen, 2005; Demou et Hendrix, 2008; Ricci-Vitiani et al., 2010; Wang et al., 2010; Hardi et Zagzag, 2012).

Le mécanisme principal permettant aux gliomes de supporter leur croissance et leur expansion demeure toutefois l'angiogenèse, soit la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux déjà existants (Folkman, 1971). Les gliomes malins sont d'ailleurs parmi les plus vascularisés des tumeurs solides, et la prolifération vasculaire est un fait saillant dans le GBM (Brem et al., 1972). Toutefois, le processus angiogénique est chaotique, résultant en des vaisseaux sanguins très différents de ce qu'on a l'habitude de voir et ce, à plusieurs niveaux. D'abord, les vaisseaux sanguins tumoraux n'ont pas les caractéristiques hiérarchiques des artérioles, capillaires et veinules normales. Ils sont plutôt désorganisés, de calibres irréguliers, tortueux, et possèdent des embranchements bicornus (Baluk et al., 2005). Qui plus est, toutes les composantes des parois vasculaires sont anormales. Les cellules endothéliales peuvent se superposer et former plusieurs couches et elles n'ont pas de jonctions intercellulaires normales (Hashizume et al., 2000). L'espacement entre ou au travers de ces cellules rend les vaisseaux très perméables et prompts à l'hémorragie. Les péricytes ne sont que lâchement attachés aux cellules endothéliales et les relations fonctionnelles entre ces deux types cellulaires sont perturbées (Benjamin et al., 1999; Baluk et al., 2003; Armulik et al., 2005). La membrane basale, qui enveloppe normalement les cellules endothéliales et les péricytes, peut être d'épaisseur anormale, être discontinue et de composition inhabituelle (Kalluri, 2003; Neri et Bicknell, 2005). Enfin, la redistribution des astrocytes en présence d'un gliome malin n'est pas très bien compris actuellement, bien que le marquage GFAP (pour *glial fibrillary acidic protein*; un marqueur connu pour les astrocytes) soit plus intense en périphérie immédiate de la tumeur, et plus faible à l'intérieur de celle-ci (Lee et al., 2009). En somme, ces anomalies sont persistantes, mais la sévérité de celles-ci peut varier régionalement au sein d'une même tumeur (hétérogénéité), d'une tumeur à une autre, ou encore varier en fonction de la vitesse de progression de la tumeur et de son degré d'agressivité.

La principale conséquence de ces défauts structuraux est que l'endothélium des vaisseaux sanguins tumoraux est hyper-perméable, tant au niveau de la quantité d'éléments extravasés qu'au niveau de la taille des substances pouvant traverser l'endothélium. Ces vaisseaux sont donc tout le contraire de ceux formant la BHE dite normale, qui telle que décrite précédemment, est plutôt hyper-imperméable. Le degré de perméabilité des

vaisseaux sanguins peut être visualisé à l'aide d'agents de contraste IRM, molécules qui ne traversent pas (ou très peu) les vaisseaux sanguins normaux, mais qui passent rapidement à travers la paroi des vaisseaux anormaux alimentant les gliomes. Rappelons que, quoique la BHE soit bel et bien perméable en contexte tumoral, elle l'est de façon inconstante et avec une topographie hétérogène (Fortin, 2004; Kratz, 2008). Ainsi, des cellules néoplasiques peuvent exister à distance du nodule prenant le contraste, où la BHE est intacte et où elles sont protégées de la chimiothérapie (Fortin et Neuwelt, 2002; Pitz et al., 2011).

3.2 L'imagerie par résonance magnétique

L'objectif de cette introduction de thèse n'était pas de décrire en détails l'IRM, le lecteur qui veut compléter certaines connaissances est référé à l'excellent manuel d'auto-apprentissage "Comprendre l'IRM" (Kastler et Vetter, 2011). Ce volume détaille entre autre les phénomènes de résonance magnétique et de relaxation, les principaux types de séquences d'acquisition (écho de spin, écho de gradient, etc.), le contraste en T_1 , T_2 et densité protonique, ainsi que le codage spatial et la reconstruction de l'image. Toutefois, afin d'améliorer la compréhension du lecteur, une description sommaire est présentée ici.

Comme son nom l'indique, l'imagerie par résonance magnétique est une technique d'imagerie médicale qui s'appuie sur la résonance magnétique nucléaire (RMN) de certains noyaux, plus précisément ceux à nombre impair de protons ou de neutrons, qui peuvent présenter un magnétisme détectable. Notons, par exemple, les éléments comme l'hydrogène (^1H), le carbone (^{13}C), le fluor (^{19}F), le sodium (^{23}Na) et le phosphore (^{31}P), qui peuvent être à l'origine d'une aimantation nucléaire. Toutefois, nous discuterons uniquement des atomes d'hydrogène des molécules d'eau, constituant majeur de l'être humain (entre 60 et 70% chez l'adulte; 80% dans le cerveau). Chaque noyau d'hydrogène, constitué uniquement d'un proton, possède un moment magnétique, ce qui signifie qu'il agit un peu comme un petit aimant lorsqu'on le place à l'intérieur d'un champ magnétique externe. Lorsqu'un tissu est placé dans l'aimant supraconducteur, ces petits aimants tendent donc à s'aligner avec le champ magnétique externe, faisant apparaître une magnétisation macroscopique, dite magnétisation longitudinale, dans le tissu.

Les mesures sont faites par l'application d'un champ électromagnétique tournant (ou pulses de radiofréquences) à une fréquence (de résonance) précise afin de générer une magnétisation transverse (Yankeelov et Gore, 2009). Une fois le champ appliqué, un certain temps est nécessaire à chaque proton afin de se réorienter, et donc de revoir apparaître une magnétisation longitudinale. Ce temps nécessaire pour se réaligner est appelé "relaxation longitudinale" ou relaxation T_1 . Le temps de relaxation T_1 est affecté par la présence de macromolécules telles que les protéines, qui affectent la viscosité locale et donc la dynamique de mouvement de l'eau. En d'autres termes, le temps de relaxation des protons de l'eau est grandement affecté par leur environnement immédiat.

Le contraste en IRM correspond à la traduction des signaux RMN en tons de gris, passant du noir (signal faible) au blanc (signal élevé). Il traduit les différences en temps de relaxation des tissus (retour à l'équilibre suite à l'application des radiofréquences). Grâce aux différents paramètres de la séquence d'acquisition, choisis par l'opérateur, il est possible de mettre en évidence ces différences tissulaires, en favorisant l'un des facteurs, soit T_1 , T_2 ou ρ (densité protonique). C'est ce qu'on appelle "pondérer" la séquence. Le contraste en IRM dépend donc des paramètres d'acquisition des images (le temps de répétition (TR), temps d'écho (TE)) qui permettent de mettre l'emphase sur les caractéristiques intrinsèques des tissus (T_1 , T_2 , ρ).

Ces caractéristiques tissulaires peuvent être influencées par l'ajout d'un agent de contraste. Ce dernier agit sur les paramètres T_1 et T_2 , les seuls paramètres modifiables (considérant que la densité protonique des tissus reste fixe). En IRM, la visualisation de l'agent de contraste dans l'organisme est indirecte. C'est plutôt l'impact qu'il a sur son environnement (son influence sur les temps de relaxation des protons de l'eau environnante) qui est mesurable, par une augmentation ou une diminution artificielle du signal mesuré. En effet, les agents de contraste raccourcissent les temps de relaxation T_1 et T_2 des tissus, l'un ou l'autre de ces effets étant prédominant en fonction du produit utilisé ou de sa concentration (et donc de leur distribution dans l'organisme) (Kastler et Vetter, 2011). Le Magnevist (ou Gadolinium(Gd)-DTPA) et le Gadomer, deux agents à base de

gadolinium utilisés dans notre étude, sont dits paramagnétiques, ou T_1 -prédominant, et agissent donc en diminuant le temps de relaxation T_1 des tissus environnants (ou retour à l'équilibre plus rapide), menant à une augmentation du signal (plus blanc) dans la région où ils sont situés sur des images en pondération T_1 . Ce sont les champs magnétiques émanant des électrons non appariés (le gadolinium en a 7) de l'agent T_1 qui vont interagir avec les moments magnétiques des protons à proximité (Caravan et al., 1999). Cette interaction entre les spins électroniques de l'agent de contraste et le spin nucléaire du proton provoque une augmentation de la vitesse de relaxation de ces derniers. Tel que déjà mentionné, l'effet du gadolinium est dépendant de la concentration du produit à un endroit donné, et donc de sa distribution dans les tissus. À titre d'exemple, si celui-ci ne traverse pas la BHE, aucune modification de signal ne devrait être observée dans le SNC (mis à part l'effet minime qu'aura la portion sanguine de l'agent de contraste). Si toutefois la BHE est perméable, dû par exemple à l'angiogenèse induite par la présence d'une tumeur au cerveau, l'agent traversera du sang vers la tumeur et aura son effet prédominant sur le temps de relaxation T_1 du tissu tumoral, résultant en une augmentation du signal au sein de ce dernier sur nos images pondérées- T_1 . Si la concentration de gadolinium augmente encore, l'effet deviendra T_2 -prédominant, ce qui aura pour conséquence, une diminution du signal. Cette caractéristique des agents paramagnétiques peut être observée par une diminution drastique du signal dans la vessie, après de multiples injections intraveineuses de Gd-DTPA, qui est éliminé par la voie rénale. Il est à noter que dans notre protocole expérimental, les concentrations d'agent de contraste utilisées mènent toujours à un effet prédominant T_1 . Toutefois, comme deux injections d'agent de contraste seront nécessaires chez un même animal, nous avons pris soin de laisser quelques heures de délai entre les deux séances d'imagerie, temps nécessaire afin d'éliminer la première dose d'agent de contraste (figure IV).

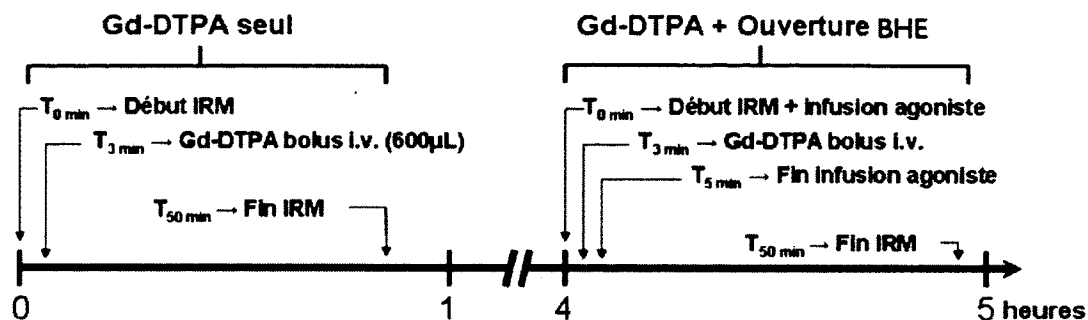


Figure IV - Procédures d'IRM avec injection d'agent de contraste et ouverture de la BHE. N.B. Un délai de 12 heures (au lieu de 4) sépare les deux procédures lorsque le Gadomer est utilisé comme agent de contraste, puisque son élimination du SNC est plus lente.

3.3 L'IRM dynamique rehaussée par un agent de contraste

L'IRM dynamique rehaussée par un agent de contraste (DCE-MRI) consiste en l'acquisition rapide d'une série d'images (un peu comme un film), avant, pendant et après l'administration intraveineuse de l'agent de contraste. Chaque image acquise correspond à un point dans le temps, et chaque voxel de chaque groupe d'images a donc sa propre évolution temporelle (une intensité de signal par point dans le temps) qui peut être analysée à l'aide d'un modèle mathématique (Yankeelov et Gore, 2009). Ce type d'imagerie est utilisé pour obtenir, lors d'une même étude, de l'information morphologique et fonctionnelle à propos de la micro-vascularisation. Au cerveau, l'agent de contraste servira de marqueur de perméabilité vasculaire, puisqu'il n'est pas en mesure de traverser du sang vers l'encéphale au travers la BHE normale (Bart et al., 2000; Neuwelt, 2004; Côté, 2007; Blanchette et al., 2009; Côté et al., 2010, 2012). Le but premier de cette thèse était de développer de nouvelles approches afin de perméabiliser la BHE tumorale en périphérie des gliomes, afin de permettre un meilleur acheminement d'agents thérapeutiques à la portion infiltrante de ces tumeurs. Nous avons donc choisi un protocole d'acquisition d'images inspiré du DCE-MRI classique. Toutefois, l'analyse des images est différente et originale. Effectivement, l'analyse des images obtenues en DCE-MRI vise généralement à obtenir une constante de transfert entre l'espace intra-vasculaire et

extravasculaire/extracellulaire (k^{trans}), la fraction volumétrique représentant le compartiment extravasculaire/extracellulaire (v^e). Chacun de ces paramètres peut révéler de l'information diagnostique et pronostique. Pour une excellente revue sur le sujet, le lecteur est référé à Yankeelov et Gore (Yankeelov et Gore, 2009). Nous nous sommes plutôt intéressés à comparer la localisation de l'augmentation du signal au sein des tumeurs (suite à l'injection de l'agent de contraste) chez un même animal, avec ou sans perméabilisation préalable de la BHE avec nos agonistes du rB1 ou du rB2 (Côté, 2007). D'abord, une analyse volumétrique de l'augmentation du signal nous a permis d'obtenir ce que nous avons nommé un "volume de distribution de l'agent de contraste" (CADV: de l'anglais *contrast agent distribution volume*). Ce volume est mesuré pour chaque série d'images en fonction du temps, pour la première (agent de contraste seul) et la deuxième (ouverture de BHE + agent de contraste) série d'images obtenue chez un même animal implanté d'un gliome F98. Ces deux CADV peuvent ensuite être comparés. Rappelons ici qu'en présence d'un gliome, la perméabilité basale de la BHE est affectée de façon hétérogène, et donc, un rehaussement de signal causé par l'agent de contraste est déjà visible à la tumeur avant toute manipulation pharmacologique, biochimique ou osmotique. Une perméabilisation de la BHE subséquente, en périphérie de la tumeur, devrait nous permettre d'apprécier une augmentation du CADV.

D'autre part, nous avons procédé à une analyse de la concentration d'agent de contraste, en fonction du temps et de l'hémisphère cérébral. Cette analyse est complémentaire et donne un aperçu plus global de la distribution des agents de contraste au cerveau. Afin d'estimer quantitativement les concentrations de gadolinium dans un protocole DCE-MRI, il est impératif d'acquérir une carte T_1 des tissus ciblés et ce, avant l'injection de l'agent de contraste. Pour y arriver, nous procédons à l'acquisition d'images en écho de gradient tout en faisant varier α (angle de bascule ou *flip angle*) pour des acquisitions successives, en utilisant le même plan (les mêmes coupes) que pour la dynamique qui suivra. Ensuite, une reconstruction voxel par voxel des images sera faite afin d'obtenir une carte des valeurs T_1 avant l'injection d'un agent de contraste. Pour plus de détails sur ces techniques d'acquisition et de mesure, le lecteur est de nouveau référé à l'ouvrage de Yankeelov et Gore (Yankeelov et Gore, 2009). La procédure initialement

rapportée dans mon mémoire de maîtrise en pharmacologie (Côté, 2007) est décrite plus en détail dans le deuxième manuscrit composant cette thèse.

Chapitre 4

Hypothèse et objectifs

Le récepteur B2 des kinines a déjà fait l'objet de cible afin de perméabiliser transitoirement la barrière hémato-encéphalique en présence d'une tumeur cérébrale, dans le but ultime d'améliorer l'acheminement de molécules thérapeutiques au site tumoral. Une fonction perméabilisante a également été suggérée pour le récepteur B1. Ce récepteur est induit et surexprimé localement sur les cellules endothéliales vasculaires dans de nombreuses pathologies inflammatoires, incluant certains types de tumeur. Ainsi, le rB1 pourrait représenter une cible pour perméabiliser la BHE tumorale. Le présent projet de recherche poursuit les investigations menées sur la caractérisation des effets perméabilisants des agonistes synthétiques des récepteurs B1 et B2 des kinines sur la BHE, dans un modèle de rat Fischer implanté d'un gliome syngénique F98 (Côté, 2007). L'expression du rB1 et du rB2 a été mesurée dans les tissus cérébraux de notre modèle animal, mais aussi dans des biopsies de gliomes humains afin d'évaluer la possibilité de transposer chez l'homme, les protocoles de thérapie mis au point chez l'animal.

4.1 Objectifs du manuscrit 1

Côté J, Savard M, Bovenzi V, Bélanger S, Morin J, Neugebauer W, Larouche A, Dubuc C, Gobeil F jr. (2009) *Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles*. Peptides 30:788-795.

Le but de cette première phase d'expérimentations était de développer de nouveaux agonistes pour le récepteur B1 des kinines. Nous nous sommes inspirés de la structure du peptide agoniste le plus actif disponible à ce moment, soit le Sar[DPhe⁸]desArg⁹BK (Rhaleb et al., 1990; Drapeau et al., 1991). Nous avons synthétisé plusieurs peptides avec

différentes modifications à la séquence peptidique de référence, afin d'améliorer leur résistance au métabolisme enzymatique (les rendre plus stables) tout en conservant, voire en augmentant, l'affinité et l'activité pour les rB1. Des essais de liaison *in vitro* sur des cellules HEK-293T transfectées avec le rB1 humain était donc à l'affiche sur le plan de l'étude, en plus d'essais de vasoconstriction *ex vivo* sur la veine ombilicale humaine exprimant le rB1 et d'essais *in vivo* de mesure de pression artérielle chez le lapin immunostimulé au LPS. Les peptides possédant les meilleures propriétés pharmacologiques sont ainsi identifiés pour des études ultérieures sur les rôles potentiels de l'activation du rB1 chez l'animal et chez l'humain.

4.2 Objectifs du manuscrit 2

Côté J, Savard M, Bovenzi V, Dubuc C, Tremblay L, Tsanaclis AM, Fortin D, Lepage Ma, Gobeil F jr. (2010) *Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe⁸Ψ(CH₂NH)Arg⁹]-BK in a F98 glioma rat model: an MRI study.* *Neuropeptides* 44(2):177-185.

Ici, nous avons voulu investiguer les effets perméabilisants de l'agoniste sélectif du rB2, [Phe⁸Ψ(CH₂NH)Arg⁹]-BK (R523), dans un modèle animal de tumeur cérébrale, le rat Fischer implanté d'un gliome F98. Pour ce faire, nous avons utilisé une nouvelle approche d'imagerie quantitative et non-invasive, l'imagerie par résonance magnétique réhaussée par un agent de contraste (deux agents de constrate différents ont été étudiés, avec des poids moléculaire différents). Nous avons également pour objectif de caractériser les niveaux d'expression du rB2 dans la tumeur, sa périphérie, ainsi que dans le tissu cérébral normal, à distance du nodule tumoral. Pour ce faire, les techniques d'immunobuvardage Western, de RT-PCR et d'immunohistochimie ont été privilégiées. Les effets systémiques vasculaires du R523 ont quant à eux été décrits par mesure directe de la pression artérielle chez le rat.

4.3 Objectifs du manuscrit 3

Côté J, Bovenzi V, Savard M, Dubuc C, Fortier A, Neugebauer W, Tremblay L, Müller-Esterl W, Tsanaclis AM, Lepage M, Fortin D, Gobeil F jr. (2012) *Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model.* PLOS ONE 7(5) : 1-17.

Ce troisième manuscrit comportait deux grands objectifs centraux: (1) détecter et localiser l'expression du rB1 au niveau des gliomes chez le rat et l'humain à l'aide d'approches variées de biologie moléculaire et cellulaire; (2) corrélérer l'expression du rB1 avec un effet perméabilisant vasculaire *in vivo* à l'aide du peptide agoniste NG29, un agoniste sélectif et stable du rB1 (voir l'article 1). Pour ce faire, nous avons une fois de plus utilisé l'IRM rehaussé par un agent de contraste (toujours avec le Gd-DTPA et le Gadomer) ainsi que la spectrométrie de masse de type ICP-MS et le marquage de l'albumine liée au bleu d'Evans.

4.4 Objectifs du manuscrit 4

Côté J, Savard M, Neugebauer W, Tremblay L, Fortin D, Lepage M, Gobeil F jr. (2013) *Dual kinin B1 and B2 activation provides enhanced blood-brain barrier permeability and anticancer drug delivery to brain tumors.* Soumis à Cancer Biology and Therapy.

Les résultats illustrés dans les manuscrits #2 et #3 ont permis d'identifier deux mécanismes d'actions différents enclenchés par les agonistes du rB1 et du rB2 lors de la perméabilisation de la BHE tumorale. Ce quatrième et dernier article met donc l'emphase sur l'activation simultanée des récepteurs B1 et B2 des kinines pour perméabiliser davantage la BHE. Nous avons développé un hétérodimère composé du NG29 (Côté et al., 2012) et du NG291, un puissant agoniste du rB2. Cette molécule a la possibilité d'activer tant le rB1 que le rB2. Nous avons comparé, toujours par IRM et ICP-MS, l'efficacité de ce dimère à favoriser l'acheminement de molécules comme les agents de contraste IRM et le carboplatin. Nous y comparons son efficacité avec le NG29 seul, le NG291 seul, et une combinaison (co-injection) de ces deux molécules, simultanément.

Chapitre 5

Manuscrit 1

Titre : Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles

Auteurs de l'article : Jérôme Côté, Martin Savard, Veronica Bovenzi, Simon Bélanger, Josée Morin, Witold Neugebauer, Annie Larouche, Céléna Dubuc, Fernand Gobeil jr.

Statut de l'article : Publié (Peptides 30:788-95, 2009)

Avant-propos :

Dans cet article, j'ai effectué plus de 90% des expérimentations et j'ai participé de manière active à la rédaction du manuscrit et à sa correction en étroite collaboration avec les auteurs Savard, Bovenzi et Gobeil. Toutefois, mentionnons que cette thèse regroupe, sous la forme d'un continuum d'études, l'ensemble des données obtenues durant mes travaux de maîtrise en pharmacologie (non publiées à cette époque) ainsi que celles développées au cours de cette thèse. De ce fait, environ les deux tiers des résultats présentés dans ce premier manuscrit ont été obtenus au cours de mon programme de maîtrise en pharmacologie (Côté, 2007). Il est tout de même inclus dans cette thèse puisque la balance des résultats y est présentée et que sa rédaction a été effectuée au cours de mon programme de doctorat. De plus, son sujet est étroitement lié avec les trois autres articles présentés dans cet ouvrage.

Résumé de l'article :

Dans ce premier manuscrit, nous avons synthétisé une série de nouveaux peptides analogues à la séquence de base Sar[D⁸Phe]desArg⁹-bradykinine, un agoniste relativement stable possédant une affinité modérée envers le récepteur B1. Nous avons ensuite évalué les propriétés pharmacologiques de ces nouveaux peptides en utilisant (1) des essais de liaison compétitifs sur des cellules transfectées transitoirement avec le récepteur B1 ou B2 des kinines, (2) des essais de vasomotricité *ex vivo* sur la veine ombilicale humaine, et (3) une évaluation *in vivo* des effets sur la pression artérielle chez le lapin immunostimulé au lipopolysaccharide. Les résultats obtenus ont montré que des modifications clés en N-terminal, ainsi qu'aux positions 3 et 5 de la Sar[D⁸Phe]desArg⁹-bradykinine mènent à des analogues agonistes puissants. À titre d'exemple, les peptides 10 (SarLys[D⁸Phe]desArg⁹-bradykinine), 18 (SarLys[Hyp³,Cha⁵, D⁸Phe]desArg⁹-bradykinin) et 20 (SarLys[Hyp³,Igl⁵, D⁸Phe]desArg⁹-bradykinin) surpassent la molécule mère en matière d'affinité, de puissance et de durée d'action *in vitro* et *in vivo*. Ces agonistes sélectifs pourront être utilisés lors de futures études chez l'animal et chez l'humain afin d'étudier les bénéfices potentiels de l'activation du récepteur B1.

Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles

Jérôme Côté¹, Martin Savard¹, Veronica Bovenzi¹, Simon Bélanger¹, Josée Morin¹, Witold Neugebauer¹, Annie Larouche¹, Céléna Dubuc¹, Fernand Gobeil jr^{1*}

¹Department of Pharmacology, Medical School
Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec, CANADA, J1H 5N4

*** : Address all correspondence to:**

Dr. Fernand Gobeil Jr., Ph.D.
Department of Pharmacology, Medical School
Université de Sherbrooke
3001, 12th Avenue North,
Sherbrooke, Québec, CANADA, J1H 5N4
Tel: (819) 564-5341
Fax: (819) 564-5400
Email: fernand.gobeil@usherbrooke.ca

ABSTRACT

There is some evidence to suggest that inducible kinin B1 receptors (B1R) may play beneficial and protecting roles in cardiovascular-related pathologies such as hypertension, diabetes, and ischemic organ diseases. Peptide B1R agonists bearing optimized pharmacological features (high potency, selectivity and stability toward proteolysis) hold promise as valuable therapeutic agents in the treatment of these diseases. In the present study, we used solid-phase methodology to synthesize a series of novel peptide analogues based on the sequence of Sar[D^{Phe}⁸]desArg⁹-bradykinin, a relatively stable peptide agonist with moderate affinity for the human B1R. We evaluated the pharmacological properties of these peptides using 1) *in vitro* competitive binding experiments on recombinant human B1R and B2R (for index of selectivity determination) in transiently transfected human embryonic kidney 293 cells (HEK-293T cells), 2) *ex vivo* vasomotor assays on isolated human umbilical veins expressing endogenous human B1R and, 3) *in vivo* blood pressure tests using anesthetized lipopolysaccharide-immunostimulated rabbits. Key chemical modifications at the N-terminus, the positions 3 and 5 on Sar[D^{Phe}⁸]desArg⁹-bradykinin led to potent analogues. For example, peptides 18 (SarLys[Hyp³,Cha⁵,D^{Phe}⁸]desArg⁹-bradykinin) and 20 (SarLys[Hyp³,Igl⁵, D^{Phe}⁸]desArg⁹-bradykinin) outperformed the parental molecule in terms of affinity, functional potency and duration of action *in vitro* and *in vivo*. These selective agonists should be valuable in future animal and human studies to investigate the potential benefits of B1R activation.

Keywords: B1 receptor, kinins, peptides, biological assays, human

1. Introduction

The kinin B1 receptor (B1R) is a member of the G-protein coupled receptor family. The kinin metabolites, desArg⁹BK and LysdesArg⁹BK, which are formed by the enzymatic cleavage of the B2R ligands bradykinin (BK) and Lys-BK (Kallidin) respectively by plasma/tissue carboxypeptidases, are endogenous ligands for this receptor. Unlike B2R, which is constitutively expressed, B1R is usually not found under physiological conditions or is physiologically inert. However, it is induced by various inflammatory mediators (i.e. cytokines, endotoxins) and tissue damage in a number of cell types including vascular endothelial and smooth muscle cells, fibroblasts and neurons [44].

Notwithstanding some conflicting reports in the literature [40, 56, 60, 62], there is evidence indicating beneficial and protecting roles of inducible kinin B1R in vascular diseases (ex. hypertension, diabetes, ischemic organ diseases) supported by gene overexpression and knockout studies and the use of selective agonists and antagonists (see comprehensive reviews [12, 28, 46] and [37, 59]). The induction and subsequent activation of B1R may be part of an important vascular self-defense mechanism against recurrent deleterious ischemic/hypoxic episodes that can be improved by ACE inhibition and AT-1 receptor blockade [12, 28, 37, 59]. In addition to its angioprotective effect, B1R may also play a role in wound-healing reparative processes with an associated pro-angiogenic response. Examples illustrating these beneficial effects include the following: (1) in Langerdorff perfused isolated rat hearts, exogenous perfusion of desArg⁹BK prior to the induction of ischemia, decreases arrhythmias [10] and protects endothelial functions in coronary arteries in the follow-up reperfusion process [6]; (2) systemic administration of the B1R stable agonist Sar[DPhe⁸]desArg⁹BK in a murine model of limb ischemia leads to reparative angiogenesis [19]. The positive contribution of newly expressed B1R to vascular re-endothelialization of wounded arteries has also been observed in a rat model of balloon angioplasty [1]; and (3) lack of B1R worsens cardiac remodeling and dysfunction after myocardial infarction [61] and kidney damage after ischemic/reperfusion injury in B1R-null mice [37]. These salutary effects in the macro- and micro-vascular networks may lie in part on the capacity of B1R agonists to promote the release of endothelial nitric oxide,

prostaglandins, and possibly endothelium-derived hyperpolarizing factors and endocannabinoids, which may serve as cytoprotective, angiogenic and dilatory factors thereby preserving oxygenation and functions of vital organs [19, 38, 39].

However, natural B1R ligands are subjected to rapid inactivation by tissue and plasma enzymes, which limit their stability and protective functions [13, 17]. Major enzymes thought to be involved in the inactivation of naturally occurring B1R agonists include the aminopeptidase M (AmM), aminopeptidase P (AmP), angiotensin-converting enzyme (ACE) and its homologue ACE2 [13, 15-17], which are especially confined to the endothelium. This susceptibility to proteolysis has provided the impetus for the development of protease-resistant, long-acting B1R agonists [17, 52]. The best-characterized peptide, Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK, exhibits a lower susceptibility toward proteolysis and a moderate affinity and potency (about 11- and 2-fold less, respectively) relative to the natural ligand LysdesArg⁹BK on the rabbit B1R [17, 42, 52]. The non absolute enzymatic resistance of Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK probably arises from hydrolysis of nonterminal peptide bonds by unidentified vascular/tissue endopeptidases [4, 34]. Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK also triggers long-lasting hypotensive responses in comparison to LysdesArg⁹BK when injected intra-arterially in lipopolysaccharide (LPS)-pretreated rabbits. The primary mechanisms underlying the hypotensive action of Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK have been elucidated and involve a decrease of total peripheral resistance and cardiac output [4]. Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK is also much less active than LysdesArg⁹BK on human B1R as determined by ligand binding (by a factor of 500 [41] to 10 000-fold [36]; transfected COS-7 cells) and functional assays (17-fold less activity; hUV) [25].

The goal of the present study was to develop desArg⁹BK peptide mimetics, more specifically of Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK, having increased potency (and eventually stability) at human B1R. Herewith, we identified a series of stable, potent B1R peptide agonists based on in vitro radioligand binding on human B1R transfected HEK-293T cells, ex vivo vasocontraction assays on isolated human umbilical veins (hUV) expressing endogenous human B1R, and in vivo blood pressure testing using anesthetized LPS-immunostimulated

rabbits. These selective agonists should be useful in future in vitro and in vivo animal and human studies to investigate the potential benefits of B1R activation.

2. Materials and methods

2.1. Solid phase peptide synthesis

All peptides were synthesized using either Fmoc (9-fluorenylmethoxy-carbonyl) or tBOC (t-butoxy-carbonyl) solid-phase chemistries carried out in automated Pioneer peptide synthesizer and Applied Biosystems 430A synthesizer, respectively. Fmoc amino acids were purchased from Novabiochem (California, USA) or Chem-Impex (Illinois, USA). Boc amino acids used in synthesis were purchased from Chem-Impex or Bachem Bioscience Inc. (Pennsylvania, USA). All other chemicals were purchased from Sigma- Aldrich (Canada). Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) and 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) were used as coupling agents in Boc and Fmoc strategies, respectively. Only protocols recommended by the instrument manufacturers were used in both types of synthesis. The pseudopeptide bond in the Phe-Ser sequence was made by overnight coupling of the Boc-Phe aldehyde to serine on the Merrifield resin in DMF containing 1% AcOH and equimolar amount of Boc-amino acid aldehyde and NaBH₃CN. The peptides were cleaved from the resin by liquid HF (in Boc strategy) or by TFA (in Fmoc strategy) and were purified on semi-preparative reverse phase C18 columns using a linear gradient of acetonitrile in water (solvents with 0.1% TFA). Peptide purity (>95%) was assessed by analytical RP-HPLC and molecular weight was verified by electrospray mass spectrometry using a VG Platform ns 8230E (Waters, USA) or Micromass TofSpec 2E (MALDI-MS, USA). Abbreviations used for amino acids follow the rules of the IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Other abbreviations and moieties are described as follows: Sar, N-methyl-glycine; Hyp, *trans*-4-hydroxy-L-proline; Phg, phenyl-glycine; Pen, penicillamine; Igl, 2-indanyl-glycine and Cha, cyclohexyl-alanine. Concentrated stock solutions of peptides (10 mM) were prepared in double distilled deionized water and stored at -20°C until use.

2.2. Animals

In vitro experiments were performed on tissues from male New-Zealand white rabbits (1.1-1.5 kg; aortae), Sprague-Dawley rats (250-300g; stomachs) and C57/black mice (18-25g; stomachs). Animals were euthanized under Ketamine/Xylazine anesthesia by cervical dislocation or decapitation in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals provided by the Canadian Council of Animal Care, and with the approval of the Animal Care Committee of the Université de Sherbrooke. In vivo experiments were carried out on anesthetized New-Zealand white rabbits.

2.3. Contraction assays on isolated peripheral tissues

Smooth muscle contraction assays of the isolated rabbit aorta (rbA) [25], rat stomach (rS) [50], mouse stomach (mS) [3] and human umbilical vein (hUV) [26] were determined as previously described. Procedures involving human umbilical cords were approved by the institutional review boards of the University of Sherbrooke Medical School. Tissues were rapidly removed, cut into strips, cleaned of fat and connective tissues, mounted vertically in siliconized 10 ml-organ baths. The baths were filled with oxygenated (95% O₂-5% CO₂) and thermo-regulated (37°C) Krebs solution (pH 7.4) of the following composition (mmol/L): NaCl 118.1, KCl 4.7, CaCl₂ 6H₂O 2.5, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 7 H₂O 1.2, NaHCO₃ 25, and D-glucose 5.5. Strips were stretched with a resting tension of either 0.5 (mS), 1.0 (rS) or 2.0 gram-weight (g-wt) (rbA and hUV) with frequent washing and tension adjustments. After a 2-hour equilibration period, the strips were challenged 3 to 4 times with the reference B1R agonist desArg⁹BK (for the mS and rS: 50 nM; for the rbA and hUV: 500 nM) to ensure stability of the response prior to the beginning of the experiments. Muscular contractions were measured isometrically with force transducers (FT03, Grass Instruments, USA) and recorded on multichannel chart recorders (Grass model 7D, USA). Cumulative concentration-response curves to B1R agonists (0.01 to 10 000 nM) were performed on the rbA and hUV while non-cumulative concentration-response curves (i.e. consecutive doses added individually following washout of the previous dose) were

produced for the agonists on the rS and mS preparations due to spontaneous contraction activities of the tissues. The concentration of agonist producing 50% of the maximal effect (EC_{50}) was determined from each curve and used as an indicator of agonist potency. For the determination of agonist efficiencies (E_{max}), a single maximal concentration of KCl (60 mM) and of an agonist (10 μ M) was added to each preparation to give a standard contraction.

2.4. Radioligand binding assays

Competitive binding experiments on recombinant human B1R and B2R were performed in transiently-transfected human embryonic kidney 293T cells (HEK-293T cells) as described in detail elsewhere [5]. Displacement binding was carried out by incubating the cells with competing B1R peptide agonists (in the range of 0.01-10,000 nM) and the radioligand [3 H]LysdesArg⁹BK (1.0 nM) for the B1R (0.3 ml final volume for 60 min at 37°C) or [3 H]BK (1.0 nM) for the B2R (0.3 ml final volume for 120 min at 4°C). Non specific binding was determined in the presence of 10 μ M of LysdesArg⁹BK or BK. After the incubation time, the cell monolayers were washed once with ice-cold PBS buffer, lysed with 0.1N sodium hydroxide (0.2 ml), and transferred into scintillation vials. Radioactivity of the samples was measured in a β -counter after the addition of a 20-fold volume (4 ml) of scintillation liquid. Data were analyzed using GraphPad computer software (PRISM software, GraphPad, USA). Binding affinities of agonists are expressed in terms of IC_{50} values: the molar concentration of an unlabeled agonist causing 50% displacement of specific binding. Under our experimental conditions, the specific binding activities of [3 H]LysdesArg⁹BK and [3 H]BK amounted to 97 and 94%, respectively, of the total binding activities (not shown). No specific binding of the radioligands to untransfected HEK-293T cells was observed (data not shown).

2.5. Blood pressure testing on anesthetized LPS-immunostimulated rabbits

The experimental model used to evaluate blood pressure lowering effects of desArg⁹-BK derivatives via B1R has been previously described [23]. Male New-Zealand white rabbits

were pretreated with LPS (50 µg/kg i.v.), a well-known inducer of B1R expression in vivo [44], 5 hrs before inducing anesthesia with sodium pentobarbital (Abbott Laboratories, Canada) given initially at 30 mg/kg i.v., through the auricular vein, and supplemented when required. The animals were tracheotomized via an endotracheal tube (PE 330) to facilitate spontaneous breathing, placed in supine position on thermostated pads (set at 37°C). Systemic arterial blood pressure was measured through a catheter (PE 50 filled with heparinized saline) inserted in the right carotid artery and connected to a Micro-Med transducer (model TDX-300, USA) linked to a blood pressure Micro-Med analyzer (model BPA-100c) and a Grass recorder (Model 7, USA). Another catheter was inserted in the right femoral vein for bolus injections (0.1 ml, 10-20s) of vehicle (isotonic saline), LysdesArg⁹BK and selected synthetic analogues randomly administered (given at 0.1, 1 and 10 nmol/kg, spaced 5-10 min apart). After each injection, the catheter was flushed with saline (3x volumes) to remove residual injected substances. There was no occurrence of tachyphylaxis. The same catheter was also used to infuse euthanasia solution (Euthanyl (240 mg/kg); Bimeda-MTC Animal Health Ltd., Canada) at the end of the experiment. For relative potency evaluation, the change in blood pressure from baseline to post-injection in individual animals was determined. The duration of action of the hypotensive compounds was estimated as the time elapsed for the blood pressure to return to its basal value following injection of the tested agents.

2.6. Statistical Analysis

Results are expressed as means ± standard error of the mean (s.e.m.) for the specified number (*n*) of preparations or animals tested. Statistical comparisons were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test or Student's *t* test for unpaired observation when appropriate. *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant in all analyses.

3. Results

3.1. Vascular reactivity of endothelium-denuded hUV to desArg⁹BK derivatives

We tested the agonist potency of synthetic desArg⁹-BK ligands toward native human B1R using the established hUV smooth muscle contractility assay [26, 34, 53, 54]. We and others previously reported that the N-terminal lysyl group is important for binding and full activity of desArg⁹-kinin metabolites at the human B1R [26, 47]. It is further confirmed here by showing that LysdesArg⁹BK (EC₅₀: 6.5 nM) is about 30-fold more potent than desArg⁹BK (EC₅₀: 204 nM) (Table 1).

An endogenous hydroxylate analogue of desArg⁹BK, the [Hyp³]desArg⁹BK, has been recently identified in human plasma by mass spectrometry [55]. This peptide (peptide 3) showed a slight increase in activity over its counterpart desArg⁹BK. The extended Lysyl version of peptide 3 showed higher activity (1.5-fold increase) than LysdesArg⁹BK while its basic D-isomer isoforms (peptides 5 and 6), which should allow protection against AmM and P, had reduced potencies. Pioneering studies of Rhaleb et al. [52] and Drapeau et al. [16] demonstrated that the isomerization of Phe at position 8, purposely made to protect against ACE activity, has no negative impact on desArg⁹BK activity based on in vitro and in vivo studies on rabbit B1R. This modification produces similar results with the human B1R (see peptide 2 vs 8) where it rather tends to increase the potency value (see peptide 1

Table 1
Characterization of desArg⁹BK-related peptide contractile activities on human umbilical veins.

Peptide sequence	Human umbilical vein hB1 EC ₅₀ (nM)
<i>Reference</i>	
1. desArg ⁹ BK (H-Arg ¹ -Pro ² -Pro ³ -Gly ⁴ -Phe ⁵ -Ser ⁶ -Pro ⁷ -Phe ⁸ -OH)	195 ± 29
2. LysdesArg ⁹ BK	6.5 ± 1.5
<i>N-terminal and/or P3 modification</i>	
3. [Hyp ¹]desArg ⁹ BK	113 ± 34
4. Lys[Hyp ¹]desArg ⁹ BK	3.8 ± 0.9
5. D[Lys ¹]desArg ⁹ BK	4.6 ± 1.7
6. D[Arg ¹]desArg ⁹ BK	10 ± 2
<i>N-terminal and/or P8 modification</i>	
7. [oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	45 ± 13
8. Lys[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	11 ± 3
9. Sar[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	48 ± 8
10. SarLys[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	0.45 ± 0.13
11. SarArg[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	0.29 ± 0.07
12. SarArgArg[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	7.9 ± 2.4
13. SarArg[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	4.8 ± 1.2
14. SarLys[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK-NH ₂	>1000
<i>N-terminal, P3, P5 and/or P8 modification</i>	
15. Sar[Gly ¹ W(CH ₂ -NH)Phe ³ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	>1000
16. SarLys[(αMe)Phe ³ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	>1000
17. SarLys[Hyp ¹ , (αMe)Phe ³ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	>1000
18. SarLys[Hyp ¹ , Cha ³ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	0.56 ± 0.13
19. SarLys[Hyp ¹ , Phg ³ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	7 ± 1
20. SarLys[Hyp ¹ , Igl ³ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	0.62 ± 0.08
21. SarLys[Hyp ¹ , Pen ³ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	26 ± 5
22. SarLys[Hyp ¹ , Cpg ³ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	1.80 ± 0.61
23. SarLys[Hyp ¹ , Dcpg ³ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	2.40 ± 0.37

Numbers are means ± S.E.M. of 5–13 experiments. All positions (P) are with respect to the amino acid positions in the native desArg⁹BK sequence (labeled peptide 1).

vs 7). Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK (peptide 9) is reported to be resistant to hydrolysis by ACE, neutral endopeptidase 24.11 and aminopeptidases [45]. In addition, it is unlikely that ACE-2 plays a dominant role in degrading Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK since the D⁸Phe substituent at position 8 should equally protect the Pro⁷-Phe⁸ peptide bond from ACE-2 cleavage. Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK presented fairly good potency (48 nM) albeit significantly lower than LysdesArg⁹BK (6.5 nM), which is in good agreement with our previous functional study [25]. The insertion of basic residues (lysyl or arginyl) at the N-terminal of Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK greatly enhanced its potency (peptides 10 and 11 vs 9) while the amidation of C-terminal carboxyl group annihilated all activity (peptide 14).

It is worth mentioning that the agonistic effect of peptide 20 showed longer duration of action relative to desArg⁹BK (Figure 2). On thorough washing-out of the agonist from the organ bath, the contractile activity of desArg⁹BK subsided within 10-20 min while that of peptide 20 persisted for more than 2h (Figure 2); peptides 18 and 22 behaved very similarly to peptide 20 (not shown). Upon further examination, the activity of peptide 20 was found specific toward human B1R as only the B1R antagonist R-892 [22], but not the TxA₂ antagonist L-670,596, the histamine H1R antagonist diphenhydramine, the BK B2R antagonist HOE-140, the adrenalin α1R antagonist prazosin, the endothelin ET-A antagonist BQ-123 (all tested at 1 μM), was effective in inhibiting peptide 20-induced hUV contraction (data not shown).

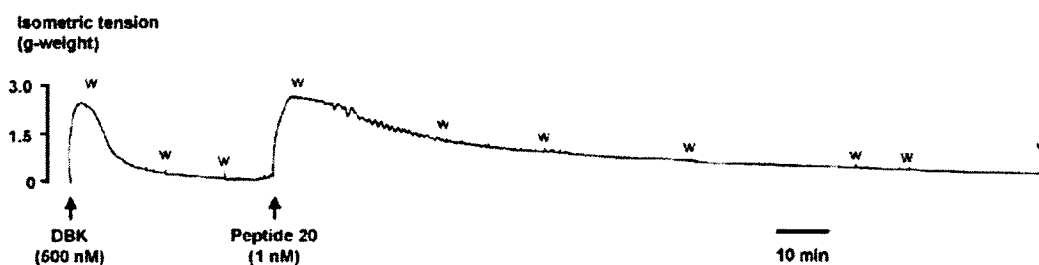


Figure 2. Typical contractions induced by desArg⁹BK and peptide 20 on the isolated endothelium-denuded human umbilical vein. W indicates washing-out of agents from the organ bath. Note the long duration of action of peptide 20, despite frequent washing of tissues. Representative tracings from 3 separate experiments.

We also estimated the efficiency (E_{max} expressed as percentage of KCl response) of some of the most potent agonists. All peptide agonists (tested at 10 μM) produced similar maximal responses in the hUV system (Figure 3), and can thus be defined operationally as full agonists.

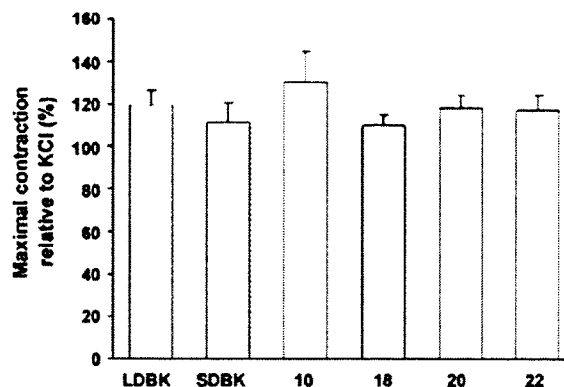


Figure 3. Comparison of the maximal responses (E_{max}) of LysdesArg⁹BK and stable agonist analogues in the isolated endothelium-denuded human umbilical vein. Contractile responses are expressed as a percentage of the contraction induced by 60 mM KCl. Abbreviations: LysdesArg⁹BK (LDBK); Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK (SDBK). The maximal effect (E_{max}) was the greatest response obtained with the agonist. Data are means \pm S.E.M. of 4 to 5 experiments. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Student's unpaired t-test.

3.2. Contraction assays using isolated peripheral tissues

Given the well-recognized cross-species differences in kinin B1R pharmacology that may account for variations in agonist efficiencies [30-32, 49, 51], we looked at whether three of the most active agonists listed in Table 1 (peptides 10, 18 and 20) exhibited differential activities on isolated tissues from different animal species (rabbit aorta and rat and mouse stomach preparations) (see Table 2). Potency values of these three peptides in eliciting smooth muscle contraction varied considerably among species being highly superior in human and rabbit than in rat and mouse. We also observed interspecies differences in the pharmacological profiles of desArg⁹BK, LysdesArg⁹BK and Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK (Table 2). These findings provide further support for the concept of extensive species-dependent heterogeneity in B1R subtypes with distinct pharmacological profiles.

Table 2
Cross-species pharmacological comparison of kinin B1R agonists.

Peptide	hUV	rbA	rS	mS
	hB1R	rbB1R	rb1R	mB1R
	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)
1. desArg ⁹ BK	195 ± 29	159 ± 25	44 ± 7	21 ± 3
2. LysdesArg ⁹ BK	6.5 ± 1.5	5.5 ± 2.4	25 ± 5	20 ± 4
9. Sar[¹⁰ Phe ⁸]desArg ⁹ BK	33 ± 9	14 ± 1	23 ± 4	10 ± 2
10. SarLys[¹⁰ Phe ⁸]desArg ⁹ BK	0.5 ± 0.1	0.9 ± 0.2	10 ± 2	25 ± 3
18. SarLys[¹⁰ Hyp ¹ , ¹ Cha ¹ , ¹⁰ Phe ⁸]desArg ⁹ BK	0.6 ± 0.1	2.1 ± 0.1	96 ± 11	210 ± 5
20. SarLys[¹⁰ Hyp ¹ , ¹ Ig ¹ , ¹⁰ Phe ⁸]desArg ⁹ BK	0.6 ± 0.1	1.9 ± 0.2	427 ± 59	400 ± 46

Data are means ± S.E.M. of 4–10 experiments.

3.3. In vitro competitive binding of desArg⁹BK analogues in transfected HEK-293T cells

The same panel of compounds was tested for their ability to compete with [³H]-LysdesArg⁹BK binding (Table 3) to HEK-293T cells expressing cloned human B1R. We observed a clear-cut structure-activity relationship with respect to agonist binding to recombinant human B1R, and agonist potency that was characterized using the functional hUV assay. There was a positive, highly significant correlation coefficient ($r = 0.8803$) between the binding affinity (Table 3) and functional potency data (Table 1). Thus the potency of peptides mediating hUV contraction appears to depend on their relative binding affinity to the human B1R. All the peptides exhibited a high index of selectivity since they did not bind to the cloned human B2R at concentrations up to 10 μ M (Table 3).

Table 3
Characterization of desArg⁹BK-related peptide binding affinities on transiently transfected human B1R- or B2R-HEK-293T cells.

Peptide sequence	HEK-293T	
	hB1R	hB2R
	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
<i>Reference</i>		
1. desArg ⁹ BK	102 ± 3	>10,000
2. LysdesArg ⁹ BK	6.3 ± 3.7	>10,000
<i>N-terminal and/or P3 modification</i>		
3. [Hyp ³]desArg ⁹ BK	29 ± 3	n.d.
4. Lys[Hyp ³]desArg ⁹ BK	3.4 ± 0.2	>10,000
5. oLys[Hyp ³]desArg ⁹ BK	3.9 ± 0.3	>10,000
6. oArg[Hyp ³]desArg ⁹ BK	21 ± 6	>10,000
<i>N-terminal and/or P8 modification</i>		
7. [oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	42 ± 4	n.d.
8. Lys[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	3.4 ± 0.6	>10,000
9. Sar[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	33 ± 10	>10,000
10. SarLys[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	0.30 ± 0.10	>10,000
11. SarArg[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	0.12 ± 0.05	>10,000
12. SarArgArg[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	1.07 ± 0.60	>10,000
13. SaroArg[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	4.9 ± 0.5	>10,000
14. SarLys[oPhe ⁸]desArg ⁹ BK-NH ₂	>10,000	>10,000
<i>N-terminal, P3, P5 and/or P8 modification</i>		
15. Sar[Gly ⁴ Ψ(CH ₂ -NH)Phe ⁵ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	>10,000	>10,000
16. SarLys[(αMe)Phe ⁵ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	>10,000	>10,000
17. SarLys[Hyp ³ , (αMe)Phe ⁵ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	>10,000	>10,000
18. SarLys[Hyp ³ , Cha ⁵ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	0.06 ± 0.02	>10,000
19. SarLys[Hyp ³ , Phg ⁵ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	28 ± 2	>10,000
20. SarLys[Hyp ³ , Igl ⁵ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	0.25 ± 0.05	>10,000
21. SarLys[Hyp ³ , Pen ⁵ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	34 ± 9	>10,000
22. SarLys[Hyp ³ , Cpg ⁵ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	0.07 ± 0.03	>10,000
23. SarLys[Hyp ³ , oCpg ⁵ , oPhe ⁸]desArg ⁹ BK	0.68 ± 0.39	>10,000

Data are means ± S.E.M. of 2-3 independent experiments, each performed in triplicates. n.d.: not determined.

3.4. In vivo evaluation of synthetic derivatives of desArg⁹BK as blood pressure lowering agents in LPS-treated rabbits

The kinin B1R relay complex hemodynamic effects in the mammalian cardiovascular system. In most animal species (ex. rabbit, dog, rat, pig, cat and monkey) investigated so far, B1R have been shown to mediate hypotensive responses upon activation with exogenous agonists administered intra-vascularly. In this line, the LPS-treated rabbit is a validated relevant animal model for the in vivo pharmacological profiling of novel selective ligands active at the inducibly expressed B1R [22, 44]. In addition, there is little doubt about the close relationship between the pharmacology of rabbit and human B1R [25, 30, 51]. Under our experimental conditions, all the agonists tested induced transient hypotensive responses whose magnitude and duration increased in a dose-dependent manner in LPS-treated rabbits (see Figure 4). Figure 4A illustrates the changes of arterial

blood pressure following intravenous (left femoral vein) bolus injections of LysdesArg⁹BK, Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK, and peptide 20. As expected from the in vitro screening results, peptides 10 and 20 were potent agonists; their hypotensive responses were significantly greater in challenged rabbits than LysdesArg⁹BK or Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK (Figure 4B). The durations of action of vasodepressor responses to a 1 nmol/kg dose of peptides 10 (20.4±3.6 min) and 20 (31.0±6.5 min) were significantly higher than those of LysdesArg⁹BK (3.4±1.5 min) and Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK (4.2±0.8 min). We did not observe any tolerance to the hypotensive effects of the agonists tested (data not shown).

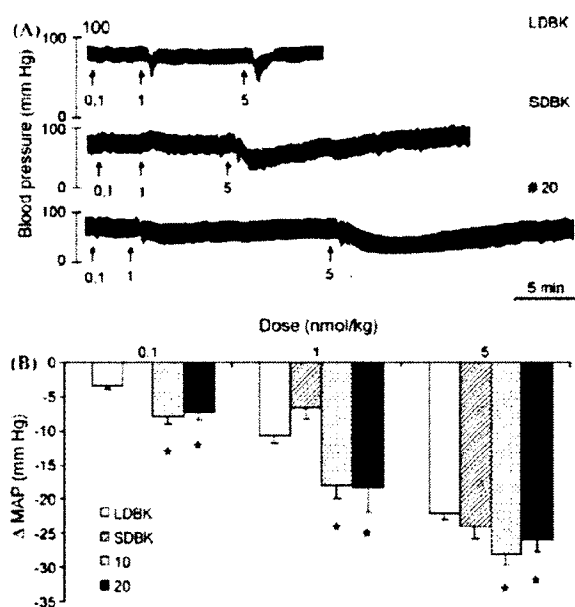


Figure 4. Blood pressure lowering effects of i.v.-administered LysdesArg⁹BK and analogues in anesthetized LPS-treated rabbits. A) Representative tracings depicting hypotensive effects of LysdesArg⁹BK (LDBK), Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK (SDBK) and peptide 20 in rabbits when given as bolus via the femoral vein. B) Histograms showing the effects of graded doses (0.1, 1, and 10 nmol/kg) of LysdesArg⁹BK and analogues on the reduction of mean arterial pressure (MAP) in rabbits. Each bar represents the average value ± S.E.M. obtained with 5-7 animals. *p < 0.05 vs corresponding LysdesArg⁹BK. Statistical analyses were performed with one-way ANOVA followed by Dunnett's test.

4. Discussion

As alluded to earlier, in view of the purported beneficial influence of B1R agonism in some experimental diseases such as: i) protection from cardiac, kidney and brain injuries [35, 37, 46], ii) promotion of endothelial regeneration in vascular diseases [1, 20], iii) induction of specific blood-brain barrier penetration in brain tumors [9, 21], iv) reduction of leukocyte invasion in multiple sclerosis [48] and v) contribution to the maintenance of normal blood pressure [18], it seemed worthwhile to attempt to expand the repertoire of stable peptide activators of the human B1R and investigate the functional spectrum and potential value of B1R agonists in these life-threatening diseases.

Herein, we report novel analogues of Sar[DPhe⁸]desArg⁹BK with improved pharmacological properties that contain N-terminal modifications and have the Phe⁵ residue replaced by a variety of non standard amino acids. These modifications were made to confer a high affinity for human B1R and to overcome metabolism of Sar[DPhe⁸]desArg⁹BK [4, 34]. Some of the synthetic amino acids used in the present study (e.g. Igl, Cpg) have been successful in creating potent peptide B1R antagonists that are also resistant to proteolysis [22, 24, 58].

We identified a number of high affinity/high potency peptide agonists of human B1R (see Tables 1 and 3). In particular, peptides 10, 11, 18 and 20 exhibited high potency in stimulating contraction of the hUV (Table 1). Interestingly, peptide 20 (as well as peptides 18 and 22) had markedly prolonged duration of action in vitro compared to the natural peptide desArg⁹BK, possibly indicating a stronger ligand-receptor interaction at the human B1R (Figure 2). In vitro ligand binding studies with recombinant B1R proteins suggest that all derivatives interact selectively with the human B1R, not human B2R (Table 3). In addition to examining agonist affinity, selectivity, potency and efficacy in vitro, complementary experiments were performed to assess in vivo activity of some of the most active compounds. These agonists such as peptide 20 were profiled in LPS-pretreated anesthetized rabbits for their hypotensive properties (Figure 4). At a dose of 1 nmol/kg, peptide 20 induced depressor actions more potently (~2 to 3-fold) and for a longer period (~8 to 10-fold) than the corresponding doses of LysdesArg⁹BK and Sar[DPhe⁸]desArg⁹BK

when administered as bolus via the femoral vein (Figure 4). Collectively, these observations are suggestive of combined effects of improved peptide stability in the circulation and higher affinity interaction with the B1R, conveyed by the implemented structural changes of the agonists. Further studies are required to determine whether the increased in vivo potency and duration of action of the novel B1R agonists relative to Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK are attributable to a bona fide gain in protease resistance in addition to an increased binding affinity. It is likely that the development of more potent, long-acting B1R agonists (and antagonists) will relate to limiting factors other than metabolism such as renal clearance [2, 22]. This impediment can be overcome by standard conjugation methods such as PEGylation, glycosylation and lipidation, which can improve pharmacokinetics and bioavailability (prolong residence time in circulation) of peptides [7, 8, 14]. Development of such conjugated peptide agonists is currently ongoing in our laboratory.

Structural features considered ideal to develop high-affinity/high-potency agonists of the human B1R can be described as follows: i) positively charged N-terminal amino group in position 0 is crucial (see potency of peptide 1 vs 2, 3 vs 4, 7 vs 8, 9 vs 10). Stereospecificity appears crucial as well, given the negative impact seen with the D-isomer versions of the lysyl and arginyl residues. Moreover, it was suggested that N-terminal extensions by two basic residues may lead to increased potencies of B1R antagonists [57]. The same trend does not seem to hold for B1R agonists (see peptide 11 vs 12). ii) The –OH group of the Hyp residue in position 3 appears important for affinity and activity because its absence lessens both of these parameters (see peptides 1 vs 3, 2 vs 4). Potent B1R analogues featuring a Hyp in position 3 may comprise an extended system of molecular H-bonds. iii) Aromaticity is not essential in position 5. Substitution of the phenyl moiety by isosteric, cyclic Cha (peptide 18) or Cpg (peptide 22) was well tolerated. This indicates that the steric and hydrophobic characters of side chains of the Phe substitutes, which should be able to occupy a common hydrophobic pocket in the receptor, are factors determining the potency of these analogues. The latter interpretation is compatible with a recent site-directed mutagenesis study of the human B1R that identified a deep hydrophobic cavity of putative interaction with Phe⁵ of kinin B1R agonists and antagonists [27]. Moreover, there

is a probable ring stacking interaction with Phe³⁰² lining the B1R cavity and the Phe⁵ of the ligand [27]. iv) A free C-terminal carboxylic group is also crucial. We observed mostly a total loss of potency and affinity when the C-terminal acid group is amidated (peptide 10 vs 14). These novel structural determinants may play a role in determining agonist potency at the human B1R.

The strong species-related differences in potency observed for some agents binding to the B1R [30-32, 49, 51] also applied to some of the new agonists (Table 2). The contractile potency of peptide 20 at the human B1R stands out in this regard; it was at least 500-fold higher than at the rat or mouse B1R while retaining similar potency toward the rabbit B1R. Another striking example is provided by the B1R peptide antagonist R715 (AcLys[DβNal⁷, Ile⁸]desArg⁹BK), which shows high antagonistic potency ($pA_2 = 8.5$) at human B1R while at the dog B1R, its potency is lower by more than three orders of magnitude ($pA_2 < 5.0$; F. Gobeil, unpublished data), based on in vitro studies on isolated hUV and dog carotid and renal arteries carried out as described previously [26, 52]. Consistent with these results, this peptide also has 1000-fold less binding affinity to dog B1R than to human B1R (>1000 nM versus 0.66 nM, respectively) as determined by competition experiments on heterologous expression systems [31, 43]. Given their species-related heterogeneity, it may not always be possible to extrapolate the efficacy and potency of B1R agonists and antagonists based on findings on laboratory animals to the human. Alternative transgenic animal models expressing the humanized form of B1R have been recently described to compensate for the interspecies variability related to the efficacy of B1R selective compounds [11, 29, 33]. Although these novel promising animal models have yet to be fully characterized, an opportunity exists to test agonist (and antagonist) compounds in vivo to screen for those with an improved pharmacological profile in the therapy of experimental diseases.

It is important to bear in mind however that treatment with B1R agonists may produce negative side effects related to their inflammatory, oedematogenic and algogenic activities [41, 44-46]. Such concern may also apply to the chronic, systemic treatment with B1R antagonists because of their potential adverse cardiovascular actions demonstrated in

animal models [6, 10, 46, 59, 61]. A careful risk/benefit assessment with the use of synthetic B1R agonists and antagonists ought to be undertaken.

In conclusion, we developed novel, highly potent and long-acting analogues of Sar[DPhe⁸]desArg⁹BK. As far as the potency at the human B1R is concerned, peptides 18, 20 and 22 turned out to be the most potent compounds (with picomolar affinity) reported to date. These selective agonists should be useful for future studies aimed at establishing therapeutic benefits of B1R activation in experimental disease models like in human diseases.

Acknowledgements

J. Côté and S. Bélanger, and M. Savard are recipients of studentships and fellowship awards, respectively, from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). F. Gobeil is a recipient of a Junior 1 Scholarship from the FRSQ, a researcher of the Canada Foundation for Innovation, and a member of the FRSQ-funded Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel. This study was supported in part by startup funding from the Faculty of Medicine of the Université de Sherbrooke and from the FRSQ, by grants from the Heart and Stroke Foundation of Québec and the Canadian Institute of Health Research.

REFERENCES

- [1] Agata J, Miao RQ, Yayama K, Chao L, Chao J. Bradykinin B(1) receptor mediates inhibition of neointima formation in rat artery after balloon angioplasty. *Hypertension* 2000;36:364-70.
- [2] Ahmad S, Ward PE. Depressor action of bradykinin agonists relative to metabolism by angiotensin-converting enzyme, carboxypeptidase N, and aminopeptidase P. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200:115-21.
- [3] Allogho SN, Gobeil F, Pheng LH, Nguyen-Le XK, Neugebauer W, Regoli D. Kinin B1 and B2 receptors in the mouse. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:1759-64.
- [4] Audet R, Rioux F, Drapeau G, Marceau F. Cardiovascular effects of Sar-[D-Phe8]des-Arg9-bradykinin, a metabolically protected agonist of B1 receptor for kinins, in the anesthetized rabbit pretreated with a sublethal dose of bacterial lipopolysaccharide. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;280:6-15.
- [5] Bélanger S, Bovenzi V, Côté J, Neugebauer W, Amblard M, Martinez J, et al. Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin B2 receptor. *Peptides* 2009;in press.
- [6] Bouchard JF, Chouinard J, Lamontagne D. Role of kinins in the endothelial protective effect of ischaemic preconditioning. *Br J Pharmacol* 1998;123:413-20.
- [7] Brown LR. Commercial challenges of protein drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2005;2:29-42.
- [8] Caliceti P, Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1261-77.
- [9] Cardoso RC, Lobao-Soares B, Bianchin MM, Carlotti CG, Jr., Walz R, Alvarez-Silva M, et al. Enhancement of blood-tumor barrier permeability by Sar-[D-Phe8]des-Arg9BK, a metabolically resistant bradykinin B1 agonist, in a rat C6 glioma model. *BMC Neurosci* 2004;5:38.
- [10] Chahine R, Adam A, Yamaguchi N, Gaspo R, Regoli D, Nadeau R. Protective effects of bradykinin on the ischaemic heart: implication of the B1 receptor. *Br J Pharmacol* 1993;108:318-22.
- [11] Connor M, Vaughan CW. Humanizing mice: catching up with elusive B1 receptors. *Br J Pharmacol* 2005;144:885-6.
- [12] Couture R, Girolami JP. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 2004;500:467-85.

- [13] Cyr M, Lepage Y, Blais C, Jr., Gervais N, Cugno M, Rouleau JL, et al. Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H275-83.
- [14] Dasgupta P, Singh A, Mukherjee R. N-terminal acylation of somatostatin analog with long chain fatty acids enhances its stability and anti-proliferative activity in human breast adenocarcinoma cells. *Biol Pharm Bull* 2002;25:29-36.
- [15] Decarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, Adam A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* 1996;271:H1340-7.
- [16] Drapeau G, Chow A, Ward PE. Metabolism of bradykinin analogs by angiotensin I converting enzyme and carboxypeptidase N. *Peptides* 1991;12:631-8.
- [17] Drapeau G, deBlois D, Marceau F. Hypotensive effects of Lys-des-Arg9-bradykinin and metabolically protected agonists of B1 receptors for kinins. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;259:997-1003.
- [18] Duka A, Duka I, Gao G, Shenouda S, Gavras I, Gavras H. Role of bradykinin B1 and B2 receptors in normal blood pressure regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E268-74.
- [19] Emanuelli C, Bonaria Salis M, Stacca T, Pintus G, Kirchmair R, Isner JM, et al. Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation* 2002;105:360-6.
- [20] Emanuelli C, Madeddu P. Targeting kinin receptors for the treatment of tissue ischaemia. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:478-84.
- [21] Gobeil F, Côté J, Bélanger S, Tremblay L, Savard M, Lepage M, et al. Real-time monitoring of kinin B1 receptor-mediated selective blood brain tumour barrier opening using MRI. *Kinin 2007, 2nd International Conference on exploring the future of vascular and inflammatory mediators; 2007; Berlin, Germany; 2007.*
- [22] Gobeil F, Jr., Charland S, Filteau C, Perron SI, Neugebauer W, Regoli D. Kinin B1 receptor antagonists containing alpha-methyl-L-phenylalanine: in vitro and in vivo antagonistic activities. *Hypertension* 1999;33:823-9.
- [23] Gobeil F, Jr., Montagne M, Inamura N, Regoli D. Characterization of non-peptide bradykinin B2 receptor agonist (FR 190997) and antagonist (FR 173657). *Immunopharmacology* 1999;43:179-85.
- [24] Gobeil F, Neugebauer W, Filteau C, Jukic D, Allogho SN, Pheng LH, et al. Structure-activity studies of B1 receptor-related peptides. Antagonists. *Hypertension* 1996;28:833-9.

- [25] Gobeil F, Neugebauer W, Nguyen-Le XK, Nea Allogho S, Pheng LH, Blouin D, et al. Pharmacological profiles of the human and rabbit B1 receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75:591-5.
- [26] Gobeil F, Pheng LH, Badini I, Nguyen-Le XK, Pizard A, Rizzi A, et al. Receptors for kinins in the human isolated umbilical vein. *Br J Pharmacol* 1996;118:289-94.
- [27] Ha SN, Hey PJ, Ransom RW, Bock MG, Su DS, Murphy KL, et al. Identification of the critical residues of bradykinin receptor B1 for interaction with the kinins guided by site-directed mutagenesis and molecular modeling. *Biochemistry* 2006;45:14355-61.
- [28] Hagiwara M, Murakami H, Ura N, Agata J, Yoshida H, Higashiura K, et al. Renal protective role of bradykinin B1 receptor in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2004;27:399-408.
- [29] Hess JF, Chen RZ, Hey P, Breese R, Chang RS, Chen TB, et al. Generation and characterization of a humanized bradykinin B1 receptor mouse. *Biol Chem* 2006;387:195-201.
- [30] Hess JF, Derrick AW, MacNeil T, Borkowski JA. The agonist selectivity of a mouse B1 bradykinin receptor differs from human and rabbit B1 receptors. *Immunopharmacology* 1996;33:1-8.
- [31] Hess JF, Hey PJ, Chen TB, O'Brien J, Omalley SS, Pettibone DJ, et al. Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B1 and B2 bradykinin receptors. *Biol Chem* 2001;382:123-9.
- [32] Hess JF, Hey PJ, Chen TB, Pettibone DJ, Chang RS. Molecular and pharmacological diversity of the kinin B1 receptor. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1747-54.
- [33] Hess JF, Ransom RW, Zeng Z, Chang RS, Hey PJ, Warren L, et al. Generation and characterization of a human bradykinin receptor B1 transgenic rat as a pharmacodynamic model. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:488-97.
- [34] Houle S, Landry M, Audet R, Bouthillier J, Bachvarov DR, Marceau F. Effect of allelic polymorphism of the B(1) and B(2) receptor genes on the contractile responses of the human umbilical vein to kinins. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294:45-51.
- [35] Ifuku M, Farber K, Okuno Y, Yamakawa Y, Miyamoto T, Nolte C, et al. Bradykinin-induced microglial migration mediated by B1-bradykinin receptors depends on Ca²⁺ influx via reverse-mode activity of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci* 2007;27:13065-73.
- [36] Jones C, Phillips E, Davis C, Arbuckle J, Yaqoob M, Burgess GM, et al. Molecular characterisation of cloned bradykinin B1 receptors from rat and human. *Eur J Pharmacol* 1999;374:423-33.

- [37] Kakoki M, McGarrah RW, Kim HS, Smithies O. Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:7576-81.
- [38] Kichuk MR, Seyedi N, Zhang X, Marboe CC, Michler RE, Addonizio LJ, et al. Regulation of nitric oxide production in human coronary microvessels and the contribution of local kinin formation. *Circulation* 1996;94:44-51.
- [39] Lagneux C, Adam A, Lamontagne D. A study of the mediators involved in the protection induced by exogenous kinins in the isolated rat heart. *Int Immunopharmacol* 2003;3:1511-8.
- [40] Lagneux C, Bader M, Pesquero JB, Demenge P, Ribuot C. Detrimental implication of B1 receptors in myocardial ischemia: evidence from pharmacological blockade and gene knockout mice. *Int Immunopharmacol* 2002;2:815-22.
- [41] Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 2005;57:27-77.
- [42] Levesque L, Harvey N, Rioux F, Drapeau G, Marceau F. Development of a binding assay for the B1 receptors for kinins. *Immunopharmacology* 1995;29:141-7.
- [43] MacNeil T, Feighner S, Hreniuk DL, Hess JF, Van der Ploeg LH. Partial agonists and full antagonists at the human and murine bradykinin B1 receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 1997;75:735-40.
- [44] Marceau F. Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology* 1995;30:1-26.
- [45] Marceau F, Regoli D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:845-52.
- [46] McLean PG, Perretti M, Ahluwalia A. Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc Res* 2000;48:194-210.
- [47] Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, et al. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* 1994;269:21583-6.
- [48] Prat A, Weinrib L, Becher B, Poirier J, Duquette P, Couture R, et al. Bradykinin B1 receptor expression and function on T lymphocytes in active multiple sclerosis. *Neurology* 1999;53:2087-92.
- [49] Regoli D, Gobeil F. Peptides receptors: From classical pharmacology to molecular biology: The case of kinin receptors. In: Geppetti P, Müller-Esterl W, Regoli D, editors. *Peptidergic G protein-coupled receptors*. Amsterdam: ISO press; 1999, p. 64-77.

- [50] Regoli D, Gobeil F, Nguyen QT, Jukic D, Seoane PR, Salvino JM, et al. Bradykinin receptor types and B2 subtypes. *Life Sci* 1994;55:735-49.
- [51] Regoli D, Rizzi A, Perron SI, Gobeil F, Jr. Classification of kinin receptors. *Biol Chem* 2001;382:31-5.
- [52] Rhaleb NE, Drapeau G, Dion S, Jukic D, Rouissi N, Regoli D. Structure-activity studies on bradykinin and related peptides: agonists. *Br J Pharmacol* 1990;99:445-8.
- [53] Rizzi A, Gobeil F, Calo G, Inamura N, Regoli D. FR 173657: a new, potent, nonpeptide kinin B2 receptor antagonist. An in vitro study. *Hypertension* 1997;29:951-6.
- [54] Sardi SP, Perez H, Antunez P, Rothlin RP. Bradykinin B1 receptors in human umbilical vein. *Eur J Pharmacol* 1997;321:33-8.
- [55] Schluter H, Mentrup D, Gross I, Meyer HE, Spengler B, Kaufmann R, et al. Identification of endogenous Des-Arg9-[Hyp3]-bradykinin in human plasma with post-source-decay matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem* 1997;246:15-9.
- [56] Souza DG, Lomez ES, Pinho V, Pesquero JB, Bader M, Pesquero JL, et al. Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. *J Immunol* 2004;172:2542-8.
- [57] Stewart JM, Gera L, Chan DC, Whalley ET, Hanson WL, Zuzack JS. Potent, long-acting, orally-active bradykinin antagonists for a wide range of applications. *Immunopharmacology* 1997;36:167-72.
- [58] Stewart JM, Gera L, Hanson W, Zuzack JS, Burkard M, McCullough R, et al. A new generation of bradykinin antagonists. *Immunopharmacology* 1996;33:51-60.
- [59] Tschöpe C, Spillmann F, Altmann C, Koch M, Westermann D, Dhayat N, et al. The bradykinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effects of AT1 blockade after experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2004;61:559-69.
- [60] Wang PH, Cenedeze MA, Pesquero JB, Pacheco-Silva A, Camara NO. Influence of bradykinin B1 and B2 receptors in the immune response triggered by renal ischemia-reperfusion injury. *Int Immunopharmacol* 2006;6:1960-5.
- [61] Xu J, Carretero OA, Sun Y, Shesely EG, Rhaleb NE, Liu YH, et al. Role of the B1 kinin receptor in the regulation of cardiac function and remodeling after myocardial infarction. *Hypertension* 2005;45:747-53.
- [62] Yin H, Chao J, Bader M, Chao L. Differential role of kinin B1 and B2 receptors in ischemia-induced apoptosis and ventricular remodeling. *Peptides* 2007;28:1383-9.

Chapitre 6

Manuscrit 2

Titre : Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe⁸Ψ(CH₂NH)Arg⁹]-BK in a F98 glioma rat model: an MRI study

Auteurs de l'article : Jérôme Côté, Martin Savard, Veronica Bovenzi, Céléna Dubuc, Luc Tremblay, Ana Maria Tsanaclis, David Fortin, Martin Lepage, Fernand Gobeil Jr

Statut de l'article : Publié (Neuropeptides 44(2):177-185, 2010)

Avant-propos :

Dans cet article, j'ai effectué toutes les expérimentations pour les figures 3, 4 et 5 et j'ai participé étroitement aux résultats illustrés aux figures 1 et 2 (avec les auteurs Bovenzi, Dubuc et Tsanaclis). De plus, j'ai participé de manière active à la rédaction du manuscrit et à sa correction en étroite collaboration avec les auteurs Savard, Bovenzi et Gobeil.

Résumé de l'article :

De nombreux efforts sont faits afin de perméabiliser transitoirement la barrière hémato-encéphalique afin de permettre l'acheminement de molécules thérapeutiques dans le système nerveux central. Un nombre considérable d'études pré-cliniques ont montrés l'efficacité du pseudopeptide [Hyp³,Thi⁵,(4Me)TyrΨ(CH₂NH)Arg⁹]-BK (Cereport, Labradimil ou RMP-7), analogue de la bradykinine, à induire une perméabilisation transitoire de la BHE et ainsi permettre l'acheminement d'une variété de drogues. Notre objectif a été de caractériser pharmacologiquement la perméabilisation de la BHE par un analogue stable, ligand du récepteur B2 [Phe⁸Ψ(CH₂NH)Arg⁹]-BK (R523), chez le rat Fischer implanté d'un gliome F98. L'originalité de cette étude tient principalement dans l'utilisation d'une technique d'imagerie quantitative jamais utilisée jusqu'à maintenant pour l'étude de la BHE. En effet, nous avons évalué ici la perméabilité de la BHE avant et après l'infusion intra-carotidienne de R523 à l'aide de l'imagerie par résonance magnétique dynamique rehaussée (DCE-MRI) avec des agents de contraste de différents poids moléculaire (Gd-DTPA 0.5 kDa; Gadomer 17 kDa). Les images pondérées T1 ont été analysées en l'absence ou en présence de réhaussement de contraste dans la tumeur et en périphérie de celle-ci et traitées afin d'obtenir un volume de distribution de l'agent de contraste (CADV), indicateur de la perméabilité vasculaire.

Les résultats présentés dans cette étude montrent que l'agoniste R523 augmentent, de manière dose-dépendante, les CADV du Gd-DTPA ainsi que du Gadomer. Cette augmentation de CADV a été prévenue par l'antagoniste du récepteur B2 HOE140 ainsi que par l'inhibiteur des NO synthase L-NA, mais non par l'antagoniste du récepteur B1 R892 ni par l'inhibiteur des cyclo-oxygénases Meclofenamate. De plus, la perméabilisation de la BHE dure moins d'une heure et est accompagnée d'une chute de pression artérielle et d'une augmentation du rythme respiratoire.

Ces résultats nous ont permis de conclure que le R523 permet l'extravasation d'agents macro-moléculaire (≤ 17 kDa) dans les tissus tumoraux en induisant une

perméabilisation transitoire et sélective de la BHE tumorale par des mécanismes dépendants du rB2 et du NO.

SELECTIVE TUMOR BLOOD-BRAIN BARRIER OPENING WITH THE KININ B2 RECEPTOR AGONIST [Phe⁸ψ(CH₂NH)Arg⁹]-BK IN A F98 GLIOMA RAT MODEL: AN MRI STUDY

Jérôme Côté¹, Martin Savard², Veronica Bovenzi², Céléna Dubuc², Luc Tremblay¹, Ana Maria Tsanaclis³, David Fortin⁴, Martin Lepage¹, Fernand Gobeil Jr^{2*}

¹Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, ²Department of Pharmacology, ³Department of Pathology, ⁴Department of Surgery, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4.

***Correspondence to:**

Dr. Fernand Gobeil jr, Ph.D.

Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke

3001, 12th Avenue North, Sherbrooke

QC, Canada, J1H 5N4

Tel: (819) 564-5341

Fax: (819) 564-5400

Email address: Fernand.Gobeil@USherbrooke.ca

Keywords: Kinins, G protein-coupled receptor, brain cancer, vascular permeability, MRI, rat

Number of figures: 5

Contract grant sponsors: HSFQ (FG) and CIHR (FG, ML, DF)

Contract grant numbers: MOP# 89832 (FG), MOP#81358 (FG, ML, DF)

Abstract

Treatment of malignant glioma with chemotherapy is limited mostly because of delivery impediment related to the blood-brain barrier (BBB). One approach for transporting drugs across the BBB involves the activation of bradykinin-B2 receptors (BK-B2R). Our objective was to pharmacologically characterize the BBB permeability induced by the synthetic biostable BK-B2R analogue [Phe⁸ψ(CH₂NH)Arg⁹]-BK (R523) in F98 glioma-implanted Fischer rats. On day 10 post-inoculation, we detected the presence of B2R in the tumor cells and the peritumoral microvasculature (RT-PCR and immunohistochemistry). We assessed BBB permeability before and after the intracarotid (i.c.) infusion of R523 (0.1 ml/min for 5 min; 2.5, 10, and 50 nmol/kg/min) using non-invasive dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) with the different sized-contrast agents Gd-DTPA (0.5 kDa) and Gadomer (17 kDa) (0.25 mmol/kg via the caudal vein). *T*₁-weighted images were analyzed for the presence or absence of contrast enhancement within and surrounding the tumor area and mathematically processed to yield a contrast agent distribution volume (CADV), which was used as an indicator of vascular permeability. Our results showed that the agonist R523 increased, in a dose-dependent manner, the CADV indexes of Gd-DTPA and Gadomer, with a maximum 2-fold increase in brain uptake of both CA. The increase in CADV induced by R523 (10 nmol/kg/min) was prevented by the B2R antagonist HOE140 (20 nmol/kg/min, i.c.) and the nitric oxide synthase inhibitor L-NA (5 mg/kg, i.v.) but not by the B1R antagonist R892 (20 nmol/kg/min, i.c.) or the cyclooxygenase inhibitor Meclofenamate (5 mg/kg, i.v.). The BBB permeabilizing effect of R523 (10 nmol/kg/min) lasted for less than one hour and was accompanied by a dose-related fall in arterial blood pressure. We concluded that R523 allows the extravasation of hydrophilic macromolecular agents (≤17kDa) into tumor tissues by inducing selective tumor BBB permeability via B2R- and NO-dependent mechanisms.

1. Introduction

The treatment of malignant glioma with chemotherapeutic agents is complicated by the presence of the blood-brain barrier (BBB), which basically consists of a monolayer of polarized and specialized endothelial cells sealed by complex tight junctions. The intact BBB prevents the passage of ionized water-soluble substances with molecular weights >180 Daltons (DA). Most effective chemotherapeutic agents currently available have molecular weights ranging from 200 to 1,200 Da. The integrity of the BBB is heterogeneous in the malignant tumor, being leaky in the center and more impermeable in the actively proliferating edge and further away from the tumor nodule (Rapoport, 2000; Neuwelt, 2004). The amount of chemotherapeutic agent reaching these latter areas is negligible (Fortin, 2004). Thus, the pernicious infiltrative behavior of malignant gliomas in surrounding healthy brain tissues, which makes complete surgical resection nearly impossible, remains the central therapeutic challenge of gliomas (Neuwelt, 2004).

Over the years, different strategies have been attempted to permeabilize the BBB to allow chemotherapeutic agents to reach and eradicate individually infiltrating glioma cells. These include disrupting the BBB using hyperosmotic solutions (Rapoport, 2000; Neuwelt, 2004) and G proteins-coupled receptor (GPCR)-mediated systems including the bradykinin-B2 receptor (BK-B2R) (e.g., adenosine, leukotriene C4, histamine, and BK) (Black, 1995). Activation of B2R can cause vasodilatation, hypotension, and vascular permeability in many organs, including the brain (Wahl et al., 1999). A number of preclinical studies have described the effectiveness of the pseudopeptide BK analogue [Hyp³,Thi⁵,(4Me)Tyr⁸ψ(CH₂NH)Arg⁹]-BK (Cereport, or labradimil; formerly RMP-7) in inducing transient permeation of the BBB leading to an increase in the delivery of a variety of experimental therapeutic agents such as methotrexate, borophenylalanine, carboplatin, cytokines, and cyclosporine (Black, 1995; Emerich et al., 2001). This synthetic peptide agonist was developed to circumvent metabolic instability thereby improving in vivo activity of native BK while maintaining high selectivity for B2R (Emerich et al., 2001). Unfortunately, clinical studies involving intravenous Cereport in combination with a carboplatin chemotherapy regimen did not show any additional benefits in patients with

malignant glioma (Prados et al., 2003; Warren et al., 2006). Although the negative clinical Phase 2 results may be due to sub-optimal intravenous dosing of Cereport and/or the choice of the combined chemotherapy agent, it is also uncertain whether the tumor models, typically C6, 9L and RG2, used in the preclinical studies sufficiently mirror the BBB characteristics and aggressiveness of tumors in patients (Kemper et al., 2004; Bryant et al., 2008). Moreover, there is currently a strong interest in exploring combination therapy for treating malignant brain cancer. This includes testing combinations of new promising molecularly targeted agents affecting different signal transduction pathways (e.g. anti-EGFR kinase) pertaining to mitosis, survival, chemoresistance, adhesion, invasion and angiogenesis, and combination with cytotoxic chemotherapy and/or radiotherapy (Adamson et al., 2009; Schor, 2009). This provides an opportunity to reassess the use of B2R agonists as a provascular strategy to potentially facilitate delivery of these antiglioma agents, in combined modality treatment, with an original laboratory animal model for preclinical evaluation.

As indicated above, many rodent glioma models (e.g., 9L, C6, T9, RG2 and F98) are available to assess the efficacy of innovative approaches for the treatment of brain tumors (Barth, 1998). The Fischer/F98 rat glioma model is particularly attractive for testing new therapeutic and diagnostic modalities. When implanted in their syngeneic host (Fischer rats), F98 glioma simulates the behavior of human gliomas in terms of their highly invasive pattern of growth, immunoinhibitory activity, resistance to a number of therapeutic modalities, and uniform lethality (Barth, 1998; Mathieu et al., 2007; Barth and Kaur, 2009).

In early research, analytical methods for the determination of BBB permeability in rat models of glioma were mainly based on quantitative autoradiography using radioactive-labeled tracers (Asotra et al., 2003). More recently, the dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) has emerged as an alternative promising method for convenient follow up of tumor burden, responsiveness to therapy and the precise localization and quantitative expression of BBB permeability changes in an

uncompromized BBB, with the advantage of no radiation exposure, high spatial resolution and non-invasiveness (Ferrier et al., 2007).

In the present study, we sought to investigate the BBB permeability and the hypotensive effects of a selective B2R agonist using the F98 rat glioma model. We used non-invasive DCE-MRI as a novel quantitative technique to monitor changes in vascular permeability in response to the biostable, selective B2R agonist [Phe⁸ψ(CH₂NH)Arg⁹]-BK (R523) (Drapeau et al., 1988; Bélanger et al., 2009) in F98 glioma-implanted rats.

2. Experimental procedures

2.1. Solid phase peptide synthesis

All peptides were synthesized by solid-phase methodology using the Fmoc (9-fluorenylmethoxy-carbonyl) strategy on a Pioneer peptide synthesizer or t-Boc (t-butoxy-carbonyl) strategy on an Applied Biosystems 430A synthesizer according to Bélanger et al. (2009). Peptide purity (>95%) was assessed by analytical RP-HPLC, and molecular weights were verified by electrospray mass spectrometry using a VG Platform ns 8230E (Waters, Milford, MA). Stock solutions (10 mM) of peptides and other agents were prepared in double-distilled water and stored at -20°C until use. The stock solutions were diluted in sterile 0.9% saline prior to each experiment.

2.2 Animals

Male Fischer 344 rats (n= 75) (Charles River Laboratories, QC, Canada) weighing 225-275g were used. The study was conducted in accordance with Canadian Council of Animal Care guidelines, and with the approval of the Animal Care Committee of the Université de Sherbrooke.

2.3. Cell culture

The F98 glioma cell line was originally derived from transformed fetal CD Fischer rat brain cells following exposure to ethyl-nitrosourea on the 20th day of gestation (Barth, 1998). F98 glioma cells (ATCC, CRL-2397) were grown in monolayers in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin mixture under standard culture conditions. The implantation solution was prepared by trypsinization of the cells followed by resuspension in FBS-free DMEM (1×10^4 cells in 5 μ l).

2.4. RT-PCR

Brain tumors and control homologous tissue from the contralateral hemisphere were resected from the brains of F98-implanted rats at day 10 post-implantation. Resected samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used. RNA was extracted using Qiagen RNeasy mini kits according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was evaluated by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The RNA (2 μ g) was used for first-strand cDNA synthesis using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Canada). The oligonucleotide primers for amplifying the kinin rat B2R and 18S (internal control), and the length of the expected PCR products (in parentheses) were as follows: B2: F 5'-GCC ATC ACC ATC GCC AAT AAC TTC-3', R 5'-CTG GAA AGG AAA CCA ACA CAG CAC-3' (522 bp); 18S : F 5'-GTG CAT GGC CGT TCT TAG TTG GTG-3', R 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CGA CGG-3' (401 bp). Amplification reaction mixtures contained 1x amplification buffer, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM dNTPs, 400 nM primers, and 1 U of Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen, Canada). A sample without cDNA served as a negative control. The PCR products were quantified using an Agilent 2100 Bioanalyzer as described previously (Gobeil et al., 2006; Savard et al., 2008).

2.5. Immunohistochemistry

At day 10 post-inoculation, F98-implanted rats were anesthetized with 2% isoflurane and transcardially perfused with 60 ml of phosphate-buffered saline (PBS;

0.01M phosphate-buffered 0.9% NaCl solution, pH 7.6) followed by perfusion with 150 ml of 4% formaline. The brains were removed and placed in 4% formaline for 24 h. A 5-mm slice containing the tumor was then paraffin-embedded, and 3 μ m sections were mounted on positively charged microscope slides for immunohistochemical labeling of B2R. Slides were deparaffinized in xylene and rehydrated. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min. To retrieve antigens, the sections were boiled in citrate buffer (pH 6) in a microwave oven for 5 to 7 min. After cooling to room temperature, the sections were incubated in Tris-buffered saline-0.1% Tween 20 (TBS-T, pH 7.6) containing 5% bovine serum albumin (BSA) and 5% normal goat serum (NGS) (Wisent) for 30 min. The sections were then incubated overnight at 4°C with a primary antibody (anti-B2R polyclonal antibody: LS-A797; LifeSpan Biosciences) (1:50 in PBS-1% BSA, pH 7.6) that recognizes the C-terminal domain of human B2R. The primary antibody was removed by thoroughly washing with TBS-T. The secondary antibody (sheep anti-rabbit, 1:100 in PBS-1% BSA; Serotec) was added and the sections were incubated for a further 1 h at room temperature. Diaminobenzidine (Roche) was used as the chromogen. Nuclei were counterstained with hematoxylin. Specificity of the anti-B2R antibody is described elsewhere (Savard et al., 2008; Bélanger et al., 2009). Omission of the primary antibody served as a negative control.

2.6. Glioma cell inoculation

Fischer rats were anesthetized with ketamine:xylazine (87 mg/kg:13 mg/kg, i.p.). The implantation procedure was performed according to Mathieu et al. (2007). Briefly, glioma cells (1×10^4) were injected into the region of the right caudate nucleus using these coordinates: 3 mm lateral and 1 mm anterior to the bregma, and 6 mm below the external table. The scalps were closed using a running suture. To reduce the pain caused by the incision, lidocaine (5 mg/kg) was injected sub-cutaneously at the site of incision before the animal awoke. The tumors were allowed to grow for 10 days. The success rate of implantation was 100% as all the F98-inoculated animals developed brain tumors measurable by histology and/or MRI (not shown). Mathieu et al (2007) reported a mean survival time after inoculation of 25.3 ± 4.6 days, under these experimental conditions.

2.7. BBB disruption procedure

Animals were anesthetized using 1.5 l/min of oxygen containing isoflurane (3% for induction and 2% for maintenance). All surgical procedures were performed on a heating pad to avoid per-procedural hypothermia and warm air from a feedback-controlled animal monitoring system (SA Instruments, Stony Brook, NY) was blown onto the animals inside the MRI scanner to maintain their body temperature at 37°C. The caudal vein was catheterized to enable the injection of the contrast agent (CA). The external carotid artery was then catheterized in a retrograde fashion using PE-50 intramedic tubing, with the tip of the catheter at the bifurcation to allow the B2R agonist R523 (or other agents) to be injected into the internal carotid directly to the right implanted hemisphere of the brain. Animals received a single intracarotid infusion (with a volume kept constant at 500 µl) of vehicle (sterile 0.9% saline), R523 (0.1 ml/min for 5 min; 2.5, 10, or 50 nmol/kg/min), or R523 (10 nmol/kg/min) in combination with the peptide B2R antagonist DArg[Hyp³,Thi⁵,DTic⁷,Oic⁸]BK (HOE140: 20 nmol/kg/min) (Wirth et al., 1991) or the peptide B1R antagonist AcLys[(^αMe)Phe⁵,DβNal⁷,Ile⁸]desArg⁹BK (R892: 20 nmol/kg/min) (Gobeil et al., 1999). In other experiments, animals were pretreated with the nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NA (5 mg/kg) (Sigma) or with the cyclooxygenase (COX) inhibitor Meclofenamate (5 mg/kg) (Sigma) (i.v. given as bolus via the caudal vein), 30 minutes prior to disrupting the BBB with R523 (10 nmol/kg/min).

2.8. DCE-MRI and image post-processing

MRI studies were conducted at the Centre d'imagerie moléculaire de Sherbrooke with a Varian 7T small animal scanner (Varian Inc., Palo Alto, USA) using 210/120 mm gradient coils (30 G/cm) and a 63-mm volume RF coil. Typically, 10 axial T_1 -weighted slices of 1.5-mm thickness, with a field of view of 4 x 4 cm², a matrix size of 128 x 128, a repetition time of 100 ms, an echo time of 2.5 ms, 4 averages, were acquired. A preprocedure T_1 map was acquired using a multiflip angle approach and flip angle values of 10, 20, 25, 35, and 50 degrees to enable quantitation of the data. Then, 50 sets of T_1 -

weighted images using the same sequence and $\alpha = 30^\circ$ were acquired continuously before, during, and after CA injection with a temporal resolution of ~ 51 s.

DCE-MRI was first performed using a single bolus injection (143 mM, 500 μ l over 1 min), given after the first third of 50 scans, of either Gd-DTPA (Magnevist, 0.5 kDa; Bayer HealthCare Inc.) or Gadomer (~ 17 kDa; Bayer HealthCare Inc.) in the caudal vein to determine the extent of BBB permeabilization in and around the tumor. After a delay (4 h for Gd-DTPA and 12 h for Gadomer), a second MRI session using the same concentrations and volumes of CA immediately following the pharmacological BBB disruption procedure described above. Previous control experiments showed that Gd-DTPA and Gadomer are completely washed out of the brain after 4 and 12 h, respectively. These gadolinium-based CA are used as intravascular tracers in the brain and are believed to be non-toxic, non-actively transported and cleared from the body through the kidney (Barnhart et al., 1987; Misselwitz et al., 2001).

Post-processing of the MRI data was performed using MATLAB® (The MathWorks, 2007) and a home-made Matlab image viewer. Both sets of anatomic MR images were analyzed for the presence or absence of contrast enhancement within and surrounding the tumor area, and were processed to yield quantitative CA distribution volume (CADV) values (in mm^3), which were used as indicators of vascular permeability. A region of interest was first drawn, incorporating both hemispheres of the brain for each slice where the tumor was visible. The maximal intensity value of voxels in the contralateral hemisphere was chosen as the minimal threshold value. A region of interest was drawn in the middle of the tumor where the signal was maximal and the mean intensity value represented the maximal threshold value for subsequent analyses. The CADV was calculated for the series of images by adding the volume of each voxel with an intensity exceeding the maximal threshold and by adding a partial volume proportional to the signal enhancement for the voxels whose intensity was between the two thresholds. The difference between the maximal CADV determined from the first set of images acquired (contrast without BBB disruption) versus the maximal CADV determined from the second set (contrast + BBB disruption procedure) for each animal was determined. The MRI

signals were also calibrated in terms of the concentration of Gadomer, determined using the precontrast T_1 map and the relaxivity of Gadomer at 7T ($8.74 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) as previously determined in our laboratory. The resulting concentration-time curve of every voxel was integrated over time after injection. We defined this integrated value ($\text{mM} \times \text{min}$) as the exposure of the brain to Gadomer. The mean Gadomer concentration into a brain hemisphere represents the mean value of every voxel located in a manually delineated region of interest, corresponding to the whole hemisphere.

2.9. Arterial blood analysis

Blood samples were collected at different time points (via the femoral artery) following Gd-DTPA i.v. injection (1, 3, 5, 15, 30, 60, and 120 min) in F98 implanted-rats submitted to an intracarotid infusion of vehicle or R523 (10 nmol/kg/min for 5 min). Samples were centrifuged to isolate plasma (12,000 rpm, 5 min at 4°C), diluted 400-fold with 0.5% v/v H_2NO_3 and analysed by inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS) (SCIEX ELAN, PerkinElmer) to measure Gd concentrations and create time-elimination curves of Gd-DTPA (Brown et al., 2007).

2.10. Arterial blood pressure monitoring

The effect of the B2R agonist R523 on arterial blood pressure was measured in F98 implanted-rats. Animals were anesthetized and catheterized as described above for the BBB disruption procedure. Another catheter (PE 50 filled with heparin 1000U/ml) was inserted in the right femoral artery to monitor arterial blood pressure. The catheter was connected to a Micro-Med transducer (model TDX-300, USA) linked to a blood pressure Micro-Med analyzer (model BPA-100c) and a Grass recorder (Grass, Model 7, USA) (Bélanger et al., 2009). The agonist R523 was infused into the right external carotid (i.c.) as described above. At the end of experiment, the femoral catheter was used to infuse euthanasia solution (Eutanyl 240 mg/kg, Bimeda-MTC Animal Health Ltd.). The change in mean arterial pressure (MAP) from baseline to post-infusion in individual animals was determined. Under our experimental conditions, the isoflurane-anesthetized rats had an

average MAP of 78 ± 3 mmHg (1 mmHg=133.3 Pa), a systolic pressure of 94 ± 6 mmHg, a diastolic pressure of 64 ± 2 mmHg and a heart rate of 340 ± 21 beats/min.

2.11. Statistical analysis

Unless otherwise stated, the results are expressed as means \pm standard error of the mean (S.E.M.) for the specified number (n) of animals tested. Statistical comparisons were analyzed using a Student's t-test for unpaired observations. A p-value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Bradykinin B2R is over-expressed in brain tumor tissues of F98 glioma-bearing rats.

At 10 days post-inoculation, we determined B2R mRNA and protein levels in rat brain tumor and normal tissues by quantitative RT-PCR (Fig. 1) and immunohistochemistry (Fig. 2), respectively. We detected an increase of B2R mRNA expression (~1.4-fold) in the rat tumor relative to autologous contralateral tissues using our designed primer sets (Fig. 1). No specific band was obtained with RNA from RT-untreated samples (not shown). In accordance with RT-PCR data, we observed consistent and intense staining of B2R in rat glioma (Fig. 2A) and islets of tumor cells invading the contiguous normal brain tissue (Figs. 2B and E), many of which forming perivascular clusters (Fig. 2D); signals for B2R-like immunoreactivity were predominantly cytoplasmic with occasional perinuclear/nuclear localization (Fig. 2A; insert). A strong B2R staining was observed in endothelial cells (at both the luminal and adluminal surfaces) of cerebral microvessels located in the vicinity of the tumor (Figs. 2C-E). Most of these microvessels were identified as arterioles and venules. We were unable to positively identify B2R staining on capillaries due to magnifying power limits of the technique. It is noteworthy that the B2R immunoreactivity in microvessels of the contralateral hemisphere was significantly reduced or even absent (Fig. 2F); although this does not preclude the presence

of B2R in vascular (and other brain) structures at very low levels and their potential functional importance owing to the low sensitivity of the immunohistochemistry assays. The vast majority of neurons in both cerebral hemispheres were also positively stained with the anti-B2R antibody (Figs. 2B-F), which is in agreement with previous studies (Chen et al., 2000; Arganaraz et al., 2004). By contrast, no staining was observed in control experiments when the primary B2R antibody had been omitted (not shown).

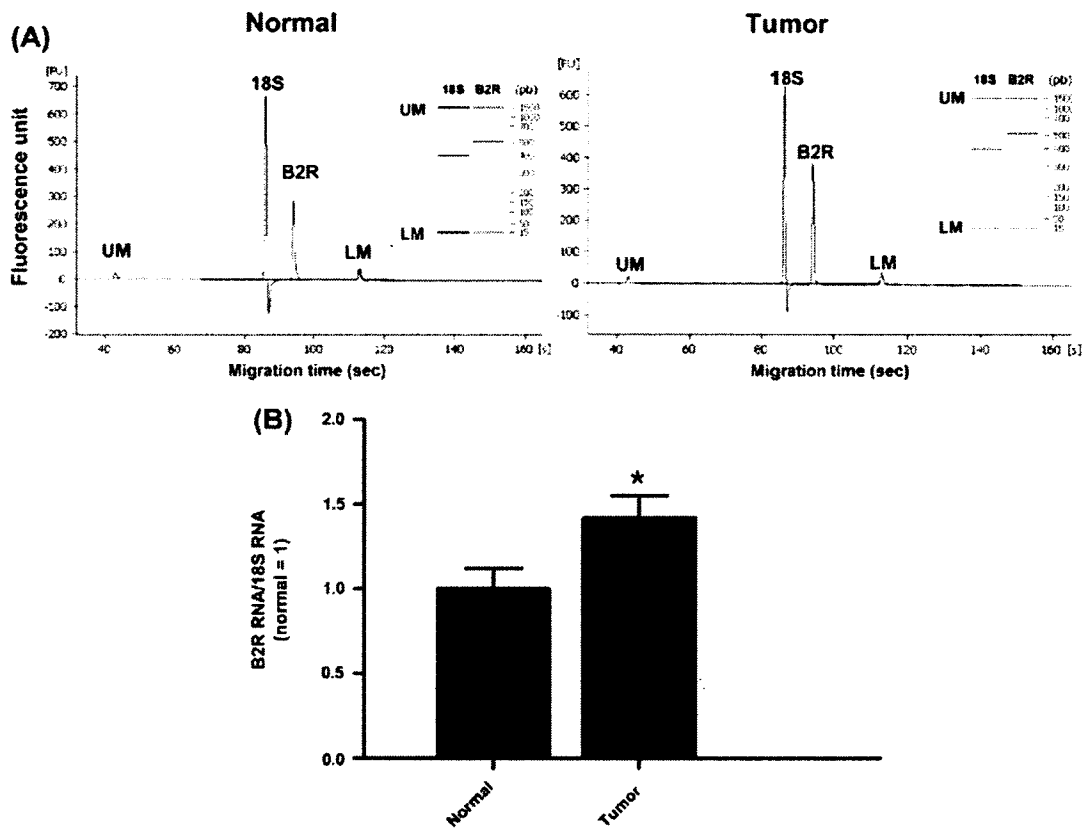


Figure 1 - B2R mRNA levels in rat tumor and control brain tissue assessed by RT-PCR. (A) Representative electropherograms and gel-like images of RT-PCR products amplified from one rat brain tumor and the corresponding control tissues are shown. LM and UM correspond to the lower and upper internal markers provided with the Agilent DNA LabChip 1000. (B) Histogrammic representation of B2R mRNA levels from multiple autologous control and tumoral tissues. For each brain sample, quantified RT-PCR values were normalized to that of 18S level. * $p < 0.05$ compared to normal brain tissues.

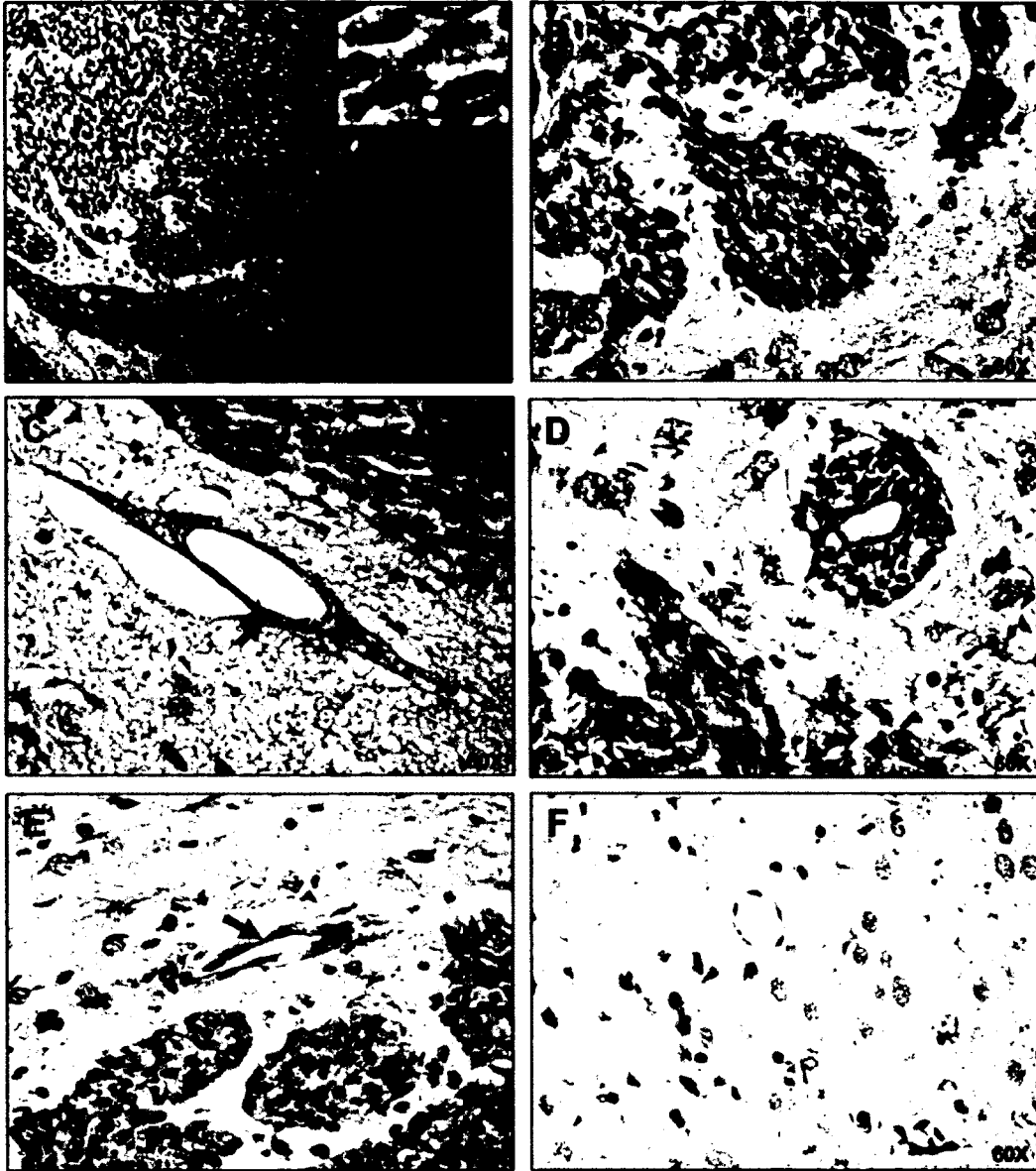


Figure 2 - Immunohistochemical staining of rat brain tumor and normal tissues with an anti-B2R antibody (A-F). (A) Low and (B) high magnification photomicrographs of tumor cells in the implanted right hemisphere. Insert: Representative field inside the tumor taken with a 100x objective. Note the predominant diffuse cytoplasmic B2R staining with sporadic nuclear immunoreactivity (black arrow). White arrow heads indicate positive B2R immunolabeling in neuronal cells. (C-E) Photomicrographs illustrating positive B2R immunoreactivity in microvascular endothelial cells adjacent to the tumor (black arrows). Note the presence of tumoral cells surrounding the vessel in (D). (F) Photomicrograph of B2R immunoreactive staining mostly of neurons in the contralateral hemisphere. Negative controls with no primary antibody showed no staining (not shown). Magnification as indicated. Photomicrographs were equalized in terms of contrast, brightness and gamma using ImagePro Plus 5.1.

3.2. The B2R agonist R523 induces tumor BBB permeability in F98 glioma-bearing rats: Role of B2R and NO in mediating R523 responses.

We used DCE-MRI with the low molecular weight CA Gd-DTPA (0.5 kDa) to evaluate functional tumor vascular responses to the B2R agonist R523 in F98 glioma-bearing rats at day 10 post-inoculation (Figs. 3 and 4). A bright and homogenous contrast enhancement was consistently observed at the tumor in the Gd-DTPA-enhanced images (see the axial contrast-enhanced T_1 -weighted MR image; Fig. 3A, left panel), which can be explained by the presence of an impaired BBB allowing CA to leak out of the microvascular system. The signal at the tumor was nearly isotense with the normal brain in the unenhanced T_1 -weighted MR images (not shown). The CA enhancement signals were more pronounced in the central core and the peripheral rim of the tumor relative to baseline following i.c. infusion of R523 (10 nmol/kg/min for 5 min) (Fig. 3A, left panel), which translated to a larger CADV (Fig. 3A, right panel). The R523 treated group of animals showed a significant increase of CADV (~43%) (Fig. 3B). Signal intensities of the normal brain parenchyma from the contralateral hemisphere remained at baseline following the administered dose of R523. The increase of CADV was not observed when the vehicle was infused and was completely blocked by concomitant infusion of an excess of the B2R antagonist HOE140 (20 nmol/kg/min for 5 min) with the agonist (Fig. 3B) implying that B2R play a major role in mediating R523 responses. Moreover, administration of R523 caused no significant change, at any time points, in plasma Gadolinium concentration, as measured with the ICP-MS analytic method (Fig. 3C).

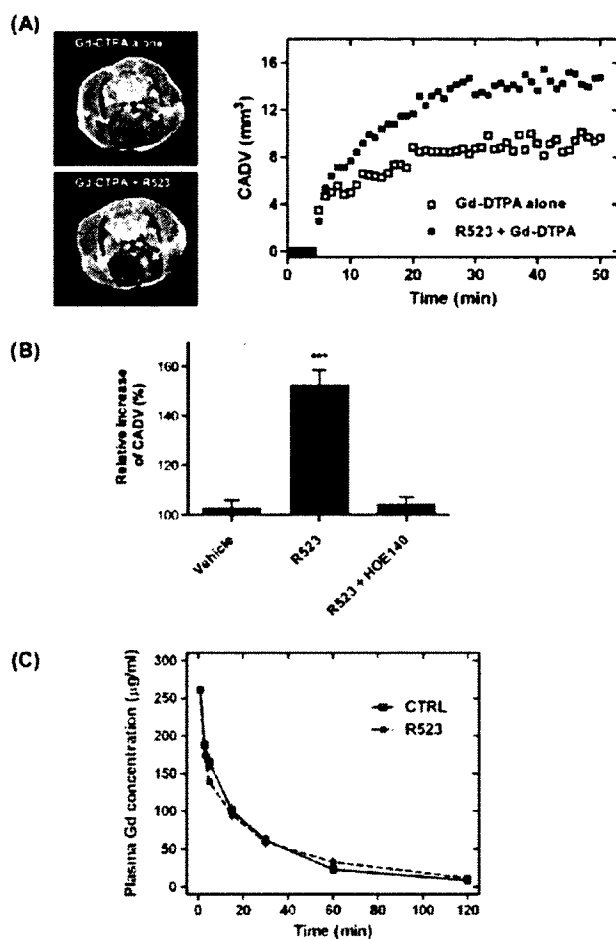


Figure 3 - R523-mediated BBB disruption in F98 glioma-bearing rats assessed by DCE-MRI using Gd-DTPA. (A) Representative axial Gd-DTPA-enhanced T_1 -weighted MR images depicting the brain of an F98-implanted rat before and after R523 treatment (10 nmol/kg/min for 5 min i.c.) (left panels). Note the increase in the signal intensity at the tumor (white arrows). CADV calculated from the corresponding sets of images (1 image / 51 s for 50 min) (right panel). (B) Increase in CADV relative to CA alone following the infusion of the vehicle, R523 (10 nmol/kg/min) or R523 (10 nmol/kg/min) + HOE140 (20 nmol/kg/min). Each bar represents the mean \pm S.E.M. for 4 to 6 experiments. *** $p < 0.001$ compared to vehicle-treated animals. (C) Mean plasma concentration of Gadolinium (of Gd-DTPA) versus time in F98 glioma-bearing rats submitted or not to an i.c. infusion of vehicle or R523 (10 nmol/kg/min for 5 min) using the ICP-MS method. Value represents the mean \pm S.D. obtained with 3 animals.

To obtain insight into the degree of vascular leakage of the tumor at baseline and following BBB opening with R523, we repeated the above MRI experiments using the CA Gadomer, which has a higher molecular weight (~17 kDa) than Gd-DTPA (Fig. 4). A

similar enhancement pattern at the tumor was observed with Gadomer after a single i.v. injection (Fig. 4, left panel), indicating that R523 can induce extravasation of hydrophilic macromolecular agents as large as 17 kDa into tumor tissues. While the rates of distribution were approximately identical, the distribution of Gadomer stabilized more rapidly than that of Gd-DTPA (see Figs. 3 and 4, right panels), which could be attributed to a decreased ability of Gadomer over Gd-DTPA to passively diffuse into the interstitial space (Verhoye et al., 2002). This property of Gadomer may confer an advantage over Gd-DTPA for the estimation of CADV parameters. The i.c. infusion of R523 increased CADV indexes of Gadomer within rat glioma and brain tissue surrounding the tumor in a dose-dependent manner (Figs. 4A and B). At the highest dose tested (50 nmol/kg/min) of R523, non-specific contrast enhancements could occasionally be seen in the contralateral hemisphere (not shown).

The R523-induced increase of CADV was abolished by co-infusing R523 with HOE140 but not with R892, and was prevented by a pretreatment with L-NA but not with Meclofenamate (Fig. 4B). This suggests that the BBB permeability response to R523 in rat glioma occurs via B2R- and nitric oxide (NO)-dependent mechanisms. Furthermore, no significant relative increase in CADV was seen when Gadomer was injected 60 min after the R523 infusion had begun (10 nmol/kg/min) (Fig. 4C), which suggests that the BBB permeabilizing effect of R523 does not last more than one hour.

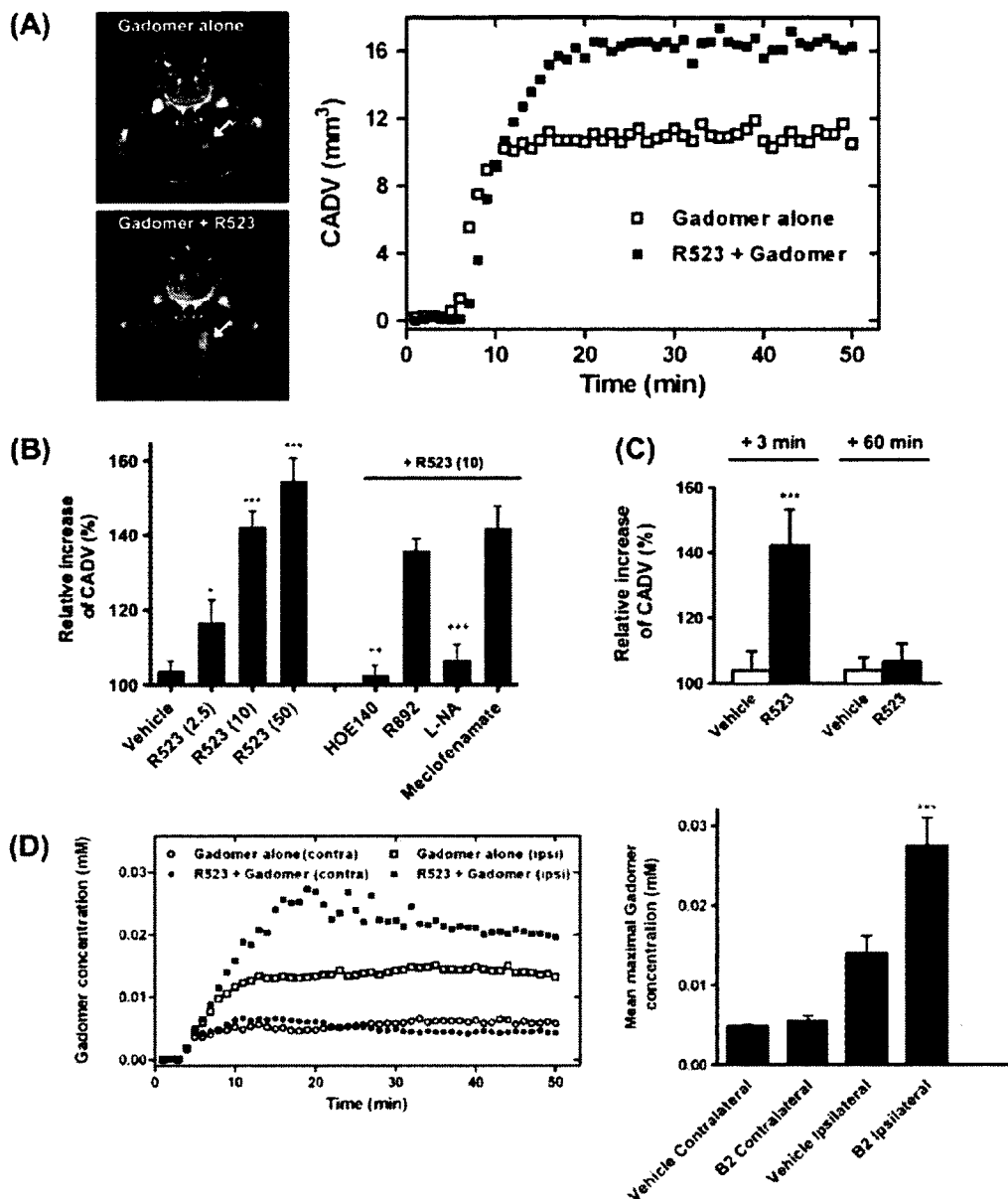


Figure 4 - R523-mediated BBB disruption in F98 glioma-bearing rats assessed by DCE-MRI using Gadomer. (A) Representative axial Gadomer-enhanced T_1 -weighted MR images depicting the brain of an F98-implanted rat before and after R523 treatment (10 nmol/kg/min for 5 min i.c.) (left panels). Note the increase of the signal intensity at the tumor (white arrows). CADV calculated from the corresponding set of images (1 image / 51 s for 50 min) (right panel). (B) Dose-, B2R-, NO-dependence of R523-induced tumor BBB permeability. Numbers in parenthesis represent infusion rates in nmol/kg/min, for 5 min. The B2R antagonist HOE140 and the B1R antagonist R892 (both at 20 nmol/kg/min, for 5 min, i.c.) were infused simultaneously with R523 while the non-selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NA and the non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitor

Meclofenamate (both 5 mg/kg i.v.) were administered 30 min before the infusion of R523. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared to vehicle-treated animals; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to R523 (10 nmol/kg/min)-treated animals. (C) Duration of the increase in BBB permeability caused by R523. Gadomer was injected 3 min or 60 min following the start of the infusion (10 nmol/kg/min) of R523 over 5 min. Each bar represents the mean \pm S.E.M. for 3 to 7 experiments. *** $p < 0.001$ compared to vehicle-treated animals. (D) Representative time course of Gadomer uptake in the ipsilateral (tumor-implanted) hemisphere and the contralateral hemisphere, before and after treatment with R523 (10nmol/kg/min for 5 min) (left panel). Histogrammic representation of average maximal Gadomer concentrations in the ipsilateral (tumor-implanted) and the contralateral hemispheres following saline vehicle or R523 treatment (right panel). *** $p < 0.001$ compared to vehicle-treated ipsilateral groups.

To give a clearer picture of the extent of CA delivery into brain tumor, we determined the MRI contrast agent concentration time courses in the ipsilateral (tumor-implanted) and contralateral hemispheres of F98 glioma-bearing rats submitted or not to i.c. infusion of R523 (Fig. 4D). The Gadomer concentration time course into tumor tissue (Fig. 4D) paralleled the enhanced Gadomer CADV (Fig. 4A); that is, the maximal change occurred at about 18 min. Results also showed that R523 increased delivery of Gadomer into brain tumor by up to 2-fold while the contralateral hemisphere remained unaffected (Fig. 4D). Similar uptake values were obtained with Magnevist in response to R523 (not shown).

The i.c. infusion of R523 provoked a dose-related, acute, reversible decrease in MAP in the isoflurane-anesthetized F98-bearing rats (Figs. 5A and B). Hematocrit values also increased by 2% and 10% (normal value \sim 45%) after the infusion of the pharmacological doses of 10 and 50 nmol/kg/min of R523, respectively, which is compatible with a decrease in plasma volume.

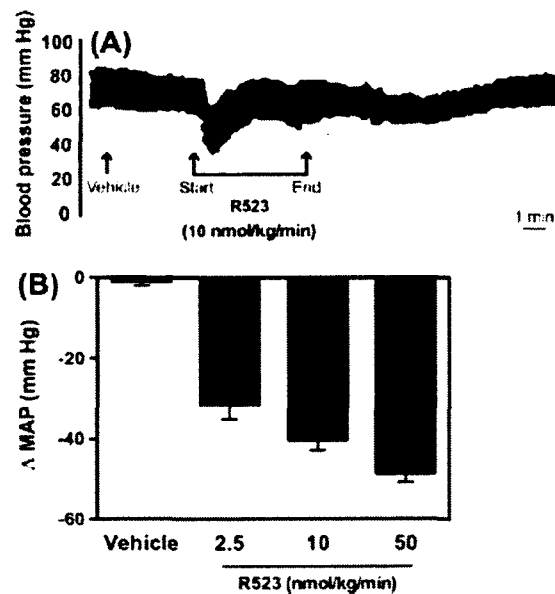


Figure 5 - Intracarotid administration of the agonist R523 induces hypotension in F98-implanted rat. (A) Representative tracing depicting the blood pressure lowering effects of R523 (10 nmol/kg/min, over 5 min, i.c.). (B) Histogram showing the effect of various doses (2.5, 10, and 50 nmol/kg/min, for 5 min) of R523 on the reduction of the mean arterial blood pressure (MAP) in F98- bearing Fischer rats on day 10 post-inoculation. Each bar represents the mean \pm S.E.M. obtained with 2 to 3 animals.

4. Discussion

In the present study, we showed that B2R is expressed at high levels in tumor cells and the peritumoral microvasculature in F98 glioma-bearing rats (Figs. 1 and 2). These observations are consistent with previous findings showing that B2R is highly expressed in other rat models of gliomas (Liu et al., 2001), and in human malignant astrocytoma specimens (Raidoo et al., 1999; Zhao et al., 2005; Fortier et al., 2006), which points to a potential role of B2R in the progression of brain cancer in vivo.

We also validated that DCE-MRI is an effective and sensitive method in detecting the location of intracranial tumors and that it can be used for non-invasive, quantitative evaluations of contrast extravasation in animal brain tissues (Figs. 3 and 4) (Ferrier et al., 2007; Blanchette et al., 2009). It also provides the means to measure the status of the BBB continuously (in real-time) within the same F98 rat glioma at baseline and during

temporary disruption of the BBB with a GPCR agonist in the form of MRI signal intensity changes on T_1 -weighted images. A marked contrast enhancement in the tumor tissues, predominantly in the periphery, was observed with both Gd-DTPA and Gadomer following R523 treatments. This was associated with a maximum 2-fold increase in brain uptake of both CA (Fig. 4), in line with the findings of other similar studies (Black, 1995). The BBB permeabilizing effect of R523 is consistent with a BK-B2R mechanism of action since it was totally blocked by the B2R antagonist HOE140 (Figs. 3 and 4). These results extend our previous findings (Côté et al., 2007) and confirm that BK (and synthetic analogues) is a vascular permeability factor in central nervous system tumors, promoting transvascular delivery and accumulation of hydrophilic agents in tumors and surrounding tissues (Black, 1995; Emerich et al., 2001). Interestingly, the expression of B2R was associated with areas of tumor BBB disruption following intracerebral injection of R523. This suggests that the agonist R523 exerts its permeabilizing effect on microvascular endothelial cells within and notably at the periphery of the brain tumor by activating B2R, possibly through changes in paracellular endothelial transport across the tight junctions, as previously proposed for Cereport and BK using other experimental glioma models (Bartus et al., 1996; Elliott et al., 1996; Liu et al., 2008). The peptide R523 shows relatively good binding affinity and high selectivity for B2R, and is not metabolized by the two major BK-inactivating enzymes, namely angiotensin-converting enzyme and carboxypeptidase M/N. These properties most likely contribute to the pharmacological activity of R523 observed in vivo (Drapeau et al., 1988; Bélanger et al., 2009; present study). The permeabilizing effect of R523 occurs rapidly (within a few minutes) (see Figs. 3 and 4, right panels) and decays completely within an hour, as shown by the absence of CADV increase on MRI when Gadomer was injected 60 min after the administration of the agonist (Fig. 4C). Thus, this suggests that the disruption of the BBB is reversible and its integrity can be restored to original state. Possible mechanistic explanations for the restoration of the BBB might include the presence of auto-regulatory mechanisms (at pre-receptor, receptor and post-receptor levels) of R523 activity such as activation of desensitization/internalization processes of B2R triggered by prolonged administration of high doses of R523, depletion of secretory endothelial products required for R523 to increase BBB permeability (discussed below), inhibition of intracellular signal transduction pathways involved in BBB disruption, and/or

clearance from the body of the peptide agonist. Further studies are required to elucidate the exact mechanism of this phenomenon.

Cyclooxygenase derived-prostanoids and NO are important modulators of vascular tone and permeability that can be released from the endothelium by BK (Wu et al., 1998; Venema, 2002). Our data indicated that NO is a key signaling molecule in the selective blood tumor barrier permeability-promoting effect of R523, since only the inhibition of NOS by L-NA affected the R523-induced disruption of the BBB (Fig. 4B). Western analyses revealed higher levels of endothelial NOS (eNOS), which catalyzes the conversion of L-arginine to L-citrulline and NO, in the tumor than in the contralateral normal brain tissue in Fischer rats with day-10-old F98 cerebral gliomas (C. Dubuc, unpublished results), suggesting that eNOS-derived NO production may contribute to R523 responses. Indeed, BK is one of the most potent inducers of eNOS activity in vascular endothelial cells (Venema, 2002). The observation that R523 exerts an indirect effect via the release of eNOS-derived NO is in agreement with a recent report by Yin et al. (Yin et al., 2008), who showed that oral ingestion of NO-boosting agents, including L-arginine, can selectively and sustainably increase tumor permeability in 9L gliosarcoma-bearing Fischer rats, possibly via up-regulated expression of eNOS in tumor vasculature.

A common hemodynamic side effect of intra-arterial administration of BK or analogues such as Cereport in the adjuvant therapy for brain cancer is a drop in blood pressure (Riley et al., 1998; Sugita and Black, 1998). We also observed this effect with the i.c. infusion of R523, which caused dose-related, acute and transient hypotension in F98-bearing rats (Figs. 5A and B). In addition, all doses of R523 produced an increase of respiratory rate (not shown); this effect could derive either from a peripheral (bronchial) or central (respiratory center) stimulation of B2R. It may be argued that R523 also directly affects cerebrovascular resistance by promoting local vasodilatation and increase of cerebral blood flow (Wahl et al., 1999). Thus, we cannot discount at this stage the possibility that the modulation of BBB permeability of the tumor vascular network by exogenous R523 in the F98 rodent glioma model may be aided by hydrostatic pressure-operated mechanisms. Further experiments are needed to address this issue.

While this manuscript was under preparation, the group of Sarin et al. who used the RG2 rat glioma model and similar MRI experiments, proposed an interesting new mechanism, independent of the BBB system, by which biostable, long acting bradykinin agonists, in particular Cereport, enable transvascular delivery of the CA magnevist (as study drug for carboplatin) in brain glioma by increasing blood half-life of the co-infused CA supposedly via modulation of kidney functions (Sarin et al., 2009). Our imaging results indicated contrast agent extravasation through the disrupted (leaky) BBB at the primary tumor sites, but not in the infiltrative peritumoral areas in the absence of R523 treatment, suggesting that the BBB is virtually intact at the latter site. Quantitatively similar results were obtained with Magnevist and Gadomer (Figs 3 and 4). We used the intracarotid administration of R523 for a direct and rapid response in the CNS tumor and peritumoral microvasculature overexpressing the B2R, as opposed to the study of Sarin et al. (2009), where an intravenous route of administration was used. By doing so, R523 resulted in a larger CA concentration within the primary tumor and a larger CADV with both Magnevist and Gadomer. Because Gadomer does not freely diffuse compared to Magnevist upon extravasation into brain parenchyma, as judged by the stability of CADV calculations at the plateau phase (see Fig. 4A) (Verhoye et al., 2002), it is likely that the appearance of Gadomer-related T_1 -weighted signal enhancement in other brain areas during R523 treatment reflects alterations in intact vessels. Perhaps, arguing against the hypothesis of a role of long acting B2R agonists in modulation of half-lives of water-soluble, small molecules, is that we have directly measured the gadolinium concentrations in arterial blood samples from F98 glioma-bearing rats treated or not with R523 using the validated ICP-MS method and found no difference in the time-elimination curves of Magnevist, in fact, the two curves were almost super-imposable (Fig. 3C). The reasons for this discrepancy between our study and that of Sarin et al (2009) are unclear.

In conclusion, our results support the notion that biostable BK agonist analogues can be used as pharmacological enhancers of drug delivery to brain tumors and that DCE-MRI can be used to monitor this effect. DCE-MRI is especially useful in the investigation of microvasculature in tumor regions that are characterized by low

permeability to macromolecules. This technique should also permit the *in vivo* evaluation of combinatorial (multiple) delivery of therapeutic substances, aiming at killing infiltrating glioma cells in a clinically relevant animal model of malignant brain cancer such as the F98 glioma.

Acknowledgements

The authors would like to thank A Larouche for technical assistance, W. Neugebauer for the synthesis of some peptides, and Bayer HealthCare for generously providing Gadomer. J. Côté and M. Savard are recipients of studentship and fellowship awards, respectively, from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). F. Gobeil is a recipient of a Junior 2 scholarship from the FRSQ and a researcher of the Canada Foundation for Innovation. M. Lepage and D. Fortin hold a Canada Research Chair in MRI and a Banque Nationale Chair in brain cancer treatment, respectively. FG, ML and DF are members of the FRSQ-funded Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel. This study was supported in part by grants from the Heart and Stroke Foundation of Québec (FG) and the Canadian Institute of Health Research #MOP# 89832 (FG), #MOP-81358 (FG, ML, DF).

References

- Adamson, C., Kanu, O.O., Mehta, A.I., Di, C., Lin, N., Mattox, A.K., Bigner, D.D., 2009. Glioblastoma multiforme: a review of where we have been and where we are going. *Expert Opin Investig Drugs*. 18, 1061-1083.
- Arganaraz, G.A., Silva, J.A., Jr., Perosa, S.R., Pessoa, L.G., Carvalho, F.F., Bascands, J.L., Bader, M., da Silva Trindade, E., Amado, D., Cavalheiro, E.A., Pesquero, J.B., da Graca Naffah-Mazzacoratti, M., 2004. The synthesis and distribution of the kinin B1 and B2 receptors are modified in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res*. 1006, 114-125.
- Asotra, K., Ningaraj, N., Black, K.L., 2003. Measurement of blood-brain and blood-tumor barrier permeabilities with [14C]-labeled tracers. *Methods Mol Med*. 89, 177-190.
- Barnhart, J.L., Kuhnert, N., Bakan, D.A., Berk, R.N., 1987. Biodistribution of GdCl₃ and Gd-DTPA and their influence on proton magnetic relaxation in rat tissues. *Magn Reson Imaging*. 5, 221-231.

- Barth, R.F., 1998. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol.* 36, 91-102.
- Barth, R.F., Kaur, B., 2009. Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol.* 94, 299-312.
- Bartus, R.T., Elliott, P.J., Dean, R.L., Hayward, N.J., Nagle, T.L., Huff, M.R., Snodgrass, P.A., Blunt, D.G., 1996. Controlled modulation of BBB permeability using the bradykinin agonist, RMP-7. *Exp Neurol.* 142, 14-28.
- Bélanger, S., Bovenzi, V., Côté, J., Neugebauer, W., Amblard, M., Martinez, J., Lammek, B., Savard, M., Gobeil, F., Jr., 2009. Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin B2 receptor. *Peptides.* 30, 777-787.
- Black, K.L., 1995. Biochemical opening of the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 15, 37.
- Blanchette, M., Pellerin, M., Tremblay, L., Lepage, M., Fortin, D., 2009. Real-time monitoring of gadolinium diethylenetriamine penta-acetic acid during osmotic blood-brain barrier disruption using magnetic resonance imaging in normal wistar rats. *Neurosurgery.* 65, 344-350; discussion 350-341.
- Brown, J.J., Hynes, M.R., Wible, J.H., Jr., 2007. Measurement of serum calcium concentration after administration of four gadolinium-based contrast agents to human volunteers. *AJR Am J Roentgenol.* 189, 1539-1544.
- Bryant, M.J., Chuah, T.L., Luff, J., Lavin, M.F., Walker, D.G., 2008. A novel rat model for glioblastoma multiforme using a bioluminescent F98 cell line. *J Clin Neurosci.* 15, 545-551.
- Chen, E.Y., Emerich, D.F., Bartus, R.T., Kordower, J.H., 2000. B2 bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol.* 427, 1-18.
- Côté, J., Tremblay, L., Fortin, D., Gobeil, F., Jr., Lepage, M., 2007. Assessment of bradykinin B2 receptor mediated-selective blood brain barrier opening in a F98 glioma rat model by non invasive magnetic resonance imaging. *Proceedings of Society of Magnetic Resonance in Medicine.* 15.
- Drapeau, G., Rhaleb, N.E., Dion, S., Jukic, D., Regoli, D., 1988. [Phe⁸ psi(CH₂-NH)Arg⁹]bradykinin, a B2 receptor selective agonist which is not broken down by either kininase I or kininase II. *Eur J Pharmacol.* 155, 193-195.
- Elliott, P.J., Hayward, N.J., Huff, M.R., Nagle, T.L., Black, K.L., Bartus, R.T., 1996. Unlocking the blood-brain barrier: a role for RMP-7 in brain tumor therapy. *Exp Neurol.* 141, 214-224.

Emerich, D.F., Dean, R.L., Osborn, C., Bartus, R.T., 2001. The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: from concept to clinical evaluation. *Clin Pharmacokinet.* 40, 105-123.

Ferrier, M.C., Sarin, H., Fung, S.H., Schatlo, B., Pluta, R.M., Gupta, S.N., Choyke, P.L., Oldfield, E.H., Thomasson, D., Butman, J.A., 2007. Validation of dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging-derived vascular permeability measurements using quantitative autoradiography in the RG2 rat brain tumor model. *Neoplasia.* 9, 546-555.

Fortier, A., Bovenzi, V., Fortin, D., Gobeil, F., Jr., 2006. Étude de l'expression des récepteurs B1 et B2 des kinines chez les glioblastomes multiformes humains. *Médecine/Sciences.* 22, 24.

Fortin, D., 2004. The blood-brain barrier should not be underestimated in neuro-oncology. *Rev Neurol.* 160, 523-532.

Gobeil, F., Jr., Charland, S., Filteau, C., Perron, S.I., Neugebauer, W., Regoli, D., 1999. Kinin B1 receptor antagonists containing alpha-methyl-L-phenylalanine: in vitro and in vivo antagonistic activities. *Hypertension.* 33, 823-829.

Gobeil, F., Jr., Zhu, T., Brault, S., Geha, A., Vazquez-Tello, A., Fortier, A., Barbaz, D., Checchin, D., Hou, X., Nader, M., Bkaily, G., Gratton, J.P., Heveker, N., Ribeiro-da-Silva, A., Peri, K., Bard, H., Chorvatova, A., D'Orleans-Juste, P., Goetzl, E.J., Chemtob, S., 2006. Nitric oxide signaling via nuclearized endothelial nitric-oxide synthase modulates expression of the immediate early genes iNOS and mPGES-1. *J Biol Chem.* 281, 16058-16067.

Kemper, E.M., Boogerd, W., Thuis, I., Beijnen, J.H., van Tellingen, O., 2004. Modulation of the blood-brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours? *Cancer Treat Rev.* 30, 415-423.

Liu, L.B., Xue, Y.X., Liu, Y.H., Wang, Y.B., 2008. Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occludin, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton. *J Neurosci Res.* 86, 1153-1168.

Liu, Y., Hashizume, K., Chen, Z., Samoto, K., Ningaraj, N., Asotra, K., Black, K.L., 2001. Correlation between bradykinin-induced blood-tumor barrier permeability and B2 receptor expression in experimental brain tumors. *Neurol Res.* 23, 379-387.

Mathieu, D., Lecomte, R., Tsanaclis, A.M., Larouche, A., Fortin, D., 2007. Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. *Can J Neurol Sci.* 34, 296-306.

Misselwitz, B., Schmitt-Willich, H., Ebert, W., Frenzel, T., Weinmann, H.J., 2001. Pharmacokinetics of Gadomer-17, a new dendritic magnetic resonance contrast agent. *Magma.* 12, 128-134.

- Neuwelt, E.A., 2004. Mechanisms of disease: the blood-brain barrier. *Neurosurgery*. 54, 131-140; discussion 141-132.
- Prados, M.D., Schold, S.J.S., Fine, H.A., Jaeckle, K., Hochberg, F., Mechtler, L., Fetell, M.R., Phuphanich, S., Feun, L., Janus, T.J., Ford, K., Graney, W., 2003. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma. *Neuro Oncol*. 5, 96-103.
- Raidoo, D.M., Sawant, S., Mahabeer, R., Bhoola, K.D., 1999. Kinin receptors are expressed in human astrocytic tumour cells. *Immunopharmacology*. 43, 255-263.
- Rapoport, S.I., 2000. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cell Mol Neurobiol*. 20, 217-230.
- Riley, M.G., Kim, N.N., Watson, V.E., Gobin, Y.P., LeBel, C.P., Black, K.L., Bartus, R.T., 1998. Intra-arterial administration of carboplatin and the blood brain barrier permeabilizing agent, RMP-7: a toxicologic evaluation in swine. *J Neurooncol*. 36, 167-178.
- Sarin, H., Kanevsky, A.S., Fung, S.H., Butman, J.A., Cox, R.W., Glen, D., Reynolds, R., Auh, S., 2009. Metabolically stable bradykinin B2 receptor agonists enhance transvascular drug delivery into malignant brain tumors by increasing drug half-life. *J Transl Med*. 7, 33.
- Savard, M., Barbaz, D., Bélanger, S., Muller-Esterl, W., Bkaily, G., D'Orléans-Juste, P., Côté, J., Bovenzi, V., Gobeil, F., Jr., 2008. Expression of endogenous nuclear bradykinin B2 receptors mediating signaling in immediate early gene activation. *J Cell Physiol*. 216, 234-244.
- Schor, N.F., 2009. Pharmacotherapy for adults with tumors of the central nervous system. *Pharmacol Ther*. 121, 253-264.
- Sugita, M., Black, K.L., 1998. Cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibition and intracarotid bradykinin infusion enhances permeability into brain tumors. *Cancer Res*. 58, 914-920.
- Venema, R.C., 2002. Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin. *Int Immunopharmacol*. 2, 1755-1762.
- Verhoye, M., van der Sanden, B.P., Rijken, P.F., Peters, H.P., Van der Kogel, A.J., Pee, G., Vanhoutte, G., Heerschap, A., Van der Linden, A., 2002. Assessment of the neovascular permeability in glioma xenografts by dynamic T(1) MRI with Gadomer-17. *Magn Reson Med*. 47, 305-313.
- Wahl, M., Grolach, C., Hortobagyi, T., Benyo, Z., 1999. Effects of bradykinin in the cerebral circulation. *Acta Physiol Hung*. 86, 155-160.

Warren, K., Jakacki, R., Widemann, B., Aikin, A., Libucha, M., Packer, R., Vezina, G., Reaman, G., Shaw, D., Krailo, M., Osborne, C., Cehelsky, J., Caldwell, D., Stanwood, J., Steinberg, S.M., Balis, F.M., 2006. Phase II trial of intravenous lobradimil and carboplatin in childhood brain tumors: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer Chemother Pharmacol.* 58, 343-347.

Wirth, K., Hock, F.J., Albus, U., Linz, W., Alpermann, H.G., Anagnostopoulos, H., Henk, S., Breipohl, G., Konig, W., Knolle, J., et al., 1991. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br J Pharmacol.* 102, 774-777.

Wu, J., Akaike, T., Maeda, H., 1998. Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Res.* 58, 159-165.

Yin, D., Wang, X., Konda, B.M., Ong, J.M., Hu, J., Sacapano, M.R., Ko, M.K., Espinoza, A.J., Irvin, D.K., Shu, Y., Black, K.L., 2008. Increase in brain tumor permeability in glioma-bearing rats with nitric oxide donors. *Clin Cancer Res.* 14, 4002-4009.

Zhao, Y., Xue, Y., Liu, Y., Fu, W., Jiang, N., An, P., Wang, P., Yang, Z., Wang, Y., 2005. Study of correlation between expression of bradykinin B2 receptor and pathological grade in human gliomas. *Br J Neurosurg.* 19, 322-326.

Chapitre 7

Manuscrit 3

Titre : Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model

Auteurs de l'article : Jérôme Côté, Veronica Bovenzi, Martin Savard, Célina Dubuc, Audrey Fortier, Witold Neugebauer, Luc Tremblay, Werner Müller-Esterl, Ana Maria Tsanaclis, Martin Lepage, David Fortin, Fernand Gobeil Jr

Statut de l'article : Publié (PLOS ONE 7(5) : 1-17, Mai 2012)

Avant-propos :

Dans cet article, j'ai effectué toutes les expérimentations pour les figures 3, 4, 5, S3 et S4 et j'ai participé étroitement aux résultats illustrés aux autres figures (avec les auteurs Bovenzi, Dubuc, Fortier, Savard et Tsanaclis). De plus, j'ai participé de manière active à la rédaction du manuscrit et à sa correction en étroite collaboration avec les auteurs Savard, Bovenzi et Gobeil.

Résumé de l'article :

Les expérimentations présentées dans ce manuscrit ont pour la plupart été effectuées en parallèle avec celles du manuscrit précédent (Côté et al., 2010), où l'efficacité d'un agoniste du rB2 à perméabiliser la BHE tumorale est évaluée dans le modèle de rat porteur d'un gliome de type F98. Le même objectif général était poursuivi, soit de favoriser un acheminement supérieur d'agents de contraste IRM, et ultimement d'agents de chimiothérapie au sein des lésions cérébrales. Seul l'agoniste est différent, puisque nous parlons plutôt d'un nouveau peptide puissant agoniste des récepteurs B1 des kinines, le NG29 (ou peptide #10; Côté et al., 2009). Toutefois, comme le concept est original et très peu étudié, nous avons poussé l'étude un peu plus loin, en ajoutant quelques séries d'expérimentations tel le dosage par ICP-MS et le marquage de l'albumine, afin de valider les résultats obtenus à l'IRM. Les nouveautés qu'apportent cette étude, effectuée avec le même modèle animal de gliome malin, peuvent être résumées ainsi : 1) les gliomes F98 expriment l'ARNm et la protéine du rB1; 2) le rB1 est majoritairement localisé dans les cellules tumorales (en grande quantité dans le compartiment nucléaire) et dans les vaisseaux sanguins tumoraux; 3) l'administration systémique d'un agoniste stable analogue à la LDBK, et non la LDBK elle-même, augmente la distribution de macro-molécules de bas et de haut poids moléculaire (Magnevist, Gadomer, Carboplatin et l'albumine endogène) au delà de la BHE tumorale; 4) cette perméabilisation induite par le NG29 est réversible, efficace tant en intraveineux qu'intra-artériel, médiée par l'activation des COX, et apparemment sûre et bien tolérée; 5) une variété de lignées cellulaires de gliomes humains, et plus d'échantillons cliniques de différents grades de gliomes, expriment une grande quantité de rB1 comparé à leurs homologues tissulaires/cellulaires normaux, faisant du rB1 un adjuvant thérapeutique intéressant, en plus d'un possible biomarqueur utile pour la détection des gliomes humains. Mis ensemble, ces résultats offrent la preuve de concept que cibler le rB1 peut être une approche pharmacologique hautement efficace afin d'acheminer des molécules thérapeutiques à la tumeur. Dans ce 3^e manuscrit, l'abréviation BTB (pour *blood-tumor barrier*) remplace l'abréviation BBB retrouvé dans le 2^e manuscrit, ceci dans le but de préciser le caractère localisé de la perméabilisation induite

par le NG29. Le lecteur est référé à l'introduction de cette thèse s'il veut revoir les différences impliquant les deux concepts.

Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model

Jérôme Côté^{1,2}, Veronica Bovenzi¹, Martin Savard¹, Céléna Dubuc¹, Audrey Fortier¹, Witold Neugebauer¹, Luc Tremblay², Werner Muller-Esterl⁵, Ana Maria Tsanaclis⁴, Martin Lepage², David Fortin³, Fernand Gobeil jr¹ *

¹Department of pharmacology; ²Department of nuclear medicine and radiobiology; ³Department of surgery; ⁴Department of pathology, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Canada; ⁵Institute for Biochemistry II, University Hospital, Frankfurt, Germany;

* Correspondence to:

Fernand Gobeil jr, Ph.D.

Department of Pharmacology, Université de Sherbrooke

3001, 12th avenue North,

Sherbrooke, Québec, CANADA, J1H 5N4

Tel: (819) 346-1110 (ext. 12378)

Fax: (819) 564-5400

Email: fernand.gobeil@usherbrooke.ca

Running title: Modulation of blood-tumor barrier permeability by kinins

ABSTRACT

Treatment of malignant glioma with chemotherapy is limited mostly because of delivery impediment related to the blood-brain tumor barrier (BTB). B1 receptors (B1R), inducible prototypical G-protein coupled receptors (GPCR) can regulate permeability of vessels including possibly that of brain tumors. Here, we determine the extent of BTB permeability induced by the natural and synthetic peptide B1R agonists, LysdesArg⁹BK (LDBK) and SarLys[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK (NG29), in syngeneic F98 glioma-implanted Fischer rats. Ten days after tumor inoculation, we detected the presence of B1R on tumor cells and associated vasculature. NG29 infusion increased brain distribution volume and uptake profiles of paramagnetic probes (Magnevist and Gadomer) at tumoral sites (*T*₁-weighted imaging). These effects were blocked by B1R antagonist and non-selective cyclooxygenase inhibitors, but not by B2R antagonist and non-selective nitric oxide synthase inhibitors. Consistent with MRI data, systemic co-administration of NG29 improved brain tumor delivery of Carboplatin chemotherapy (ICP-Mass spectrometry). We also detected elevated B1R expression in clinical samples of high-grade glioma. Our results documented a novel GPCR-signaling mechanism for promoting transient BTB disruption, involving activation of B1R and ensuing production of COX metabolites. They also underlined the potential value of synthetic biostable B1R agonists as selective BTB modulators for local delivery of different sized-therapeutics at (peri)tumoral sites.

Keywords: B1 receptor, synthetic agonists, blood-brain barrier modulation, glioma, rat

INTRODUCTION

Major advances in medical and surgical treatments in the last few decades have increased the overall survival of patients with many types of cancers with the exception of those in the central nervous system (CNS) [1,2]. In fact, the survival of patients with malignant gliomas more precisely glioblastoma (WHO grade IV), the most aggressive and prevalent primary brain tumors in adults (about 20-30%), has remained virtually unchanged over the last 40 years [3]. Furthermore, analytical epidemiologic studies indicate that the incidence of these tumors is steadily increasing in children and adults [4,5]. The cause of this increase in incidence currently remains unknown. High grade malignant gliomas (WHO grades III and IV) are characterized by high levels of proliferative, migratory and invasion activities as well as high resistance to treatment. These hallmarks typify the aggressive tumor phenotype and account for the very poor prognosis and as yet, the incurable nature of the disease. Treatments of patients with malignant gliomas thus remain palliative and generally include surgery, radiotherapy, and chemotherapy in various combinations. Chemotherapy is assuming an increasingly important role in the treatment of malignant gliomas [6,7,8]. Chemotherapeutic agents are commonly administered orally or intravenously [9]. However, these routes of administration do not provide high concentrations of drugs in the brain parenchyma especially because of the blood-brain barrier (BBB) that isolates the brain from the rest of the body [10]. It has been estimated that only about 2% of drugs pass through this barrier [11,12]. The impermeability of the BBB is due to tight junction proteins connecting adjacent endothelial cells, which inhibit any significant paracellular transport. The highly regulated transport systems of the endothelial cell membranes also restrain drug transcytosis across the BBB (see review [13]). The BBB in malignant brain tumors (also referred to as blood-tumor barrier (BTB)) is abnormal and variably disrupted within the main body of the tumor and nearby tissue. Various parts of tumors, especially large areas of diffuse infiltrative tumors, with a mainly intact BTB may thus be shielded from chemotherapy [14]. There is thus a critical need to develop successful methods to safely open the BTB in order to improve chemotherapeutic treatment for malignant glioma.

Kinins are a group of autacoid peptides formed by numerous tissues and in the blood at the vascular endothelial layer. They are natural modulators of the tone and permeability of vessels including the cerebral microcirculation [15,16]. Bradykinin (BK) and kallidin (LysBK), and their respective bioactive natural metabolites (desArg⁹BK and LysdesArg⁹BK), which lack the C-terminal arginyl residue, are the main sources of kinin activity. The biological effects of BK- and desArg⁹-related peptides are mediated through the activation of specific GPCRs called B2R and B1R, respectively [17]. Like most GPCRs, B2R exhibit constitutive expression with measurable levels of these receptors under normal conditions. B2R is thought to be responsible for most of kinin activities under physiological conditions, including the regulation of the cardiovascular and kidney functions [17]. On the other hand, B1R is inducible and is expressed in major inflammatory pathologies such as cardiovascular diseases and cancer [17,18], making it an attractive pharmaceutical target with anticipated reduced collateral effects. B1R is induced or overexpressed during tissue injury or ischemia, or following exposure to bacterial endotoxins or inflammatory cytokines such as interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor α (TNF- α) [18]. Gliomas, like many other solid tumors, are surrounded by a zone of inflammation that is needed for sustained tumor growth and angiogenesis [19,20]. This process is partly dependent on glioma tumor derived cytokines IL-1 β and TNF- α [19,21], which could plausibly trigger expression and activity of B1R impacting on the brain tumor microcirculatory system. Preliminary experiments revealed that tumor F98 gliomas implanted in the brains of rats have high levels of IL-1 β immunoreactivity, providing support to this hypothesis (Supplementary Fig. S1). Furthermore, in vivo studies on the effects of exogenous pharmacological agonists and antagonists in a number of animal disease models have revealed that B1R may play a role in inducing systemic vascular permeability in peripheral organs and have been generally supported by semi-quantitative Evans blue analyses [22,23,24,25,26]. In central nervous tissue, B1R also appears to modulate BBB permeability, including that of brain tumors [27,28,29]. This is consistent with preliminary clinical observations from our group and others showing that endothelial and glioma cells in human malignant glioma specimens exhibit B1R immunoreactivity [30,31]. The exact role of B1R in the glioma biology remains unclear. Although the

evidence so far seems to be pointing to a vasomodulator role of B1R in the brain tumor vasculature, no clear and convincing evidence has yet been established.

Based on this rationale, we surmised that selective B1R agonists, when infused systemically, would induce selective BTB disruption thereby maximizing macromolecular delivery and efficacy of the chemotherapeutic agents used to treat malignant glioma. In addition, agonist treatments would not result in systemic complications because of the restricted expression of B1R target in the glioma environment. We used syngeneic F98 glioma bearing rats as a clinically relevant animal model of malignant brain cancer [32,33]. Our objectives were 1) to detect and locate B1R expression in rat and human brain tumor (for clinical validation purposes) by integrating molecular and cellular biology approaches, and 2) to correlate B1R expression to in vivo functional permeability data of peptide agonists that selectively target B1R. Previous studies, including ours, have shown that non-invasive dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) is a reliable method to determine the spatio-temporal BTB opening in vivo [34,35,36,37,38,39]. We thus used this technique with gadolinium-based contrast agents Magnevist (Gd-DTPA; 0.5 kDa) and Gadomer (17 kDa) as brain intravascular tracers, together with conventional immunohistochemistry (IHC) and Evans blue staining of albumin (~65 kDa), to assess the extent and duration of BTB permeability. We also explored whether a B1R agonist can enhance bioavailability of the chemotherapeutic agent Carboplatin (and Magnevist used as reference) in brain tumor tissues using inductively coupled plasma-mass spectroscopy (ICP-MS). The natural B1R agonist LysdesArg⁹BK (LDBK) and its degradation resistant, long-acting analogue SarLys[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK, NG29 [40], capable of improved stimulation of BTB opening, were used for comparison purpose.

Here, we report that NG29, and probably other synthetic biostable B1R agonists sharing the proper pharmacokinetic features [40], can be used as selective BTB modifiers to improve transvascular delivery of various-sized water soluble molecules to CNS tumors expressing substantial level of B1R. These results may constitute a significant contribution to the development of effective systemic chemotherapy modalities for the treatment of inoperable or of recurrent malignant brain tumors.

RESULTS

Kinin B1R are overexpressed in rat brain F98 glioma tissue, in human glioma cell lines and in human glioma specimens

We analysed the expression profile of B1R in rat brain normal and tumor tissues by RT-PCR and WB (Fig. 1A, B). B1R mRNA and protein expression levels were significantly higher ($p < 0.05$) in brain tumor tissues than in normal brain tissues. In fact, most normal tissues had very low to negligible levels of B1R. To confirm these results and provide an idea of the subcellular localization of B1R in glioma tissues, we performed standard peroxidase-based IHC. Glioma tissues and perivascular tumor microsatellites distant from the primary tumor mass were nearly all B1R immunoreactive (Fig. 1C, ii). Notably, the positive staining with the anti-B1R antiserum AS434 was mainly intracellular (with few cell plasma membrane associated labeling) and was confined to perinuclear zones and inside the nucleus. Closer examination by high magnification TEM confirmed the predominant localization of B1R to the endoplasmic reticulum (ER)/nuclear envelope and nucleoplasm of F98 glioma cells (Fig. 1D). Similar TEM results were obtained with the anti-B1R antibody RC72 (data not shown). We also detected moderate positive staining in intra- and peritumoral microvessels (Fig. 1) and, sporadically, in ipsy- and contralateral normal glial cells. Staining was absent or barely detectable in neurons (Fig. 1).

In an initial effort to translate the results from the animal model to humans, we also examined the expression of B1R in well-established human glioblastoma cell lines, clinical glioma specimens of varying grades, and post-mortem normal control human brain biopsies (Fig. 2A-D) using the same techniques used to quantify B1R expression profiles in rats. WB analysis consistently revealed significantly higher B1R protein expression in glioma cells relative to their nontransformed counterparts, normal human astrocytes (Figure 2A). The predominant B1R immunoreactive species (~45 kDa) appearing in human glioma cells had a lower molecular-mass than that identified in rat glioma tissues (~65 kDa) (Fig. 1B),

possibly due to differences in post-translational processing of B1R (ex. glycosylation). The striking *in vitro* upregulation was also revealed by RT-PCR (Figure 2B) and WB analyses (Figure 2C) of B1R in *ex vivo* human glioma biopsies. B1R transcripts were variably upregulated in human grade II-IV astrocytic tumors (9 cases) compared to normal brain cortical specimens (Fig. 2B). WB analyses of a different panel of tumor tissues (11 cases) confirmed that B1R was expressed in tumors but not in normal brain tissue (Fig. 2C, left panel). Moreover, WB analyses of protein extracts from seven pairs of matched human glioma tissues and peritumoral brain tissues (Fig. 2C, right panel) showed that B1R was expressed in all glioma tissues analyzed while expression levels were variable in the inflamed peritumoral areas (4/7 cases). The WB results obtained with AS434 were validated using two other anti-B1R antibodies (LS799 and RC72), which generated very similar staining patterns (Supplementary Fig. S2).

Four cases of malignant human astrocytoma specimens that included one WHO grade 3 and three WHO grade 4 glioblastoma multiforme, tested positive for B1R expression using the IHC method (Fig. 2D). Like to rat F98 glioma IHC staining, B1R-positive cells were mainly observed in tumor tissues and were mostly restricted to the perinuclear envelopes and within nuclei (Fig. 2D). Moreover, B1R immunoreactivity was always associated with mitotic chromosomes in the anaplastic high-grade gliomas (Fig. 2D, inset), likely due to the localization of B1R in fragmented endoplasmic reticulum (ER)/nuclear membranes wrapped around chromatins during mitosis [41]. Microvessels in malignant tumor also tested positive, albeit to lesser extent (Fig. 2D, black arrowheads), but showed less to no nuclear staining. On the other hand, one case of benign diffuse low grade astrocytoma (WHO grade 2) stained negative for B1R (Fig. 2D). These results provide support for the hypothesis that B1R might be a novel, valid pharmacological target for detecting malignant astrocytoma, manipulating newly forming vasculature integrity, and regulating tumor permeability using potent B1R agonists in preclinical and clinical settings. However, given the small sample size for human subjects and possible risk of unrepresentative astrocytoma biopsy sampling related to intratumoral genetic heterogeneity [42], further work is required to determine the appropriateness of these results.

FIGURE 1
Côté et al., 2012

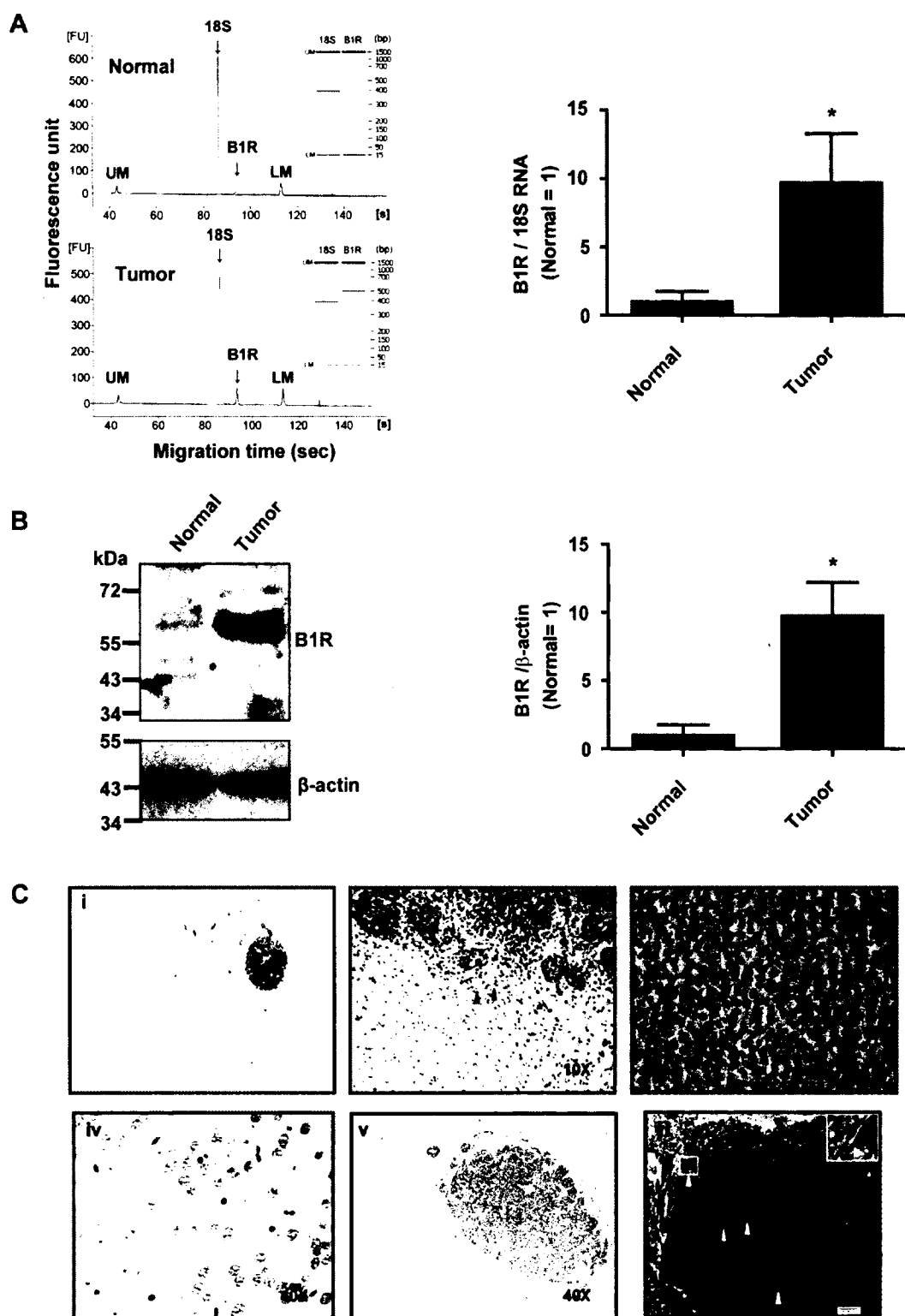
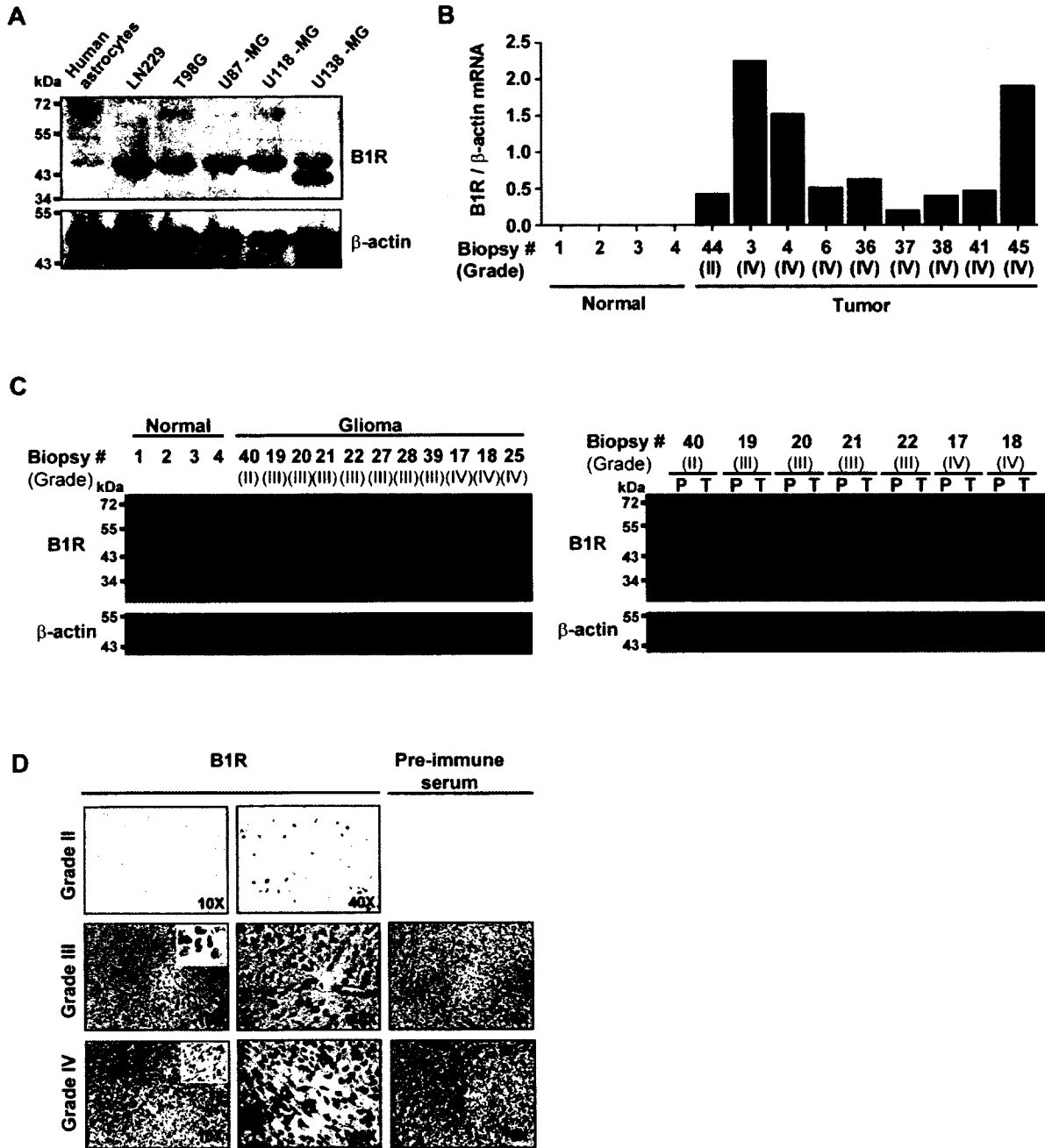


FIGURE 2
Côté et al., 2012

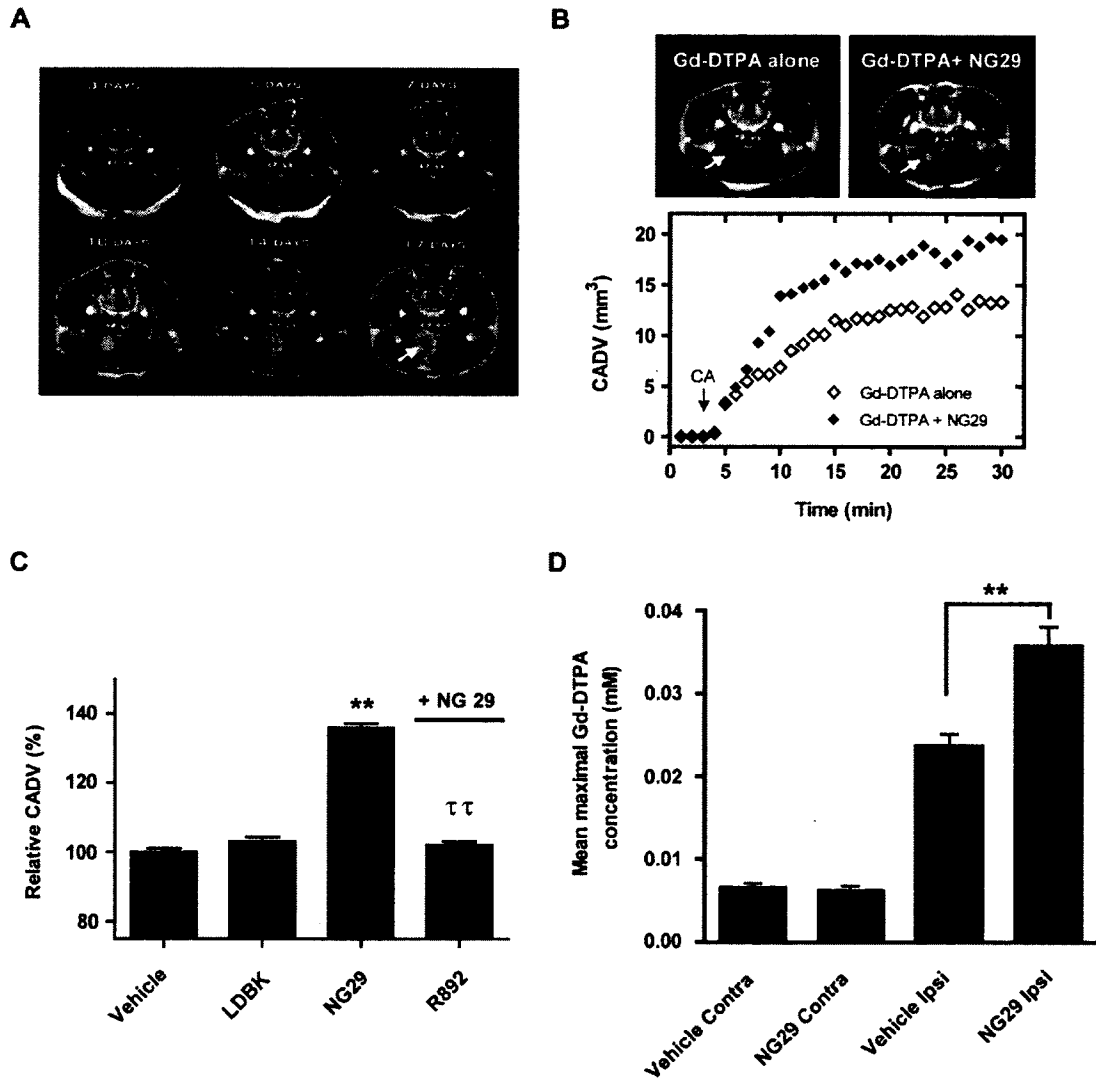


The peptide agonist NG29 induces effective transvascular delivery across the BTB of malignant glioma and the accumulation of two different-sized contrast agents via B1R and a COX-dependent pathway

Having shown that B1R are overexpressed in rat brain F98 tumors and its associated blood vascular network, we then used real-time MRI with two different sized-CA (Magnevist (Gd-DTPA; 0.5 kDa) and Gadomer (17 kDa)) (Figs. 3 and 4) to determine localization and volume of the tumors and to provide non-invasive assessment of cerebral microvascular responses and BTB disruption to the natural B1R agonist LDBK and its analogue NG29. Magnevist and Gadomer are believed to be non-toxic, non-actively transported, and are regarded as useful intravascular hydrophilic tracers for monitoring paracellular permeability (via inter-endothelial clefts) and extent of BBB disruption in vivo [34,43]. The Magnevist-enhanced images revealed the presence of F98 gliomas as early as 3 days after their inoculation in rats, with changes in T_1 signal intensities that became much stronger on follow-up through to day 17 (Fig. 3A). This suggested a leaky and penetrable BTB, even during an early stage of tumor development. The tumor T_1 -weighted intensity was isointense with normal brain before injection of CA (data not shown). Compared with F98-implanted rats, we observed no Magnevist enhancement at the tumor sites on day 10 post-inoculation in rats that underwent sham surgery and that were inoculated with F98-free DMEM (data not shown). The signal enhancement of Magnevist (Fig. 3B, upper panels) and of Gadomer (Fig. 4B, upper panels) was more pronounced in the central core and the peripheral rim of the tumor relative to baseline following intracarotid (i.c.) infusion of NG29 (10 nmol/kg/min for 5 min), which translated to a larger maximum CA distribution volume (CADV) (Fig. 3B and 4A, bottom panels). In fact, a dose-response relationship and a significantly higher average maximal CADV were observed with the i.c. NG29-treated group of animals (Magnevist: $36\pm3\%$; Gadomer: $23\pm6\%$) (Figs. 3C and 4B). I.V. administration of NG29 also increased the total interstitial distribution volume of Gadomer in the tumor microenvironment but required obviously a higher dose to produce an effect similar to that seen with i.c. administration, which creates a rapid “first pass” effect in the brain tumor (Fig. 4B). The increase of mean maximal CADV was not observed when the vehicle or an equimolar amount of the natural agonist LDBK was

infused (Figs. 3C and 4B). The relatively low-level disruption of the BTB induced by LDBK may be explained by the activity of the kinin-destroying enzymes ACE and NEP, EP24.15 and EP24.16, which are widely distributed in microvessels and in many tissues including the brain [44].

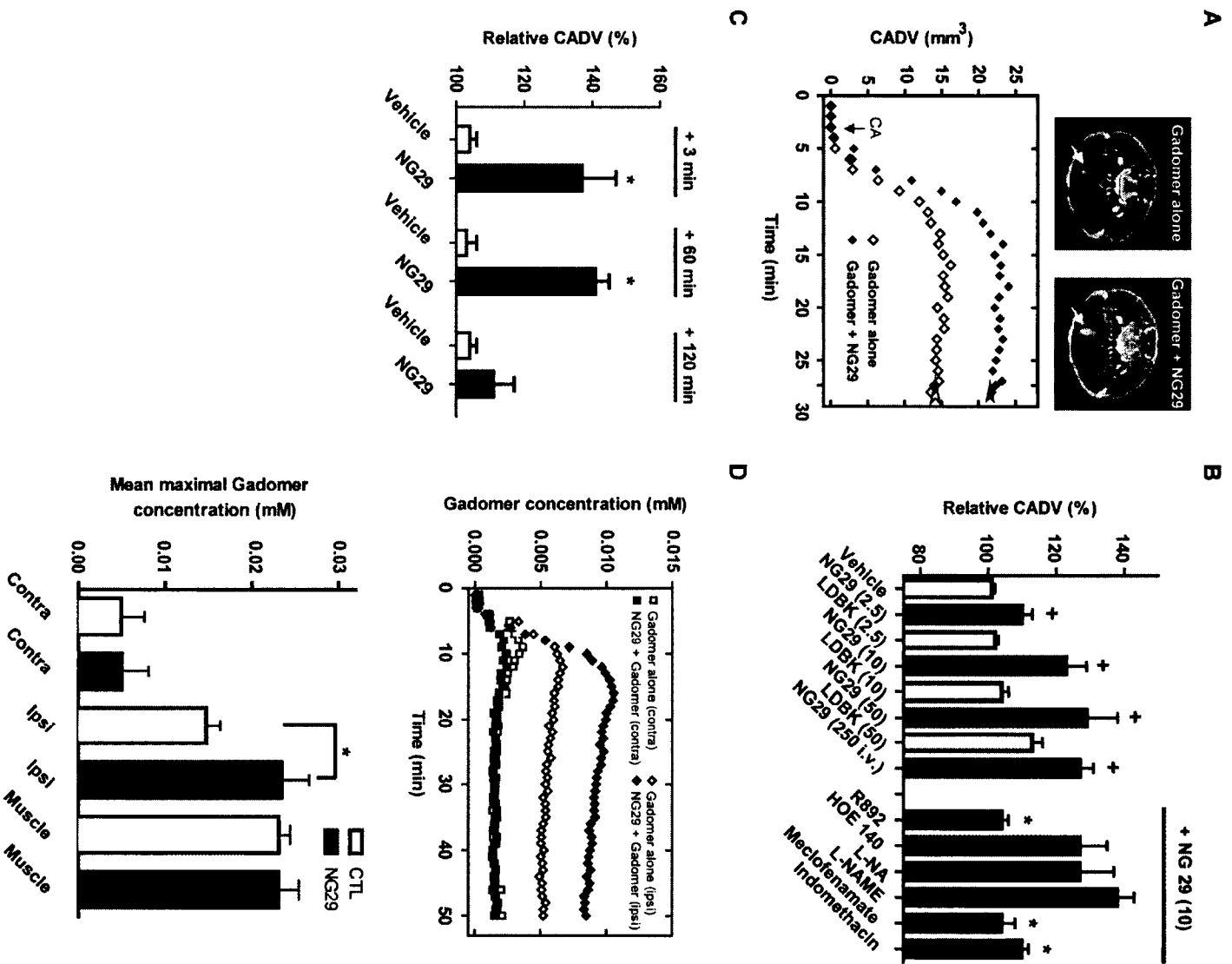
FIGURE 3
Côté et al., 2012



To investigate which kinin receptor-subtype mediates NG29 responses, the animals were treated with a combination of NG29 and the biostable B1R antagonist R892 [45] or the B2R antagonist HOE-140 [46] (in dose exceeding twice the agonist dose) (Figs. 3C and 4B). As expected from previous *in vitro* selectivity studies [40], only R892 significantly blunted the NG29-induced increase in mean maximal CADV (Figs. 3C and 4B). To elucidate the mechanism by which NG29 modulates the disruption of the BTB, we tested two series of inhibitors that block either the NOS or COX pathway (Fig. 4B). The NOS inhibitors L-NA and L-NAME had no effect on NG29-induced disruption of BTB or changes in CADV. Conversely, pretreatment with meclufenamate or indomethacin, two structurally unrelated COX inhibitors, blocked the effects of NG29 (Fig. 4B). This strongly indicated that COX byproducts (most probably PGI₂ and PGE₂) [15,47,48] play a role in regulating permeability of BTB. We investigated the reversibility and duration of action of i.c. NG29 by administering Gadomer at different times (3, 60 and 120 min) after the initiation of agonist infusion and determined mean maximal CADV as described above (Fig. 4C). The time-course results showed that BTB modulatory responses to NG29 promptly peaked at 3 min, remained stable for at least 1 h then fade away completely after approximately 2 h, indicating that the integrity of the BTB had been restored (Fig. 4C).

Lastly, increases in CADVs elicited by i.c. NG29 (Figs. 3C and 4B) were associated with increases in the apparent amount of CA crossing into the brain tumor interstitial space (Figs. 3D and 4D). Differences in representative Gadomer concentration–time plots generated using i.c. NG29 between ipsilateral (tumor-implanted) and contralateral hemispheres can be appreciated in Figure 4D (upper panel). The average maximal Gadomer concentration following i.c. NG29 treatment into the ipsilateral compartment significantly exceeded that of control untreated group (Fig. 4D, bottom panel). Similar results were obtained with Magnevist (Fig. 3D). There was no tendency of increased Gadomer concentration over time in the contralateral hemisphere and the jaw muscle upon NG29 treatment, demonstrating the tumor-site specific activity of NG29 (Fig. 4D).

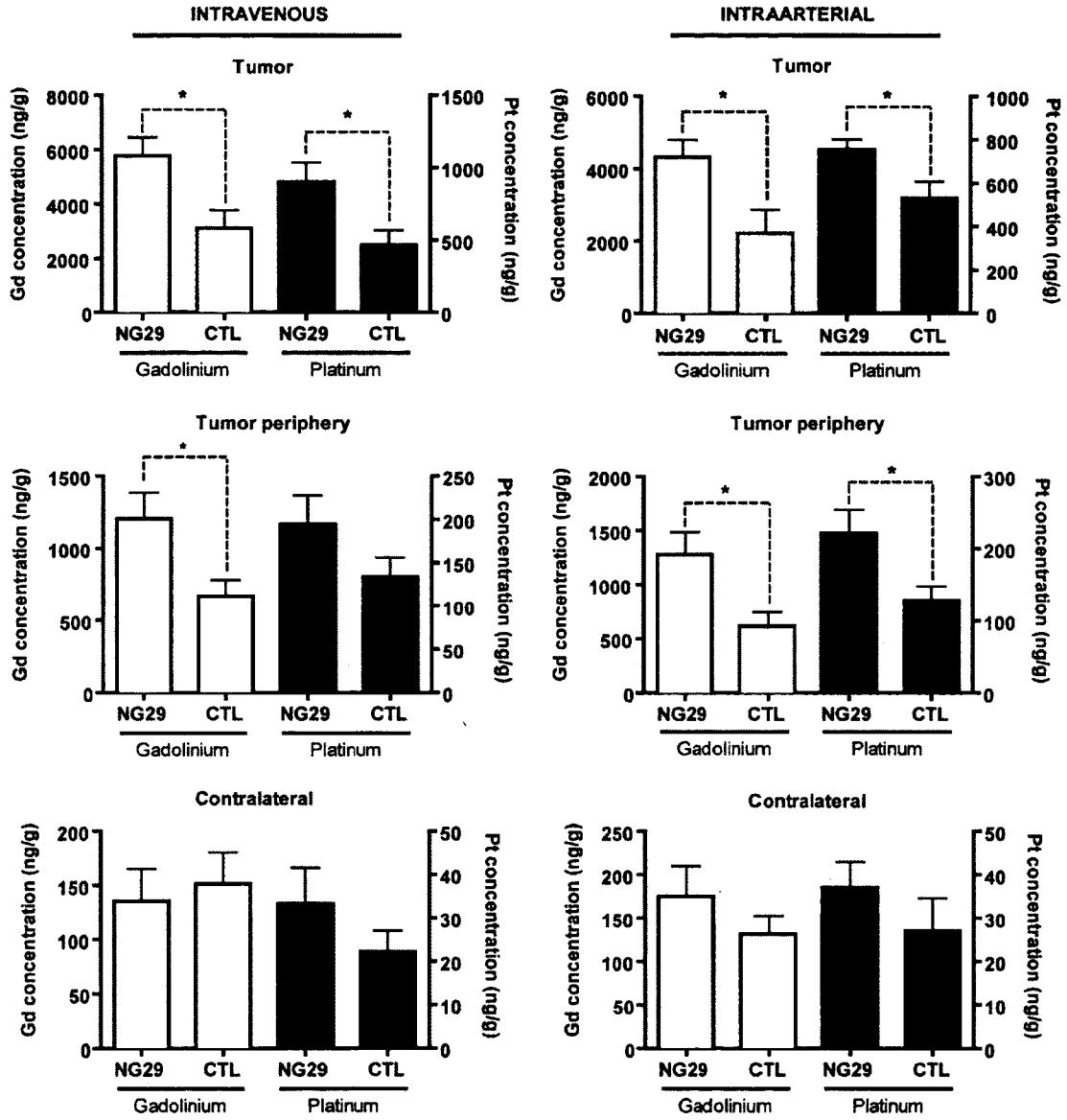
FIGURE 4
Côté et al., 2012



Comparison between the intracerebral delivery of Magnevist and Carboplatin following intraarterial or intravenous NG29 administration

To corroborate the contrast-enhanced MRI findings and to gain better insights into the potential of B1R agonists for delivering chemotherapeutic agents into CNS tumors via different routes of administration, we used the validated, highly sensitive, elemental ICP-MS method. We determined the Carboplatin platinum and Magnevist gadolinium content of tissue extracts from tumor, adjacent brain tissue, and cortical contralateral tissues (Fig. 5). Even though it is known that F98 glioma cells are highly resistant to DNA-alkylating agents such as Carboplatin [49], we chose to study this chemotherapeutic agent because it is used to treat glioma patients, albeit with limited evidence of efficacy [50]. Its molecular size (371 Da) and hydrophilicity are comparable to Magnevist (500 Da). As such, we anticipated that its intracerebral bioavailability would be similar to that of Magnevist. Our results proved the hypothesis and showed that the systemic co-administration of NG29 with Magnevist and Carboplatin significantly enhanced their brain delivery and actual bona fide concentrations, to a similar degree, in tumor and peritumoral sites (~2-fold increase in both cases) (Fig. 5). Notably, the NG29/drug combination can be given i.v. or i.c. with similar effectiveness, taking into account dosage adjustment for difference on the administration site of the mixture. We observed no consistent changes in Magnevist or Carboplatin concentrations in the contralateral control side after systemic i.v. and i.c. NG29 administration (Fig. 5).

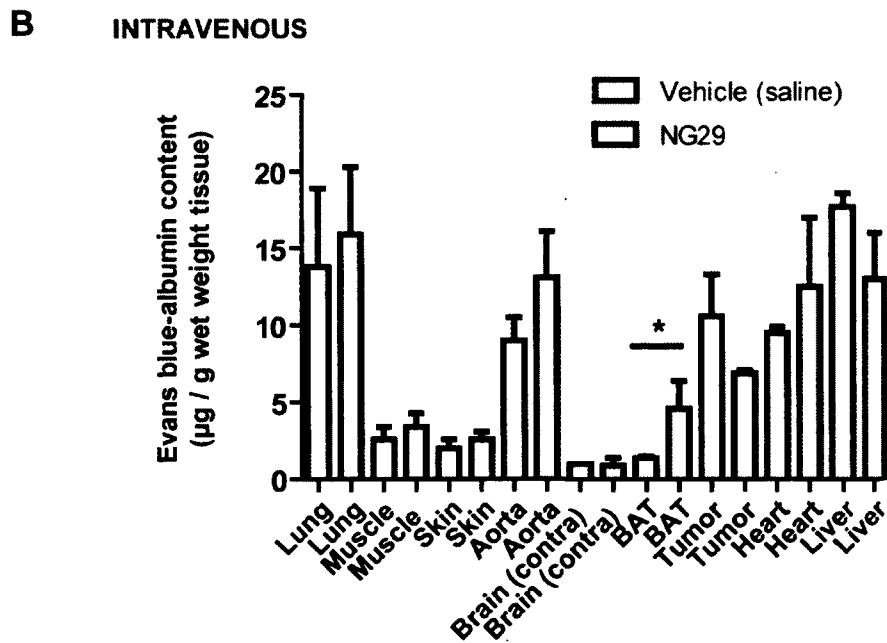
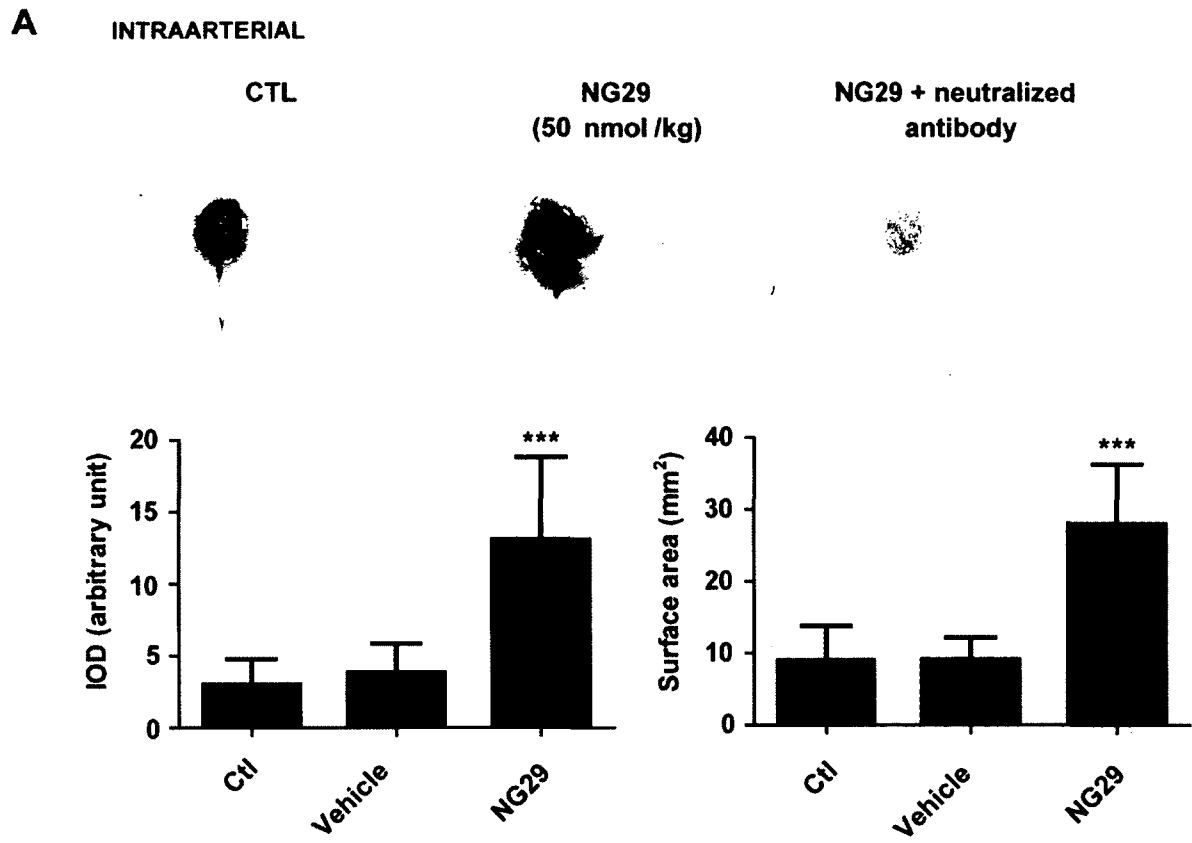
FIGURE 5
Côté et al., 2012



NG29 increases BTB permeability and the uptake of large protein albumin by rat gliomas and peritumoral tissues

We then looked at whether albumin (~65 kDa), which is a larger molecule than the CA, could also be delivered to tumor sites by modulating BTB permeability with NG29. Many chemotherapeutic agents (eg, chlorambucil, etoposide, melphalan, vincristine, and paclitaxel) are heavily bound (>90%) to plasma proteins, unabling them to cross the BBB [10]. We thus reasoned that it might be worthwhile to use synthetic B1R agonists to facilitate local entry of albumin-bound drugs given that the bound fraction will probably be released into brain tumors in order to maintain equilibrium. We used macroscopic direct albumin immunostaining and EB-staining methods to assess albumin uptake. The results of these experiments are presented in Fig. 6 (A and B). Positive albumin immunoreactivity can be seen in brain regions surrounding tumors in control animals, indicating the presence of inflammatory BBB damage (Fig. 6A, left upper panel). We observed an increase in extravasated albumin staining in the implanted hemisphere following disruption of the BTB with i.c. NG29 (50 nmol/kg/min for 5 min), with the periphery of tumor having more marked staining than the central portion (Fig. 6A, center upper panel). The presence of high interstitial fluid pressure in the core of tumor most likely explains this phenomenon. No staining was observed in control (not shown) and agonist treated sections using the antibody preabsorbed with purified rat albumin antigen (20-fold excess), demonstrating the specificity of the staining patterns observed (Fig. 6A, right upper panel). Both the surface area and the intensity of albumin immunostaining (expressed as total IOD) at tumoral sites increased in response to i.c. NG29 (Fig. 6A, left and right bottom panels). The co-injection of i.v. NG29 with the albumin-binding dye Evans blue caused brain tumor-specific accumulation of the dye (Fig. 6B), suggesting that i.v. administered NG29 homes to brain tumors by initially binding to B1R that are specifically expressed on tumor microvessels. As shown by the IHC staining of albumin, the local induction of plasma albumin extravasation by NG29 was markedly more localized at the invasion site (referred to as BAT) than at the tumor itself (approximately 2- versus 1.5-fold increase, respectively).

FIGURE 6
Côté et al., 2012



No significant changes in mean arterial blood pressure, heart rate, respiratory rate, or body temperature were observed following the administration of NG29, regardless of administration route and dosing regimen (Supplementary Fig. S3). Hematocrit and arterial pH values also remained in physiological ranges at 1 h post-NG29 administration (data not shown). Thus, the pharmacological modulation of BTB with NG29 agonist appeared to be safe and secure. The apparent lack of toxicity of NG29 was supported by the results of preliminary toxicity analyses consisting of repeated daily bolus injections of single suprapharmacological dose of the peptide NG29 (50 mg/kg, i.v. tail-vein) over a period of three days in normal Fischer rats. Except for a mild elevation of body temperature (control: 37 ± 1 vs treated 39 ± 1 C°), which disappeared within few hours (possibly mediated by central release and action of proinflammatory prostaglandins (Fig. 4B)), NG29 had no toxic effects (data not shown).

Taken together, our results show that B1R agonism may be a valuable therapeutic approach for increasing the selective penetration into brain tumors of systemically administered chemotherapeutic drugs or tumor-imaging agents that otherwise have no or limited access to this region. Cognate agonists that are not metabolized in the bloodstream and that temporarily increase BTB permeability may thus be potential adjuvants for optimizing the performance of anticancer drugs used in the treatment of malignant brain cancers.

DISCUSSION

The salient findings of our study can be summarized as follows: 1) intracranial F98 glioma tumors expressed B1R mRNA and protein; 2) B1R mainly localized in tumor cells (especially in the nuclear compartment) and the tumor vasculature; 3) systemic administration of the metabolically stabilized desArg⁹-bradykinin analogue, NG29, but not the natural agonist LDBK, promoted B1R-mediated transvascular delivery of hydrophilic low- and high-molecular weight soluble macromolecules (Magnevist, Gadomer, Carboplatin and endogenous albumin) through the BTB and their accumulation in tumors; 4) the single permeation of the BTB with NG29 was reversible, was effective by i.v. or i.a.

infusion, operated via a COX-mediated mechanism, and appeared relatively safe; and 5) importantly, various human glioblastoma cell lines and glioma patient samples of different grades exhibited high levels of B1R expression compared to their normal cellular/tissue counterparts, identifying the B1R as a potentially relevant biomarker and therapeutic target for brain cancer. Our findings offer preclinical proof of principle that targeting B1R in the brain tumor microenvironment can be a highly effective approach for delivery of chemotherapeutic agents.

Much effort has gone into identifying powerful and selective methods to bypass or transiently breach the BBB/BTB that could be used in chemotherapy protocols [51]. For instance, the chemical modification of drugs and the use of transcellular, receptor-mediated transport mechanisms (known as transcytosis) are possible methods for enhancing drug targeting to brain tumors. However, the clinical benefit of these approaches has yet to be proved [51,52]. Other methods to open the BBB/BTB via the paracellular pathway such as the intracarotid infusion of hyperosmolar mannitol or Cereport (Labradimil and formerly called RMP-7), a selective bradykinin B2R agonist, have been shown to be safe, with no associated vasogenic brain edema and apparent neurocognitive function loss, and effective in the adjuvant treatment of experimental and clinical brain tumors [10,11,53,54]. However, both techniques have a number of disadvantages. The osmotic BBB disruption procedure using mannitol is cumbersome and highly invasive, requires general anesthesia, permeabilizes the normal BBB, thus is not fully compatible with certain classes of chemotherapy that are neurotoxic (e.g. taxanes, doxorubicin, cisplatin), and carries a risk of inducing seizures [10]. The BK-B2R-mediated BTB opening using Cereport is transient and lasts only 20 min, even with continuous infusion of the agonist. In addition, it does not work when the agonist is i.v. administered [14]. Cereport also has a narrow therapeutic index and a number of adverse effects, mainly vasodilatation and decreased blood pressure, which limit its practical value [14,54].

We provide a new mechanistic insight into the design of minimally invasive pharmacological method for inducing local, transient BTB permeability to enhance transvascular transport of drugs intended to detect (namely MRI agents) and to treat brain

cancer, thus paving the way for earlier diagnosis and more targeted treatments. The method relies on systemic co-administration of potentially safe, fast acting, synthetic peptide agonists such as NG29 [40] that trigger kinin B1R activity at brain tumor sites. We believe that synthetic biostable peptide B1R agonists, when used as BTB permeability enhancers, may offer a number of potential advantages over other strategies including a) unsurpassed affinity/potency towards human B1R [40], b) expected good safety profile due to their high selectivity and specificity [40], c) a negligible immunogenicity, as with other kinin related peptides of similar size such as Icatibant [55], Cereport [54] and R954 [56] (Sirois P, personal communication), d) a high therapeutic index due to the localized expression of B1R in tumors (Figs 1, 2 and 5) (B1R has virtually no role in normal physiology), e) a lack of tachyphylaxis by receptor desensitization upon agonist exposure [17], which may explain why the BTB-permeability effects of B1R agonists lasted considerably longer than those of the B2R agonists BK and Cereport (Fig. 4), f) may not require surgery and general anesthesia if given i.v., and g) do not require chemical modifications to deliver the drug in the CNS.

In addition, our findings showed that there is concordant high-level expression of (vascular and tumoral) B1R on malignant tumors in the preclinical F98 glioma xenograft model (Fig. 1), in various human glioblastoma cell lines and in clinical glioma samples (Fig. 2), as shown by our RT-PCR, WB, and IHC results. It is to be noted that the high prevalence of B1R protein expression we observed in malignant glioma patient samples may occasionally extend to adjacent peritumoral brain regions (Fig. 2C), possibly due to the presence of infiltrative tumor cells. Our initial validation of B1R targets in actual high-grade human glioma cells and tumor microvessels underlines the need for further research to assess the potential of B1R agonists in the diagnosis and/or adjuvant chemotherapy of brain tumors. Determining expression levels of expression in human high-grade glioma biopsies may also be valuable for the early prediction of treatment responses to B1R agonists that modulate BTB permeability.

We used high-field MRI to show that the B1R agonist NG29 can induce rapid transvascular delivery and uptake increment (about 1.5-fold higher) of both Magnevist (0.5

kDa) and Gadomer (17 kDa) into intracerebral F98 glioma in syngeneic Fischer rats, as shown by the increase of T_1 MRI intensity signals (Figs. 3 and 4). It should be noted that the areas of BTB disruption following intracerebral injection of NG29 corresponded closely with the distribution of B1R in the tumor (Fig. 1). Similar efficacy data of NG29 were obtained using a syngeneic rat model of intracerebral metastatic breast cancer (a secondary brain tumor model) with an impeded BTB [57] (Supplementary Fig. S4). The sizes of these MRI agents cover the spectrum of molecular weights of most commonly used antineoplastic agents [9,51].

Systemic co-administration of NG29 also improved brain tumor uptake profiles (2-fold) of i.v. or i.a. Carboplatin (Fig. 4), which is in agreement with the MRI results. This is in the same range of increase of [^{14}C]-Carboplatin levels induced by ic Cereport in RG2 brain tumors [58]. Our results also indicated that NG29 opens the BTB wide enough to allow free and Evans blue bound-albumin (~65 kDa) to cross the BTB (Fig. 5). Good brain tumor penetration of drugs of comparable or smaller dimensions can thus be expected. For instance, B1R agonists could conceivably be used as an add-on treatment to improve glioma immunotherapy aimed at artificially priming the immune system with specific cytokines (ex. IL-12, IFN- β , TNF- α , etc.) that promote antitumor T-cell activity [59,60], as previously proposed for the selective B2R bradykinin analogue Cereport [61]. Combining B1R agonist with different anticancer drugs may be particularly useful in a multipronged “cocktail” attack of brain tumor cells, which is the gold standard of modern clinical trial designs [62]. However, further work is required to confirm this hypothesis. Overall, our findings demonstrate that the B1R agonist NG29 can be administered i.a. and i.v. in dosages that create preferential extensive extravasation of various drugs in the glioma microenvironment (including central and peripheral portions) while not disturbing the integrity of normal microvessels of organs, such as the normal brain, lung, muscle, skin, heart, liver, and of macrovessels (aortae) (Fig. 6). This may be particularly relevant with regards to increasing therapeutic delivery within and most importantly, beyond the edge of the primary tumor in order to gain access to infiltrated tumor foci.

As mentioned, drugs penetrate the BBB/BTB via the paracellular tight junctional and transcellular vesicular pathways, among others [13]. Since albumin and the two CA used in the present study are apparently not transported across the BBB/BTB via any known transcellular pathway, these results would suggest that NG29 mediates the increase in cerebrovascular permeability mostly through a paracellular mechanism. However, in the absence of *in vivo* results from tests with specific markers of transcellular permeability such as transferrin, insulin, and amino acids [13], it is possible that NG29 increases both paracellular and transcellular permeation across the BTB. Other experiments will be required to clarify this issue.

We have partially deciphered the mechanism underlying the NG29-induced increase in BTB permeability and the delivery of drugs to brain tumors. This may involve direct activation of the B1R at the tumor vasculature causing i) increased blood flow (hyperemia) through arterial/arteriolar vasodilatation, ii) increase in venular tone (venoconstriction) leading in both cases to a rise in capillary hydrostatic pressure and/or iii) increased capillary/venule permeability by retraction (fenestration) of the endothelial cells. All of these events may cause in turn, disengagement of tight junctional zones in capillaries/venules and contribute to the opening of the paracellular pathway [29,63]. In addition, since glioma cells overexpress B1R (Figs. 1 and 2) and can secrete capillary permeability factors such as arachidonic acid when activated [64], we cannot exclude the possibility of an indirect mechanism of NG29 passing through the BTB and acting on these cancer cells in the induction of BTB opening, much like the B2R-mediated increase in BTB permeability caused by Cereport [65,66]. Future studies are necessary to elucidate the exact mechanism(s) responsible for the tumor hyperpermeability responses to NG29. However, our results provide convincing evidence that secondarily released prostanoids play a key role given that pharmacological inhibition of the COX pathway, but not the NOS pathway, repressed NG29 activity. This contrasts with the B2R-mediated increase in BTB permeability in RG2 or F98 glioma-bearing rats, which mainly depends on NO production [34,67].

As already emphasized for Cereport [68] and mannitol [53], the rate and duration of agent infusion, among other parameters, are to be considered critical factors for successful BTB disruption. Experiments are underway to determine whether prolonged infusion of NG29 could extend much further the opening period of time and retard recovery (closure) of the BBB/BTB. Because of absence of ligand-induced desensitization of B1R [17], a prolongation of signalling pathway initiating endothelial retraction or inhibition of intercellular adhesion may be anticipated. These experiments will most likely be necessary to establish an optimum dosing paradigm and improve therapeutic efficacy. Agonizing the B1R with NG29 to tackle the porosity-permeability problem of the BTB appears relatively safe, as there was no abnormality evidence of some forms of hemodynamic and respiratory instabilities. This is in marked contrast with the earlier approach using metabolically protected agonists to activate B2R in order to manipulate the BTB [14,69]. In fact, under the same experimental conditions, we observed severe undesired effects (non-specific permeability induction, disturbance of respiratory function, hypotension) when the pseudopeptide B2R agonist R523 ([Phe⁸ψ(CH₂NH)Arg⁹]-BK) [34,70] was used at the same dose as NG29 (50 nmol/kg/min for 5 min, i.c.) (Supplementary Fig. S4).

One possible concern about the use of exogenous selective B1R kinins as BTB disruptors in adjuvant glioma therapy is that they can potentially act as mitogens with promigratory activity (at least in vitro) and may thereby accelerate disease progression [71,72]. However, some evidence argues against this possibility. First, the proliferation rate of F98 cells cultured in vitro in the presence of LDBK or NG29 (10µM) over a 96-h exposure period was the same as the control untreated cells, as determined with the MTT colorimetric method (data not shown). Second, and more convincingly, the median and maximum survival of F98 glioma bearing rats following i.a. and i.v. infusion of NG29 at maximal doses tested were the same as those of the vehicle-treated animals (data not shown). This is in agreement with the findings of similar survival studies in orthotopic brain tumor xenograft models that used the selective kinin B2R agonist analogue Cereport, which had no stimulatory growth effects on brain tumor cells (see review ref. [54]).

Lastly, one unanticipated finding of the study was that the B1R are predominantly expressed internally, mainly at the nuclear envelope, in situ high-grade rat and human glioma tumors (Figs. 1 and 2). Elevated B2R levels in the nucleus have recently been documented in the F98 rat glioblastoma model [34]. Elevated nuclear B1R and B2R levels have also been reported in other types of cancer such as malignant pleural mesotheliomas [73] and lung cancer [74]. An emerging concept in the field of GPCRs is that these receptors can function intracellularly on ER/nuclear membranes to promote noncanonical actions in normal physiological as well as disease states [41,75,76,77,78]. Whether B1R located at the ER/nuclear envelope can mediate intracrine regulation of oncogenic pathways associated with aberrant growth, invasion and survival processes of glioma cells are subjects of investigation in our laboratory.

In conclusion, our results document a novel GPCR signaling mechanism for promoting transient BTB disruption to F98 rat glioma, involving activation of B1R and ensuing production of COX metabolites. Our results also underline the potential value of synthetic B1R agonists as selective BTB modulators for increasing the local delivery of various sized-therapeutic agents to (peri)tumoral sites. Combining chemotherapeutic agents with a B1R agonist may thus be a valuable strategy for improving the effectiveness of the agents against malignant gliomas while possibly minimizing systemic exposure.

MATERIALS AND METHODS

Solid phase peptide synthesis

The peptide kinin agonists LysdesArg⁹BK (H-Lys⁰-Arg¹-Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸-OH); LDBK), SarLys[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK (NG29), and antagonists AcLys[(α Me)Phe⁵,D β NaI⁷,Ile⁸]desArg⁹BK (R892) and DArg[Hyp³,Thi⁵,dTic⁷,Oic⁸]BK (HOE140), were synthesized on a Pioneer peptide synthesizer using the Fmoc (9-fluorenylmethoxy-carbonyl) solid-phase chemistry as previously described [40,70]. Peptide purity (>95%) was assessed by analytical RP-HPLC, and molecular weights were

verified by electrospray mass spectrometry using a VG Platform ns 8230E (Waters). Binding affinity (transiently transfected HEK-293T cells) and pharmacological activity (contraction of isolated human umbilical veins) of the peptides on human B1R expressing systems were in agreement with previously reported data from our laboratories, indicating a high level of batch-to-batch consistency [40,45,70]. Peptides were stored in powder form at -20°C. Stock solutions (10 mM) of peptides were also prepared in Nanopure water and were stored at -20°C until use. The stock solutions were diluted in sterile 0.9% saline prior to each experiment.

Animals

Male Fischer 344 rats (250-275g, Charles River Laboratories, St-Constant, Québec, Canada) were used. Animals were used in full compliance with the Canadian Council of Animal Care guidelines. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Sherbrooke (CIPA/CFPA-FMSS).

Clinical samples

Fresh human brain tumor tissues were obtained from 41 patients (26 males and 15 females, aged 21–75 years) who underwent therapeutic removal of astrocytic brain tumors between 2004 and 2009 at the Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS). Whenever possible, peritumoral brain samples (comprising infiltrative astrocytomas and normal brain tissues) were also collected. Most specimens were obtained at primary resection. All glioma specimens were classified morphologically and graded by an experienced neuropathologist (AM. S.), as per WHO criteria. One astrocytoma WHO grade 2 (from a 67 year male) was purchased from BioChain. Post-mortem human brain (frontal or temporal) cortex tissues from white males aged between 36 to 62 years old who had met sudden death resulting from either cardiac arrest (1 case), drowning (1 case), or pulmonary embolism (2 cases)) were obtained from the Maryland Brain collection (Maryland Psychiatric Research Center, Baltimore, MD, USA) and were used as controls. The resected tumors or normal brain tissue specimens were snap-frozen in liquid nitrogen and

were stored at -80°C until used for RNA and protein extractions. Other tumors were fixed in 10% buffered formaldehyde for ~24h, embedded in paraffin, cut into 3-µm-thick sections, and mounted on silanized slides. For histological confirmation, the sections were stained with haematoxylin and eosin. The study was carried out with the approval of the research ethic board for human subject of the CHUS. All participants gave verbal informed consent until 2008 (the Ethic Committee did not demand that the consent should be documented at this time). Since 2008, written consent has been obtained to save diagnostic samples in a biobank to be used for scientific research.

Cell lines and cultures

The established human glioma cancer cell lines U87-MG (#HTB-14), U138-MG (#HTB-16), U118-MG (#HTB-15), T98G (#CRL1690), LN-229 (#CRL2611), and the F98 rat glioma cells (#CRL-2397) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). These cells were cultured as monolayers in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin mixture at 37°C in a humidified 5% CO₂/95% air incubator.

Glioma cell implantation

The procedure of F98 glioma cell implantation was similar to that used in our previous studies [33,34]. Briefly, F98 glioma cells (1×10^4 cells in 5 µl) were injected into the region of the right caudate nucleus of the animals under ketamine: xylazine anesthesia (87 mg/kg:13 mg/kg, i.p.) at the following stereotaxic coordinates: 1 mm anterior and 3 mm lateral to bregma, and 6 mm below the external table of the skull. Unless otherwise specified, tumors were allowed to grow for 10 days to mid-stage (approximately 15-20 mm³) before the beginning of the experiments. All tumor transplantations were successful as determined by histology and/or MRI.

RT-PCR

The rats were anesthetized with 2% isoflurane and were transcardially perfused with 60 ml of phosphate-buffered saline (PBS; 0.01M phosphate-buffered 0.9% NaCl solution, pH 7.6). Brain tumors and control autologous tissues from the contralateral hemisphere were resected from the brains. Resected samples were snap-frozen in liquid nitrogen and were stored at -80°C until use. RNA was extracted and reverse transcribed as previously described [34]. The oligonucleotide primers for amplifying the kinin rat B1R and 18S (internal control), and the length of the expected PCR products (in parentheses) were as follows: B1: F 5'-ACT GTG TCA ACG TCA GGT CAC TGT-3', R 5'-GAT GCT GAC AAA CAG GTT GGC CTT-3' (431 bp); 18S : F 5'-GTG CAT GGC CGT TCT TAG TTG GTG-3', R 5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAG CGA CGG-3' (401 bp). Amplification reaction mixtures contained 1x amplification buffer, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM dNTPs, 400 nM primers, and 1 U of Platinum Pfx DNA polymerase (Invitrogen, Canada). As a negative control, reverse transcriptase was omitted during the initial cDNA synthesis step. The PCR products were quantified using the DNA 1000 kit for the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies) [34].

Western blot

Brain tumors and control autologous subcortical tissue taken from the contralateral hemisphere were resected from the brains under the same conditions as above. Total protein extraction from tissues were prepared by adding RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.25% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1mM NaF) containing a protease inhibitor cocktail (Roche, Canada). Brain samples were disrupted using a Potter homogenizer and left on ice for 15 min. Tissue extracts were sonicated twice for 10-sec bursts on ice and then centrifuged at 16,000g for 15min at 4°C. Whole-cell lysates were also prepared from semi-confluent human glioma cell line cultures. A lysate of primary normal human astrocytes (NHA) purchased from Sciencell Research Laboratories (Carlsbad, CA) was used as a control. Proteins were quantified using BCA™ (bicinchoninic acid) protein assay kits (Pierce). SDS-PAGE and Western

blotting (WB) were performed as previously described [78]. The following primary antibodies and dilutions were used: rabbit anti-B1R antiserum (mix AS434: 0.2 µg/ml; 1:5,000) (provided by Dr. W Müller-Esterl, University of Mainz, Germany) and mouse monoclonal anti-β-actin antibody (1:20,000, Sigma-Aldrich). Rabbit anti-mouse (1:20,000, Sigma-Aldrich) or sheep anti-rabbit (1:10,000; Serotec) antibody conjugated to horseradish peroxidase was used as secondary antibody. The same techniques were used to extract total proteins from human normal brain and glioma samples for WB. B1R expression was quantified using ImageProPlus 5.1 and was normalized against β-actin expression level. The specificity of the antiserum to B1R (raised against intra- and extra-cellular domains of the human B1R sequence) has been reported elsewhere [70]. On some occasions, the staining pattern seen with the AS434 antiserum was confirmed using two other polyclonal anti-B1R antibodies (recognizing C-terminal domains), namely LS-A799 (1:1000, LifeSpan) and RC72 (1:300; a kind gift of Dr. R Couture, Université de Montréal, Canada).

Immunohistochemistry

F98-implanted rats were deeply anesthetized with ketamine: xylazine on day 10 and were then perfused with PBS, followed by 4% formalin solution. Brains were carefully removed, post-fixed overnight in 4% formalin. A 5-mm-thick coronal brain slice containing the tumor was paraffin embedded, and 3-µm-sections were mounted on positively charged slides for immunochemical localization of B1R. IHC staining was performed with an automated system (Dako Autostainer plus) using the Envision Flex High pH visualization system (Dako). The mix anti-B1R antiserum (AS434) was diluted 1:800 in blocking buffer and incubated on the brain slides 1 h at room temperature. After washing, secondary sheep anti-rabbit antibody-HRP (1:100) (Serotec) was added for 1 h at room temperature. Diaminobenzidine (DAB) (Roche) was used as chromogen. Nuclei were counterstained with hematoxylin. An identical IHC staining protocol was used for the human normal brain and glioma biopsies. All the slides were observed under light microscopy (Olympus model BX51). For high-resolution transmission electron microscopy (TEM), tissue samples were processed according to standard techniques [78]. Ultrathin epoxy-embedded sections (~50 nm) were collected on formvar-coated nickel grids and

were immunolabelled with AS434 (1:20). The grids were then incubated with a goat anti-rabbit gold (10 nm)-conjugated IgG (1:20) (Sigma-Aldrich) without silver intensification. The sections were then examined using a transmission electron microscope at 120 kV (Hitachi, H-7500). Sections treated with normal (preimmune) rabbit serum were used as negative controls.

BTB permeabilization procedure

The experimental protocol was similar to that used in a previous study [34]. The animals were anesthetized using isoflurane gas (2%) with 1.5 l/min of oxygen. All surgical procedures were performed on a heating pad to avoid per-procedural hypothermia. The caudal vein was catheterized to enable the injection of CA via PE-10 intramedic tubing later connected to a remote-controlled power injector (model PHD 2000, Harvard Apparatus). The right carotid complex was surgically exposed and the external carotid artery was catheterized in a retrograde fashion using PE-50 intramedic tubing such that the tip of the catheter lay just above the bifurcation. This catheter was used to infuse drugs directly into the right hemisphere of the brain via the internal carotid. For the BTB permeabilization procedure, the animals received a single intracarotid infusion of vehicle (sterile 0.9% saline), B1R agonist (LDBK or NG29) (2.5, 10 or 50 nmol/kg/min for 5 min) alone, or NG29 in combination with antagonists for B1R (R892) or B2R (HOE140) (20 nmol/kg/min for 5 min), during MRI scans (see below). Total volume infused was kept constant at 0.5 ml. In other experiments, animals were pretreated with non-selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors (L-NA (5 mg/kg) or L-NAME (20 mg/kg) (Sigma-Aldrich)) or with non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitors (Meclofenamate (5 mg/kg) or Indomethacine (2.5 mg/kg) (Sigma-Aldrich)). These inhibitors were given i.v. as a bolus with a 150 μ l saline flush via the caudal vein, 30 minutes prior to intracarotid NG29 infusion (10 nmol/kg/min for 5 min). All the inhibitors were dissolved in isotonic saline, except indomethacine, which was dissolved in 75% ethanol prior to dilution. The doses of the inhibitors were selected based on results of previous studies. In some cases, NG29 was also administered via the intrajugular route by a catheter pre-inserted through the right internal jugular vein. Arterial blood pressure was monitored throughout the experimental

period with a blood pressure monitor (DigiMed) using the catheter surgically inserted into right femoral artery.

MRI and data post-processing

MRI studies were conducted at the Centre d'Imagerie Moléculaire de Sherbrooke using a Varian 7T small animal scanner (Varian Inc.) equipped with 210/120 mm gradient coils (30 G/cm) and a 63-mm volume RF coil. All MRI measurements were performed according to Côté et al. [34]. For the MRI experiments, the animals were anesthetized with 2% isoflurane (Abott) administered with a face mask. The temperature in the scanner was kept constant at 30°C (with rectal temperature remaining near 37°C) using a warm-air heating system (SA Instruments). Thirty sets of T_1 -weighted images were acquired continuously before, during, and after CA injection with a temporal resolution of ~51s using the following parameters: TR = 100 ms, TE = 2.49 ms, $\alpha = 30^\circ$, matrix = 128 x 128, field of view (FOV) = 35 x 35 mm², number of averages = 4, and ten contiguous 1.5- mm-thick slices. The MRI experiments were performed in two sessions (without and then with BTB permeabilization procedure) for each animal. This study design allows each animal to act as its own control. The first MRI session was performed with a bolus injection (3 min after the first of 50 scans) of either Magnevist (Gd-DTPA, 0.5 kDa) or Gadomer (~17 kDa) (143 mM in 500 μ l, 1 min duration) (Bayer Schering Pharma AG, Germany) in the lateral tail-vein to determine the extent of BTB permeability in and around the intracranial tumor. The second MRI session was performed using a bolus injection of the same CA immediately following the permeabilization of the BTB with a B1R agonist (see above). The time lags between sessions were 4 h for Magnevist and 12 h for Gadomer. These time lags were selected to ensure complete elimination of the CA from the brain circulation [34].

The image data was processed using MATLAB[®] (The MathWorks, 2007). Both sets of anatomic MR images were analyzed for the presence or absence of contrast enhancement within and surrounding the tumor areas, and were processed to yield quantitative contrast agent distribution volume (CADV; in mm³), which was used as an

index of vascular permeability [34]. The relative CADV expressed as a percentage is defined as the normalized ratio between the maximal CADV value determined from the second set of images acquired (CA + BTB permeabilization procedure) and the maximal CADV value determined from the first set of images (CA alone). In separate analyses, the MRI signals were calibrated in terms of the concentration of CA in the brain parenchyma (and jaw muscles) using the precontrast T_1 map and the relaxivity of Magnevist ($3.6 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) and Gadomer ($8.74 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) at 7T.

ICP-MS of platinum and gadolinium

The rats were anesthetized with isoflurane (2%), and either the external carotid artery or the caudal vein was cannulated. A mixture of Magnevist (143 mM) and Carboplatin (5 mg/ml/rat; 20 mg/kg) including or not NG29 (i.a.: 250 nmol/kg or i.v.: 1 $\mu\text{mol/kg}$), was given in a single 1-ml infusion over 15 min. Five minutes after the end of the infusion, anesthetized rats were euthanized by transection of vena cava followed by an intra-cardiac injection of saline (100 ml) in order to flush the blood from the brain. The brain was rapidly removed and placed in physiological saline. The tumors as well as size-related samples of peritumoral tissue and matched tissue located in contralateral hemisphere were resected. These samples were weighed and digested in 2 ml of hydrogen peroxide (30%)/nitric acid solution for 24 h. Gadolinium (Gd) and platinum (Pt) levels were then measured by inductively coupled plasma-mass spectroscopy (ICP-MS; Elan DRC II, Perkin Elmer).

Assessment of vascular permeability to albumin

A direct immunohistochemical technique was used for endogenous albumin staining in the evaluation of BBB permeability with i.c. NG29 (see BTB disruption procedure). Slides with 5- μm sections were equilibrated in Tris-buffered saline-0.1% Tween 20 (TBS-T, pH 7.6) for 10 min. They were then incubated with HRP conjugated-sheep anti-rat albumin (Accurate Chemical and Scientific Corporation) diluted 1:50 in

TBS-T overnight at 4°C. After extensive washing, Diaminobenzidine (DAB) (Roche) was used as chromogen. Nuclei were counterstained with hematoxylin. The specificity of the patterns observed was confirmed by preabsorbing the antibody with a 20-fold excess (w/w) of pure rat albumin (Accurate Chemical and Scientific Corporation). Images of whole immunolabelled rat brain tissue sections were acquired using a Nikon Super Coolscan 9000 ED scanner at a resolution of 4000 dpi and analysed with ImagePro 5.1 software. For each animal group (untreated, vehicle control and experimental treated groups; n=4/group), the integrated optical density (IOD) and surface area (mm²) values were calculated from at least four tissue sections per animal. Details of image acquisition, processing and albumin quantification are provided in supplementary methods.

Organ-specific NG29-induced extravasation was also assessed in tumor-bearing animals under ketamine: xylazine anesthesia using the semi-quantitative albumin-bound Evans blue method. Immediately after intravenous femoral saline or B1R agonist infusion (5 mg/kg infused over 15 min via a femoral vein catheter), the animals were injected i.v. with Evans blue (10 mg/kg, Sigma-Aldrich). The animals were euthanized after 45 min. Following a systemic perfusion with 250 ml of 0.9% saline to remove macromolecules in the circulation, tumor and normal organ specimens (lung, skeletal muscle, skin, aorta, brain, heart ventricle, liver) were excised, minced, and dye extracted by formamide (1 ml per 100 mg tissue) for 72 h. The absorbance of Evans blue at 620 nm was measured with a spectrophotometer (Spectra Max Plus 384, Molecular Devices). The dye concentration in the tissue extracts was calculated from a standard curve of Evans blue.

Vital signs and hemodynamic measurements

Vital signs (respiratory rate, blood pressure, heart rate, body temperature) and other physiological variables (hematocrit, arterial pH) were monitored during i.a. and i.v. NG29 administration in isoflurane-anesthetized adult F98 glioma-implanted rats. A PE 50 catheter was inserted into the left common carotid artery to continuously monitor the mean arterial pressure and the heart rate with a Micro-Med transducer (model TDX-300) connected to a blood pressure Micro-Med analyzer (model BPA-100c). Blood samples

were withdrawn from a catheter inserted in the left femoral artery to monitor both hematocrit and pH levels.

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm standard error of the mean (S.E.M.) for the specified number (n) of animal tested. Statistical comparisons were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test or Student's t test for unpaired observation when appropriate. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgements

We recognize the expert technical assistance of Andr eanne Gagner and Ang le Tremblay. We also wish to thank Bayer Schering Pharma AG (Germany) for generously providing Gadomer.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the experiments: JC FG. Performed the experiments: JC VB MS CD AF. Analyzed the data: JC MS LT AMS DF ML FG. Contributed reagents/materials/analysis tools: ME ML DF FG. Wrote the paper: JC VB MS FG.

REFERENCES

1. Maroldi R, Ambrosi C, Farina D (2005) Metastatic disease of the brain: extra-axial metastases (skull, dura, leptomeningeal) and tumour spread. *Eur Radiol* 15: 617-626.
2. Rainov NG, Soling A, Heidecke V (2006) Novel therapies for malignant gliomas: a local affair? *Neurosurg Focus* 20: E9.
3. Rich JN, Bigner DD (2004) Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. *Nat Rev Drug Discov* 3: 430-446.

4. Hoffman S, Propp JM, McCarthy BJ (2006) Temporal trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1999. *Neuro Oncol* 8: 27-37.
5. Mao Y, Desmeules M, Semenciw RM, Hill G, Gaudette L, et al. (1991) Increasing brain cancer rates in Canada. *Cmaj* 145: 1583-1591.
6. Mathieu D, Fortin D (2006) The role of chemotherapy in the treatment of malignant astrocytomas. *Can J Neurol Sci* 33: 127-140.
7. Nieder C, Mehta MP, Jalali R (2009) Combined radio- and chemotherapy of brain tumours in adult patients. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 21: 515-524.
8. Stewart LA (2002) Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 359: 1011-1018.
9. Mathieu D, Fortin D (2007) Chemotherapy and delivery in the treatment of primary brain tumors. *Curr Clin Pharmacol* 2: 197-211.
10. Muldoon LL, Soussain C, Jahnke K, Johanson C, Siegal T, et al. (2007) Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignancy: a reality check. *J Clin Oncol* 25: 2295-2305.
11. Neuwelt E, Abbott NJ, Abrey L, Banks WA, Blakley B, et al. (2008) Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol* 7: 84-96.
12. Pardridge WM (2002) Why is the global CNS pharmaceutical market so under-penetrated? *Drug Discov Today* 7: 5-7.
13. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41-53.
14. Black KL, Ningaraj NS (2004) Modulation of brain tumor capillaries for enhanced drug delivery selectively to brain tumor. *Cancer Control* 11: 165-173.
15. McLean PG, Perretti M, Ahluwalia A (2000) Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc Res* 48: 194-210.
16. Wahl M, Whalley ET, Unterberg A, Schilling L, Parsons AA, et al. (1996) Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation. *Immunopharmacology* 33: 257-263.
17. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57: 27-77.

18. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR (1998) The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50: 357-386.
19. Black KL, Chen K, Becker DP, Merrill JE (1992) Inflammatory leukocytes associated with increased immunosuppression by glioblastoma. *J Neurosurg* 77: 120-126.
20. Maeda H, Akaike T, Wu J, Noguchi Y, Sakata Y (1996) Bradykinin and nitric oxide in infectious disease and cancer. *Immunopharmacology* 33: 222-230.
21. Sasaki A, Tamura M, Hasegawa M, Ishiuchi S, Hirato J, et al. (1998) Expression of interleukin-1beta mRNA and protein in human gliomas assessed by RT-PCR and immunohistochemistry. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 653-663.
22. Abdouh M, Talbot S, Couture R, Hassessian HM (2008) Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. *Br J Pharmacol* 154: 136-143.
23. Cruwys SC, Garrett NE, Perkins MN, Blake DR, Kidd BL (1994) The role of bradykinin B1 receptors in the maintenance of intra-articular plasma extravasation in chronic antigen-induced arthritis. *Br J Pharmacol* 113: 940-944.
24. Hayashi I, Amano H, Ishihara K, Kumagai Y, Yoshimura H, et al. (2002) The role of kinin B1 in the plasma extravasation of carrageenin-induced pleurisy. *Life Sci* 70: 937-949.
25. Simard B, Gabra BH, Sirois P (2002) Inhibitory effect of a novel bradykinin B1 receptor antagonist, R-954, on enhanced vascular permeability in type 1 diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 1203-1207.
26. Vianna RM, Calixto JB (1998) Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg9-BK in mouse pleurisy. *Br J Pharmacol* 123: 281-291.
27. Cardoso RC, Lobao-Soares B, Bianchin MM, Carlotti CG, Jr., Walz R, et al. (2004) Enhancement of blood-tumor barrier permeability by Sar-[D-Phe8]des-Arg9BK, a metabolically resistant bradykinin B1 agonist, in a rat C6 glioma model. *BMC Neurosci* 5: 38.
28. Prat A, Biernacki K, Pouly S, Nalbantoglu J, Couture R, et al. (2000) Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 896-906.
29. Sarker MH, Hu DE, Fraser PA (2000) Acute effects of bradykinin on cerebral microvascular permeability in the anaesthetized rat. *J Physiol* 528 Pt 1: 177-187.

30. Fortier A, Bovenzi V, Fortin D, Gobeil F (2006) Étude de l'expression des récepteurs B1 et B2 des kinines chez les glioblastomes multiformes humains. *Médecine/Science* 22: 24 (Abstract).
31. Raidoo DM, Sawant S, Mahabeer R, Bhoola KD (1999) Kinin receptors are expressed in human astrocytic tumour cells. *Immunopharmacology* 43: 255-263.
32. Barth RF, Kaur B (2009) Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol* 94: 299-312.
33. Mathieu D, Lecomte R, Tsanaclis AM, Larouche A, Fortin D (2007) Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. *Can J Neurol Sci* 34: 296-306.
34. Côté J, Savard M, Bovenzi V, Dubuc C, Tremblay L, et al. (2010) Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe(8)psi(CH(2)NH)Arg(9)]-BK in a F98 glioma rat model: an MRI study. *Neuropeptides* 44: 177-185.
35. Jahnke K, Muldoon LL, Varallyay CG, Lewin SJ, Kraemer DF, et al. (2009) Bevacizumab and carboplatin increase survival and asymptomatic tumor volume in a glioma model. *Neuro Oncol* 11: 142-150.
36. Ross BD, Zhao YJ, Neal ER, Stegman LD, Ercolani M, et al. (1998) Contributions of cell kill and posttreatment tumor growth rates to the repopulation of intracerebral 9L tumors after chemotherapy: an MRI study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7012-7017.
37. Sarin H, Kanevsky AS, Fung SH, Butman JA, Cox RW, et al. (2009) Metabolically stable bradykinin B2 receptor agonists enhance transvascular drug delivery into malignant brain tumors by increasing drug half-life. *J Transl Med* 7: 33.
38. Yang W, Barth RF, Wu G, Ciesielski MJ, Fenstermaker RA, et al. (2005) Development of a syngeneic rat brain tumor model expressing EGFRvIII and its use for molecular targeting studies with monoclonal antibody L8A4. *Clin Cancer Res* 11: 341-350.
39. Yang W, Huo T, Barth RF, Gupta N, Weldon M, et al. (2011) Convection enhanced delivery of carboplatin in combination with radiotherapy for the treatment of brain tumors. *J Neurooncol* 101: 379-390.
40. Côté J, Savard M, Bovenzi V, Bélanger S, Morin J, et al. (2009) Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles. *Peptides* 30: 788-795.

41. Gobeil F, Fortier A, Zhu T, Bossolasco M, Leduc M, et al. (2006) G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 287-297.
42. Misra A, Chattopadhyay P, Dinda AK, Sarkar C, Mahapatra AK, et al. (2000) Extensive intra-tumor heterogeneity in primary human glial tumors as a result of locus non-specific genomic alterations. *J Neurooncol* 48: 1-12.
43. Pillai DR, Dittmar MS, Baldaranov D, Heidemann RM, Henning EC, et al. (2009) Cerebral ischemia-reperfusion injury in rats--a 3 T MRI study on biphasic blood-brain barrier opening and the dynamics of edema formation. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 1846-1855.
44. Norman MU, Lew RA, Smith AI, Hickey MJ (2003) Metalloendopeptidases EC 3.4.24.15/16 regulate bradykinin activity in the cerebral microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1942-1948.
45. Gobeil F, Jr., Charland S, Filteau C, Perron SI, Neugebauer W, et al. (1999) Kinin B1 receptor antagonists containing alpha-methyl-L-phenylalanine: in vitro and in vivo antagonistic activities. *Hypertension* 33: 823-829.
46. Wirth K, Hock FJ, Albus U, Linz W, Alpermann HG, et al. (1991) Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br J Pharmacol* 102: 774-777.
47. Tanaka S, Akaike T, Wu J, Fang J, Sawa T, et al. (2003) Modulation of tumor-selective vascular blood flow and extravasation by the stable prostaglandin I2 analogue beraprost sodium. *J Drug Target* 11: 45-52.
48. Williams TJ (1979) Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes of inflammation. *Br J Pharmacol* 65: 517-524.
49. Recinos VR, Tyler BM, Bekelis K, Sunshine SB, Vellimana A, et al. (2010) Combination of intracranial temozolomide with intracranial carmustine improves survival when compared with either treatment alone in a rodent glioma model. *Neurosurgery* 66: 530-537; discussion 537.
50. Sathornsumetee S, Reardon DA, Desjardins A, Quinn JA, Vredenburgh JJ, et al. (2007) Molecularly targeted therapy for malignant glioma. *Cancer* 110: 13-24.
51. Juillerat-Jeanneret L (2008) The targeted delivery of cancer drugs across the blood-brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles? *Drug Discov Today* 13: 1099-1106.
52. Erdlenbruch B, Alipour M, Fricker G, Miller DS, Kugler W, et al. (2003) Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in

normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries. *Br J Pharmacol* 140: 1201-1210.

53. Bellavance MA, Blanchette M, Fortin D (2008) Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy. *Aaps J* 10: 166-177.
54. Borlongan CV, Emerich DF (2003) Facilitation of drug entry into the CNS via transient permeation of blood brain barrier: laboratory and preliminary clinical evidence from bradykinin receptor agonist, Cereport. *Brain Res Bull* 60: 297-306.
55. Zuraw BL (2006) Novel therapies for hereditary angioedema. *Immunol Allergy Clin North Am* 26: 691-708.
56. Neugebauer W, Blais PA, Halle S, Filteau C, Regoli D, et al. (2002) Kinin B1 receptor antagonists with multi-enzymatic resistance properties. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 287-292.
57. Emerich DF, Dean RL, Marsh J, Pink M, Lafreniere D, et al. (2000) Intravenous cereport (RMP-7) enhances delivery of hydrophilic chemotherapeutics and increases survival in rats with metastatic tumors in the brain. *Pharm Res* 17: 1212-1219.
58. Dean RL, Emerich DF, Hasler BP, Bartus RT (1999) Cereport (RMP-7) increases carboplatin levels in brain tumors after pretreatment with dexamethasone. *Neuro Oncol* 1: 268-274.
59. Jean WC, Spellman SR, Wallenfriedman M, Hall WA, Low WC (1997) IL-12-based Tumor Cell Vaccine for the Treatment of Gliomas: 728. *Neurosurgery* 41: 726.
60. Ksendzovsky A, Glick RP, Polak P, Simonini M-V, Sharp AJ, et al. (2010) Mechanisms of Cytokine-Induced Glioma Immunosuppression. *The open immunology journal* 3: 30.
61. Nakano S, Matsukado K, Black KL (1997) Enhanced cytokines delivery and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression in glioma by intracarotid infusion of bradykinin analog, RMP-7. *Neurol Res* 19: 501-508.
62. Gilbert MR, Gonzalez J, Hunter K, Hess K, Giglio P, et al. (2010) A phase I factorial design study of dose-dense temozolomide alone and in combination with thalidomide, isotretinoin, and/or celecoxib as postchemoradiation adjuvant therapy for newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol* 12: 1167-1172.
63. Abbott NJ (2000) Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol* 20: 131-147.

64. Ohnishi T, Sher PB, Posner JB, Shapiro WR (1990) Capillary permeability factor secreted by malignant brain tumor. Role in peritumoral brain edema and possible mechanism for anti-edema effect of glucocorticoids. *J Neurosurg* 72: 245-251.
65. Liu Y, Hashizume K, Chen Z, Samoto K, Ningraj N, et al. (2001) Correlation between bradykinin-induced blood-tumor barrier permeability and B2 receptor expression in experimental brain tumors. *Neurol Res* 23: 379-387.
66. Uchida M, Chen Z, Liu Y, Black KL (2002) Overexpression of bradykinin type 2 receptors on glioma cells enhances bradykinin-mediated blood-brain tumor barrier permeability increase. *Neurol Res* 24: 739-746.
67. Nakano S, Matsukado K, Black KL (1996) Increased brain tumor microvessel permeability after intracarotid bradykinin infusion is mediated by nitric oxide. *Cancer Res* 56: 4027-4031.
68. Emerich DF, Snodgrass P, Dean R, Agostino M, Hasler B, et al. (1999) Enhanced delivery of carboplatin into brain tumours with intravenous Cereport (RMP-7): dramatic differences and insight gained from dosing parameters. *Br J Cancer* 80: 964-970.
69. Emerich DF, Dean RL, Osborn C, Bartus RT (2001) The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: from concept to clinical evaluation. *Clin Pharmacokinet* 40: 105-123.
70. Bélanger S, Bovenzi V, Côté J, Neugebauer W, Amblard M, et al. (2009) Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin B2 receptor. *Peptides* 30: 777-787.
71. Lu DY, Leung YM, Huang SM, Wong KL (2010) Bradykinin-induced cell migration and COX-2 production mediated by the bradykinin B1 receptor in glioma cells. *J Cell Biochem* 110: 141-150.
72. Walsh DA, Fan TPD (1997) Bradykinin as a growth factor. In: Farmer SG, editor. *The Kinin system*. San Diego: Academic Press. pp. 301-314.
73. Chee J, Singh J, Naran A, Misso NL, Thompson PJ, et al. (2007) Novel expression of kallikreins, kallikrein-related peptidases and kinin receptors in human pleural mesothelioma. *Biol Chem* 388: 1235-1242.
74. Chee J, Naran A, Misso NL, Thompson PJ, Bhoola KD (2008) Expression of tissue and plasma kallikreins and kinin B1 and B2 receptors in lung cancer. *Biol Chem* 389: 1225-1233.
75. Re RN, Cook JL (2011) Noncanonical intracrine action. *J Am Soc Hypertens* 5: 435-448.

76. Revankar CM, Mitchell HD, Field AS, Burai R, Corona C, et al. (2007) Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30. *ACS Chem Biol* 2: 536-544.
77. Robben JH, Kortenoeven ML, Sze M, Yae C, Milligan G, et al. (2009) Intracellular activation of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus by nonpeptide agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12195-12200.
78. Savard M, Barbaz D, Belanger S, Muller-Esterl W, Bkaily G, et al. (2008) Expression of endogenous nuclear bradykinin B2 receptors mediating signaling in immediate early gene activation. *J Cell Physiol* 216: 234-244.

Figure legends

Figure 1 - B1R expression in normal cerebral cortical and tumoral tissues of F98 glioma-bearing rats. (A) Left: Representative electropherograms and gel-like images (insets) of RT-PCR products amplified from one tumor and autologous contralateral tissue (normal); LM and UM correspond to lower and upper internal markers, respectively. Right: Histogrammic representation of B1R expression from multiple normal and tumoral tissues. B1R mRNA level was normalized to the corresponding 18S level for each biopsy. n= 5 rats. *p<0.05 vs normal. (B) Western blot of rat brain soluble protein extracts probed with the anti-B1R antiserum AS434. Left: Rat brain tumor shows a robust single immunoreactive band around 60 kD. In the absence of antiserum, no band was seen in the rat brain samples (not shown). Right: Histogrammic representation of B1R expression from multiple normal and tumoral tissues. B1R protein level was normalized to the corresponding β -actin level for each biopsy. n= 4 rats. *p<0.05 vs normal. (C) The antiserum used for Western blot was also used to characterize the location of the proteins in rat brain cortical samples by IHC, along with HRP (panels i-v), and TEM immunogold labeling (panel vi). Photomicrographs illustrating positive B1R immunoreactivity in tumor (C, i-iii) and microvascular endothelial cells (ii) adjacent to the tumor (black arrowheads). Note the chromosomal staining on all tumor cells under mitosis (black arrowheads, iii). Negative control with preimmune serum showed no staining (v). Weak positive B1R staining of glial cells from both implanted (ii) and contralateral hemispheres (iv) is also shown. Magnification as indicated. EM photomicrograph (vi) showing subcellular localization of B1R in a glioma cancer cell (white arrowheads). Insert: digital enlargement of the delineated area (white rectangle) showing B1R immunoreactivity at both the inner and outer leaflets of the nuclear envelope. Scale bar = 500nm. Photomicrographs of HRP labeling were equalized in terms of contrast, brightness and gamma using ImagePro Plus 5.1.

Figure 2 - Overexpression of B1R in human glioma tissues. (A) Detection of B1R in various human glioma cell lines and nontransformed counterparts, normal human astrocytes, by WB analysis. β -actin serves as a loading control in the lower panel. The doublet band in U138-MG cells may indicate degradation of B1R. (B) Comparative

quantification of B1R mRNA levels among normal and glioma brain tissue samples was normalized against that of the corresponding β -actin. (C) Expression of B1R in normal versus tumoral tissue specimens (left panel) or in paired primary glioma (T) and peritumoral tissue biopsies (P) (right panel), with each pair obtained from a same patient. (D) Representative images from IHC assay of paraffin-embedded specimens of primary glioma tissue biopsies (WHO grades II-IV) exposed to pre-immune serum or anti-hB1R AS434 antiserum. Optical magnification is indicated in the bottom-right corner of each image.

Figure 3 - NG29 enhances transvascular delivery, distribution and accumulation of Magnevist within brain tumor tissues of F98-bearing rats. (A) MRI contrast-enhanced detection of glial brain tumors in rats at day 3, 5, 7, 10 14 and 17 post-inoculation. Note the rapidly growing tumor over a 2-week time and the appearance of a necrotic center on the 17 day-image (white arrow) outgrowing its blood supply. Assessment of BTB disruption by MRI monitoring was conducted on the same animal on day 10 post-inoculation, corresponding to mid stage development of the tumor. (B) Representative axial Magnevist-enhanced T_1 -weighted MR images depicting the brain of an F98-implanted rat before and after NG29 treatment (10 nmol/kg/min for 5 min i.c.) (left panel). Note the increase in the signal intensity at the tumor (white arrows). Temporal CADV calculated from the corresponding sets of images (1 image / 51 s for 50 min) (bottom panel). (C) Relative CADV in percent determined following the infusion of the vehicle (saline), LDBK, NG29 (10 nmol/kg/min for 5 min) or NG29 (10 nmol/kg/min, 5 min) + R892 (20 nmol/kg/min, 5 min). Each bar represents the mean \pm S.E.M. for 4 to 6 animals. ** $p < 0.01$ compared to vehicle-treated animals; $\dagger\dagger p < 0.01$ compared to NG29-treated animals. (D) Histogrammic representation of average maximal Gd-DTPA concentrations in the ipsilateral (tumor-implanted) and the contralateral hemispheres following saline vehicle or NG29 treatment (10 nmol/kg/min). ** $p < 0.01$ compared to vehicle-treated ipsilateral groups. Value represents the mean \pm S.E.M. obtained with 3 animals.

Figure 4 - NG29 increases transvascular delivery, distribution and accumulation of Gadomer within brain tumor tissues of F98-bearing rats. (A) Representative axial Gadomer-enhanced T_1 -weighted MR images depicting the brain of an F98-implanted rat before and after intracarotid NG29 treatment (10 nmol/kg/min for 5 min i.c.) (left panels). Note the increase of the signal intensity at the tumor (white arrows). CADV in function of time calculated from the corresponding set of images (1 image / 51 s for 50 min) (bottom panel). (B) Dose-, B1R-, PGs-dependence of NG29-induced BTB permeability. Numbers in parenthesis represent infusion rates in nmol/kg/min, for 5 min. The B2R antagonist HOE140 and the B1R antagonist R892 (both at 20 nmol/kg/min, for 5 min, i.c.) were infused simultaneously with NG29 while the non-selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors L-NA (5 mg/kg, i.v.) and L-NAME (20 mg/kg, i.v.), and the non-selective cyclooxygenase (COX) inhibitors Meclofenamate (5 mg/kg, i.v.) and Indomethacin (2.5 mg/kg, i.v.) were administered 30 min before the infusion of NG29. Note the effectiveness of NG29 administered by the i.v. (intrajugular) route. + $p < 0.05$ compared to vehicle-treated animals; * $p < 0.05$ compared to NG29 (10 nmol/kg/min)-treated animals. (C) Duration of the increase in BTB permeability caused by NG29 as determined by relative CADV values. Gadomer was injected 3 min, 60 or 120 min following the start of the infusion (10

nmol/kg/min) of NG29 over 5 min. Each bar represents the mean \pm S.E.M. for 3 to 7 animals. * p <0.05 compared to respective vehicle-treated animals. (D) Representative time course of Gadomer uptake in the ipsilateral (tumor-implanted) hemisphere and the contralateral hemisphere, before and after treatment with NG29 (10nmol/kg/min for 5 min) (left panel). Histogrammic representation of average maximal Gadomer concentrations in the ipsilateral (tumor-implanted) and the contralateral hemispheres, and the facial muscle following NG29 treatment (right panel). * p <0.05 compared to vehicle-treated ipsilateral groups. ** p <0.01 compared to untreated ipsilateral groups. Value represents the mean \pm S.E.M. obtained with 3 animals.

Figure 5 – NG29 induces changes in local concentration of gadolinium and platinum in tumoral cerebral tissues. Direct measures of drug concentration (ng/g of tissue) by ICP-MS in three different tissue extracts (tumor, tumor periphery and contralateral) from the brain of F98 glioma-bearing Fischer rats were made following intraarterial (carotid artery) or intravenous (femoral vein) injections of Gd-DTPA (Gd) (143 mM i.v.) and carboplatin (Pt) (20 mg/kg i.a. or i.v.) with the B1R agonist NG29 (50 nmol/kg i.a.; 5 μ mol/kg i.v.) or saline (CTL). Mean \pm S.E.M. of 7-10 rats for each data set.

Figure 6 – Systemic infusion of NG29 increases permeability and uptake of albumin within peritumoral tissue. (A) Direct immunological staining of endogenous albumin in brain tissues from F98-implanted rats treated or not with intracarotid NG29 (50 nmol/kg/min for 5 min). Representative coronal sections of CTL-, vehicle- and NG29-treated rats immunostained with sheep anti-rat albumin HRP conjugated are shown in the upper panels. Scale bar: 1 mm. Histogrammic representation of integrated optical density (IOD) values (left) and stained surface areas (right) of immunoreactive albumin in respective animal groups (bottom panels). *** p < 0.001 vs CTL. Differences were examined by Student's unpaired t-test, considering p < 0.05 significant. (B) Semi-quantitative measurement of Evans blue content (mg/g wet weight tissue) in several tissues after systemic intravenous (femoral) injection of saline vehicle or NG29 (5 μ mol/kg i.v.) in F98 glioma bearing rats. Data are presented as means \pm S.E.M. N=3 in each group. * p <0.05 vs respective vehicle group.

Chapitre 8

Manuscrit 4

Titre : Dual kinin B1 and B2 receptor activation provides enhanced blood-brain barrier permeability and anticancer drug delivery to brain tumors

Auteurs de l'article : Jérôme Côté, Martin Savard, Witold Neugebauer, David Fortin, Martin Lepage, Fernand Gobeil jr.

Statut de l'article : En révision (Cancer Biology & Therapy)

Avant-propos :

Dans cet article, j'ai effectué toutes les expérimentations pour les figures 2 et 3. J'ai participé au développement du concept avec le Pr. F. Gobeil. J'ai rédigé une première ébauche du manuscrit et j'ai participé à sa correction finale. Le professeur Neugebauer a produit l'hétérodimère illustré au schéma 1.

Résumé de l'article :

Nous avons précédemment démontré que la stimulation individuelle du rB2 (manuscrit 2) et du rB1 (manuscrit 3) s'avère efficace et complémentaire (deux mécanismes d'actions différents) pour favoriser l'acheminement de molécules de différentes tailles à un gliome F98. Dans ce quatrième et dernier manuscrit, nous avons mis à l'essai le concept de co-stimulation des deux sous-types de récepteurs des kinines. Ainsi, nous avons conceptualisé un hétérodimère composé d'un agoniste du rB1 (NG29) et d'un agoniste du rB2 (NG291), relié ensemble de façon covalente par un bras espaceur. L'utilisation d'un ligand multivalent comporte de nombreux avantages versus l'utilisation des deux analogues séparément, notamment, un profil pharmacologique unique et étude préclinique *in vivo* simplifiée. En utilisant les mêmes protocoles décrits précédemment (IRM et ICP-MS), nous avons donc évalué la capacité de ce dimère à perméabiliser la BHE tumorale, en comparaison avec les deux agonistes seuls, ou une co-injection simultanée de ces deux mêmes agonistes. Nous exposons que la co-stimulation des deux sous-types de récepteurs augmentent significativement le volume de distribution du Gd-DTPA en plus d'accroître les concentrations de Gd-DTPA et de carboplatin acheminées à la tumeur et sa périphérie. Cette étude offre une nouvelle stratégie potentielle pour maximiser la biodisponibilité et l'efficacité thérapeutique des agents de chimiothérapie pour le traitement des gliomes.

Short report

Dual kinin B1 and B2 receptor activation provides enhanced blood-brain barrier permeability and anticancer drug delivery into brain tumors

Jérôme Côté^{1,2,4}, Martin Savard^{1,4}, Witold Neugebauer^{1,4}, David Fortin^{3,4}, Martin Lepage^{2,4}, Fernand Gobeil jr^{1,4*}

¹Department of Pharmacology; ²Department of Nuclear Medicine and Radiobiology; ³Department of Surgery; ⁴Institute of Pharmacology (IPS), Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Canada, J1H 5N4.

*Corresponding author

Email: fernand.gobeil@usherbrooke.ca

Disclosure of potential conflicts of interest:

FG, DF, and ML have received research funding from Tranzyme Pharma Inc. This company has no proprietary or financial interest in the outcome of the research. This does not alter authors' adherence to all the journal policies on sharing data and materials.

Abstract

The low permeability of the blood-brain barrier (BBB) is largely responsible for the lack of effective systemic chemotherapy for the treatment of primary and metastatic brain tumors. Kinin B1 and B2 receptors have been shown to mediate reversible tumor-selective BBB disruption in preclinical animal models. We investigated whether the co-administration of two novel potent kinin B1R and B2R agonists offers an advantage over administering each agonist alone for enhancing BBB permeability and tumor targeting in a malignant glioma rat model. A new covalent kinin heterodimer that stimulates B1R and B2R to the same extent was also constructed for our study. The co-administration of the B1R and B2R agonists and the administration of the heterodimeric agonist conjugate more effectively delivered carboplatin as well as the MRI contrast agent Gd-DTPA to the brain tumors and surrounding tissues (2 to 2.5-fold) than the agonists alone, as determined by dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging and inductively-coupled plasma-mass spectrometry. The present study offers a potential strategy for maximizing the brain bioavailability and therapeutic efficacy of chemotherapeutic drugs.

Keywords: Kinins, G-protein-coupled receptors, synthetic agonists, blood-brain barrier modulation, glioma, rat, MRI

Abbreviations: Blood-brain barrier, BBB; blood-tumor barrier, BTB; BK, bradykinin; MRI, magnetic resonance imaging; Gd-DTPA, gadolinium diethylenetriamine-pentaacetic acid; ICP-MS, inductively coupled plasma-mass spectroscopy; NO, nitric oxide; PGs, prostaglandins.

Gliomas are the most common and deadly intrinsic tumors of the brain and are among the most aggressive of all tumors. Since there is currently no cure, the prognosis is very poor and only limited therapeutic progress has been made in the past three decades ¹. The treatment of malignant gliomas is complicated by their infiltrative phenotype and by the existence of the blood-brain barrier (BBB), which reduces the delivery of numerous anticancer drugs to primary tumor sites and peripheral tumor cells ². An intact or partially compromised BBB may also explain the abnormal refractoriness and poor responses of brain metastases to chemotherapy ^{3,4}.

Some experimental strategies for bypassing (e.g. direct injection into the brain) or modulating (via transcellular or paracellular transport process) the BBB have been investigated to improve the effectiveness of anticancer drugs. Among these strategies, the use of vasoactive, biostable analogues of natural ligands for the G protein-coupled B1 (B1R) and B2 receptors (B2R), which contain noncoded α -amino acid residue substitutions within their peptide backbone, has been shown to be suitable for delivering drugs specifically to brain tumors. This is likely due to the high levels of their cognate bradykinin (BK) receptors found in the microvasculature of the tumor ^{5, 6}. Our previous work has shown that the peptidic compounds, [Phe⁸ ψ (CH₂NH)Arg⁹]-BK (B2R agonist; R523) and SarLys[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK (B1R agonist; NG29), given systemically, can induce an increased uptake of co-injected tracer molecules such as contrast material, endogenous albumin, carboplatin, by F98 gliomas in syngeneic Fischer rats, by a factor of 2 to 4 ^{5, 6}. Interestingly, B1R and B2R recruit different pathways and chemical mediators to disrupt the blood-tumor barrier (BTB). B1R is linked to the cyclooxygenase pathway, which modulates the production of prostaglandins (PGs) while B2R is driven almost entirely by endogenous nitric oxide (NO)^{5, 6}.

There is some evidence that support a NO/PGs reciprocal interaction regulating microvascular reactivity ⁷⁻¹⁰, although the extent of this interaction at the BBB/BTB is unclear. As such, a formulation or a compound that targets B1R and B2R simultaneously may theoretically combine the modulatory effects of endogenous NO and PGs on BBB/BTB permeability and integrity. In the present study, we explored the possibility that

the dual activation of both B1R and B2R by a combination treatment with potent agonists, selective for each receptor subtype, would be more effective than either receptor activated alone in improving the delivery of drugs that have limited or no access to the brain (e.g. contrast agents, carboplatin). To strengthen the hypothesis and to simplify the BBB permeation procedure using single-molecule experiments, we designed a new kinin heterodimer capable of stimulating B1R and B2R to the same extent (Scheme 1). To synthesize the bifunctional B1R/B2R kinin agonist using a straightforward, flexible and efficient strategy, we took advantage of copper (I)-catalysed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC; widely referred to as the 'click' reaction) to covalently link the two kinin agonists. We then incorporated an N-terminal Boc-protected, azide-modified lysine residue to complete the preparation of the solid-phase attached B2R peptide agonist, [Hyp³,Thi⁵,^NChg⁷,Thi⁸]-BK (NG291). This agonist displayed potent *in vitro* and *in vivo* activity greater than that of BK^{11, 12}. The highly potent B1R agonist, Lys-[DPhe⁸]desArg⁹BK¹³, which was grown on an acid trityl resin, was N-terminally extended with an ϵ -aminocaproyl (ϵ -Aca) spacer followed by an Fmoc-protected (propargyl)glycine as a CuAAC substrate. Efficient dimer formation was achieved by mixing the precursor resin-tethered B2R agonist containing azide with a solution of the alkyne (propargyl)-containing B1R agonist under standard "click" conditions (see Scheme 1 for detailed synthesis conditions).

Scheme 1
Côté et al., 2013

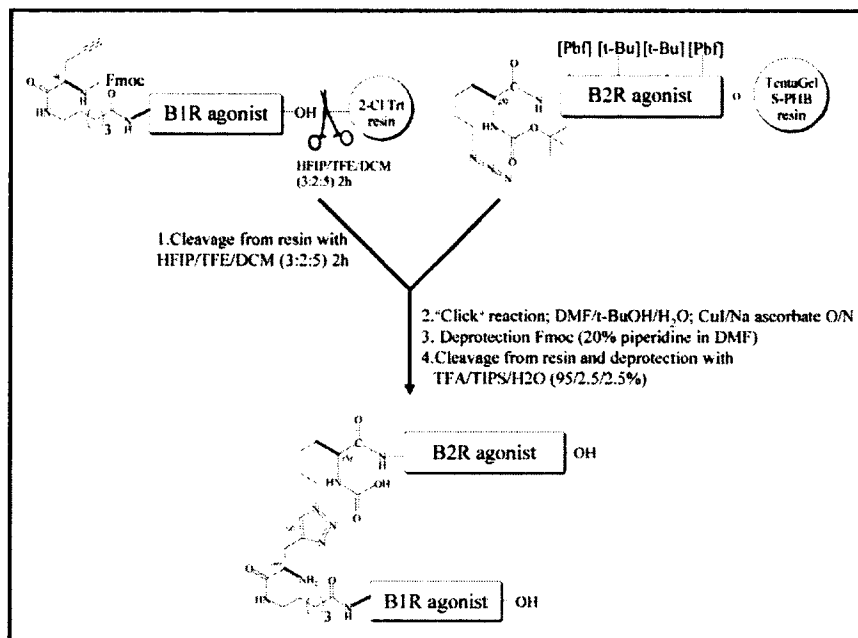


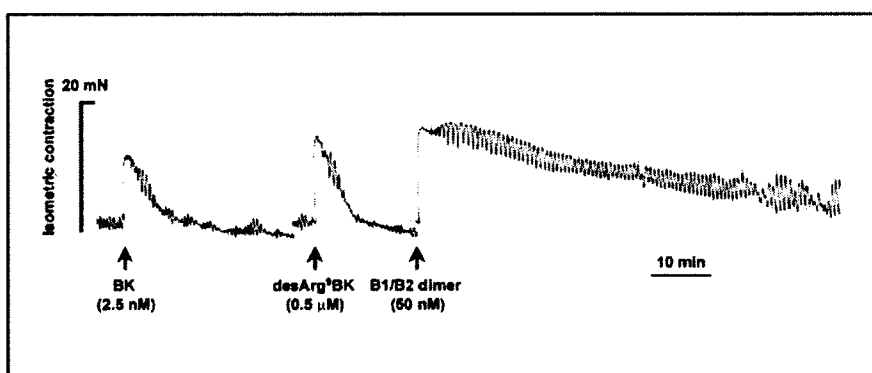
Table 1. Receptor binding affinity and pharmacological activity of kinin derivatives at human B1R and B2R

Peptide sequence	HEK-293T (receptor binding)		hUV (bioassay)	
	hB1R	hB2R	hB1R	hB2R
	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)
Natural agonist				
BK (BK)	>10 000 ¹	4.9 ¹	>10 000 ¹	3.0 ¹
LysdesArg ³ BK	6.3 ²	>10 000 ²	3.9 ²	>10 000 ¹
Synthetic agonist				
[Tyr ³ , Thr ⁴ , Chg ⁷ , Thi ⁸]-BK (NG291)	>10 000 ¹	1.8 ¹	n.d.	1.8 ¹
SarLys[D-Phe ⁴]-desArg ³ BK (NG29)	0.3 ²	>10 000 ²	0.45 ²	n.d.
B1R/B2R dimeric agonist	28	40	32	50

Data taken from ¹Bélanger et al.¹¹ ; ²Côté et al.¹³. Competition binding assays were performed with [³H]-BK (B2R agonist) and [³H]-LysDesArg³-BK (B1R agonist) using adherent HEK-293T cells transiently transfected with human B1R or B2R. Binding affinity of the peptides is expressed in terms of IC₅₀ value. For functional experiments, complete concentration-contractile response curves to agonists were performed on human de-endothelialized umbilical veins (hUV) according to Gobeil et al., 1996. Agonist potencies of the heterodimer at the B1R and the B2R were determined following B2R blockade with HOE140 and B1R blockade with R954 (applied at 5 μM), respectively. EC₅₀ values derived from these curves are shown. n.d.: not determined.

The ability of the novel heterodimer to bind and activate human kinin B1R and B2R was evaluated using *in vitro* assays (Table 1). Compared to the parental unconjugated agonists, the heterodimer showed moderate affinity in transiently transfected B1R- or B2R-HEK-293T cells, and displayed full as well as ambivalent agonist activity on B1R and B2R, as determined in vasoconstriction tests using the isolated human umbilical vein¹⁴. One peculiar characteristic of the heterodimer was the extended *in vitro* duration of action (at least 10-fold), which greatly exceeded that of the natural individual B1R and B2R agonists, despite repeated washing of the human vessels (see Figure 1). The long-lasting effect of the heterodimer was similarly displayed by the peptides NG291 and NG29^{11,13}. This factor may play an important role in the generation of long-lasting modulatory effects of BBB permeability *in vivo*. Co-administration of or pretreatment with HOE140 (B2R antagonist; DArg[Hyp³,Thi⁵,DTic⁷,Oic⁸]-BK) and R954 (B1R antagonist; AcOrn[Oic²,(α Me)Phe⁵,D β Nal⁷,Ile⁸]desArg⁹-BK) (5 μ M) antagonized the *in vitro* activity of the heterodimer, which is consistent with its non-selectivity and specificity of action (data not shown). Despite a significant loss of binding affinity/activity compared to the unmodified parent ligand, the heterodimeric agonist retained favorable pharmacodynamic properties (in the nanomolar affinity/activity range), which makes it a candidate for further *in vivo* experiments.

Figure 1
Côté et al., 2013

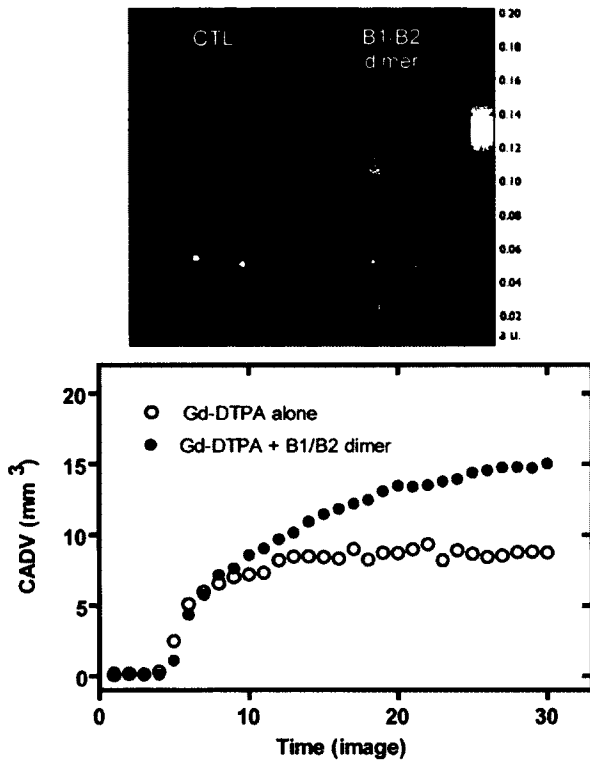


To examine the *in vivo* efficacy of the kinin B1R and B2R agonists in modulating the status of the BBB/BTB at the tumor of Fischer rats bearing intracranial syngeneic F98

gliomas, we used dynamic-contrast enhanced magnetic resonance imaging (DCE-MRI) with intravenous Gd-DTPA (0.5 kDa; Magnevist) as an intravascular tracer in brain. This technique has been shown to be suitable for real-time, non-invasive monitoring of the spatiotemporal processes of BBB/BTB opening and of the delivery of contrast agents into the brain^{5,6}. At 10 days post-implantation (mid-stage of tumor development), the animals underwent baseline MRI and were randomized into 5 groups: (i) saline control; (ii) BBB disruption (BBBD) by B1R agonist NG29; (iii) BBBD by B2R agonist NG291; (iv) BBBD by NG29 and NG291 given in conjunction; and (v) BBBD by the B1R/B2R heterodimer. The agonists were administered via the right internal carotid, directly into the tumor-bearing hemisphere at a high dose (50 nmol/min/kg for 5 min) that produces a robust increase in BBB permeability in gliomas. The Gd-DTPA was injected i.v. (caudal vein) 2 min after the beginning of BBBD maneuver^{5,6}. When compared to the controls, all the agonists significantly increased the contrast agent distribution volume (CADV) at the tumor site (Figure 2B), which was likely due to the permeation of the BBB/BTB feeding glioma. This is clearly illustrated in the case of the B1R/B2R heterodimer, which produced a more pronounced signal enhancement of Gd-DTPA in the central core and the peripheral rim of the tumor relative to baseline, leading to a larger maximum CADV (Figure 2A). Compared to the B1R agonist NG29, the B2R activating agonists produced a slightly higher increased distribution of Gd-DTPA, which is consistent with the abundant and wide distribution of B2R in the vascular networks of the brain. Moreover, T_1 -weighted images obtained in the animal groups subjected to B1R/B2R co-stimulation, by the two agonists administered individually or as a covalently linked heterodimer, did not show any extended contrast tumor distribution as compared to the B2R agonist NG291 administered alone (Figure 2). These findings suggested that the maximal anatomical extent of increased vascular permeability and Gd-DTPA uptake at the tumor site was attained following BBBD with NG291. Unlike the B1R agonist NG29, B2R interacting ligands were highly hypotensive at the selected BBB disrupting dose. This side effect was, nevertheless, brief and reversible, with a recovery within approximately 30 min after injection (not shown). A dosage adjustment will be required in order to prevent this unwanted effect.

Figure 2
Côté et al., 2013

A



B

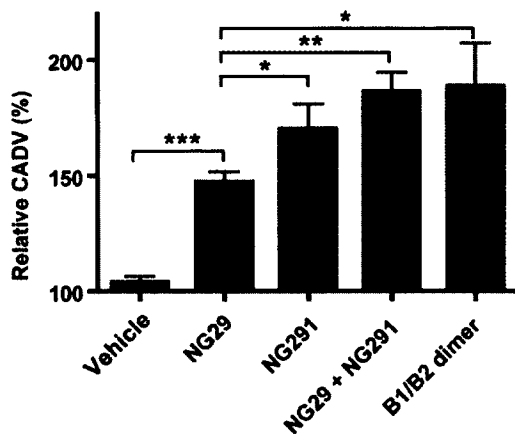
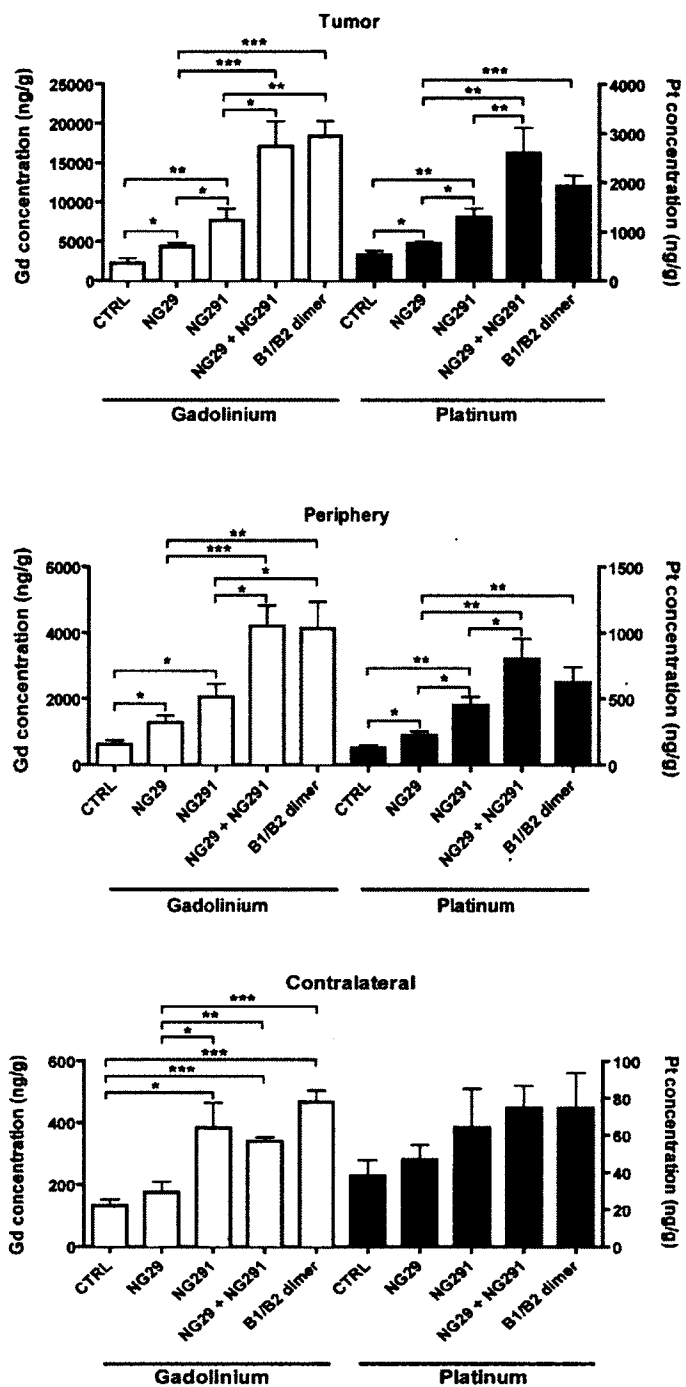


Figure 3
Côté et al., 2013



To determine whether dual kinin B1R/B2R activation provides enhanced BBB/BTB permeability and, as a result, increased anticancer drug levels in tumors, we used the highly sensitive, validated ICP-MS method ⁵. Specifically, the method was used to directly and simultaneously determine the concentrations of platinum (Pt) and gadolinium (Gd), originating from Carboplatin and Gd-DTPA (used as a reference), respectively, in tissue extracts from tumors, adjacent brain tissues, and cortical matched contralateral tissues of the control and experimental animal groups (Figure 3). The administration of the individual agonists led to a marked, rapid increase in transvascular delivery and an incremental increase of circulating Gd-DTPA and Carboplatin in the tumor and at the tumor periphery compared to the controls (1.5 to 4-fold). It should be stressed that tissue Pt and Gd concentrations were measured soon (15 min) after the i.c. administration of the agonist/drug combination, and probably underestimated the true magnitude of the effect of kinin agonist treatment. Notably, NG29 combined with NG291 caused significantly greater penetration and accumulation (5 to 10-fold) of the molecules in tumor and surrounding normal tissues, suggesting an additive effect of the agonists. Co-stimulation of B1R and B2R with the novel heterodimer also led a dominant uptake of Pt and Gd by the tumors. The concentrations at the contralateral site remained low or unchanged (with some exceptions) following BBBB with the agonists.

In summary, the increased uptake of platinum by malignant brain tumors and the surrounding tissues induced by the concerted actions of B1R and B2R agonist analogues indicated that this pharmacological approach may be useful for increasing the dose-intensity of chemotherapy in patients with brain tumors. These findings are significant given that the best method for delivering higher concentrations of intracerebral anticancer drugs remains elusive ^{2, 15}. In addition, aside from being highly potent modulators of BBB/BTB, single molecules exhibiting mixed B1R/B2R agonist activity, such as the heterodimer described here, may provide a number of advantages over combination therapy utilizing individual agonists, including a single pharmacokinetic profile, a uniform ratio of activities at the cellular level, and simpler in vivo preclinical testing in animal models. Heterodimeric B1R/B2R agonists also show good potential for the development of more

efficient chemotherapeutic treatments for various classes of brain tumors that display variable patterns of expression of their cognate kinin receptors ¹⁶.

Acknowledgments. JC was the recipient of the 2010 Domenico-Regoli/IPS studentship. FG is a senior scholar from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and a researcher of the Canada Foundation for Innovation (CFI). ML is the Canada Research Chair in Magnetic Resonance Imaging. FG, DF, ML are members of the FRQS-funded Centre de recherche clinique Étienne-Le Bel. This work was supported by competitive grants from the IPS/Tranzyme Pharma Inc and the Canadian Institute for Health Sciences (CIHR; #PPP-120206).

References

1. Rich JN, Bigner DD. Development of novel targeted therapies in the treatment of malignant glioma. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3:430-46.
2. Muldoon LL, Soussain C, Jahnke K, Johanson C, Siegal T, Smith QR, et al. Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignancy: a reality check. *J Clin Oncol* 2007; 25:2295-305.
3. Fortin D. The blood-brain barrier: its influence in the treatment of brain tumors metastases. *Curr Cancer Drug Targets* 2012; 12:247-59.
4. Misra A, Ganesh S, Shahiwala A, Shah SP. Drug delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharm Sci* 2003; 6:252-73.
5. Coté J, Bovenzi V, Savard M, Dubuc C, Fortier A, Neugebauer W, et al. Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model. *PLOS One* 2012; 7:e37485.
6. Coté J, Savard M, Bovenzi V, Dubuc C, Tremblay L, Tsanaclis AM, et al. Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe(8)psi(CH(2)NH)Arg(9)]-BK in a F98 glioma rat model: an MRI study. *Neuropeptides* 2010; 44:177-85.
7. Davidge ST, Baker PN, Laughlin MK, Roberts JM. Nitric oxide produced by endothelial cells increases production of eicosanoids through activation of prostaglandin H synthase. *Circ Res* 1995; 77:274-83.
8. Emerich DF, Dean RL, Snodgrass P, Lafreniere D, Agostino M, Wiens T, et al. Bradykinin modulation of tumor vasculature: II. activation of nitric oxide and phospholipase A2/prostaglandin signaling pathways synergistically modifies vascular physiology and morphology to enhance delivery of chemotherapeutic agents to tumors. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296:632-41.
9. Maeda H, Fang J, Inutsuka T, Kitamoto Y. Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *Int Immunopharmacol* 2003; 3:319-28.

10. Mollace V, Muscoli C, Masini E, Cuzzocrea S, Salvemini D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol Rev* 2005; 57:217-52.
11. Bélanger S, Bovenzi V, Côté J, Neugebauer W, Amblard M, Martinez J, et al. Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin B2 receptor. *Peptides* 2009; 30:777-87.
12. Savard M, Labonté J, Dubuc C, Neugebauer W, D'Orléan-Juste P, Gobeil F. Further pharmacological evaluation of a novel synthetic peptide bradykinin B2 receptor agonist. *Biol Chem* 2013; 394(3): 353-360.
13. Côté J, Savard M, Bovenzi V, Bélanger S, Morin J, Neugebauer W, et al. Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles. *Peptides* 2009; 30:788-95.
14. Gobeil F, Pheng LH, Badini I, Nguyen-Le XK, Pizard A, Rizzi A, et al. Receptors for kinins in the human isolated umbilical vein. *Br J Pharmacol* 1996; 118:289-94.
15. Neuwelt E, Abbott NJ, Abrey L, Banks WA, Blakley B, Davis T, et al. Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol* 2008; 7:84-96.
16. Zhao Y, Xue Y, Liu Y, Fu W, Jiang N, An P, et al. Study of correlation between expression of bradykinin B2 receptor and pathological grade in human gliomas. *Br J Neurosurg* 2005; 19:322-6.

Legend

Scheme 1 - Construction of an $N\alpha$ -linked B1R/B2R agonist heterodimer utilizing "click" chemistry and Aca linker. Chemistry conjugation reaction between an alkyne-containing B1R agonist molecule (Fmoc-G(propargyl)-Aca-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-DPhe-OH) and an azide-containing B2R agonist molecule (Boc-Lys(N₃)-Arg(Pdf)-Pro-Hyp(t-Bu)-Gly-Thi-Ser(t-Bu)-^NChg-Thi-Arg(Pbf)). The peptide B1R agonist (in solution) and the peptide B2R agonist (immobilized on the solid-phase) were then joined at their N-terminal side via a triazole linker, made by "click" chemistry. Heterodimer was then deprotected, cleaved from resin and purified to homogeneity by using RP-HPLC and mass spectrometry. Abbreviations: Aca, ϵ -aminocaproyl; HFIP, 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol; TFE, 2,2,2-trifluoroethanol; TIPS, Triisopropylsilane; TFA,

trifluoroacetic acid; Aca, 6-amino caproic acid; t-BuOH, *tert*-butanol. Hyp, *trans*-4-hydroxy-L-proline; Thi, β -(2-thienyl)-L-alanine; ^NChg, N-cyclohexyl-glycine.

Figure 1 - Differential vasoconstrictor actions of natural B2R and B1R agonists, bradykinin (BK) and desArg⁹BK, and the newly-developed heterodimeric B1R/B2R agonist in the isolated human (endothelium-denuded) umbilical veins. A representative tracing of vasoconstriction responses produced by the kinin agonists (at concentrations near their EC₅₀ value (Table 1)) is shown. Note the important long, sustained duration of action of the heterodimer while having a rapid onset of action.

Figure 2 - Comparison of contrast-agent distribution and uptake in the brain following intraarterial administration of B1R and B2R agonists

(A) Representative axial Gd-DTPA-enhanced T₁-weighted MR images depicting the brain of an F98-implanted rat before and after intracarotid B1R/B2R dimer agonist treatment (50 nmol/kg/min for 5 min). Regions of contrast enhancement related to Gd-DTPA are highlighted in pseudo-colors. Contrast agent distribution volume (CADV) as a function of time calculated from the corresponding set of images (1 image/51 s for 30 min) (bottom panel). (B) Relative CADV in percent determined following the infusion of the vehicle (saline), B1R agonist NG29, B2R agonist NG291, NG29+NG291, or B1R/B2R dimer agonist. Agonists were given at the dose of 50 nmol/kg/min for 5 min (i.c.). Each bar represents the mean \pm S.E.M. for 4 to 6 animals. The differences between treatment groups were examined using Student's unpaired t-test. *Statistical significance (p<0.05). Methods of these experiments based on MRI are presented elsewhere ^{5,6}.

Figure 3 - Differential effects of synthetic B1R and B2R agonists on tumor and tissue uptake of the chemotherapy drug carboplatin and the contrast agent Gd-DTPA.

Direct measures of drug concentration (ng/g of tissue) by ICP-MS in three different tissue extracts (tumor, tumor periphery and contralateral) from the brain of F98 glioma-bearing Fischer rats were made following intra-arterial (internal carotid) injections of Gd-DTPA (Gd) (143 mM i.v.) and carboplatin (Pt) (20 mg/kg) with various agonists (50 nmol/kg) or saline (CTL) in a single 1-ml infusion over 10 minutes. Five minutes after the end of the

infusion, rats were euthanized and the brain rapidly removed, dissected into regions, and prepared for ICP-MS analysis. Differences were examined by Student's unpaired t-test, considering $p < 0.05$ significant. General methods as in Côté et al. ⁵

Chapitre 9

Discussion

À l'image des sections précédentes incorporant les quatre manuscrits, le neuvième et dernier chapitre de cette thèse sera divisé en cinq sections. Les quatre premières sections (9.1 à 9.4) serviront à reprendre l'essentiel des résultats obtenus en plus d'apporter certains éléments non discutés dans les manuscrits (p. ex. résultats non publiés, limitations). Dans la cinquième section (9.5), quelques perspectives relatives à ce projet de recherche seront décrites, en plus d'une conclusion générale.

9.1 Manuscrit 1

Titre : Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles.

Auteurs : Côté J, Savard M, Bovenzi V, Bélanger S, Morin J, Neugebauer W, Larouche A, Dubuc C, Gobeil F Jr.

2009. *Peptides* 30:788-795.

Considérant les nombreux bénéfices à l'activation du rB1, notamment l'induction possible de la perméabilisation de la BHE (Cardoso et al., 2004), il était plus qu'attrayant pour nous d'élargir la banque d'agonistes peptidiques stables et d'étudier leur fonctionnalité et leur utilité potentielle en tant qu'activateur du rB1. Rappelons que le choix d'agonistes disponibles au moment où cette étude a débuté était relativement limité. D'une part, les agonistes naturels DBK et LDBK, qui sont rapidement inactivés par des enzymes plasmatiques et tissulaires. D'autre part, un analogue synthétique, Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹BK, qui est moins susceptible à la dégradation enzymatique, mais qui possède une affinité et une puissance inférieures par rapport aux agonistes naturels (Rhaleb et al, 1990; Drapeau et al., 1991; Levesque et al., 1995a). Les protéases, tel que l'enzyme de conversion de

l'angiotensine, l'endopeptidase neutre et l'aminopeptidase M ou N, sont considérées comme les plus actives contre les kinines desArg⁹ *in vivo* (Drapeau et al., 1991; Skidgel, 1997), même s'il semble que d'autres protéases soient aussi responsables de leur dégradation. Ce premier manuscrit relate donc la caractérisation de nouveaux composés analogues à Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹-BK, avec des modifications structurales stratégiques conçues pour en augmenter l'affinité envers le rB1 et la résistance au métabolisme enzymatique. Le but ultime étant d'en faire des candidats de choix pour les études *in vivo*. La structure chimique de Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹-BK a été sélectionnée comme modèle de départ, car ce composé est le plus étudié et le plus évolué connu à ce jour (Rhaleb et al., 1990; Drapeau et al., 1991; Levesque et al., 1995; Audet et al., 1997; Rizzi et al., 1997; Houle et al., 2000). Sont donc présentés dans ce papier, une vingtaine de nouveaux analogues possédant des modifications en N- et C-terminal et en position 3, en plus d'en position 5, où la phénylalanine (Phe) a été remplacée par une variété d'acide aminés non naturels. Le choix des modifications, tel que la sélection des acides aminés synthétiques Igl et Cpg, repose sur leur utilité dans la création d'antagonistes du rB1 résistant à la protéolyse (Stewart et al., 1997; Gobeil et al., 1996a). Dans cette section, l'emphase sera mise sur les nouveaux peptides possédant les meilleures caractéristiques pharmacologiques (peptides #10, #11, #18, #20, #22 et #23). Il est à noter que le peptide de référence Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹-BK a été étudié en parallèle et porte le numéro 9. De plus, la démonstration de la biostabilité des nouveaux agonistes présentés dans ce manuscrit a été effectuée par incubation dans des extraits sanguins ou tissulaires (rein et poumon). Les produits de dégradation ont été mesurés par HPLC/MS (Gobeil et al., 2011).

Des modifications chimiques ont d'abord été apportées à la portion N-terminale de Sar[D⁸Phe⁸]desArg⁹-BK afin d'améliorer sa résistance aux aminopeptidases, tout en rehaussant son affinité pour le rB1. À ce sujet, l'AmM est retrouvée dans plusieurs tissus (p. ex. les cellules endothéliales et le muscle lisse vasculaire), dans le sang et dans les excréments inflammatoires (Skidgel, 1997). Elle est reconnue pour dégrader plusieurs membres de la famille des kinines, de l'angiotensine et des opioïdes (Drapeau et al., 1993; Skidgel, 1997). Sur l'aspect de l'affinité, il a été démontré que la présence d'une lysine en N-terminal est avantageuse. Par exemple, Lys-desArg⁹-BK possède une activité supérieure

sur le rB1 humain par rapport à son équivalent sans la lysine en position 0, desArg⁹-BK (Gobeil et al., 1996a; Rizzi et al., 1997 ; Côté et al., 2009). Un résidu lysine a donc été ajouté à la suite de la sarcosine dans la séquence de base. Le composé obtenu, SarLys[D⁸Phe]desArg⁹-BK (peptide #10), montre une excellente activité agoniste en bain d'organes avec un EC50 (concentration efficace médiane) près de 100 fois supérieur à son analogue de base sans la lysine (peptide #9), et 40 fois supérieur à l'agoniste naturel LDBK (peptide #2) (tableau 1). Ces résultats concordent avec les essais de liaison, où le peptide #10 montre une affinité 100 fois supérieure au peptide #9 et 50 fois supérieure au peptide #2 (tableau 3). Ce nouveau peptide est d'ailleurs entièrement sélectif pour le rB1 (aucune liaison au rB2), tel que démontré en essai de liaison (tableau 3). Il est à noter que l'ajout d'une arginine en remplacement de la lysine (deux acides aminés basiques) confère les mêmes avantages au peptide final (peptide #10 vs peptide #11). Enfin, nous croyons que l'allongement de la portion N-terminale pourrait apporter aux peptides davantage de résistance vis-à-vis les aminopeptidases, puisque non reconnue par ces dernières, résultant ainsi en une plus longue durée d'action. Ceci reste toutefois à être démontré.

Il a été établi que le remplacement de la proline par une hydroxy-proline (Hyp) en position 3 peut être bénéfique pour l'affinité de ces peptides (Rhaleb et al., 1990). Cette modification a également été utilisée avec succès dans le développement d'antagonistes du rB2, tel que DArg[Hyp³, D⁷Phe, Leu⁸]BK (Regoli et al., 1990). Ainsi, nous avons remplacé Pro³ par Hyp³ dans la conception de la plupart de nos agonistes. Tel qu'attendu, cette simple modification a permis d'améliorer l'affinité et l'activité des nouveaux composés (p. ex. peptide #1 vs peptide #3, peptide #2 vs peptide #4). Il est fort possible que Hyp apporte également une protection contre la digestion par la prolinase (qui hydrolyse le lien peptidique entre les positions 3 et 4) ou encore par une autre peptidase pouvant agir à cette position. L'hydroxy-proline (*trans*-4-hydroxy-L-proline), comme son nom l'indique, possède un groupement -OH supplémentaire en comparaison avec la proline, ce qui pourrait lui permettre de ne pas être reconnue par la prolinase. De plus, la présence du groupement -OH de l'Hyp permettrait un système plus étendu de pont hydrogène, favorisant ainsi une meilleure liaison du composé à son récepteur. Ces affirmations demeurent toutefois hypothétiques pour le moment, bien que nos composés possédant Hyp³

ont bel et bien une durée d'action supérieure, donc une meilleure longévité *in vivo* (évalué chez le lapin prétraité au LPS), en plus d'une meilleure affinité pour rB1.

La série de modifications suivante a consisté au remplacement de l'acide aminé phénylalanine en position 5 par un acide aminé non naturel sur la structure de la SarLys[Hyp³, DPhe⁸]DBK. De telles modifications sont inspirées du développement d'antagonistes du rB1 et du rB2, où l'indanylglycine (Igl) et la cyclopentylglycine (Cpg) ont été utilisées en remplacement de la Phe⁵ (Gera et al., 1996; Stewart et al., 1997). Ces acides aminés non naturels, qu'on ne retrouve pas normalement dans l'organisme, ne sont par conséquent pas reconnus par les peptidases. Leur utilisation en position 5 devrait ainsi augmenter la résistance à l'ECA, à l'EPN 24.11 et à toutes autres endopeptidases pouvant cliver à ce site (voir section 2.2). Les six composés obtenus (peptides #18 à #23) ont tous démontré une activité agoniste de 2 à presque 100 fois supérieure à la Sar[DPhe⁸]DBK sur la veine ombilicale humaine. Les acides aminés non-naturels cyclohexylalanine (Cha), Igl et du L- ou D-Cpg ont mené à des composés démontrant des activités biologiques inégalées à ce jour (peptide #18, #20, #22 et #23; Tableau 1). Les données expérimentales obtenues à l'aide des essais de liaison ont confirmé la puissance de ces nouveaux composés (voir Tableau 3). Ces quatre composés ont une affinité prodigieuse de 100 à 550 fois supérieure à la Sar[DPhe⁸]DBK et de 60 à 250 fois supérieure à la LDBK. Ils sont de plus totalement sélectifs envers le rB1 (tableau 3), ce qui fait d'eux des outils pharmacologiques idéals pour l'étude des rôles physiologiques et pathophysiologiques des rB1 chez l'homme.

À ce stade, résumons les caractéristiques structurelles, du N- au C-terminal, ayant permis le développement d'agonistes du rB1 humain à haute affinité/activité possédant une meilleure résistance à la protéolyse:

A) un acide aminé chargé positivement en N-terminal est crucial (voir l'affinité des peptides #1 vs #2, #3 vs #4, #7 vs #8, et #9 vs #10). La stéréospécificité semble décisive également, vu l'impact négatif de l'isomère DLys et DArg (#4 vs #5, et #11 vs #13). De plus, contrairement aux antagonistes (Stewart et al., 1997), l'extension par un deuxième acide aminé Arg en N-terminal n'est pas bénéfique sur l'activité des agonistes (#11 vs #12).

B) Le groupement -OH de Hyp en position 3 est important pour l'affinité et l'activité puisque son absence abaisse chacun de ces deux paramètres (#1 vs #3, et #2 vs #4). La formation d'un pont-H additionnel possible serait la raison principale derrière cette observation.

C) Un résidu aromatique n'est pas essentiel en position 5. La substitution de la Phe par un résidu isostérique et cyclique tel que Cha (peptide #18) ou Cpg (peptide #22) a été bien tolérée, ce qui laisse présager que des interactions de nature hydrophobe prévalent entre le résidu en position 5 et le rB1. La présence d'une pochette hydrophobe dans ce dernier, généralement occupée par la Phe en position 5 (Ha et al., 2006), interagirait alors avec le substitut hydrophobe.

D) Un groupement carboxyle en C-terminal est également crucial, puisqu'une perte d'affinité presque totale est observée lorsqu'il est remplacé par un groupement amide (#10 vs #14).

Il existe de grandes différences inter-espèces lorsque l'on parle d'affinité et d'activité des agonistes et antagonistes envers le rB1 (Hess et al., 1996; Regoli et al., 1998; Gobeil, 1999; Regoli et al., 2001). Ces différences dépendent majoritairement de la structure du récepteur, qui peut varier d'une espèce à l'autre. Par conséquent, il ne faut pas tenir pour acquis qu'une bonne activité sur un tissu humain comme la veine ombilicale se traduira nécessairement par une bonne activité chez le rongeur. À titre d'exemple, le peptide #20 s'est avéré 700 fois moins actif sur le rB1 de rat (EC_{50} : 427 nM) et de souris (EC_{50} : 400 nM) que sur le rB1 humain (EC_{50} : 0.6 nM; tableau 2). Tout comme le peptide #18, il conserve toutefois une bonne activité *ex vivo* sur l'aorte de lapin (EC_{50} : 2,1 nM et 1,9 nM respectivement; tableau 2), ainsi que *in vivo* tel que démontré par des essais sur la pression artérielle de lapins prétraités au LPS (figure 4). Par conséquent, nous avons écarté les prototypes comportant des modifications en position 5 et conservé le peptide #10 (désigné par le code NG29) pour la majorité des expérimentations de perméabilisation de la BHE qui suivront. Les raisons motivant ce choix sont basées sur la puissance du NG29 (essai de vasomotricité), son affinité et sa sélectivité envers le rB1 (essai de liaison), sa longue durée d'action *in vivo* (essai de vasomotricité et essai sur la pression artérielle), ainsi que sa

disponibilité (synthèse peptidique). Notons que le NG29 démontre une excellente activité biologique, et ce peu importe l'espèce (tableau 2).

En conclusion, nous rapportons dans ce premier manuscrit le développement de nouveaux peptides agonistes du rB1, hautement actifs et à longue durée d'action. Nous suggérons que ces agonistes ont un avenir prometteur dans l'étude des rôles du rB1 en pathophysiologie, tant chez l'animal que chez l'humain.

9.2. Manuscrit 2

Titre : Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe⁸Ψ(CH₂NH)Arg⁹]-BK in a F98 glioma rat model: an MRI study

Auteurs : Côté J, Savard M, Bovenzi V, Dubuc C, Tremblay L, Tsanaclis A M, Fortin D, Lepage M, Gobeil F Jr.

2010. *Neuropeptides* 44(2):177-85

Le second manuscrit inclut dans cette thèse décrit les effets perméabilisants et hypotensifs de l'agoniste sélectif du rB2 [Phe⁸Ψ(CH₂NH)Arg⁹]-BK (R523) chez le rat Fischer porteur d'un gliome F98. Nous y démontrons également une nouvelle utilisation de l'imagerie par résonance magnétique dynamique rehaussée par un agent de contraste (DCE-MRI) afin de caractériser la perméabilité vasculaire tumorale. L'IRM nous a permis d'évaluer en temps réel et de façon non-invasive les changements de perméabilité vasculaire cérébrale en réponse au peptide R523. Les effets systémiques reliés à l'injection du R523 ont également été mesurés, afin d'évaluer la sécurité de la procédure.

Avant tout, il était impératif que nous confirmions l'expression du rB2 dans notre modèle de gliome. Des analyses de RT-PCR et de Western Blot nous ont permis de démontrer que le rB2 est effectivement exprimé en forte densité au niveau des cellules tumorales et des cellules de la micro-vascularisation tumorale de notre modèle animal (voir figures 1 et 2). Ces résultats appuient les observations faites ailleurs et qui mettent à jour la forte expression du rB2 dans d'autres modèles de gliomes chez le rat (Liu et al., 2008) ainsi que dans des tissus d'astrocytomes malins humains (Raidoo et al., 1999; Zhao et al., 2005; Fortier et al., 2006; Montana et Sontheimer, 2011). Pour plusieurs, cette expression localisée à la tumeur sous-tend un rôle potentiel du rB2 dans sa progression. Ce récepteur est d'ailleurs connu pour, une fois activée, initier la perméabilité vasculaire, la prolifération cellulaire, la production de métalloprotéinases de matrice, et causer la migration et l'invasion des cellules tumorales vers les tissus avoisinants (Montana et Sontheimer, 2011;

Figuerola et al., 2012). Toutefois, l'utilisation du Cereport (un agoniste du rB2) n'a montré aucun effet stimulateur de la croissance tumorale dans des modèles de tumeurs cérébrales orthotopiques (Borlongan et Emerich, 2003; Black et Ningaraj, 2004). Comme le rB2 est surexprimé à la tumeur et au pourtour de celle-ci, il va de soi que les effets reliés à son activation devraient s'observer majoritairement dans ces régions de l'encéphale. L'hypothèse était donc qu'un traitement avec le R523 devrait causer une perméabilisation de la vascularisation cérébrale tumorale (Wahl et al., 1999), permettant ainsi un acheminement accru d'une molécule injectée à postériori (ici, un agent de contraste IRM). Il faut toutefois garder en tête qu'un niveau basal constitutif de rB2 est présent dans plusieurs organes en périphérie, incluant tout le système cardio-vasculaire. On doit donc s'attendre à observer des effets secondaires lors de l'utilisation du R523.

Afin de visualiser cet effet perméabilisant, quelques choix s'offraient à nous. Les plus étudiés sont le marquage de l'albumine, une grosse protéine plasmatique d'environ 65 kDa (Rapoport et al., 1971) ou l'autoradiographie quantitative à l'aide de radiotraceurs (Asotra et al., 2003). Typiquement, le marquage de l'albumine est fait à l'aide du bleu d'Evans, qui se lie à la protéine de façon irréversible, ou par immunohistochimie (Kroll et Neuwelt, 1998; Fortin, 2003; Côté et al., 2012). L'autoradiographie permet l'utilisation de différents traceurs, de poids moléculaire variés, tel le [¹⁴C]sucrose (372 Da) ou le [¹⁴C]dextran (70 kDa) (Weyerbrock et al., 2003). Toutefois, ces techniques impliquent l'euthanasie de l'animal à l'étude afin de prélever le cerveau pour les analyses subséquentes. Elles ne permettent donc qu'une analyse statique de la perméabilité de la barrière, telle une photographie prise à un instant donné. De plus, un groupe de rats dits contrôle, distinct de ceux traités pour perméabiliser la BHE, est nécessaire pour fin de comparaison. Pour pallier à ce problème, nous avons proposé une étude longitudinale sur un même animal (et donc sur une même tumeur) avec l'IRM rehaussé par un agent de contraste. Tel que discuté au chapitre 3, cette technique permet d'obtenir de façon non-invasive des images en coupes du sujet dans différents plans. Il nous a d'abord fallu valider l'utilisation de cette technique comme méthode sensible et efficace pour quantifier l'étendue de la perméabilité de la BHE en temps réel. Les deux agents de contraste choisis pour l'étude, le Gd-DTPA (0.5 kDa) et le Gadomer (17 kDa), ne traverse pas la BHE normale. Toutefois, lorsque cette dernière est

perméable, ils traversent aisément du sang vers le parenchyme cérébral. Il est bien connu que l'intégrité de la BHE est hétérogène dans un gliome, étant souvent perméable en son centre, et plus étanche en périphérie, là où des cellules tumorales peuvent migrer et ainsi être protégées par la BHE (Rapoport, 2000; Neuwelt, 2004). À l'aide de l'IRM, il nous est donc possible de visualiser la région tumorale d'un rat porteur d'un gliome, et ce, par une augmentation de l'intensité du signal, suite à l'injection de l'agent de contraste, dans les voxels correspondant aux endroits où la BHE est perméable. Cette technique nous a donc permis de mesurer l'état de la BHE de façon continue (en temps réel) chez un même animal, au niveau basal ainsi que pendant la perméabilisation temporaire induite par un agoniste du rB2, à l'aide des changements d'intensité du signal sur les images pondérées T_1 . Une augmentation d'intensité du signal dans les tissus tumoraux, particulièrement en périphérie de ceux-ci, fut associée aux traitements avec le R523, et ce pour les deux agents de contraste utilisés dans cette étude.

Le travail de recherche pour le développement de nouveaux agonistes du rB1 présenté dans l'article #1 de cette thèse a été fait en parallèle avec le développement de nouveaux agonistes du rB2 (Bélanger et al., 2009). De la même façon, la séquence du peptide naturel BK a été modifiée à des régions spécifiques, dans le but d'améliorer son activité biologique ainsi que sa résistance à la protéolyse. Plusieurs peptides y sont comparés, et quelques-uns d'entre ont été identifiés comme d'excellents candidats. Toutefois, au moment où a commencé cette étude, celle de Bélanger et al. n'était pas encore terminée. C'est pourquoi le composé prototype R523 a été choisi pour les essais de perméabilisation vasculaire à l'IRM. Rappelons que les descriptions initiales pour le R523 ont été faites il y a plusieurs années dans les laboratoires du Pr. D. Regoli (Drapeau et al., 1988). Ce composé ne possède pas l'activité biologique la plus importante du lot, mais il est très résistant au métabolisme enzymatique, ce qui en fait un bon candidat pour des études *in vivo*. De plus, il s'agit d'un peptide qui garde une excellente activité biologique chez le rat (Bélanger, 2008; Bélanger et al., 2009). Après la publication des résultats de Bélanger et al., l'évidence de l'existence de composés agonistes du rB2 plus actifs que le R523 nous a indiqué le chemin vers une série d'autres expériences de perméabilisation de la BHE, dont les résultats sont présentés dans le dernier article de cette thèse (voir chapitre 8 et 9.4).

C'est donc avec tous ces outils en main que nous avons fait les premiers essais de perméabilisation vasculaire chez le rat implanté d'un gliome F98. Au départ, le Gd-DTPA était notre agent de contraste de référence. Il nous a été possible de démontrer l'utilité de l'IRM afin de mesurer les changements de perméabilité de la BHE (figure 3A), et ce en comparant les images obtenues avec une injection de Gd-DTPA seul, avec celles où le R523 est infusé juste avant l'injection de l'agent de contraste. Les analyses de CADV ont clairement montré qu'en présence de R523 i.c. (10 nmol/kg/min sur 5 minutes), le volume calculé était augmenté par un facteur 1.5 (figure 3B), ce qui suggère que l'agent de contraste a pénétré dans le cerveau, à la tumeur, sur une plus grande surface. Rappelons que c'est principalement la périphérie de la tumeur que nous visons, là où des cellules tumorales ont possiblement infiltré le parenchyme cérébral sain, étant donc protégé par une BHE saine.

Il a été observé que l'analyse du CADV à la tumeur était influencée par la diffusion de l'agent de contraste. En effet, une fois dans la tumeur, au-delà de la BHE, le Gd-DTPA diffuse par gradient de concentration vers des endroits du cerveau où la BHE est imperméable. Le CADV mesuré se trouve donc à être plus grand que celui qui devrait être mesuré. La figure V décrit bien ce phénomène. On remarque sur cette figure qu'avec le Gd-DTPA, le CADV ne cesse d'augmenter, même 30 minutes après l'injection. Il y a donc surestimation du CADV, et ainsi surestimation du volume où la BHE est perméable. Le Gadomer quant à lui, nous permet d'estimer un CADV réaliste dès les premières minutes après l'injection, puisqu'une fois dans le parenchyme cérébral, il ne diffuse pas ou très peu. De plus, sa grande taille en fait une meilleure référence pour le passage présumé d'autres molécules, tel les agents de chimiothérapie. Ainsi, pour la majorité des expérimentations subséquentes, l'utilisation du Gadomer a été privilégiée (étude du mécanisme d'action, de l'impact de la dose et de la durée d'action des agonistes B1 et B2).

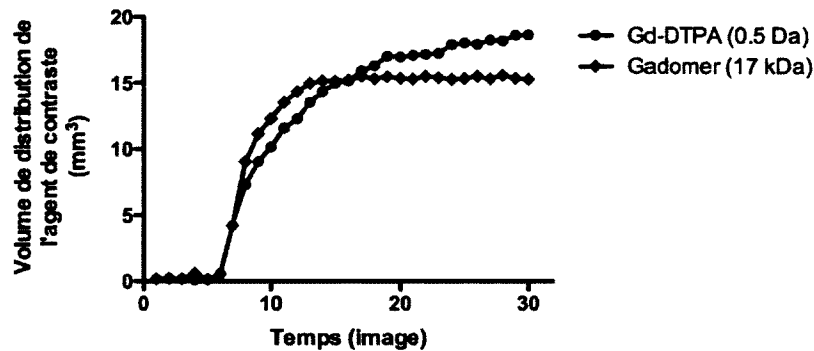


Figure V - CADV calculés à partir des images obtenues sur un même rat porteur d'un gliome, avec injection de Gd-DTPA ou de Gadomer (pendant l'acquisition de la 3e de 30 séries d'images).

Les mêmes expériences de perméabilisation de la BHE ont d'abord été reprises avec le Gadomer, mettant l'emphase sur la possibilité d'acheminer des molécules de grande taille (figure 4A). L'effet perméabilisant du R523 est dose-dépendant, avec l'obtention de l'effet maximal lorsqu'infusé i.c. sur 5 minutes à une dose de 50 nmol/kg/min (figure 4B). Quoiqu'il ait été démontré qu'une infusion continue d'un agoniste du rB2 ne pouvait augmenter le temps d'ouverture à plus de 20 minutes (Black et Ningaraj, 2004), nous n'excluons pas la possibilité que des paramètres d'infusion différents pourraient mener à une perméabilisation plus importante (p. ex. infusion plus lente ou plus rapide d'un même volume, délai plus court entre l'infusion de l'agoniste et de l'agent de contraste). Des expériences futures seront nécessaires afin de déterminer le protocole d'infusion idéal. La dose totale de 250 nmol/kg de R523 ne pourra toutefois pas être augmentée significativement, dû à l'importance des impacts systémiques qu'elle induit. Nous avons également montré que la perméabilisation par le R523 se produit rapidement (quelques minutes) et ne perdure pas plus d'une heure post-infusion (figure 4C). Cette courte fenêtre temporelle d'ouverture s'explique probablement par la désensibilisation et l'internalisation rapide du rB2 suite à son activation (Blaukat et al., 1996; Pizard et al., 1999), mettant ainsi fin à son action perméabilisante (voir chapitre 2). Toutefois, nous ne pouvons exclure des éléments comme l'épuisement des stocks de médiateurs endothéliaux sécrétés suite à

l'activation des rB2, ou encore l'inhibition des signaux intracellulaires impliqués dans la perméabilisation de la BHE.

Il a été possible de renverser l'effet perméabilisant du R523 en injectant préalablement un antagoniste sélectif du rB2, le HOE 140 (Hock et al., 1991; Wirth et al., 1991), indiquant que l'activation des rB2 en est bel et bien responsable (figure 4B). Malgré notre connaissance de la grande sélectivité du R523 pour les rB2 (Bélangier et al., 2009), nous avons quand même voulu nous assurer que le rB1 n'était pas impliqué. L'injection préalable du R892 (Gobeil et al., 1999), un antagoniste sélectif du rB1, nous a permis d'atteindre cet objectif (figure 4B) et de conclure à la sélectivité du R523. Ensuite, la description sommaire du mécanisme d'action a été faite en ciblant les deux principales voies de signalisation responsables des effets vasculaires du rB2, soit la phospholipase A2/cyclooxygénase qui mènent vers la production de prostanoïdes, et les NO synthases vers la production d'oxyde nitrique et ultimement la production de cGMP, connu pour ses propriétés perméabilisantes (Joo et al., 1983; Wu et al., 1998; Venema, 2002). Seul le L-NA, inhibiteur non-sélectif des NO synthases a été en mesure d'inhiber l'effet perméabilisant du R523 (figure 4B). Ces résultats sont cohérents avec la littérature (Nakano et al., 1996; Emerich et al., 2001b). L'étude d'Emerich et collaborateurs a entre autre démontré que l'inhibition de l'activité du NO (avec le L-NAME, un autre inhibiteur non-sélectif des NOS) bloque complètement la capacité du Cereport à favoriser l'acheminement de ¹⁴C-Carboplatin aux tumeurs hors du SNC, en plus de bloquer son effet dilatatoire des vaisseaux sanguins tumoraux. De plus, il a déjà été démontré que des donneurs de NO sont en mesure de perméabiliser la BHE tumorale (Weyerbrock et al., 2003; Yin et al., 2008; Weyerbrock et al., 2011). Tel que nous le mentionnons dans la discussion de l'article, des analyses par Western Blot faites dans nos laboratoires ont révélé de plus hauts niveaux d'expression des NOS endothéliale (eNOS) et inductible (iNOS) dans la tumeur en comparaison avec les tissus sains de l'hémisphère controlatéral dans notre modèle de gliome F98 (C. Dubuc, données non publiées).

Contrairement à la eNOS qui est constitutivement exprimée dans les cellules endothéliales, l'expression de la iNOS est inductible en réponse à des médiateurs

inflammatoires tel que des cytokines immunostimulantes et des pathogènes bactériens (p. ex. l'interleukine-1 β , l'interferon- γ et le LPS) (Förstermann et Kleinert, 1995; Aktan, 2004; Kleinert et al., 2004). Cette induction rappelle d'ailleurs celle du récepteur B1 des kinines (voir chapitre 2 et 9.3). Alors que la eNOS est calcium-dépendante et fortement activable par la bradykinine (Venema, 2002), la iNOS serait calcium-indépendante et constitutivement active en générant du NO sans cesse, tant que les cofacteurs et les substrats nécessaires sont disponibles (Kleinert et al., 2004). Étant donné les propriétés perméabilisantes du NO, il est possible que la perméabilisation basale observée sur nos images IRM (en présence d'une tumeur) soit favorisée par cette production de NO par iNOS. Une stimulation subséquente du rB2 accroîtrait la production de NO, étendant son effet perméabilisant à la périphérie de la tumeur. En somme, nos résultats nous permettent de confirmer que l'activité des NOS est essentielle au phénomène rapporté ici. Toutefois, comme l'inhibiteur utilisé (L-NA) est non-sélectif, il nous est impossible de statuer sur l'implication individuelle des différentes NOS. Ainsi, il sera intéressant de pousser cette analyse plus loin, notamment par l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs tels que le 1400W (iNOS) ou le L-NIO (eNOS).

Il n'est pas exclu que la PLA₂ et les COX aient également un rôle à jouer ici, malgré le fait que nous n'ayons pas pu abolir l'effet de l'agoniste du rB2 en bloquant les COX avec le Meclofenamate (figure 4B). D'autres ont pu limiter partiellement l'impact de la stimulation du rB2 avec des doses croissantes d'indométhacine, un autre inhibiteur non-sélectif des COX, dans un modèle animal de tumeur solide périphérique (Emerich et al., 2001b). Les auteurs expliquent cette abolition partielle des effets perméabilisants du Cereport par la limitation intrinsèque au dosage de l'indométhacine, qui induit une hypotension significative à fortes doses. Les divergences entre notre étude et celle d'Emerich et al. (2001b) peuvent être attribuables aux différents types de cancers étudiés, au choix de l'inhibiteur (eux : indométhacine; nous : meclofenamate), à son dosage (eux : jusqu'à 20 mg/kg; nous : 5 mg/kg) ou encore à son administration (eux : co-injecté i.v. avec le ¹⁴C-Carboplatin et le Cereport sur 25 minutes; nous : pré-injecté en bolus i.v. 30 minutes avant le Gd-DTPA). La voie de signalisation des COX mériterait donc qu'on s'y attarde davantage. Elle sera d'ailleurs discutée plus longuement dans le prochain chapitre.

Il a été mentionné en introduction que les agonistes du α_2 sont exprimés de façon constitutive partout dans le système cardiovasculaire et que leur stimulation induit une vasodilatation (Bhoola et al., 1992). C'est d'ailleurs cet effet que nous mettons à profit dans nos laboratoires, lors du développement de nouveaux agonistes, afin d'évaluer leur activité *in vivo* (Blais et al., 2005; Bélanger et al., 2009). Au cours de l'étude des effets perméabilisants du R523, trois effets secondaires reliés à l'infusion de ces derniers ont pu être observés. D'abord, sans surprise et comme d'autres l'ont fait auparavant (Riley et al., 1998; Sugita et Black, 1998; Emerich et al., 2001b) nous documentons une chute de pression artérielle dose-dépendante, rapide et transitoire suite à l'infusion de l'agoniste du α_2 (figure 5A et 5B). À la plus forte dose à l'étude, la vasodilatation induite par le R523 a également pu être visualisée en temps réel à l'IRM. Comme l'injection se fait via la carotide externe droite, directement dans la carotide interne vers l'hémisphère droit du cerveau, seule la carotide externe gauche continue d'alimenter les muscles faciaux. Le R523, une fois injecté, rejoint plus facilement la portion gauche du visage, et par conséquent, la vasodilatation y est induite plus rapidement et plus intensément. Cet effet est clairement visible puisqu'une démarcation nette survient entre la droite et la gauche sur les coupes axiales, en matière de rehaussement du signal induit par l'agent de contraste co-injecté avec le R523. La figure VI ci-dessous démontre ce phénomène, et deux flèches blanches indiquent la langue et le muscle masséter (un puissant muscle de l'appareil manducateur), qui constituent des régions très vascularisées se trouvant dans le champ de vue de nos images. L'intensité du signal, plus fort dans la portion gauche de ces muscles, est sans doute le résultat d'une vasodilatation induite par la stimulation du α_2 . Cette vasodilatation fait en sorte que le volume sanguin (ou la lumière des vaisseaux) occupent une plus grande place au sein des tissus contenus dans chacun des voxels de l'image, faisant en sorte qu'une plus grande quantité d'agent de contraste s'y retrouve. On sait qu'à ces concentrations, plus il y a d'agent de contraste, plus le signe sera intense. Il faut toutefois noter que la différence de concentration de Gd-DTPA dans le muscle perdure plus de 30 minutes (figure VI, à droite). De ce fait, il nous est impossible d'exclure la possibilité qu'un traitement avec le R523 puisse permettre à une plus grande quantité d'agent de contraste de s'échapper du sang vers les tissus musculaires, et qu'ainsi, un agent anti-néoplasique puisse en faire

autant. L'importance de cet effet perméabilisant périphérique pourrait être évaluée par une mesure directe par ICP-MS de la quantité de Gd dans les tissus musculaires.

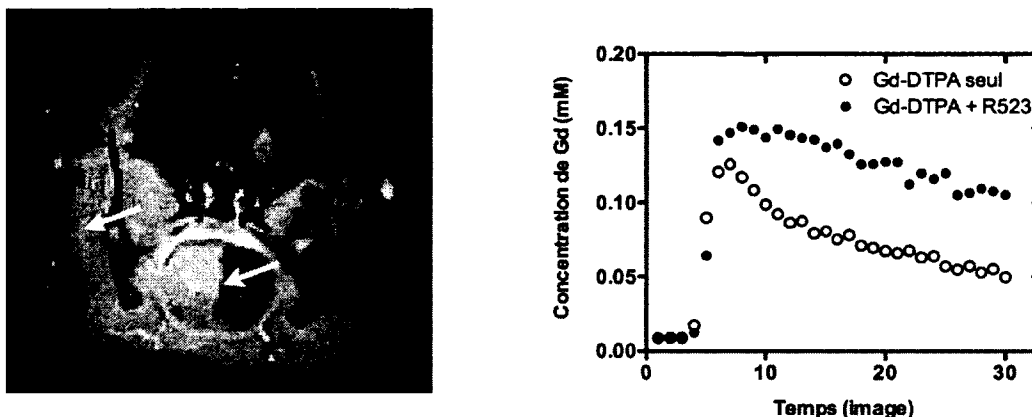


Figure VI – Effets perméabilisants de l'agoniste du rB2 R523 sur les vaisseaux sanguins périphériques. Gauche : Le signal est plus intense dans les muscles de la moitié gauche de l'animal (suite à l'injection de R523 et du Gd-DTPA; flèches blanches). Droite : Tracé temporel représentatif de l'acheminement de Gd-DTPA au muscle masséter.

En deuxième lieu, cette chute de pression artérielle est également accompagnée d'une augmentation importante mais transitoire du rythme respiratoire, tel que mesuré pendant les séances d'IRM, et qui dure quelques minutes suivant le début de l'infusion du R523 i.c. (figure S3 à l'annexe 2). Cette augmentation du rythme respiratoire peut être la conséquence directe d'une stimulation des rB2 systémiques, qui induit une vasodilatation et une bronchoconstriction (Bhoola et al., 1962; Dusser et al., 1988; Ichinose et al., 1990). L'animal compense alors en respirant plus rapidement. Une stimulation des centres de la respiration au SNC pourrait également être responsable de cet effet.

Quoique très spécifique à la tumeur, la perméabilisation induite par R523 n'est pas limitée à cette région du SNC, surtout à la plus forte dose à l'étude. Nous avons pu observer, à titre de troisième impact collatéral, une hausse des concentrations de Gd-DTPA

à bonne distance de la tumeur, jusque dans l'hémisphère controlatéral. Quoiqu'elle demeure faible en comparaison avec les zones tumorale et péri-tumorale, la concentration moyenne d'agent de contraste mesurée dans l'hémisphère contrôle est environ deux fois plus grande lorsque traitée avec le R523 en comparaison du véhicule (0,006 vs 0,013 mM; $p = 0,04$). Des résultats obtenus par ICP-MS viendront corroborer ces données d'IRM plus tard, dans le dernier article inclut dans cette thèse (voir chapitre 8). Nos résultats sont donc consistants avec d'autres observations indiquant qu'une faible dose d'un agoniste B2 des kinines serait en mesure de perméabiliser de façon spécifique la BHE tumorale, alors qu'une forte dose aurait un impact plus généralisé au cerveau (Inamura et Black, 1994; Nomura et al., 1994). Le rB2 étant exprimé partout au SNC (et surexprimé à la tumeur), c'est sans surprise qu'une stimulation de ces récepteurs avec une forte dose d'agoniste soit en mesure d'engendrer une perméabilisation non-spécifique de la BHE. En co-administration avec un agent de chimiothérapie, une dose efficace moindre de R523 serait donc à privilégier, afin de limiter les effets toxiques aux tissus sains.

En conclusion, le deuxième article de cette thèse présente nos résultats qui confirment le potentiel du peptide synthétique $[\text{Phe}^8\text{Ψ}(\text{CH}_2\text{NH})\text{Arg}^9]\text{-BK}$ comme agent perméabilisant la BHE tumorale. Nous exposons également les principaux effets indésirables associés à l'injection d'un agoniste du rB2, mettant l'emphase sur la nécessité de bien évaluer le dosage et les paramètres d'infusion, afin d'assurer le partage efficacité/sécurité de la procédure. De plus, nous démontrons l'utilité de l'IRM rehaussée par un agent de contraste pour l'étude de l'étendue de cette perméabilisation au SNC. Nous suggérons qu'une telle approche, éventuellement combinée avec des molécules thérapeutiques, permettra d'améliorer le traitement des gliomes.

9.3. Manuscrit 3

Titre : Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model

Auteurs : Côté J, Bovenzi V, Savard M, Dubuc C, Fortier A, Neugebauer W, Tremblay L, Muller-Esterl W, Tsanaclis A M, Lepage M, Fortin D, Gobeil F Jr.

2012. PLOS ONE 7(5):e37485

Constituant le coeur de cet ouvrage, ce troisième manuscrit décrit l'ensemble des résultats obtenus en lien avec la caractérisation d'une nouvelle approche pour perméabiliser la BHE, soit l'utilisation d'un agoniste des récepteurs B1 des kinines. L'ouverture de la BHE avec les agonistes du rB2 comporte déjà certains avantages par rapport aux autres techniques décrites en introduction. Maintenant, les avantages prévus des agonistes du rB1 sont supérieurs, notamment la sélectivité de la perméabilisation ainsi que la possibilité de traiter par voie intraveineuse. Ces expérimentations avaient pour but d'évaluer le potentiel d'une telle approche pharmacologique afin d'augmenter l'acheminement d'agents de chimiothérapie au sein et en périphérie d'une tumeur cérébrale.

Nous démontrons d'abord l'expression du rB1 dans les tumeurs intracrâniennes F98 chez le rat Fischer (cellules tumorales et cellules endothéliales vasculaires), ainsi que dans différentes lignées cellulaires humaines de GBM et dans des échantillons de tumeurs de multiples grades, provenant de résection tumorale chez l'humain (figure 1 et 2). Il s'agit là de résultats d'une importance cruciale, puisque la rationnelle de cette étude est basée sur l'expression inductible et localisée du rB1. Rappelons que, contrairement au rB2 qui a pavé la voie de l'ouverture de la BHE avec les kinines et dont l'utilisation implique forcément des effets systémiques suite à leur activation, le rB1 est induit exclusivement en contexte pathologique (Marceau et al., 1998; Leeb-Lundberg et al., 2005). Dans le cas des gliomes F98 qui nous intéresse, cette expression est circonscrite à la tumeur et sa périphérie (figure

1). Ces récepteurs deviennent alors une cible de choix, n'impliquant virtuellement aucun effet secondaire systémique (le rB1 n'a pratiquement aucune fonction physiologique répertoriée en condition normale). De plus, ce récepteur est exprimé dans d'autres types de cancer, notamment celui du col de l'utérus et de la prostate (Olejek et al., 2000; Taub et al., 2003), sans pour autant être retrouvé dans des échantillons sains de ces mêmes organes.

La possibilité d'une infusion intraveineuse d'un agoniste du rB1 est donc à portée de main, réduisant ainsi les risques d'embolie associés à l'installation d'un cathéter intra-artériel pour l'ouverture de la BHE avec le mannitol (Fortin et al., 2007; Blanchette et al., 2009). De plus, aucun des effets collatéraux du R523 décrit précédemment n'ont été observés lors de l'étude avec le NG29, que ce soit sur la pression artérielle, le rythme respiratoire ou l'acheminement non-spécifique d'agent de contraste (figure S3 à l'annexe 2). De plus, des études parallèles avec une dose supra-pharmacologique de NG29 (jusqu'à 50 mg/kg/jr pendant 3 jrs, i.v.) n'ont montré aucune toxicité à court terme, en plus de n'avoir toujours aucun impact sur la pression artérielle moyenne et sur le rythme respiratoire. Enfin, les résultats obtenus avec le bleu d'Evans nous indiquent qu'un traitement avec un agoniste du rB1 ne perturbe aucunement l'intégrité des micro-vaisseaux des organes périphériques et des tissus cérébraux sains (figure 6). Il est donc permis de croire que le NG29 serait en mesure d'induire une perméabilisation locale importante de la BHE tumorale chez l'humain, tout en étant sécuritaire.

Nous avons d'abord utilisé l'IRM pour démontrer que le NG29, administré dans la carotide interne droite, augmente de façon dose-dépendante l'acheminement du Gd-DTPA et du Gadomer à la tumeur et sa périphérie chez les rats implantés d'un gliome F98 (figure 3 et 4). D'autres agonistes du rB1, également développés dans nos laboratoires, ont été mis à l'essai afin de corroborer le lien existant entre la stimulation du rB1 et la perméabilisation de la BHE tumorale. Le peptide synthétique SarLys[Hyp³, DCpg⁵, DPhe⁸]desArg⁹BK (N222b) a mené à des résultats équivalents au NG29, soit près de 150% d'augmentation du CADV (n=3). L'agoniste naturel LDBK a aussi été évalué pour son potentiel perméabilisant (figure 4B), mais il n'a toutefois pas été en mesure d'élever significativement le CADV, et ce même à la plus forte dose utilisée (50 nmol/kg/min).

L'explication la plus plausible concernant cette faible activité vient de la courte demi-vie de la LDBK, qui comme sa version sans lysine (DBK), est rapidement dégradée par les peptidases (Décarie et al., 1996). Le même phénomène a déjà été observé avec la bradykinine, l'agoniste naturel des rB2 (Nomura et al., 1994; Liu et al., 2001). Bien sûr, l'avantage de la proximité entre le lieu d'injection (carotide interne droite) et la tumeur peut aider un agoniste à courte demi-vie comme la LDBK. Par contre, nos résultats suggèrent que la grande stabilité du NG29 permettrait de viser une injection intraveineuse (figure 4B), beaucoup plus simple à transposer en clinique. Il sera toutefois nécessaire d'effectuer davantage de caractérisation en lien avec le traitement par voie intraveineuse afin de statuer sur la faisabilité d'une telle pratique. Finalement, il est à noter que les régions où il y a une augmentation du contraste, c'est-à-dire où il y a passage de l'agent de contraste du sang vers le compartiment extra-cellulaire, correspondent très bien avec la distribution des récepteurs (figure 1). Ces résultats concordent avec les actions autocrine et paracrine des récepteurs des kinines. De plus, l'utilisation de l'antagoniste du rB1 R892 (Gobeil et al., 1999) se traduit par l'annulation des effets du NG29 (figure 4B), ce qui confirme le rôle des rB1 dans le processus menant à la perméabilisation de la BHE tumorale.

À l'origine de ce projet de recherche, nous avons tenté de reproduire les résultats décrits dans l'étude de Cardoso (2004), mais sans succès. Le même agoniste du rB1 a été utilisé, à la même dose et par la même voie d'administration (i.v.). Seul le modèle animal était différent (C6 vs F98), ce qui peut expliquer notre échec à reproduire leurs résultats. L'équipe de Cardoso a préféré le modèle C6, très immunogénique et inflammatoire, ce qui nous laisse croire en une très forte expression du rB1 et ainsi, une plus grande efficacité de la procédure de perméabilisation de la BHE tumorale par un agoniste du rB1. Ensuite, mentionnons que nous avons bel et bien été en mesure d'observer une perméabilisation de la BHE lors d'une administration intra-veineuse (de NG29), mais à dose beaucoup plus élevée, afin de pallier à la distribution systémique, ainsi qu'à la dégradation enzymatique rapide qui en découle.

Le NG29, que ce soit i.v. ou i.a., a permis de doubler la quantité de carboplatin, un agent de chimiothérapie, acheminé au sein et en périphérie d'une tumeur cérébrale. Des

résultats d'ICP-MS le démontre (figure 5), ce qui concorde bien avec les résultats d'IRM. Il a même été possible d'acheminer une molécule aussi imposante que l'albumine liée au bleu d'Evans (environ 65 kDa) (figure 6), ce qui nous permet de croire qu'il est possible d'acheminer à peu près n'importe quelle molécule, de taille similaire ou plus petite. De plus, notre approche pourrait être utile pour le traitement des tumeurs cérébrales secondaires si l'on se fie à de récents résultats obtenus avec un simulacre de métastase, où la lignée cellulaire de cancer du sein Mat B III, qui exprime le rB1, remplace les F98 dans notre protocole d'implantation habituel (figure S4 à l'annexe 2). D'autres résultats préliminaires encourageants ont également été obtenus chez la souris immunosupprimée implantée de façon sous-cutanée avec des cellules d'adénocarcinome prostatique humain (LnCAP; ATCC). Dans ce modèle, un traitement intraveineux avec le NG29 (5 mg/kg) a permis d'accroître l'acheminement du Gd-DTPA et du Carboplatin dans ces tumeurs solides périphériques, sans affecter significativement les autres tissus (figure VII).

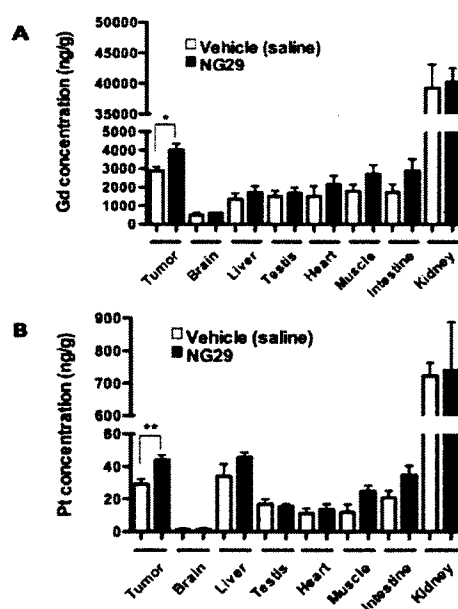


Figure VII - Mesure directe de la concentration de gadolinium (A) et de platine (B) par ICP-MS dans différents tissus de souris immunosupprimées implantées de cellules tumorales LnCAP, suite à l'administration intraveineuse de NG29 (5 mg/kg) ou de saline, en concomitance avec le Gd-DTPA (143 mM) et le carboplatin (20 mg/kg). La méthode est adaptée de (Côté et al., 2012) avec un volume total d'injection de 60 μ l. Les données sont la moyenne \pm erreur standard pour 4 à 8 animaux par groupe de traitement.

Le débit et la durée d'infusion sont probablement des paramètres critiques pour le succès de la procédure de perméabilisation (Emerich et al., 1999). Dans les expérimentations du manuscrit #3, nous avons choisi d'infuser un volume de 500 μ l d'un dosage variable de NG29 sur une période de 5 minutes (100 μ l/min) dans la carotide interne droite. Ces paramètres se sont avérés efficaces, mais il sera nécessaire d'évaluer si, par exemple, une infusion prolongée (p. ex. 15, 30 minutes) permettrait d'accentuer l'effet perméabilisant, ainsi que d'étendre sa durée, actuellement établie à un peu plus d'une heure (figure 4C). Il a été démontré que l'ouverture de la BHE médiée par l'agoniste du rB2 Cereport est transitoire (20 minutes) et ce même si l'infusion du peptide est continue (Black et Ningraj, 2004). Toutefois, contrairement au rB2, le rB1 n'est pas désensibilisé ni internalisé suite à son activation (Regoli et al., 1998; Leeb-Lundberg et al., 2005). Il est donc permis de croire qu'une infusion prolongée du NG29 entraînerait une signalisation intracellulaire également prolongée, et ultimement une disjonction endothéliale qui perdurerait plus longtemps. Considérant le rôle protecteur de la BHE, il ne faut toutefois pas négliger les impacts négatifs que peut représenter son ouverture sur une longue période de temps, aussi sélective soit-elle.

Bien que les deux récepteurs des kinines soit connus pour opérer via les mêmes voies de signalisation cellulaire, nous avons démontré que l'effet perméabilisant induit par la stimulation du rB2 dépend majoritairement du NO (Côté, 2007; Côté et al., 2010), alors que celui relié au rB1 semble plutôt régulé par les prostanoïdes sécrétés suite à l'activation des rB1. Les résultats illustrés à la figure 4B montrent que l'indométhacine et le méclofenamate, deux inhibiteurs non-sélectifs des COX, enzymes responsables de la synthèse des prostanoïdes à partir de l'acide arachidonique, sont en mesure d'annuler totalement l'augmentation du CADV suite à une infusion de NG29. Il nous est toutefois impossible de statuer sur la provenance de ces prostanoïdes, puisque les cellules endothéliales vasculaires ainsi que les cellules tumorales F98 expriment toutes deux les rB1 (figure 1). On ne peut donc pas exclure la possibilité d'un mécanisme d'action indirect paracrine (Liu et al., 2001; Uchida et al., 2002), où le NG29 passerait à travers la BHE pour stimuler son récepteur sur les cellules tumorales. Par conséquent, les prostanoïdes seraient

produites par ces dernières, pour ensuite diffuser vers l'endothélium et le muscle lisse vasculaire. Le type de prostanoïdes responsable de l'effet perméabilisant induit par le NG29 nous est également inconnu, même s'il est fort probable que PGE2 et/ou PGI2 soient des acteurs de premier plan (Williams, 1979; Tanaka et al., 2003). Le ou les sous-types de récepteur que ces prostaglandines stimuleront par la suite nous est également inconnu, tout comme le sous-type de COX impliqué dans le processus, puisque les inhibiteurs à l'étude sont non-sélectifs. Rappelons qu'il existe deux sous-types de COX, une constitutive (COX-1) et l'autre inductible (COX-2). Un peu à l'image du rB1 et de iNOS, COX-2 est surexprimé par certaines cytokines inflammatoires (p. ex. Il-1 β , Il-2, TNF- α) et pathogènes bactériens (p. ex. LPS) (Bakhle et Botting, 1996; Vane et al., 1998). L'interleukine-1 β est d'ailleurs surabondante dans notre modèle de gliome (figure S1, annexe 2), ce qui pointe vers une surexpression de COX-2 (et du rB1 et de iNOS). De plus, COX-2 est surexprimé dans les gliomes humains et dans plusieurs modèles de gliomes implantés (Deininger et Schulzener, 1999; Shono et al., 2001; Hara et Okayasu, 2004). Il apparaît donc que la COX-2 puisse jouer un rôle important dans la perméabilisation de la BHE induite par un agoniste du rB1. L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs permettraient de faire la lumière sur ce point (p.ex. pour COX-2: celecoxib, etoricoxib, parecoxib; pour COX-1: SC-560, FR122047, mofezolac).

9.4. Manuscrit 4

Titre : Dual kinin B1 and B2 receptor activation provides enhanced blood-brain barrier permeability and anticancer drug delivery into brain tumors

Auteurs : Côté J, Savard M, Neugebauer W, Fortin D, Lepage M, Gobeil F Jr.

Soumis à Cancer Biology and Therapy.

Considérant la surexpression locale des deux récepteurs des kinines au niveau des gliomes, tant dans notre modèle Fischer-F98 que chez l'humain, et considérant l'effet perméabilisant engendré par un agoniste ciblant chacun de ces récepteurs individuellement, il était plus qu'intéressant d'envisager l'activation simultanée des deux récepteurs. Plus encore, nous avons démontré précédemment que les mécanismes d'action sous-jacents à chacun des récepteurs sont différents et possiblement complémentaires. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une co-stimulation du rB1 et du rB2 pourrait entraîner un effet additif, voire synergique, sur la perméabilisation de la BHE tumorale.

Ainsi, nous avons conceptualisé une nouvelle molécule peptidique pouvant activer les deux sous-types de récepteurs des kinines simultanément. Cet hétérodimère est constitué de deux agonistes reliés l'un à l'autre de façon covalente par un bras espaceur *6-amino caproic acid* (schéma 1) : le NG29 (agoniste rB1; Côté et al., 2012) et le NG291 (agoniste rB2; [Hyp³, Thi⁵, NChg⁷, Thi⁸]-BK; peptide #20; Bélanger et al., 2009). Sommairement, cette nouvelle molécule combinant deux analogues demeure très active, tel que démontré sur la veine ombilicale humaine en bains d'organes isolés (tableau 1). Il a été possible d'inhiber complètement cette contraction de la veine ombilicale par l'ajout préalable des antagonistes R954 (rB1) et HOE140 (rB2), ensemble. Ce nouveau dimère possède une excellente activité pour les deux récepteurs (tableau 1), quoique légèrement inférieure aux deux molécules prises individuellement, et promet donc d'être efficace *in vivo*.

Nous avons évalué la capacité de l'hétérodimère à perméabiliser la BHE tumorale de nos rats implantés d'un gliome F98. Le CADV du Gd-DTPA mesuré par IRM a été doublé suite aux traitements avec le dimère B1/B2 ou la combinaison NG29/NG291 par rapport au véhicule, en plus d'être significativement plus élevé par rapport au NG29 seul (figure 2). Aucune différence significative n'a cependant pu être observée entre le dimère, la co-injection du NG29 et du NG291, et du NG291 seul. Ce résultat indique que l'étendue volumétrique de la perméabilisation est déjà maximale avec une dose de 50 nmol/kg/min de NG291. Ceci correspond d'ailleurs plutôt bien avec la surexpression des récepteurs B1, qui s'étend de façon limitée à la périphérie de la tumeur (manuscrits 2 et 3). Nous avons tout de même pu acheminer une plus grande concentration de carboplatin et de Gd-DTPA en périphérie rapprochée. C'est du moins ce que nous indiquent les mesures effectuées par ICP-MS (figure 3). Ces résultats nous confirment que la costimulation des deux récepteurs des kinines, que ce soit avec le dimère B1/B2 ou la co-injection du NG29 et du NG291, permet l'acheminement d'une quantité significativement plus grande des deux molécules à l'étude, et ce tant à la tumeur qu'à sa périphérie. Dans les tissus de l'hémisphère controlatéral, nous avons mesuré une quantité significativement plus grande de Gd-DTPA et tendentiellement plus grande de carboplatin, lorsqu'une stimulation du rB2 est incluse dans le protocole de traitement (NG291 seul, NG29/NG291 et le dimère B1/B2). Quoique surexprimé à la tumeur, le rB2 est exprimé de façon constitutive dans l'ensemble de l'encéphale et ainsi, sa stimulation peut engendrer une faible perméabilisation à distance de la tumeur (p. ex. controlatéralement). Toutefois, les quantités acheminées restent très faibles, voire négligeables par rapport aux tissus tumoraux (figure 3).

L'utilisation du dimère B1/B2 comporte de nombreux avantages versus l'utilisation des deux analogues séparément (p. ex. profil pharmacologique unique, étude préclinique *in vivo* simplifiée). Toutefois, l'aspect du dosage doit être considéré. En effet, nous savons que l'activation du rB2 entraîne des effets indésirables systémiques (manuscrit 2). La co-injection du NG29 et du NG291 nous permet ainsi de varier la dose de chacun pour atténuer les effets secondaires du NG291 (en abaissant la dose) tout en profitant au maximum des effets perméabilisants de chacun (la dose de NG29 peut demeurer élevée, puisqu'aucun effet indésirable n'y est associé). Le dimère, dans sa forme actuelle, ne nous

permet malheureusement pas une telle séparation du dosage. Toutefois, un autre hétérodimère récemment développé dans nos laboratoires pourrait contenir la solution, puisqu'un son activité sur le rB2 est plus faible. La dose de ce dimère pourra possiblement être augmentée, favorisant l'action sur le rB1, tout en minimisant les effets systémiques reliés à l'activation du rB2.

Les résultats présentés dans ce quatrième manuscrit promettent un avenir d'importance à la co-stimulation des récepteurs B1 et B2 des kinines, du moins dans la perméabilisation de la BHE tumorale chez l'humain, considérant que le profil d'expression du rB2 au niveau des gliomes est hautement variable en fonction du grade (Zhao et al., 2005). Nous croyons que de cibler d'emblée les deux récepteurs ne peut qu'augmenter nos chances de réussite.

9.5. Perspectives et conclusion

Les prochaines lignes seront consacrées à discuter sommairement des quelques avenues que nous nous suggérons d'emprunter et qui n'ont pas déjà été décrites précédemment. Rappelons d'abord que les agents de chimiothérapie ne sont que très peu efficaces face à l'agressivité des GBM. Cette limitation s'explique en partie par la résistance des cellules tumorales aux agents chimiothérapeutiques et par la faible distribution de ces derniers au sein des tumeurs en raison de la présence de la barrière hémato-encéphalique (Fortin, 2004; Pardridge, 2005). Nous avons démontré qu'il est possible d'améliorer l'acheminement de diverses molécules (agent de contraste IRM, carboplatin, albumine) au sein d'une tumeur et de sa périphérie lorsque les récepteurs des kinines sont stimulés. Maintenant, il nous faudra démontrer que cet acheminement accru permet d'accroître l'efficacité des agents thérapeutiques. Ainsi, une vaste étude de survie impliquant le modèle de gliome de rat Fischer-F98 est actuellement en cours. Pour le moment, il a été possible de démontrer que le NG29 seul, qu'il soit administré par voie intraveineuse ou intra-artérielle, ne modifie pas le temps de survie des rats porteurs d'un gliome F98 (figure S5B à l'annexe 2). Ce résultat a d'ailleurs été confirmé sur les cellules en culture (figure S5A à l'annexe 2), ce qui dément le possible rôle du rB1 dans l'accélération de la prolifération cellulaire tumorale (Lu et al., 2010), du moins dans notre modèle animal. De plus, des résultats préliminaires avec le carboplatin montrent que l'acheminement accru de ce dernier à la tumeur (lorsque co-injecté avec le NG29), tel que démontré par ICP-MS (manuscrit 3), semble affecter les temps de survie des rats porteurs de tumeurs F98, passant de 27 jours à 30 jours post-implantation. Cette modeste augmentation de survie est prometteuse pour la suite considérant que le modèle Fischer-F98 est reconnu pour être réfractaire à certains agents thérapeutiques, incluant le carboplatin (von Eckardstein et al., 2005). Ainsi, d'autres agents thérapeutiques devront être mis à l'essai. Parmi les choix qui s'offrent à nous, le temozolomide (Temodal™) sera assurément sélectionné, puisqu'il est actuellement l'agent préconisé en première ligne de traitement chez l'humain (Stupp et al., 2009). Cet agent alkylant possède un faible poids moléculaire en plus d'être fortement lipophile, deux caractéristiques essentielles à sa bonne distribution au SNC (Patel et al., 2003; Ostermann et al., 2004). Nous envisageons aussi intégrer à l'étude des agents encapsulés dans des

liposomes (voir section 1.3.4), puisque ces ajouts physiques ont également pour but d'en améliorer l'acheminement (Bellavance et al., 2010). De plus, le paradigme de traitement (p. ex. dose, volume d'injection, durée d'injection) doit encore être optimisé considérant qu'il est d'une importance cruciale pour l'efficacité de la procédure (Emerich et al., 1999). L'ajout du R523 à la combinaison NG29/carboplatin exploré précédemment a permis d'augmenter la survie moyenne jusqu'à 35 jours. C'est donc dire que la co-stimulation des deux récepteurs des kinines représente un avantage indéniable. Ainsi, nous nous promettons d'évaluer l'efficacité de différents agents thérapeutiques, suite à une double activation des récepteurs des kinines avec l'hétérodimère B1/B2.

Des résultats récents obtenus dans nos laboratoires démontrent l'effet additif de la combinaison du carboplatin et d'un traitement de radiothérapie par gamma knife dans le modèle Fischer-F98, dû à l'effet radiosensibilisant des composés platinés (Yang et al., 1995; Charest et al., 2012). Ainsi, nous croyons qu'en augmentant la quantité de carboplatin acheminée aux tissus tumoraux, l'impact anti-tumoral d'un traitement de radiothérapie standard serait majoré. D'autre part, l'expression du rB1 est induite davantage par le stress oxydatif découlant des radiations (Levesque et al., 2001). En effet, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites suite à une irradiation des tissus activent NFκB, un facteur impliqué dans la transcription des gènes de plusieurs molécules pro-inflammatoires (p. ex. IL-1B, iNOS, COX-2, rB1) (Yerneni et al., 1999; Couture et Girolami, 2004). Ainsi, suite à une première séance de radiothérapie, le NG29 pourrait s'avérer encore plus efficace pour perméabiliser la BHE, et ce, sur toute la surface irradiée. Enfin, la surexpression du rB1 pourrait être majoré simplement suite aux traitements avec le NG29 ou l'hétérodimère B1/B2, puisque l'activation du rB1 lui-même engendre, chez certains types cellulaires, l'activation de NFκB, et ainsi la surexpression homologue du récepteur (Schanstra et al., 1998; Phagoo et al., 1999). En somme, il faut retenir qu'une seconde ligne de traitement pourrait s'avérer plus efficace que la première, considérant l'expression accrue du rB1 au site tumoral.

Dans un contexte clinique, de nombreuses modalités de traitements sont utilisées à des fins palliatives ou dans le but d'éradiquer le gliome. Il est donc envisageable que

l'expression des récepteurs des kinines soit affectée par ces molécules thérapeutiques. À ce sujet, le Decadron® (dexaméthasone) est fréquemment utilisé pour diminuer l'œdème péri-tumoral et ainsi, réduire l'effet de masse et la pression intracrânienne. Il a été mentionné précédemment que la dexaméthasone réduit la surexpression du rB1 (voir section 2.4). Ainsi, on pourrait supposer qu'une ouverture de la BHE avec un agoniste du rB1 serait moins efficace chez un patient déjà traité avec du Decadron®, puisque l'importance de l'expression du rB1 serait moindre. À l'inverse, un agent de chimiothérapie comme le carboplatin pourrait induire l'expression de certains gènes pro-inflammatoires (Konstantinopoulos et al., 2008), et ainsi induire davantage l'expression du rB1. Une ouverture de la BHE par un agoniste du rB1 chez un patient ayant déjà reçu une médication antinéoplasique pourrait donc s'avérer encore plus efficace. Dans cet ordre d'idée, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la chimiothérapie (p. ex. carboplatin, temozolomide) sur l'expression du rB1 dans notre modèle de gliome expérimental, puis de déterminer si une deuxième série de traitement avec le NG29 et le carboplatin (voir manuscrit #3) s'avère plus efficace que la première.

Le modèle animal choisi pour notre étude, le Fischer-F98, possède des ressemblances importantes avec le GBM humain, tel que la résistance aux agents de chimiothérapie et la faible immunogénécité (Tzeng et al., 1991; von Eckardstein et al., 2005; Barth et Kaur, 2009). Toutefois, aucun modèle animal n'est parfait. À titre d'exemple, nous avons récemment démontré que l'invasion du tissu contigu est moins marquée chez le gliome F98 que chez le GBM humain (figure 2, manuscrit 2 ; figure 2, manuscrit 3 ; G. Desmarais, communication personnelle). Ainsi, l'étude des effets perméabilisants du NG29 et du dimère sera bientôt entreprise avec d'autres modèles tumoraux chez l'animal (avec entre autre, des lignées cellulaires humaines). Déjà des résultats encourageants, présentés à la section 9.3, ont démontré la possibilité de perméabiliser les vaisseaux sanguins de tumeurs situées à l'extérieur du cerveau, ce qui permettrait l'usage du NG29 (et possiblement du dimère) dans de nombreux cas de tumeurs solides périphériques. Nous planifions actuellement des expérimentations afin de pouvoir utiliser un modèle expérimental de métastase cérébrale (Francia et al., 2011), et ainsi confirmer ou infirmer la potentielle utilité de nos agonistes synthétiques au niveau des

tumeurs secondaires. Nous sommes également à développer un modèle de GBM humain implanté chez le rat ou la souris "nude" (immunosupprimé), qui s'approcherait probablement davantage de la pathologie humaine, considérant la provenance des cellules tumorales.

L'imagerie par résonance magnétique étant une technologie en constante évolution, de nouveaux outils sont désormais disponibles dans nos laboratoires (p. ex. antennes, séquence d'impulsion améliorée). Ainsi, nous sommes désormais en mesure d'effectuer des acquisitions d'images plus efficacement, avec une bien meilleure résolution spatiale, sans que le temps nécessaire pour faire ces acquisitions ne devienne une nuisance. Par exemple, alors que des tranches d'une épaisseur de 1.5 mm furent la norme tout au long de ce projet, nous sommes aujourd'hui capables de faire l'acquisition d'images en tranche d'épaisseur aussi fine que 80 μm en 30 minutes. C'est donc avec beaucoup plus de précision que nous pourrions maintenant estimer le volume de distribution de nos agents de contraste. Il est également envisageable de déduire davantage d'informations de ces mêmes images, comme par exemple, les données de perméabilité k^{trans} et de volume extracellulaire v^e d'un protocole standard de DCE-MRI (voir chapitre 3), ou encore une meilleure caractérisation de la diffusion des agents de contraste dans le parenchyme cérébral (section 9.2, figure V). Plus encore, la meilleure résolution spatiale obtenue nous permettra possiblement d'avoir une meilleure vue d'ensemble sur la localisation exacte de la perméabilité vasculaire, en segmentant les images obtenus (p. ex. nécrose au centre tumoral et pourtour de la tumeur avec forte angiogénèse). Enfin, nous pouvons maintenant envisager l'étude de nos agonistes avec un modèle murin, chose qui était impensable au début de cette étude, considérant la petite taille de l'animal et les limitations en résolution spatiale.

En conclusion, nous avons démontré qu'il est possible d'affiner les structures chimiques des agonistes du rB1, dans le but de bonifier leurs propriétés pharmacologiques. L'activité de certains d'entre eux, notamment du NG29, est inégalée à ce jour et de plusieurs fois supérieure aux agonistes utilisés auparavant. Nous avons pu mettre en évidence la surexpression du rB1 et du rB2 dans le modèle de gliome F98, ainsi qu'en fonction du grade dans différents échantillons de gliomes humains. Cette étude a également

permis de démontrer l'utilité de nos analogues des kinines comme agent sécuritaire permettant de perméabiliser la barrière hémato-encéphalique tumorale, afin d'augmenter la distribution de molécules de différents poids moléculaires au sein des tumeurs cérébrales et de leur périphérie. Une méthode d'analyse d'images d'IRM, basé sur les principes du DCE-MRI, a été développée et mise à profit efficacement pour l'étude de la perméabilité de la BHE. D'autres techniques de mesure (ICP-MS, albumine marquée au bleu d'Evans) ont permis de valider les résultats obtenus par l'IRM. Enfin, les voies mécanistiques de chacune des propositions (B1 et B2) ont été mises en évidence, en plus de la dose-dépendance du phénomène et du temps d'ouverture de la BHE suite aux différents traitements. Un hétérodimère pouvant stimuler simultanément les deux sous-types de récepteurs des kinines a également été mis à l'essai, avec grand succès, dans notre modèle.

Remerciements

Un énorme merci à mes trois directeurs de thèse, Martin Lepage, David Fortin et Fernand Gobeil jr., pour l'accueil, le support et la motivation. Leur énergie et leur rigueur ont beaucoup apporté à mon apprentissage en recherche.

Merci aux co-auteurs avec lesquels j'ai construit les quatre manuscrits présentés dans cette thèse, non seulement pour l'aide au travail, mais aussi pour les bons moments partagés.

Merci à mes parents pour la discipline et la fierté. Merci à mon frère pour l'inspiration et la fantaisie. Merci à ma conjointe pour le support et l'adorable enfant. Et à ce petit être : l'aventure ne fait que commencer!

Un merci tout spécial à tous les artistes de ce monde, qui ont alimentés non seulement mes oreilles et mes yeux, mais également ma conscience sociale et politique. Vous avez, autant que mes études, fait partie intégrante de ma vie des cinq dernières années.

Je remercie également les Fonds de recherche en santé du Québec et l'Institut de Pharmacologie de Sherbrooke pour m'avoir accordé un support financier me permettant de réaliser ce projet de recherche.

Enfin, mes remerciements s'adressent aux membres du jury, Brigitte Guérin, Pedro D'Orleans-Juste et Elvire Vaucher, qui ont accepté de réviser cette thèse.

Bibliographie

- Abbott, N.J. (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200, 629-638.
- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41–53.
- Abelous J, Bardier E. (1909). Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *CR Soc Biol* 66, 511–512.
- Aktan, F. (2004). iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci.* 75, 639–653.
- Alongi, F., Russo, G., Spinelli, A., Borasi, G., Scorsetti, M., Gilardi, M.C., and Messa, C. (2011). Can magnetic resonance image-guided focused ultrasound surgery replace local oncology treatments? A review. *Tumori* 97, 259–264.
- Armulik, A., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ. Res.* 97, 512–523.
- Armulik, A., Genove, G., Mae, M., Nisancioglu, H., Wallgard, E., Niaudet, C. He, L., Norlin, J., Per Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B.R., Betsholtz, C. (2010) Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468, 557-561.
- Asotra, K., Ningaraj, N., and Black, K.L. (2003). Measurement of blood-brain and blood-tumor barrier permeabilities with [14C]-labeled tracers. *Methods Mol. Med.* 89, 177–190.
- Audet, R., Rioux, F., Drapeau, G., and Marceau, F. (1997). Cardiovascular effects of Sar-[D-Phe8]des-Arg9-bradykinin, a metabolically protected agonist of B1 receptor for kinins, in the anesthetized rabbit pretreated with a sublethal dose of bacterial lipopolysaccharide. *J Pharmacol Exp Ther* 280, 6–15.
- Austin, C.E., Faussner, A., Robinson, H.E., Chakravarty, S., Kyle, D.J., Bathon, J.M., and Proud, D. (1997). Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. *J Biol Chem* 272, 11420–11425.
- Bakhle, Y.S., and Botting, R.M. (1996). Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. *Mediators Inflamm.* 5, 305–323.
- Baluk, P., Morikawa, S., Haskell, A., Mancuso, M., and McDonald, D.M. (2003). Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol.* 163, 1801–1815.
- Baluk, P., Hashizume, H., and McDonald, D.M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 102–111.

- Bart, J., Groen, H.J., Hendrikse, N.H., van der Graaf, W.T., Vaalburg, W., and de Vries, E.G. (2000). The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer Treat. Rev.* *26*, 449–462.
- Barth, R.F., and Kaur, B. (2009). Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the C6, 9L, T9, RG2, F98, BT4C, RT-2 and CNS-1 gliomas. *J Neurooncol* *94*, 299–312.
- Bartus, R.T., Elliott, P.J., Dean, R.L., Hayward, N.J., Nagle, T.L., Huff, M.R., Snodgrass, P.A., and Blunt, D.G. (1996). Controlled modulation of BBB permeability using the bradykinin agonist, RMP-7. *Exp. Neurol.* *142*, 14–28.
- Bascands, J.L., Pecher, C., Rouaud, S., Emond, C., Tack, J.L., Bastie, M.J., Burch, R., Regoli, D., and Girolami, J.P. (1993). Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.* *264*, F548–F556.
- Bélangier, S. (2008) Nouveaux agonistes des récepteurs B2 des kinines avec profil pharmacologique amélioré. Mémoire de maîtrise, Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- Bélangier, S., Bovenzi, V., Coté, J., Neugebauer, W., Amblard, M., Martinez, J., Lammek, B., Savard, M., and Gobeil, F. (2009). Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin B2 receptor. *Peptides* *30*, 777–787.
- Bellail, A.C., Hunter, S.B., Brat, D.J., Tan, C., and Van Meir, E.G. (2004). Microregional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* *36*, 1046–1069.
- Bellavance, M.-A., Blanchette, M., and Fortin, D. (2008). Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy. *Aaps J* *10*, 166–177.
- Bellavance, M.-A., Poirier, M.-B., and Fortin, D. (2010). Uptake and intracellular release kinetics of liposome formulations in glioma cells. *International Journal of Pharmaceutics* *395*, 251–259.
- Bellavance, M.-A. (2010) Élaboration d'une formulation liposomale pour le traitement des tumeurs cérébrales primaires malignes. Mémoire de maîtrise. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.
- Benda, P., Someda, K., Messer, J., Sweet, W.H. (1971). Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg.* *34*, 310-323.
- Benjamin, L.E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D., and Keshet, E. (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J. Clin. Invest.* *103*, 159–165.
- Bernacki, J., Dobrowolska, A., Nierwińska, K., and Małecki, A. (2008). Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Rep* *60*, 600–622.

- Bhoola, K.D., COLLIER, H.O., SCHACHTER, M., and SHORLEY, P.G. (1962). Actions of some peptides on bronchial muscle. *Br J Pharmacol Chemother* *19*, 190–197.
- Bhoola, K.D., Figueroa, C.D., and Worthy, K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* *44*, 1–80.
- Black, K.L., Hoff, J.T., McGillicuddy, J.E., and Gebarski, S.S. (1986). Increased leukotriene C4 and vasogenic edema surrounding brain tumors in humans. *Ann Neurol.* *19*, 592–595.
- Black, K.L., Chen, K., Becker, D.P., and Merrill, J.E. (1992). Inflammatory leukocytes associated with increased immunosuppression by glioblastoma. *J Neurosurg* *77*, 120–126.
- Black, K.L. (1995) Biochemical opening of the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* *15*, 37-52.
- Black, K.L., Cloughesy, S., Huang, Y., Gobin, Y., Zhou, J., Grous, G., Nelson, K., Hoh, K., Phelps, M. (1997). Intracarotid infusion of RMP-7, a bradykinin analog, and transport of gallium-68 ethylenediamine tetraacetic acid into human gliomas. *J Neurosurg* *86*, 603-609.
- Black, K.L., and Ningaraj, N.S. (2004). Modulation of brain tumor capillaries for enhanced drug delivery selectively to brain tumor. *Cancer Control* *11*, 165–173.
- Blais, P.-A., Coté, J., Morin, J., Larouche, A., Gendron, G., Fortier, A., Regoli, D., Neugebauer, W., and Gobeil, F. (2005). Hypotensive effects of hemopressin and bradykinin in rabbits, rats and mice. A comparative study. *Peptides* *26*, 1317–1322.
- Blanchette, M., Pellerin, M., Tremblay, L., Lepage, M., and Fortin, D. (2009). Real-time monitoring of gadolinium diethylenetriamine penta-acetic acid during osmotic blood-brain barrier disruption using magnetic resonance imaging in normal wistar rats. *Neurosurgery* *65*, 344–350.
- Blaukat, A., Alla, S.A., Lohse, M.J., and Müller-Esterl, W. (1996). Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B2 receptor from human fibroblasts. *J Biol Chem* *271*, 32366–32374.
- Blaukat, A., Herzer, K., Schroeder, C., Bachmann, M., Nash, N., and Müller-Esterl, W. (1999). Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation. *Biochemistry* *38*, 1300–1309.
- Blaukat, A., Pizard, A., Breit, A., Wernstedt, C., Alhenc-Gelas, F., Müller-Esterl, W., and Dikic, I. (2001). Determination of bradykinin B2 receptor in vivo phosphorylation sites and their role in receptor function. *J Biol Chem* *276*, 40431–40440.
- Bobo, R.H., Laske, D.W., Akbasak, A., Morrison, P.F., Dedrick, R.L., and Oldfield, E.H. (1994). Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA* *91*, 2076–2080.

- Bodor, N. (1992) A strategy for delivering peptides into the central nervous system by sequential metabolism. *Science* 257, 1698-1700.
- deBoer, A. et Gaillard, P. (2007) Drug targeting to the brain. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 323-355.
- Borlongan, C.V., and Emerich, D.F. (2003). Facilitation of drug entry into the CNS via transient permeation of blood brain barrier: laboratory and preliminary clinical evidence from bradykinin receptor agonist, Cereport. *Brain Res. Bull.* 60, 297-306.
- Bouthillier, J., deBlois, D., and Marceau, F. (1987). Studies on the induction of pharmacological responses to des-Arg9-bradykinin in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 92, 257-264.
- Brasnjevic, I., Steinbusch, H.W.M., Schmitz, C., Martinez-Martinez, P., Initiative, E.N.R. (2009) Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. *Prog. Neurobiol.* 87, 212-251.
- Brat, D.J., and Mapstone, T.B. (2003). Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and its role in tumor progression. *Ann. Intern. Med.* 138, 659-668.
- Brem S, Cotran R, Folkman J (1972) Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *J Natl Cancer Inst* 48, 347-356.
- Brem, H., Mahaley, M.S., Vick, N.A., Black, K.L., Schold, S.C., Burger, P.C., Friedman, A.H., Ciric, I.S., Eller, T.W., and Cozzens, J.W. (1991). Interstitial chemotherapy with drug polymer implants for the treatment of recurrent gliomas. *J Neurosurg* 74, 441-446.
- Brightman, M.W., and Reese, T.S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* 40, 648-677.
- Burch, R.M., and 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.
- Burch, R.M., Connor, J.R., and Tiffany, C.W. (1989). The kallikrein-kininogen-kinin system in chronic inflammation. *Agents Actions* 27, 258-260.
- Busse, R., and Fleming, I. (1995). Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann. Med.* 27, 331-340.
- Byron, K.L., Babnigg, G., and Villereal, M.L. (1992). Bradykinin-induced Ca²⁺ entry, release, and refilling of intracellular Ca²⁺ stores. Relationships revealed by image analysis of individual human fibroblasts. *J Biol Chem* 267, 108-118.
- Calabria, A.R., and Shusta, E.V. (2006). Blood-brain barrier genomics and proteomics: elucidating phenotype, identifying disease targets and enabling brain drug delivery. *Drug Discov. Today* 11, 792-799.

Caravan, P., Ellison, J.J., McMurry, T.J., and Lauffer, R.B. (1999). Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. *Chem. Rev.* *99*, 2293–2352.

Cardoso, R.C., Lobão-Soares, B., Bianchin, M.M., Carlotti, C.G., Walz, R., Alvarez-Silva, M., Trentin, A.G., and Nicolau, M. (2004). Enhancement of blood-tumor barrier permeability by Sar-[D-Phe⁸]des-Arg⁹BK, a metabolically resistant bradykinin B₁ agonist, in a rat C6 glioma model. *BMC Neurosci* *5*, 38.

Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M.-P., and Fenart, L. (2007). Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* *6*, 650–661.

Charest, G., Sanche, L., Fortin, D., Mathieu, D., and Paquette, B. (2012). Glioblastoma treatment: bypassing the toxicity of platinum compounds by using liposomal formulation and increasing treatment efficiency with concomitant radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* *84*, 244–249.

Chen, Y., Dalwadi, G., Benson, H.A.E., 2004. Drug delivery across the blood–brain barrier. *Curr. Drug Deliv.* *1*, 361–376.

Clark, D.E. (2003) In silico prediction of blood-brain barrier permeation. *Drug Discov Today.* *8*, 927.

Clement, G.T., and Hynynen, K. (2002). A non-invasive method for focusing ultrasound through the human skull. *Physics in Medicine and Biology* *47*, 1219–1236.

Cloughesy, T., Black, K.L., Gobin, Y., Farahani, K., Nelson, G., Villablanca, P., Kabbavar, F., Vinuela, F., Wortel, C. (1999). Intra-arterial Cereport (RMP-7) and carboplatin: a dose escalation study for recurrent malignant gliomas. *Neurosurgery* *44*, 270-178.

Cohen, Z., Bonvento, G., Lacombe, P., and Hamel, E. (1996). Serotonin in the regulation of brain microcirculation. *Prog Neurobiol* *50*, 335–362.

Cohen, Z., Molinatti, G., and Hamel, E. (1997). Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* *17*, 894–904.

Constantini, S., Tamir, J., Gomori, M.J., and Shohami, E. (1993). Tumor prostaglandin levels correlate with edema around supratentorial meningiomas. *Neurosurgery* *33*, 204–210.

Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., Bertino, J.R. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* *86*, 695-698.

Côté, J. (2007) Développement de nouveaux agonistes du récepteur B₁ des kinines à profil pharmacologique amélioré et leur utilité pour l'ouverture sélective de la barrière hémato-

encéphalique dans un modèle de glioblastome de rat. Mémoire de maîtrise, Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

Coté, J., Savard, M., Bovenzi, V., Bélanger, S., Morin, J., Neugebauer, W., Larouche, A., Dubuc, C., and Gobeil, F. (2009). Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles. *Peptides* 30, 788–795.

Coté, J., Savard, M., Bovenzi, V., Dubuc, C., Tremblay, L., Tsanaclis, A.M., Fortin, D., Lepage, M., and Gobeil, F. (2010). Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe(8)psi(CH₂)NH]Arg(9)-BK in a F98 glioma rat model: an MRI study. *Neuropeptides* 44, 177–185.

Coté, J., Bovenzi, V., Savard, M., Dubuc, C., Fortier, A., Neugebauer, W., Tremblay, L., Müller-Esterl, W., Tsanaclis, A.M., Lepage, M., et al. (2012). Induction of Selective Blood-Tumor Barrier Permeability and Macromolecular Transport by a Biostable Kinin B1 Receptor Agonist in a Glioma Rat Model. *PLOS ONE* 7, e37485.

Couture, R., and Girolami, J.-P. (2004). Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 500, 467–485.

Cuthbert, A.W., and Teather, S. (1997). Expression of bradykinin B1 receptors in colonic epithelia. *Immunopharmacology* 36, 149–152.

D'Orléans-Juste, P., de Nucci, G., and Vane, J.R. (1989). Kinins act on B1 or B2 receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 96, 920–926.

Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A., Barres, B.A. (2010) Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468 (7323), 562-566.

DeAngelis, L.M. (2001). Brain tumors. *N Engl J Med* 344, 114–123.

deBlois, D., Bouthillier, J., and Marceau, F. (1988). Effect of glucocorticoids, monokines and growth factors on the spontaneously developing responses of the rabbit isolated aorta to des-Arg⁹-bradykinin. *Br. J. Pharmacol.* 93, 969–977.

deBlois, D., Bouthillier, J., and Marceau, F. (1989). Pharmacological modulation of the up-regulated responses to des-Arg⁹-bradykinin in vivo and in vitro. *Immunopharmacology* 17, 187–198.

deBlois, D., Bouthillier, J., and Marceau, F. (1991). Pulse exposure to protein synthesis inhibitors enhances vascular responses to des-Arg⁹-bradykinin: possible role of interleukin-1. *Br. J. Pharmacol.* 103, 1057–1066.

Deininger, M.H., and Schluesener, H.J. (1999). Cyclooxygenases-1 and -2 are differentially localized to microglia and endothelium in rat EAE and glioma. *J. Neuroimmunol.* 95, 202–208.

Décarie, A., Raymond, P., Gervais, N., Couture, R., and Adam, A. (1996). Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat. *Am. J. Physiol.* *271*, H1340–H1347.

Demou ZN, Hendrix MJ: Microgenomics profile the endogenous angiogenic phenotype in subpopulations of aggressive melanoma. (2008) *J Cell Biochem* *105*, 562–573.

Diamond, J.M. et Wright, E.M. (1969) Molecular forces governing non-electrolyte permeation through cell membranes. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* *171*, 273–316.

Doolittle, N.D., Miner, M.E., Hall, W.A., Siegal, T., Jerome, E., Osztie, E., McAllister, L.D., Bubalo, J.S., Kraemer, D.F., Fortin, D., et al. (2000). Safety and efficacy of a multicenter study using intraarterial chemotherapy in conjunction with osmotic opening of the blood-brain barrier for the treatment of patients with malignant brain tumors. *Cancer* *88*, 637–647.

Drapeau, G., Rhaleb, N.E., Dion, S., Jukic, D., and Regoli, D. (1988). [Phe8 psi(CH2-NH)Arg9]bradykinin, a B2 receptor selective agonist which is not broken down by either kininase I or kininase II. *Eur J Pharmacol* *155*, 193–195.

Drapeau, G., deBlois, D., and Marceau, F. (1991). Hypotensive effects of Lys-des-Arg9-bradykinin and metabolically protected agonists of B1 receptors for kinins. *J Pharmacol Exp Ther* *259*, 997–1003.

Drapeau, G., Audet, R., Levesque, L., Godin, D., and Marceau, F. (1993). Development and in vivo evaluation of metabolically resistant antagonists of B1 receptors for kinins. *J Pharmacol Exp Ther* *266*, 192–199.

Drummond, G.R., and Cocks, T.M. (1995). Endothelium-dependent relaxation to the B1 kinin receptor agonist des-Arg9-bradykinin in human coronary arteries. *Br. J. Pharmacol.* *116*, 3083–3085.

Drummond, D.C., Meyer, O., Hong, K., Kirpotin, D.B., Papahadjopoulos, D., (1999). Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol. Rev.* *51*, 691–743.

Dusser, D.J., Nadel, J.A., Sekizawa, K., Graf, P.D., and Borson, D.B. (1988). Neutral endopeptidase and angiotensin converting enzyme inhibitors potentiate kinin-induced contraction of ferret trachea. *J Pharmacol Exp Ther* *244*, 531–536.

Ehrlich (1885). *Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus*.

Emerich, D.F., Snodgrass, P., Dean, R., Agostino, M., Hasler, B., Pink, M., Xiong, H., Kim, B.S., and Bartus, R.T. (1999). Enhanced delivery of carboplatin into brain tumours with intravenous Cereport (RMP-7): dramatic differences and insight gained from dosing parameters. *Br. J. Cancer* *80*, 964–970.

Emerich, D.F., Dean, R.L., Osborn, C., and Bartus, R.T. (2001a). The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: from concept to clinical evaluation. *Clin Pharmacokinet* 40, 105–123.

Emerich, D.F., Dean, R.L., Snodgrass, P., Lafreniere, D., Agostino, M., Wiens, T., Xiong, H., Hasler, B., Marsh, J., Pink, M., et al. (2001b). Bradykinin modulation of tumor vasculature: II. activation of nitric oxide and phospholipase A2/prostaglandin signaling pathways synergistically modifies vascular physiology and morphology to enhance delivery of chemotherapeutic agents to tumors. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 632–641.

Erdős, E.G. (1990). Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 15 Suppl 6, S20–S24.

Ewald, D.A., Pang, I.H., Sternweis, P.C., and Miller, R.J. (1989). Differential G protein-mediated coupling of neurotransmitter receptors to Ca²⁺ channels in rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neuron* 2, 1185–1193.

Fasolato, C., Pandiella, A., Meldolesi, J., and Pozzan, T. (1988). Generation of inositol phosphates, cytosolic Ca²⁺, and ionic fluxes in PC12 cells treated with bradykinin. *J Biol Chem* 263, 17350–17359.

Faussner, A., Proud, D., Towns, M., and Bathon, J.M. (1998). Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B1 and B2 kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization, and signal transduction. *J Biol Chem* 273, 2617–2623.

Fenstermacher, J., Gross, P., Sposito, N., Acuff, V., Pettersen, S., and Gruber, K. (1988). Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann N Y Acad Sci* 529, 21–30.

Figueroa, C.D., Ehrenfeld, P., and Bhoola, K.D. (2012). Kinin receptors as targets for cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 1–14.

Filteau, C (1999) Développement, synthèse et caractérisation de nouveaux antagonistes du récepteur B1 des kinines. Mémoire de maîtrise, Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

Fischer, H., Gottschlich, R., Seelig, A. (1998) Blood-brain barrier permeation : molecular parameters governing passive diffusion. *J Membr. Biol.* 165, 201-211.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285, 1182–1186.

Fong, D., Smith, D.I., and Hsieh, W.T. (1991). The human kininogen gene (KNG) mapped to chromosome 3q26-qter by analysis of somatic cell hybrids using the polymerase chain reaction. *Hum. Genet.* 87, 189–192.

Ford, J., Osborn, C., Barton, T., and Bleehen, N.M. (1998). A phase I study of intravenous RMP-7 with carboplatin in patients with progression of malignant glioma. *Eur. J. Cancer* 34, 1807–1811.

Fortier, A., Bovenzi, V., Fortin, D., and Gobeil, F. (2006). Étude de l'expression des récepteurs B1 et B2 des kinines chez les glioblastomes multiformes humains. *Med Sci* 22, 24.

Fortin, D. (2003). Altering the properties of the blood-brain barrier: disruption and permeabilization. *Prog Drug Res* 61, 125–154.

Fortin, D. (2004). La barrière hémato-encéphalique : un facteur clé en Neuro-oncologie. *Revue Neurologique* 160, 523–532.

Fortin, D., Gendron, C., Boudrias, M., and Garant, M.-P. (2007). Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in the treatment of cerebral metastasis. *Cancer* 109, 751–760.

Förstermann, U., and Kleinert, H. (1995). Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 352, 351–364.

Francia, G., Cruz-Munoz, W., Man, S., Xu, P., and Kerbel, R.S. (2011). Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* 11, 135–141.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123, 1777–1788.

Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 141, 1539–1550.

Gaetani, P., Rodriguez y Baena, R., Marzatico, F., Lombardi, D., Knerich, R., and Paoletti, P. (1991). “Ex vivo” release of eicosanoid from human brain tissue: its relevance in the development of brain edema. *Neurosurgery* 28, 853–857.

Galizzi, J.P., Bodinier, M.C., Chapelain, B., Ly, S.M., Coussy, L., Giraud, S., Neliat, G., and Jean, T. (1994). Up-regulation of [3H]-des-Arg10-kallidin binding to the bradykinin B1 receptor by interleukin-1 beta in isolated smooth muscle cells: correlation with B1 agonist-induced PGI2 production. *Br. J. Pharmacol.* 113, 389–394.

Gera, L., Stewart, J.M., Whalley, E.T., Burkard, M., and Zuzack, J.S. (1996). New bradykinin antagonists having very high potency at B1 receptors. *Immunopharmacology* 33, 183–185.

Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J., Sarkadi, B., 2004. The role of ABC transporters in

drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr. Drug Deliv. J*, 27–42.

Gobeil, F jr. (1993) Différenciation de sous-types du récepteur B2 de la bradykinine chez diverses espèces animales. Mémoire de maîtrise, Département de pharmacologie, Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

Gobeil, F., Neugebauer, W., Filteau, C., Jukic, D., Allogho, S.N., Pheng, L.H., Nguyen-Le, X.K., Blouin, D., and Regoli, D. (1996a). Structure-activity studies of B1 receptor-related peptides. *Antagonists. Hypertension* 28, 833–839.

Gobeil, F., Pheng, L.H., Badini, I., Nguyen-Le, X.K., Pizard, A., Rizzi, A., Blouin, D., and Regoli, D. (1996b). Receptors for kinins in the human isolated umbilical vein. *Br. J. Pharmacol.* 118, 289–294.

Gobeil, F. (1999). 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., and Regoli, D. (1999). Kinin B1 receptor antagonists containing alpha-methyl-L-phenylalanine: in vitro and in vivo antagonistic activities. *Hypertension* 33, 823–829.

Gobeil, F., Neugebauer, W., Regoli, D., Fortin D. (2011) Kinin B1 receptor peptide agonist and uses thereof. US 11/916, 136.

Gohla, A., Offermanns, S., Wilkie, T.M., and Schultz, G. (1999). Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* 274, 17901–17907.

Goldmann, E. (1913). Vitalfärbung am Zentralnervensystem: Beitrag zur Physiopathologie des Plexus choroideus und der Hirnhäute.

Goldstein, R.H., and Wall, M. (1984). Activation of protein formation and cell division by bradykinin and des-Arg9-bradykinin. *J Biol Chem* 259, 9263–9268.

Gregor, A., Lind, M., Newman, H., Grant, R., Hadley, D.M., Barton, T., and Osborn, C. (1999). Phase II studies of RMP-7 and carboplatin in the treatment of recurrent high grade glioma. RMP-7 European Study Group. *J Neurooncol* 44, 137–145.

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

Ha, S.N., Hey, P.J., Ransom, R.W., Bock, M.G., Su, D.-S., Murphy, K.L., Chang, R., Chen, T.-B., Pettibone, D., and Hess, J.F. (2006). Identification of the critical residues of bradykinin receptor B1 for interaction with the kinins guided by site-directed mutagenesis and molecular modeling. *Biochemistry* 45, 14355–14361.

- Hau, P., Fabel, K., Baumgart, U., Rummele, P., Grauer, O., Bock, A., Dietmaier, C., Dietmaier, W., Dietrich, J., Dudel, C., Hubner, F., Jauch, T., Drechsel, E., Kleiter, I., Wismeth, C., Zellner, A., Brawanski, A., Steinbrecher, A., Marienhagen, J., Bogdahn, U. (2004) Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent high-grade glioma. *Cancer* 100, 1199–1207.
- Hara, A., and Okayasu, I. (2004). Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression in human astrocytic gliomas: correlation with angiogenesis and prognostic significance. *Acta Neuropathol* 108, 43–48.
- Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J.W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R.K., and McDonald, D.M. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* 156, 1363–1380.
- Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Yamashita, J., and Yamamoto, H. (1997). Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* 19, 13–26.
- Hayashi, R., Yamashita, N., Matsui, S., Fujita, T., Araya, J., Sassa, K., Arai, N., Yoshida, Y., Kashii, T., Maruyama, M., et al. (2000). Bradykinin stimulates IL-6 and IL-8 production by human lung fibroblasts through ERK- and p38 MAPK-dependent mechanisms. *Eur. Respir. J.* 16, 452–458.
- Hermann, A., Buchinger, P., and Rehbock, J. (1995). Visualization of tissue kallikrein in human breast carcinoma by two-dimensional western blotting and immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376, 365–370.
- Hess, J.F., Borkowski, J.A., Young, G.S., Strader, C.D., and Ransom, R.W. (1992). Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 260–268.
- Hess, J.F., Derrick, A.W., MacNeil, T., and Borkowski, J.A. (1996). The agonist selectivity of a mouse B1 bradykinin receptor differs from human and rabbit B1 receptors. *Immunopharmacology* 33, 1–8.
- Hock, F.J., Wirth, K., Albus, U., Linz, W., Gerhards, H.J., Wiemer, G., Henke, S., Breipohl, G., König, W., and Knolle, J. (1991). Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br. J. Pharmacol.* 102, 769–773.
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ (1999) Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* 284, 1994–1998.
- Houle, S., Landry, M., Audet, R., Bouthillier, J., Bachvarov, D.R., and Marceau, F. (2000). Effect of allelic polymorphism of the B(1) and B(2) receptor genes on the contractile responses of the human umbilical vein to kinins. *J Pharmacol Exp Ther* 294, 45–51.

- Hynynen, K., McDannold, N., Vykhodtseva, N., and Jolesz, F.A. (2001). Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. *Radiology* 220, 640–646.
- Ichinose, M., Belvisi, M.G., and Barnes, P.J. (1990). Bradykinin-induced bronchoconstriction in guinea pig in vivo: role of neural mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 253, 594–599.
- Inamura, T., and Black, K.L. (1994). Bradykinin selectively opens blood-tumor barrier in experimental brain tumors. *J Cereb Blood Flow Metab* 14, 862–870.
- Inamura, T., Nomura, T., Bartus, R.T., and Black, K.L. (1994a). Intracarotid infusion of RMP-7, a bradykinin analog: a method for selective drug delivery to brain tumors. *J Neurosurg* 81, 752–758.
- Inamura, T., Nomura, T., Ikezaki, K., Fukui, M., Pöllinger, G., and Black, K.L. (1994b). Intracarotid histamine infusion increases blood tumour permeability in RG2 glioma. *Neurol. Res.* 16, 125–128.
- Jones, E.G. (1970). On the mode of entry of blood vessels into the cerebral cortex. *J. Anat.* 106, 507–520.
- Jones, T.H., Figueroa, C.D., Smith, C., Cullen, D.R., and Bhoola, K.D. (1990). Characterization of a tissue kallikrein in human prolactin-secreting adenomas. *J. Endocrinol.* 124, 327–331.
- Juliano R.L., Ling V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 455, 152-162.
- Jones, T.H., Figueroa, C.D., Smith, C.M., Cullen, D.R., and Bhoola, K.D. (1992). Tissue kallikrein is associated with prolactin-secreting cells within human growth hormone-secreting adenomas. *J. Endocrinol.* 134, 149–154.
- Jones, S., Brown, D.A., Milligan, G., Willer, E., Buckley, N.J., and Caulfield, M.P. (1995). Bradykinin excites rat sympathetic neurons by inhibition of M current through a mechanism involving B2 receptors and G alpha q/11. *Neuron* 14, 399–405.
- Joó, F., Temesvári, P., and Dux, E. (1983). Regulation of the macromolecular transport in the brain microvessels: the role of cyclic GMP. *Brain Res* 278, 165–174.
- Ju, H., Venema, V.J., Liang, H., Harris, M.B., Zou, R., and Venema, R.C. (2000). Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochem. J.* 351, 257–264.
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 422–433.

- Kastler, B., and Vetter, D. (2011). Comprendre l'IRM. Manuel d'auto-apprentissage (7^e Éd.) (Coll. Imagerie médicale : diagnostic): Librairie Lavoisier. Recherche.
- Kido, G., Wright, J.L., and Merchant, R.E. (1991). Acute effects of human recombinant tumor necrosis factor-alpha on the cerebral vasculature of the rat in both normal brain and in an experimental glioma model. *J Neurooncol* 10, 95–109.
- Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., and Schwarz, P.M. (2004). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 500, 255–266.
- Kniesel, U., and Wolburg, H. (2000). Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 20, 57–76.
- Koukourakis, M.I., Koukouraki, S., Giatromanolaki, A., Kakolyris, S., Georgoulas, V., Velidaki, A., Archimandritis, S., Karkavitsas, N.N. (2000) High intratumoral accumulation of stealth liposomal doxorubicin in sarcomas—rationale for combination with radiotherapy. *Acta Oncol.* 39, 207–211.
- Kratz, F., Müller, I.A., Ryppa, C., and Warnecke, A. (2008). Prodrug strategies in anticancer chemotherapy. *ChemMedChem* 3, 20–53.
- Kroll, R.A., and Neuwelt, E.A. (1998). Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery* 42, 1083–99–discussion1099–100.
- Lamontagne, D., Nadeau, R., and Adam, A. (1995). Effect of enalaprilat on bradykinin and des-Arg9-bradykinin release following reperfusion of the ischaemic rat heart. *Br. J. Pharmacol.* 115, 476–478.
- LaMorte, V.J., Harootunian, A.T., Spiegel, A.M., Tsien, R.Y., and Feramisco, J.R. (1993). Mediation of growth factor induced DNA synthesis and calcium mobilization by Gq and Gi2. *J. Cell Biol.* 121, 91–99.
- Langner, M., Kral, T.E., (1999). Liposome-based drug delivery systems. *Pol. J. Pharmacol.* 51, 211–222.
- Lee, E.J., Hung, Y.C., Lee, M.Y. (1999) Early alterations in cerebral hemodynamics, brain metabolism, and blood–brain barrier permeability in experimental intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 91,1013–1019.
- Leeb-Lundberg, L.M.F., Marceau, F., Müller-Esterl, W., Pettibone, D.J., and 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.
- Levesque, L., Harvey, N., Rioux, F., Drapeau, G., and Marceau, F. (1995a). Development of a binding assay for the B1 receptors for kinins. *Immunopharmacology* 29, 141–147.

- Levesque, L., Larrivée, J.F., Bachvarov, D.R., Rioux, F., Drapeau, G., and Marceau, F. (1995b). Regulation of kinin-induced contraction and DNA synthesis by inflammatory cytokines in the smooth muscle of the rabbit aorta. *Br. J. Pharmacol.* *116*, 1673–1679.
- Levesque, L., Lam, M.H., Allaire, P., Mondat, M., Houle, S., Beaudoin, G., Donath, D., and Leclerc, G. (2001). Effects of radiation therapy on vascular responsiveness. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *37*, 381–393.
- Lewandowsky, M. (1900). Lewandowsky: Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit - *Z. klin. Med.*
- Liebmann, C., Graness, A., Ludwig, B., Adomeit, A., Boehmer, A., Boehmer, F.D., Nürnberg, B., and Wetzker, R. (1996). Dual bradykinin B2 receptor signalling in A431 human epidermoid carcinoma cells: activation of protein kinase C is counteracted by a GS-mediated stimulation of the cyclic AMP pathway. *Biochem. J.* *313 (Pt 1)*, 109–118.
- Liebner, S., Fischmann, A., Rascher, G., Duffner, F., Grote, E.H., Kalbacher, H., and Wolburg, H. (2000). Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* *100*, 323–331.
- Liu, Y., Hashizume, K., Chen, Z., Samoto, K., Ningaraj, N., Asotra, K., and Black, K.L. (2001). Correlation between bradykinin-induced blood-tumor barrier permeability and B2 receptor expression in experimental brain tumors. *Neurol. Res.* *23*, 379–387.
- Liu, L.-B., Xue, Y.-X., Liu, Y.-H., and Wang, Y.-B. (2008). Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occludin, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton. *J Neurosci Res* *86*, 1153–1168.
- Löscher, W., Potschka, H., 2005. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 591–602
- Lu, D.-Y., Leung, Y.-M., Huang, S.-M., and Wong, K.-L. (2010). Bradykinin-induced cell migration and COX-2 production mediated by the bradykinin B1 receptor in glioma cells. *J. Cell. Biochem.* *110*, 141–150.
- Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S (2001) Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* *7*, 1194–1201.
- Maeda, H., Akaike, T., Wu, J., Noguchi, Y., and Sakata, Y. (1996). Bradykinin and nitric oxide in infectious disease and cancer. *Immunopharmacology* *33*, 222–230.
- Mamelak, A.N., Rosenfeld, S., Bucholz, R., Raubitschek, A., Nabors, L.B., Fiveash, J.B., Shen, S., Khazaeli, M.B., Colcher, D., Liu, A., et al. (2006). Phase I single-dose study of

intracavitary-administered iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma. *J. Clin. Oncol.* 24, 3644–3650.

Mamot, C., Drummond, D.C., Hong, K., Kirpotin, D.B., Park, J.W. (2003) Liposome-based approaches to overcome anticancer drug resistance. *Drug Resist. Updat.* 6, 271–279

Marceau, F., Hess, J.F., and Bachvarov, D.R. (1998). The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* 50, 357–386.

Mathieu, D., Lecomte, R., Tsanaclis, A.M., Larouche, A., Fortin, D. (2007) Standardization and detailed characterization of the syngeneic Fischer/F98 glioma model. *Can J Neurol* 34, 296-306.

Mathis, S.A., Criscimagna, N.L., and Leeb-Lundberg, 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.

Matsukado, K., Inamura, T., Nakado, S. et al. (1996) Enhanced tumor uptake of carboplatin and survival in glioma-bearing rats by intra-carotid infusion of bradykinin analog RMP-7. *Neurosurgery.* 39, 125-134.

Matsumura, Y., Maruo, K., Kimura, M., Yamamoto, T., Konno, T., and Maeda, H. (1991). Kinin-generating cascade in advanced cancer patients and in vitro study. *Jpn. J. Cancer Res.* 82, 732–741.

Maynard, E.A., Schultz, R.L., and Pease, D.C. (1957). Electron microscopy of the vascular bed of rat cerebral cortex. *Am. J. Anat.* 100, 409–433.

McFadden, R.G., and Vickers, K.E. (1989). Bradykinin augments the in vitro migration of nonsensitized lymphocytes. *Clin Invest Med* 12, 247–253.

Menke, J.G., Borkowski, J.A., Bierilo, K.K., MacNeil, T., Derrick, A.W., Schneck, K.A., Ransom, R.W., Strader, C.D., Linemeyer, D.L., and Hess, J.F. (1994). Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* 269, 21583–21586.

Montana, V., and Sontheimer, H. (2011). Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors. *Journal of Neuroscience* 31, 4858–4867.

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

Muldoon LL, Soussain C, Jahnke K, Johanson C, Siegal T, et al. (2007) Chemotherapy delivery issues in central nervous system malignancy: a reality check. *J Clin Oncol* 25: 2295–2305.

Nakano, S., Matsukado, K., and Black, K.L. (1996). Increased brain tumor microvessel permeability after intracarotid bradykinin infusion is mediated by nitric oxide. *Cancer Res* 56, 4027–4031.

- Neri, D., and Bicknell, R. (2005). Tumour vascular targeting. *Nat. Rev. Cancer* 5, 436–446.
- Neugebauer, W., Blais, P.A., Hallé, S., Filteau, C., Regoli, D., Gobeil, F. jr. (2002) Kinin B1 receptor antagonists with multi-enzymatic resistance properties. *Can J Physiol Pharmacol* 80, 287-292.
- Neuwelt, E.A., Frenkel, E.P., Diehl, J.T., Maravilla, K.R., Vu, L.H., Clark, W.K., Rapoport, S.I., Barnett, P.A., Hill, S.A., Lewis, S.E., et al. (1979). Osmotic blood-brain barrier disruption: a new means of increasing chemotherapeutic agent delivery. *Trans Am Neurol Assoc* 104, 256–260.
- Neuwelt, E.A. (2004). Mechanisms of disease: the blood-brain barrier. *Neurosurgery* 54, 131–140.
- Nomura, T., Inamura, T., and Black, K.L. (1994). Intracarotid infusion of bradykinin selectively increases blood-tumor permeability in 9L and C6 brain tumors. *Brain Res* 659, 62–66.
- Norinder, U., Haeberlein, M. (2002) Computational approaches to the prediction of the blood-brain distribution. *Adv Drug Deliv Rev.* 54, 291.
- Ohgaki, H., Wiestler, O., and Cavenee, W. (2007). WHO classification of tumors of the nervous system (IARC: Lyon).
- Oldendorf, W.H., Cornford, M.E., and Brown, W.J. (1977). The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol.* 1, 409–417.
- Olejek, A., Mazurek, U., Michalski, B., Kuśmierz, D., Orchel, J., Witek, A., and Wilczok, T. (2000). [Profiles of expression of genes coding kininogen and kinin receptors as a marker of tissue pathology in cervical cancer coexisting with HPV infection]. *Wiad. Lek.* 53, 247–254.
- Osman, N.M., Copley, M.P., and Litterst, C.L. (1984). Effects of the diuretics mannitol or acetazolamide on nephrotoxicity and physiological disposition of cisplatin in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 13, 58–62.
- Ostermann, S., Csajka, C., Buclin, T., Leyvraz, S., Decosterd, L.A., Stupp, R. (2004) Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clin Cancer Res.* 10, 3728-3736.
- Ostrow, S., Egorin, M.J., Hahn, D., Markus, S., Aisner, J., Chang, P., LeRoy, A., Bachur, N.R., and Wiernik, P.H. (1981). High-dose cisplatin therapy using mannitol versus furosemide diuresis: comparative pharmacokinetics and toxicity. *Cancer Treat Rep* 65, 73–78.
- Packer, R.J., Krailo, M., Mehta, M., Warren, K., Allen, J., Jakacki, R., Villablanca, J.G., Chiba, A., and Reaman, G. (2005). A Phase I study of concurrent RMP-7 and carboplatin

with radiation therapy for children with newly diagnosed brainstem gliomas. *Cancer* 104, 1968–1974.

Palmeri, D., van Zante, A., Huang, C.C., Hemmerich, S., and Rosen, S.D. (2000). Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem* 275, 19139–19145.

Pan, Z.K., Zuraw, B.L., Lung, C.C., Prossnitz, E.R., Browning, D.D., and Ye, R.D. (1996). Bradykinin stimulates NF-kappaB activation and interleukin 1beta gene expression in cultured human fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 98, 2042–2049.

Pardridge, W.M. et Mietus, L.J. (1979) Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. *J. Clin. Invest.* 64, 145-154.

Pardridge, W.M. (2002). Drug and gene targeting to the brain with molecular trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* 1, 131–139.

Pardridge, W.M. (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2, 3–14.

Pardridge, W.M. (2007). Drug targeting to the brain. *Pharm Res* 24, 1733–1744.

Parpura, V., Heneka, M.T., Montana, V., Oliet, S.H.R., Schousboe, A., Haydon, P.G., Stout, R.F., Spray, D.C., Reichenbach, A., Pannicke, T., et al. (2012). Glial cells in (patho)physiology. *J. Neurochem.* 121, 4–27.

Patel, M., McCully, C., Godwin, K., Ballis, F.M. (2003) Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous temozolomide in non-human primates. *J Neurooncol.* 61, 203-207.

Phagoo, S.B., Poole, S., and Leeb-Lundberg, L.M. (1999). Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol. Pharmacol.* 56, 325–333.

Pinto-Alphandary, H., Andremont, A., Couvreur, P. (2000) Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int. J. Antimicrob. Agents* 13, 155–168.

Pitz, M.W., Desai, A., Grossman, S.A., Blakeley, J.O. (2011) Tissue concentration of systemically administered antineoplastic agents in human brain tumors. *J Neurooncol.* 104(3), 629-638.

Pizard, A., Blaukat, A., Müller-Esterl, W., Alhenc-Gelas, F., and Rajerison, R.M. (1999). Bradykinin-induced internalization of the human B2 receptor requires phosphorylation of three serine and two threonine residues at its carboxyl tail. *J Biol Chem* 274, 12738–12747.

- Prados, M.D., Schold SC JR, S.C., Fine, H.A., Jaeckle, K., Hochberg, F., Mechtler, L., Fetell, M.R., Phuphanich, S., Feun, L., Janus, T.J., et al. (2003). A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma. *Neuro-Oncology* 5, 96–103.
- Proud, D., Togias, A., Naclerio, R.M., Crush, S.A., Norman, P.S., and Lichtenstein, L.M. (1983). Kinins are generated in vivo following nasal airway challenge of allergic individuals with allergen. *J. Clin. Invest.* 72, 1678–1685.
- Raidoo, D.M., Sawant, S., Mahabeer, R., and Bhoola, K.D. (1999). Kinin receptors are expressed in human astrocytic tumour cells. *Immunopharmacology* 43, 255–263.
- Rainov, N.G., Zimmer, C., Chase, M., et al. (1995) Selective uptake of viral and monocrystalline particles delivered intra-arterially to experimental brain neoplasms. *Hum Gene Ther.* 6, 1543-1552.
- Rapoport, S.I. (1970). Effect of concentrated solutions on blood-brain barrier. *Am. J. Physiol.* 219, 270–274.
- Rapoport, S.I., Hori, M., and Klatzo, I. (1971). Reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Science* 173, 1026–1028.
- Rapoport, S.I., Hori, M., and Klatzo, I. (1972). Testing of a hypothesis for osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am. J. Physiol.* 223, 323–331.
- Rapoport, S.I. (2000). Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cell Mol Neurobiol* 20, 217–230.
- Raymond, J.J., Robertson, D.M., and Dinsdale, H.B. (1986). Pharmacological modification of bradykinin induced breakdown of the blood-brain barrier. *The Canadian Journal of Neurological Sciences Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques* 13, 214–220.
- Raymond, P., Drapeau, G., Raut, R., Audet, R., Marceau, F., Ong, H., and Adam, A. (1995). Quantification of des-Arg9-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. *J. Immunol. Methods* 180, 247–257.
- Reese, T.S., and Karnovsky, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34, 207–217.
- Regoli, D., Barabé, J., and Park, W.K. (1977). Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can J Physiol Pharmacol* 55, 855–867.
- Regoli, D., and Barabé, J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32, 1–46.

- Regoli, D.C., Marceau, F., and Lavigne, J. (1981). Induction of beta 1-receptors for kinins in the rabbit by a bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol* 71, 105–115.
- Regoli, D., Rhaleb, N.E., Dion, S., and Drapeau, G. (1990). New selective bradykinin receptor antagonists and bradykinin B2 receptor characterization. *Trends Pharmacol. Sci.* 11, 156–161.
- Regoli, D., Nsa Allogho, S., Rizzi, A., and Gobeil, F.J. (1998). Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* 348, 1–10.
- Regoli, D., Rizzi, A., Perron, S.I., and Gobeil, F. (2001). Classification of kinin receptors. *Biol. Chem.* 382, 31–35.
- Regoli, D., Gobeil, F. (2012). Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther* 135(1), 94-111.
- Rehbock, J., Buchinger, P., Hermann, A., and Figueroa, C. (1995). Identification of immunoreactive kallikrein in human ductal breast carcinomas. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 121, 64–68.
- Rhaleb, N.E., Drapeau, G., Dion, S., Jukic, D., Rouissi, N., and Regoli, D. (1990). Structure-activity studies on bradykinin and related peptides: agonists. *Br. J. Pharmacol.* 99, 445–448.
- Rhaleb, N.E., Gobeil, F. jr., Regoli, D. (1992). Non-selectivity of new bradykinin antagonists for B1 receptors. *Life Sci* 51, 211.
- Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R (2010) Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem- like cells. *Nature* 468, 824–828
- Riley, M.G., Kim, N.N., Watson, V.E., Gobin, Y.P., LeBel, C.P., Black, K.L., and Bartus, R.T. (1998). Intra-arterial administration of carboplatin and the blood brain barrier permeabilizing agent, RMP-7: a toxicologic evaluation in swine. *J Neurooncol* 36, 167–178.
- Rizzi, A., Gobeil, F., Bogoni, G., Calo, G., Campobasso, C., Inamura, N., Regoli, D. (1997) Antagonistic effects of FR 173657 on human, pig, rabbit and guinea pig kinin receptors: an in vitro study. *Can J Physiol Pharmacol* 75(6), 601-608.
- Rosenberg, G.A., Barrett, J., Estrada, E., Brayer, J., and Kyner, W.T. (1988). Selective effect of mannitol-induced hyperosmolality on brain interstitial fluid and water content in white matter. *Metab Brain Dis* 3, 217–227.
- Ross, D., and Joyner, W.L. (1997). Resting distribution and stimulated translocation of protein kinase C isoforms alpha, epsilon and zeta in response to bradykinin and TNF in human endothelial cells. *Endothelium* 5, 321–332.

Roux, F., Durieu-Trautmann, O., Chaverot, N., Claire, M., Mailly, P., Bourre, J.M., Strosberg, A.D., and Couraud, P.O. (1994). Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* *159*, 101–113.

Sanovich, E., Bartus, R.T., Friden, P.M., Dean, R.L., Le, H.Q., Brightman, M. W. (1995). Pathway across blood-brain barrier opened by the bradykinin agonist, RMP-7. *Brain Res* *705*, 125-135.

Sapra, P., Tyagi, P., Allen, T.M. (2005) Ligand-targeted liposomes for cancer treatment. *Curr. Drug Deliv.* *2*, 369–381.

Sardi, S.P., Ares, V.R., Errasti, A.E., and Rothlin, R.P. (1998). Bradykinin B1 receptors in human umbilical vein: pharmacological evidence of up-regulation, and induction by interleukin-1 beta. *Eur J Pharmacol* *358*, 221–227.

Sardi, S.P., Daray, F.M., Errasti, A.E., Pelorosso, F.G., Pujol-Lereis, V.A., Rey-Ares, V., Rogines-Velo, M.P., and Rothlin, R.P. (1999). Further pharmacological characterization of bradykinin B1 receptor up-regulation in human umbilical vein. *J Pharmacol Exp Ther* *290*, 1019–1025.

Sasaki, A., Tamura, M., Hasegawa, M., Ishiuchi, S., Hirato, J., and Nakazato, Y. (1998). Expression of interleukin-1beta mRNA and protein in human gliomas assessed by RT-PCR and immunohistochemistry. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *57*, 653–663.

Savard, M., Labonté, J., Dubuc, C., Neugebauer, W., D'Orleans-Juste, P., Gobeil F. (2013). Further pharmacological evaluation of a novel synthetic peptide bradykinin B2 receptor agonist. *Biol Chem.* *394(3)*, 353-360.

Schanstra, J.P., Bataillé, E., Marin Castaño, M.E., Barascud, Y., Hirtz, C., Pesquero, J.B., Pecher, C., Gauthier, F., Girolami, J.P., and Bascands, J.L. (1998). The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J. Clin. Invest.* *101*, 2080–2091.

Schneider, S.W., Ludwig, T., Tatenhorst, L., Braune, S., Oberleithner, H., Senner, V., and Paulus, W. (2004). Glioblastoma cells release factors that disrupt blood-brain barrier features. *Acta Neuropathol* *107*, 272–276.

Schremmer-Danninger, E., Offner, A., Siebeck, M., and Roscher, A.A. (1998). B1 bradykinin receptors and carboxypeptidase M are both upregulated in the aorta of pigs after LPS infusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *243*, 246–252.

Sedlakova, R., Shivers, R.R., and Del Maestro, R.F. (1999). Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* *31*, 149–161.

Segond von Banchet, G., Petersen, M., and Heppelmann, B. (1996). Bradykinin receptors in cultured rat dorsal root ganglion cells: influence of length of time in culture. *Neuroscience* 75, 1211–1218.

Shono, T., Tofilon, P.J., Bruner, J.M., Owolabi, O., and Lang, F.F. (2001). Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Res* 61, 4375–4381.

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

Skidgel, R. (1997). Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease (The Kinin System).

Smith, J.A., Webb, C., Holford, J., and Burgess, G.M. (1995). Signal transduction pathways for B1 and B2 bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Mol. Pharmacol.* 47, 525–534.

Stewart, J.M., Gera, L., Chan, D.C., Whalley, E.T., Hanson, W.L., and Zuzack, J.S. (1997). Potent, long-acting, orally-active bradykinin antagonists for a wide range of applications. *Immunopharmacology* 36, 167–172.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987–996.

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* 10, 459–466.

Sugita, M., and Black, K.L. (1998). Cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibition and intracarotid bradykinin infusion enhances permeability into brain tumors. *Cancer Res* 58, 914–920.

Szakács, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C., and Gottesman, M.M. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 5, 219–234.

Tagami, M., Nara, Y., Kubota, A., Fujino, H., and Yamori, Y. (1990). Ultrastructural changes in cerebral pericytes and astrocytes of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 21, 1064–1071.

Tanaka, S., Akaike, T., Wu, J., Fang, J., Sawa, T., Ogawa, M., Beppu, T., and Maeda, H. (2003). Modulation of tumor-selective vascular blood flow and extravasation by the stable prostaglandin 12 analogue beraprost sodium. *J Drug Target* 11, 45–52.

- Taub, J.S., Guo, R., Leeb-Lundberg, L.M.F., Madden, J.F., and Daaka, Y. (2003). Bradykinin receptor subtype 1 expression and function in prostate cancer. *Cancer Res* 63, 2037–2041.
- Thiébaud, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C. (1989). Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: Evidence for localization in brain capillaries and cross-reactivity of one antibody with a muscle protein. *J Histochem Cytochem* 37, 159–164.
- Tilly, B.C., van Paridon, P.A., Verlaan, I., Wirtz, K.W., de Laat, S.W., and Moolenaar, W.H. (1987). Inositol phosphate metabolism in bradykinin-stimulated human A431 carcinoma cells. Relationship to calcium signalling. *Biochem. J.* 244, 129–135.
- Tippmer, S., Quitterer, U., Kolm, V., Faussner, A., Roscher, A., Mosthaf, L., Müller-Esterl, W., and Häring, H. (1994). Bradykinin induces translocation of the protein kinase C isoforms alpha, epsilon, and zeta. *Eur. J. Biochem.* 225, 297–304.
- Torchilin, V.P. (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 145–160.
- Torchilin, V.P. (2006) Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Del Rev.* 58, 1532–1555.
- Trevisani, M., Schmidlin, F., Tognetto, M., Nijkamp, F.P., Gies, J.P., Frossard, N., Amadesi, S., Folkerts, G., and Geppetti, P. (1999). Evidence for in vitro expression of B1 receptor in the mouse trachea and urinary bladder. *Br. J. Pharmacol.* 126, 1293–1300.
- Tropea, M.M., Gummelt, D., Herzig, M.S., and Leeb-Lundberg, L.M. (1993). B1 and B2 kinin receptors on cultured rabbit superior mesenteric artery smooth muscle cells: receptor-specific stimulation of inositol phosphate formation and arachidonic acid release by des-Arg9-bradykinin and bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther* 264, 930–937.
- Tsutsui, M., Onoue, H., Iida, Y., Smith, L., O'Brien, T., and Katusic, Z.S. (2000). B(1) and B(2) bradykinin receptors on adventitial fibroblasts of cerebral arteries are coupled to recombinant eNOS. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H367–H372.
- Turner, A.J., and Hooper, N.M. (2002). The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 23, 177–183.
- Tzeng, J.J., Barth, R.F., Orosz, C.G., and James, S.M. (1991). Phenotype and functional activity of tumor-infiltrating lymphocytes isolated from immunogenic and nonimmunogenic rat brain tumors. *Cancer Res* 51, 2373–2378.
- Uchida, M., Chen, Z., Liu, Y., and Black, K.L. (2002). Overexpression of bradykinin type 2 receptors on glioma cells enhances bradykinin-mediated blood-brain tumor barrier permeability increase. *Neurol. Res.* 24, 739–746.

- Unterberg, A., and Baethmann, A.J. (1984). The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 1: Cerebral exposure to bradykinin and plasma. *J Neurosurg* 61, 87–96.
- van Valenberg, P.L., Hoitsma, A.J., Tiggeler, R.G., Berden, J.H., van Lier, H.J., and Koene, R.A. (1987). Mannitol as an indispensable constituent of an intraoperative hydration protocol for the prevention of acute renal failure after renal cadaveric transplantation. *Transplantation* 44, 784–788.
- Vane, J.R., Bakhle, Y.S., and Botting, R.M. (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 97–120.
- Vaucher, E., Tong, X.K., Cholet, N., Lantin, S., and Hamel, E. (2000). GABA neurons provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurons in the rat cerebral cortex: a means for direct regulation of local cerebral blood flow. *J. Comp. Neurol.* 421, 161–171.
- Vavrek, R.J., Stewart, J. M. (1985). Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides* 6, 161-164.
- Velarde, V., Ullian, M.E., Morinelli, T.A., Mayfield, R.K., and Jaffa, A.A. (1999). Mechanisms of MAPK activation by bradykinin in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 277, C253–C261.
- Venema, R.C. (2002). Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin. *Int. Immunopharmacol.* 2, 1755–1762.
- Virchow, R.L.K. (1858). *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre.*
- Vogelbaum, M.A. (2005). Convection enhanced delivery for the treatment of malignant gliomas: symposium review. pp. 57–69.
- von Eckardstein, von, K.L., Patt, S., Kratzel, C., Kiwit, J.C.W., and Reszka, R. (2005). Local chemotherapy of F98 rat glioblastoma with paclitaxel and carboplatin embedded in liquid crystalline cubic phases. *J Neurooncol* 72, 209–215.
- Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, Fligelman B, Leversha M, Brennan C, Tabar V (2010) Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature* 468, 829 – 833.
- Wahl, M., Görlach, C., Hortobágyi, T., and Benyó, Z. (1999). Effects of bradykinin in the cerebral circulation. *Acta Physiol Hung* 86, 155–160.
- Walker, M.D., Strike, T.A., and Sheline, G.E. (1979). An analysis of dose-effect relationship in the radiotherapy of malignant gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 5, 1725–1731.

- Walter, K.A., Tamargo, R.J., Olivi, A., Burger, P.C., and Brem, H. (1995). Intratumoral chemotherapy. *Neurosurgery* 37, 1128–1145.
- Warren, K.E., Patel, M.C., Aikin, A.A., Widemann, B., Libucha, M., Adamson, P.C., Neuwirth, R., Benziger, D., O'Toole, T., Ford, K., et al. (2001). Phase I trial of lobradimil (RMP-7) and carboplatin in children with brain tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 48, 275–282.
- Warren, K., Jakacki, R., Widemann, B., Aikin, A., Libucha, M., Packer, R., Vezina, G., Reaman, G., Shaw, D., Krailo, M., et al. (2006). Phase II trial of intravenous lobradimil and carboplatin in childhood brain tumors: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer Chemother Pharmacol* 58, 343–347.
- Waterhouse, D.N., Madden, T.D., Cullis, P.R., Bally, M.B., Mayer, L.D., Webb, M.S., (2005) Preparation, characterization, and biological analysis of liposomal formulations of vincristine. *Methods Enzymol.* 391, 40–57.
- Weller, M., Rieger, J., Grimmel, C., Van Meir, E.G., De Tribolet, N., Krajewski, S., Reed, J.C., Deimling, von, A., and Dichgans, J. (1998). Predicting chemoresistance in human malignant glioma cells: the role of molecular genetic analyses. *Int. J. Cancer* 79, 640–644.
- Wen, P.Y., and Kesari, S. (2008). Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 359, 492–507.
- Weyerbrock, A., Walbridge, S., Pluta, R.M., Saavedra, J.E., Keefer, L.K., and Oldfield, E.H. (2003). Selective opening of the blood-tumor barrier by a nitric oxide donor and long-term survival in rats with C6 gliomas. *J Neurosurg* 99, 728–737.
- Weyerbrock, A., Walbridge, S., Saavedra, J.E., Keefer, L.K., and Oldfield, E.H. (2011). Differential effects of nitric oxide on blood-brain barrier integrity and cerebral blood flow in intracerebral C6 gliomas. *Neuro-Oncology* 13, 203–211.
- Williams, T.J. (1979). Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes of inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 65, 517–524.
- Wirth, K., Hock, F.J., Albus, U., Linz, W., Alpermann, H.G., Anagnostopoulos, H., Henk, S., Breipohl, G., König, W., and Knolle, J. (1991). Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br. J. Pharmacol.* 102, 774–777.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm, S., Duffner, F., Grote, E.-H., Risau, W., and Engelhardt, B. (2003). Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 105, 586–592.
- Wu, J., Akaike, T., and Maeda, H. (1998). Modulation of enhanced vascular permeability in tumors by a bradykinin antagonist, a cyclooxygenase inhibitor, and a nitric oxide scavenger. *Cancer Res* 58, 159–165.

- Wu, J., Akaike, T., Hayashida, K., Miyamoto, Y., Nakagawa, T., Miyakawa, K., Müller-Esterl, W., and Maeda, H. (2002). Identification of bradykinin receptors in clinical cancer specimens and murine tumor tissues. *Int. J. Cancer* 98, 29–35.
- Xing, M., Tao, L., and Insel, P.A. (1997). Role of extracellular signal-regulated kinase and PKC alpha in cytosolic PLA2 activation by bradykinin in MDCK-D1 cells. *Am. J. Physiol.* 272, C1380–C1387.
- Yang, L., Double, E.B., O'Hara, J.A., Crabtree, R.A., and Eastman, A. (1995). Enhanced radiation-induced cell killing by carboplatin in cells of repair-proficient and repair-deficient cell lines. *Radiat. Res.* 144, 230–236.
- Yankeelov, T.E., and Gore, J.C. (2009). Dynamic Contrast Enhanced Magnetic Resonance Imaging in Oncology: Theory, Data Acquisition, Analysis, and Examples. *Curr Med Imaging Rev* 3, 91–107.
- Yano, K., Higashida, H., Hattori, H., and Nozawa, Y. (1985). Bradykinin-induced transient accumulation of inositol trisphosphate in neuron-like cell line NG108-15 cells. *FEBS Lett.* 181, 403–406.
- Yerneni, K.K., Bai, W., Khan, B.V., Medford, R.M., and Natarajan, R. (1999). Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 48, 855–864.
- Yin, D., Wang, X., Konda, B.M., Ong, J.M., Hu, J., Sacapano, M.R., Ko, M.K., Espinoza, A.J., Irvin, D.K., Shu, Y., et al. (2008). Increase in brain tumor permeability in glioma-bearing rats with nitric oxide donors. *Clin. Cancer Res.* 14, 4002–4009.
- Yue WY, Chen ZP: Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? (2005) *J Histochem Cytochem* 53, 997–1002.
- Zagzag, D., Esencay, M., Mendez, O., Yee, H., Smirnova, I., Huang, Y., Chiriboga, L., Lukyanov, E., Liu, M., and Newcomb, E.W. (2008). Hypoxia- and vascular endothelial growth factor-induced stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 expression in glioblastomas: one plausible explanation of Scherer's structures. *Am. J. Pathol.* 173, 545–560.
- Zhang, Y., Zhang, Y.-f., Bryant, J., Charles, A., Boado, R.J., Pardridge, W.M. (2004) Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin. Cancer Res.* 10, 3667–3677.
- Zhao, Y., Xue, Y., Liu, Y., Fu, W., Jiang, N., An, P., Wang, P., Yang, Z., and Wang, Y. (2005). Study of correlation between expression of bradykinin B2 receptor and pathological grade in human gliomas. *Br J Neurosurg* 19, 322–326.

ANNEXE 1

A) Script MatLab pour le calcul du volume de distribution d'un agent de contraste
(agonistdetect_6.m)

```

numimages = size(viewerdata.images,2); % nombre d'images dans la
dynamique
numvox1 = str2num(viewerdata.headers(1).displayMatrixSize1); % nombre
de voxel dans une direction.
numvox2 = str2num(viewerdata.headers(1).displayMatrixSize2); % nombre
de voxel dans une direction.
%lowerth=0.0875; % en bas de ce niveau, le volume est zéro. Défini
comme le
% niveau moyen + 2cart-type

%upperth=0.11; % au dessus de ce niveau le volume est maximum.
Défini comme le niveau
% moyen de la tumeur moins un 2cart-type
voxdim1=str2num(viewerdata.headers(1).FOV1)*10; % dimension de
l'image en readout en mm
voxdim2=str2num(viewerdata.headers(1).FOV2)*10; % dimension de
l'imaee en pase encode en mm
ssthick=str2num(viewerdata.headers(1).sliceThickness); % épaisseur de
la slice en mm
acqtime=str2num(viewerdata.headers(1).repetitionTime)*numvox2*str2num(vie
werdata.headers(1).numOfAcquisitions);

prompt = {'Enter Rat number:', 'Enter slice number:', 'Intensité
minimale', 'Intensité maximale de la tumeur', 'references
filename', 'Filename to save results in ASCII', 'Filename to save images'};
dlg_title = 'Input for agonist effect evaluation';
num_lines = 1;
def = {'1', '7', '0.0875', '0.11', 'ref.dat', 'rat.dat', 'rat.mat'};
answer = inputdlg(prompt,dlg_title,num_lines,def,'on');

numrat = answer{1};
numslice = answer{2};
lowerth = str2num(answer{3});
upperth= str2num(answer{4});
refname = answer{5};
filename = answer{6};
fileimages = answer{7};

if strcmp(refname,'aucun')
    for ii=1:numimages
        refth(ii)=1;
    end
else
    refdata=load(refname);
    for ii=1:numimages
        refth(ii)= refdata(ii+numimages);
    end
end
end

```

```

volvox = (voxdim1/numvox1)*(voxdim2/numvox2)*ssthick; % volume d'un voxel
en mm3

%lowerth = input('Niveau minimum. En bas de ce niveau, le volume est
zéro? ');
%if isempty(lowerth)
%   lowerth = input('Niveau minimum. En bas de ce niveau, la tumeur est
absente du voxel');
%end

%upperth= input('Niveau maximum. En haut de ce niveau, la tumeur occupe
tout le voxel? ');
%if isempty(upperth)
%   lowerth = input('Niveau minimum. En bas de ce niveau, le volume est
zéro');
%end

for ii=1:numimages
    a(:, :, ii)=viewerdata.images{ii}.*roi;
end

affectedvol(1:numimages)=0;

for ii=1:numimages
    lowerthnorm=lowerth/refth(ii);
    upperthnorm=upperth/refth(ii);
    for jj=1:numvox1
        for kk=1:numvox2
            a(jj, kk, ii)=a(jj, kk, ii)/refth(ii);
            if a(jj, kk, ii)<lowerthnorm
                a(jj, kk, ii)=0;
                tempvol=0;
            elseif a(jj, kk, ii)>=upperthnorm
                tempvol=volvox;
            else
                tempvol=(a(jj, kk, ii)-lowerthnorm)*volvox/(upperthnorm-
lowerthnorm);
            end
            affectedvol(ii)=affectedvol(ii)+tempvol;
        end
    end
end

save(filename, 'affectedvol', '-ascii')
figure
xtime = linspace(0,acqtime*numimages,numimages); % axe des x en seconde
plot(xtime,affectedvol,'x')
xlabel('time (s)')
ylabel('affeted volume (mm^3)')
title(['Rat #',numrat,' slice ', numslice])

save(fileimages, 'a')
figure
imagesc(a(:, :, 20)); axis square ; axis off
title(['Rat #',numrat , ' slice ', numslice])

```

B) Script MatLab pour le calcul d'histogramme d'intensité d'une image (historoi.m)

```
nivmin = .06; %niveau minimum d'intensité
nivmax = .2; %niveau maximum d'intensité
stepsize = .005 ; %saut de fréquence

numpoints = (nivmax-nivmin)/stepsize;

a(:,:,1)=viewerdata.images{1}.*roi;

for ii=1:numpoints ;
    histo(ii) = length( find( a(:,:,1) < (nivmin+ (ii * stepsize)) &
a(:,:,1)> (nivmin+((ii-1) * stepsize))));
end

xtime = linspace( nivmin, nivmax-stepsize,numpoints); % axe des x
figure
plot(xtime, histo,'x')
```

C) Script MatLab pour le calcul du volume total, incluant plusieurs coupes (slicesum.m)

```
numimages=30;%nombre d'images
acqtime=51.2
a=load('r240s7c.dat');
b=load('r240s8c.dat');
%c=load('r236s8bl.dat');

voltot=a+b;

save('voltotr240c.dat', 'voltot', '-ascii')
figure
xtime = linspace(0,acqtime*numimages,numimages); % axe des x en seconde
plot(xtime,voltot,'x')
xlabel('time (s)')
ylabel('total affected volume (mm^3)')
```

D) Script MatLab pour le calcul des concentrations d'agent de contraste
(signalEnConcentrationpixels_JC.m)

```

Slice = [7 8 9];
NombreImagesDansSerie = 30;
% imageCerveauStable = '020';
FOV1 = 32;
FOV2 = 32;

% Ce que l'on obtient ^ la fin du script est donc toutes
% les images de la sřrie et donc lorsqu'une courbe est
% crře ^ partir d'un ROI elle est en nb d'images (x) par
% concentration d'agent de contraste enmM (y)

TR = 0.1; % en secondes
%T1 = 1.47; % en secondes, valide pour la rřgion vascularisře
alpha = 30; % en degrřs, valide quand les expřriences dynamiques sont
faites avec un flip de 30i
r1 = 3.6; % en (mM.s)^-1, relaxivitř du Gadomer = 8.74 (Gd-DTPA =
3.6);

if strcmp(computer,'MAC')
    token = '/';
elseif strcmp(computer,'PCWIN')
    token = '\';
elseif findstr(computer,'LNX') % name is
actually GLNX86
    token = '/';
else
    token = '/';
end

for kk = 1:1:size(Slice,2)
    SliceNumber = Slice(kk) % Point-virgule ^
ajouter!
    if SliceNumber<10
        SliceToOpen = ['00',num2str(Slice(kk))];
    elseif SliceNumber <100
        SliceToOpen = ['0',num2str(Slice(kk))];
    else
        SliceToOpen = [num2str(Slice(kk))];
    end

    T1Filename = ['MapT1_slice',SliceToOpen];

    pathname = [pwd,token];
% cd ..

    load([T1Filename,'.mat']);
    T1map = imagel;
    clear imagel;

% roiT1Filename = ['roiT1_slice',SliceToOpen];

```

```

% load([roiT1Filename, '.mat']); % va retourner une variable
appelée "roi".
% roiT1 = roi;

% newT1map = T1map.*roiT1; % On a maintenant isolé le cerveau sur la
carte de T1.

newT1map = T1map;

% % Lecture de la ROI de la portion dynamique
% roiHDFilename = ['HD_slice', SliceToOpen];
% load([roiHDFilename, '.mat']);
% roiHD = roi;
% roiHGFilename = ['HG_slice', SliceToOpen];
% load([roiHGFilename, '.mat']);
% roiHG = roi;
cd(pathname)

% ImageToOpen = imageCerveauStable;

% Ouvrir les images de la série

% for ii = 1:1:NombreImagesDansSerie
%
% filename = ['slice', SliceToOpen, 'image', ImageToOpen, 'echo001.fdf'];
%
% [im, header] = varianRead(pathname, filename, ImageToOpen);
% images(:, :, ii) = im;
% end
%

for ii = 1:1:NombreImagesDansSerie
if ii < 10
ImageToOpen = ['00', num2str(ii)];
elseif ii < 100
ImageToOpen = ['0', num2str(ii)];
else
ImageToOpen = num2str(ii);
end

filename =
['slice', SliceToOpen, 'image', ImageToOpen, 'echo001.fdf'];
[im(:, :, ii), header] = varianRead(pathname, filename,
ImageToOpen);
end

im0 = mean(im(:, :, 1:3), 3);
% im0 = im0.*roiT1;

```

```

%   imagesToRegister(:,:,1) = newIm;
%   imagesToRegister(:,:,2) = newTlmap;
%   imagesToRegister(:,:,3) = im0;

%   dim1 = size(newIm,1);
%   dim2 = size(newIm,2);

%   dim1 = size(im0,1);
%   dim2 = size(im0,2);

%   registeredImages = register(imagesToRegister, FOV1, FOV2, dim1,
dim2);
%   clear imagesToRegister

% Maintenant les calculs

%   S0 = registeredImages(:,:,3).*(1-cos(alpha*pi/180).*exp(-
TR./newTlmap))./((1-exp(-TR./newTlmap))*sin(alpha*pi/180));
%   S0 = imagesToRegister(:,:,3).*(1-cos(alpha*pi/180).*exp(-
TR./imagesToRegister(:,:,2)))./((1-exp(-
TR./imagesToRegister(:,:,2))*sin(alpha*pi/180));

for jj = 1:1:NombreImagesDansSerie
    R1(:,:,jj) = 1/TR *log((S0*sin(alpha*pi/180)-
im(:,:,jj)*cos(alpha*pi/180))./(S0*sin(alpha*pi/180)-im(:,:,jj)));
%   C(:,:,jj) = ((R1(:,:,jj) -1./newTlmap)/r1);
%   C(:,:,jj) = ((R1(:,:,jj) -1./imagesToRegister(:,:,2))/r1);

% There will be a number of 'Inf' and 'NaN' due to the
misalignment of the
% brains ( /0 and log of negative value). These need to be
removed.
    aaa = C(:,:,jj);
    [I J K] = find(isnan(aaa));
    if size(I,1) > 0
        for kk = 1:1:size(I,1)
            aaa(I(kk),J(kk)) = 0;
        end
    end
    aaa = abs(aaa);
    clear I J K kk

    [I J K] = find(isinf(aaa));
    if size(I,1) > 0
        for kk = 1:1:size(I,1)
            aaa(I(kk),J(kk))=0;
        end
    end
    aaa = abs(aaa);
    C(:,:,jj) = aaa;

end

```



```

    C = C.*abs(isinf(C)+isnan(C)-1);
    outputFilename = ['ConcentrationSlice',SliceToOpen, '.mat'];
    eval(['save ', outputFilename, ' C;']);
%   clear C Rl newTlmap im

end

% S0 = I0*(1-cos(alpha*pi/180)*exp(-TR/T1))/((1-exp(-
TR/T1))*sin(alpha*pi/180));
% Rlmax = 1/TR *log((S0*sin(alpha*pi/180)-
Imax*cos(alpha*pi/180))/(S0*sin(alpha*pi/180)-Imax));
% Cmax = (Rlmax - 1/T1)/r1;

```

ANNEXE 2

Figures supplémentaires du manuscrit 3

Figure S1
Côté et al., 2012

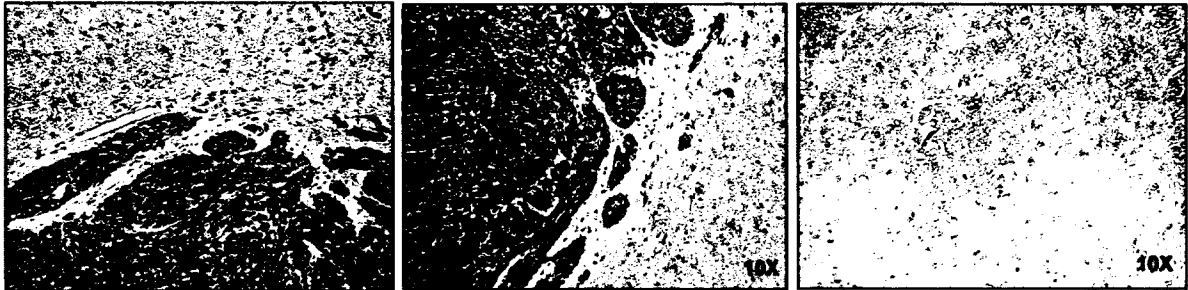


Figure S1 - IL-1 β immunoreactivity in intracranial F98 glioma tissue samples. IHC analysis was performed 10 days after F98 glioma cells were cerebrally implanted in Fischer rats. 3- μ m-thick sections from formalin-fixed, paraffin embedded F98-implanted rat brains were submitted to IHC staining using rabbit anti-rat IL-1 β antibody (1:100; AAR15G AbD Serotec) as described in Materials and Methods. Representative photomicrographs of implanted (left and middle panels) and contralateral (right panel) rat brain hemispheres showing strong immunoreactivity for IL-1 β within the main tumor and satellite nodules. Magnification as indicated.

Figure S2
Côté et al., 2012

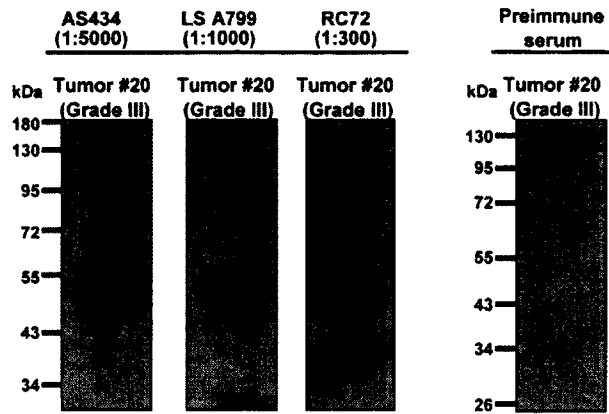


Figure S2 - Specificity of staining with different anti-B1R antibodies assessed by Western blotting. 50 μ g of protein extracts from glioma biopsy specimens (Grade III or IV) were separated by 9% PAGE and transblotted onto PVDF membranes. Comparative immunodetection of human B1R was performed using rabbit polyclonal anti-B1R antibodies AS434 (from W. Müller-Esterl, Germany), RC72 (from R. Couture, Université de Montréal) or LS-A799 (LifeSpan, BioSciences); final dilutions indicated in parenthesis. All three antibodies detected a major immunoreactive band around 45 kDa. No immunoreactivity was found when membranes were exposed to preimmune serum (right panel). Representative autoradiograms of two independent experiments.

Figure S3
Côté et al., 2012

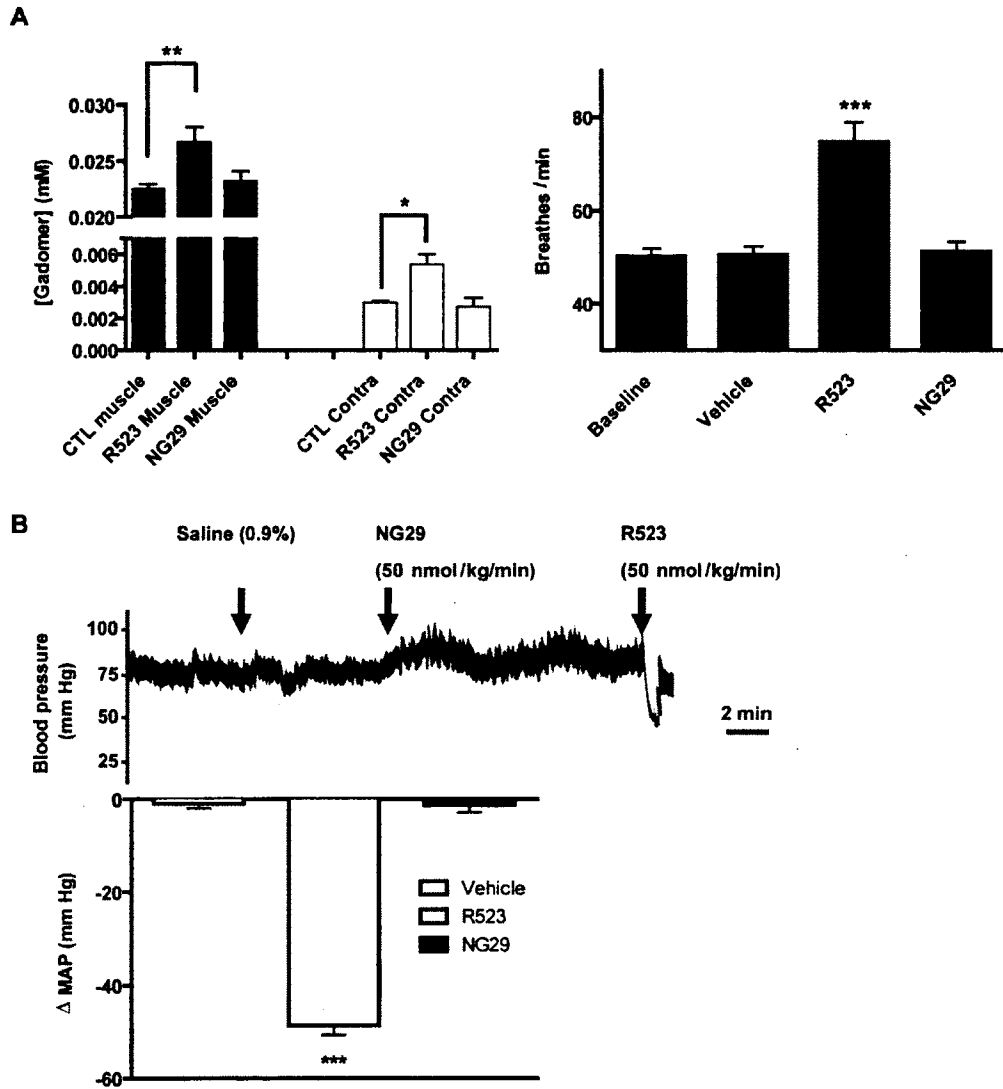


Figure S3 - Collateral consequences of the modulation of BTB permeability with kinin B1R and B2R agonists. In vivo experiments were conducted under the same experimental conditions as those described for the MRI imaging protocole. The synthetic kinin B2R agonist R523 ([Phe⁶ ψ (CH₂NH)Arg⁹]-BK) or B1R agonist NG29 (50 nmol/kg/min for 5 min) were i.c. administered in the intracranial F98 glioma-implanted rats. **(A)** Histogrammic representation of Gadomer uptake (mM) in the contralateral hemispheres and jaw muscles. **(B)** Histogrammic representation of respiratory rate (breaths/min). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus CTL or vehicle groups. Value represents the mean \pm S.E.M obtained with 6 animals. **(C)** Polygraphic (upper) and histogrammic (bottom) representation of systemic arterial blood pressure (mmHg). *** $p < 0.001$ versus vehicle groups. Value represents the mean \pm S.E.M obtained with 9 animals. Note the appearance of severe undesired effects (non-specific permeability induction and disturbance of respiratory function (**A**; left and right panels), and hypotension (**B**) only with use of R523 at equimolar doses of agonists.

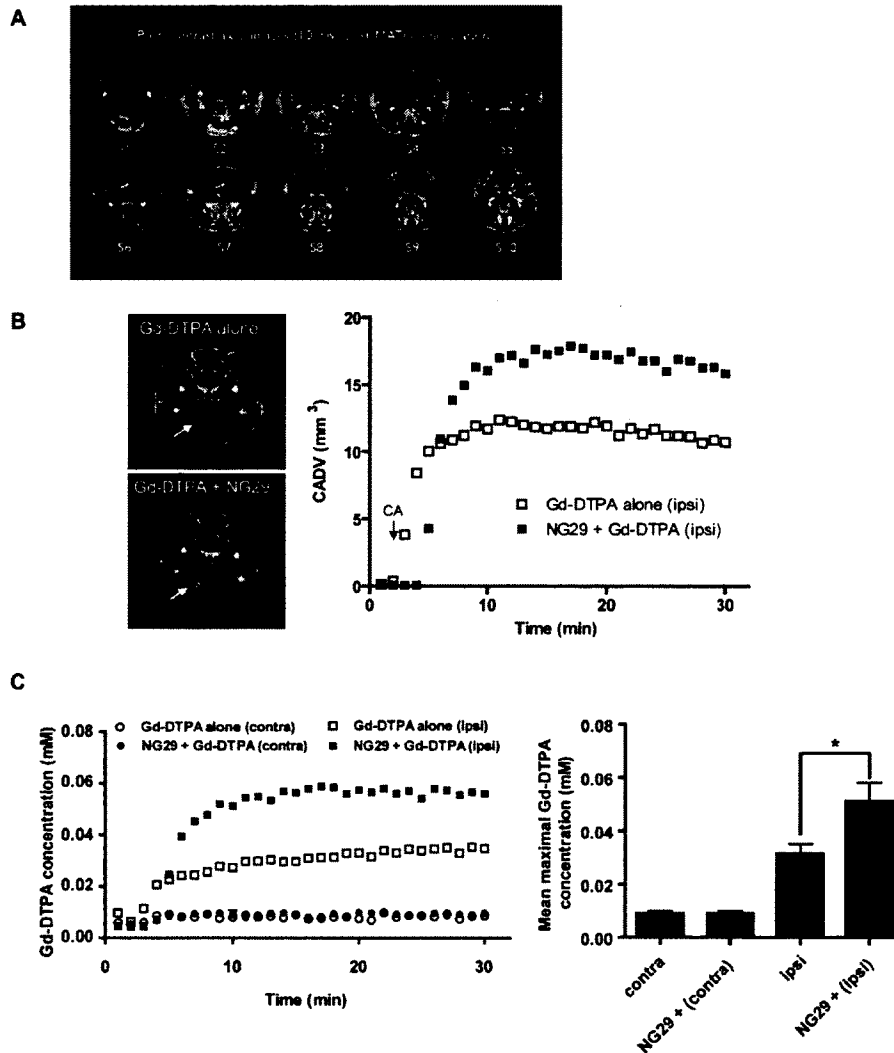


Figure S4 - NG29-mediated local BTB disruption in a syngeneic rat model of intracerebral metastatic breast cancer. Fisher 344 rats were implanted intracranially with MatBIII rat breast cancer cells (1×10^4 cells/ 5 μ l) as described in Ref. [57]. This rat mammary carcinoma cell line expressed transcripts and proteins of B1R as determined by RT-PCR and WB analyses (data not shown). **(A)** MRI-contrast based detection of the metastatic tumor in a rat brain at day 10 post-inoculation. The presence of the tumor is shown on T1-weighted images of sections 6 and 7 (white arrows). **(B)** Representative axial Magnevist (Gd-DTPA)-enhanced T1-weighted MR images depicting the brain of a MatBIII tumor-bearing rat before and after NG29 treatment (10 nmol/kg/min for 5 min i.c.) (left panels). Note the increase in the signal intensity at the tumor (white arrows). CADV in function of time calculated from the corresponding sets of images (right panel). **(C)** Representative time course of Magnevist (Gd-DTPA) uptake in the ipsilateral (tumor-implanted) and the contralateral hemispheres, before and after treatment with ic NG29 (10 nmol/kg/min for 5 min). Histogrammic representation of average maximal Gd-DTPA concentrations (mM) in the ipsilateral (tumor-implanted) and the contralateral hemispheres following i.c. saline vehicle or NG29 treatment (10 nmol/kg/min for 5 min). * $p < 0.05$ compared to vehicle-treated ipsilateral groups. Value represents the mean \pm S.E.M. obtained with 3 animals.

Figure S5

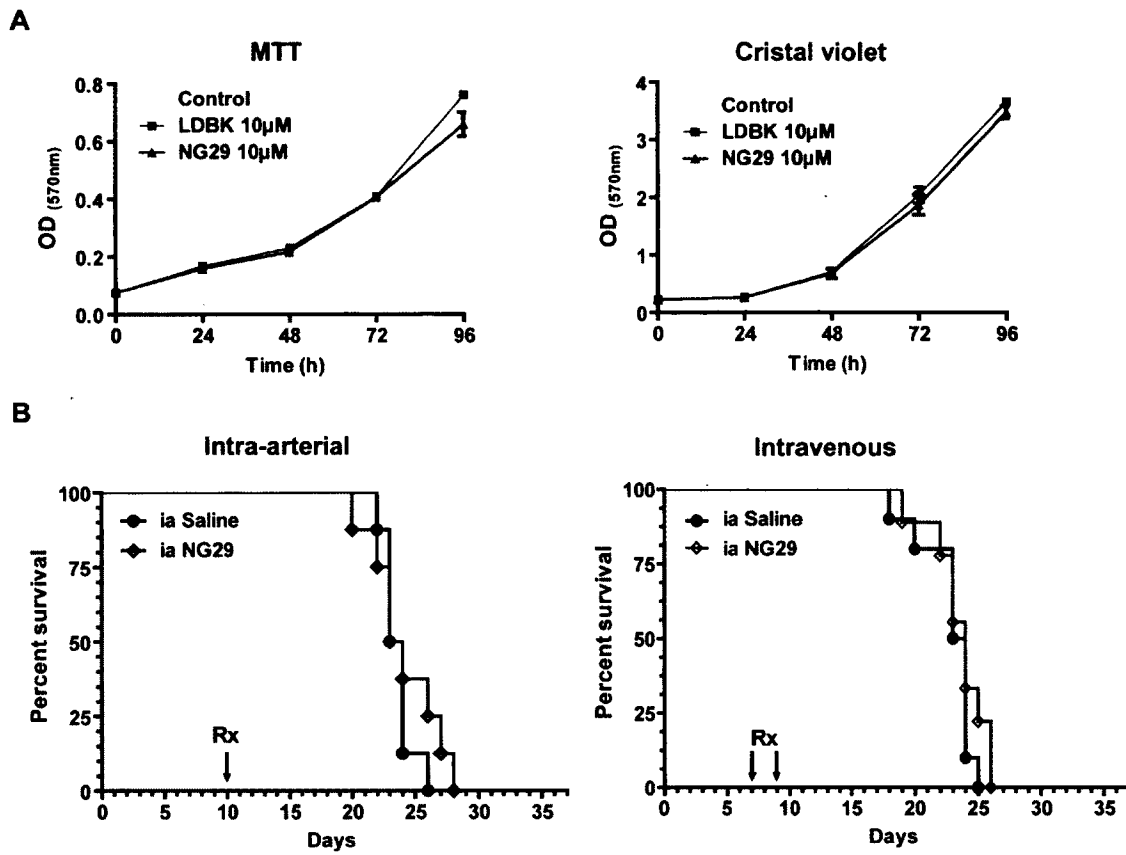


Figure S5 - NG29 does not modulate proliferation/growth rate of F98 glioma cells both in vitro and in vivo. (A) Cell proliferation assay on F98 cells was determined with colorimetric MTT and Cristal violet assays, as described in Ref. [74]. Cells were seeded in a 96 wells plate at 2,000 cells/well in DMEM media supplemented with 10% FBS for 24 h at 37°C. Cells were then incubated with and without LDBK or NG29 (10 μ M) for the indicated times. Data are means \pm s.e.m. of 5 to 8 experiments. (B) Kaplan-Meier survival curves for F98-glioma-bearing rats after systemic treatment with NG29. NG29 (250 nmol/kg i.c.; 5 μ mol/kg i.v.) or saline 0.9% was infused over a period of 2 min (250 μ l/min) via either the right external carotid or the tail caudal vein. Arrows indicate time of treatment. Note that there are two cycles of treatment for intravenous NG29 on days 7 and 9 after implantation. Survival times, used as an indirect measure of tumor growth, were calculated using the Kaplan-Meier estimation by using the log-rank method in the GraphPad Prism 5.0 software. The median survival times of the vehicle- and NG29-treated groups were similar following intra-arterial (23.5 (n = 8) versus 23.5 days (n = 10)) or intravenous agonist administration (23.5 (n = 8) versus 24.0 days (n = 10)).

ANNEXE 3

Liste des publications de l'auteur

Côté J, Savard M, Neugebauer W, Fortin D, Lepage M, Gobeil F jr. (2013) Dual kinin B1 and B2 receptor activation provides enhanced blood-brain barrier permeability and drug delivery to brain tumors. *Soumis à Cancer Biology and Therapy*.

Côté J, Savard M, Bovenzi V, Tremblay L, Lepage M, Fortin D, Gobeil F jr. (2012) Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model. *PLOS One*. 2012;7(5):e37485. Epub 2012 May 21.

Côté J, Savard M, Bovenzi V, Dubuc C, Tremblay L, Tsanaclis AM, Fortin D, Lepage M, Gobeil F jr. (2010) Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe(8)psi(CH(2)NH)Arg(9)]-BK in a F98 glioma rat model: An MRI study. *Neuropeptides* **44**: 177-185.

Côté J, Savard M, Bovenzi V, Bélanger S, Morin J, Neugebauer W, Larouche A, Gobeil F jr. (2009) Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profiles. *Peptides* **30(4)**: 788-95

Bélanger S, Bovenzi V, **Côté J**, Neugebauer W, Amblard M, Martinez J, Lammek B, Savard M, Gobeil F jr. (2009) Structure-activity relationship of novel agonists for the human bradykinin B2 receptor. *Peptides* **30(4)**: 777-87

Soblewski D, Neugebauer W, **Côté J**, Bélanger S, Gobeil F Jr, Lammek B, Prah A (2008) Analogues of bradykinin B2 receptor antagonist. *Proceeding of the 30th European peptide Symposium*. *Peptides 2008*, edit. by H. Lankinen, p. 304-5.

Savard M, Barbaz D, Bélanger S, Muller-Esterl W, Bkaily G, D'Orleans-Juste P, **Côté J**, Bovenzi V, Gobeil F jr, (2008) Expression of endogenous nuclear bradykinin B2 receptors mediating signalling in immediate early gene activation. *J Cell Physiol*. **216(1)**: 234-44.

Côté J, Blais PA, Morin J, Larouche A, Gendron G, Fortier A, Regoli D, Neugebauer WA, Gobeil F jr. (2005) Hypotensive effects of hemopressin and bradykinin in rabbits, rats and mice. A comparative study. *Peptides* **26(8)**: 1317-22.

Liste des communications de l'auteur

Côté J, Bovenzi V, Savard M, Dubuc C, Lepage M, Fortin D, Gobeil F. Induction of selective blood-brain barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model. Kinin 2012. Paris, France. 21-23 juin 2012. Présentation par affiche.

Côté J, Tremblay L, Fortin D, Gobeil F jr, Lepage M (2012) DCE-MRI and ICP-MS evaluation of biodistribution of contrast agents and chemotherapeutic agents to gliomas with a new pharmacological approach in F98 glioma cells implanted Fischer rats. ISMRM. Melbourne, Australie. 5-11 Mai 2012. Présentation orale.

Gobeil F jr, **Côté J**, Savard M, Bovenzi V, Dubuc C, Lepage M, Fortin D (2011). Potential use of synthetic kinin B1 receptor agonists as permeability enhancers for improving drug delivery to malignant brain tumours. 2011 CSPT annual conference. J Popul Ther Clin Pharmacol 18: e342-343.

Savard M, Neugebauer W, **Côté J**, Dubuc C, Bovenzi V, Gobeil F jr., (2011) Pharmacological evaluation of novel fluorescently-labeled analogs of Icatibant. San Diego, Etats-Unis. 22nd American Peptide Symposium.

Côté J (2010) Étude *in vivo* sur l'extravasation d'agents de contraste IRM induite par l'activation des récepteurs B2 des la bradykinine dans le modèle de gliome de rat F98. Bromont, Canada. 25 septembre 2010. Club de recherche clinique du Québec (CRCQ). Présentation orale. **Sélection et lauréat du prix Jacques-Genest.**

Côté J, Tremblay, L, Gobeil F jr., Lepage M, Fortin D (2010) DCE-MRI evaluation of inducible kinin B1 receptor-mediated selective blood-brain barrier permeabilisation in F98 glioma-bearing Fischer rats with a high molecular weight contrast agent. Niagara-on-the-lake, Canada. 14-16 Mai 2010. Présentation orale (Bourse ACI des IRSC).

Côté J, Tremblay, L, Gobeil F jr., Fortin D, Lepage M (2010) DCE-MRI evaluation of inducible kinin B1 receptor-mediated selective blood-brain barrier permeabilisation in F98 glioma-bearing Fischer rats with a high molecular weight contrast agent. ISMRM. Stockholm, Suède. 1-7 Mai 2010. Présentation par affiche.

Côté J, Lepage M, Gobeil F jr., Fortin D (2009) Kinin B1 receptor agonist for selective blood-brain barrier disruption in a F98 glioma rat model: a MRI assessment. Rencontre annuelle de Initiative de Recherche en Oncologie Clinique (IROC). Orford (Qc) Canada. 13 et 14 novembre 2009. Présentation par affiche.

Côté J, Savard M, Lepage M, Fortin D, Gobeil F jr. (2009) Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe8 ψ (CH₂NH)Arg⁹]-BK in a F98 glioma rat model: a MRI study. The 5th international symposium Peptide receptors & Kinin 2009. Québec (Qc) Canada. 26-30 juin 2009. **Prix: Meilleure présentation par affiche.**

Côté J, Savard M, Lepage M, Fortin D, Gobeil F jr. (2009) Dérivés de synthèse de kinines actifs sur les récepteurs B1 comme agents perméabilisant la barrière hémato-encéphalique dans le traitement des gliomes. Journée Phare. Sherbrooke (QC) Canada. 29 Janvier 2009. Prix: Meilleure présentation par affiche.

Côté J (2009) Selective blood tumor barrier disruption induced by a synthetic kinin derivative acting on B1 receptors in a F98 glioma rat model. Montreal Regional Brain Tumour Interest Group (MRBTIG). Montréal (QC) Canada. 23 janvier 2009. Conférencier invité.

Côté J, Savard M, Lepage M, Fortin D, Gobeil F jr. (2008). Dérivés de synthèse de kinines actifs sur les récepteurs B1 comme agents perméabilisant la barrière hémato-encéphalique dans le traitement des gliomes. CRCQ, La Malbaie (QC) Canada, 2-4 Octobre 2008. Présentation par affiche.

Côté J, Lepage M, Gobeil F jr., Fortin D (2008). Real time monitoring of kinin B1 receptor-mediated blood-brain barrier disruption in a F98 glioma rat model using MRI. European Association for neuro-oncology (EANO), Barcelone, Espagne, 12-14 Septembre 2008. Présentation par affiche.

Soblewski D, Neugebauer W, Côté J, Bélanger S, Gobeil F jr., Lammek B, Prahl A (2008). Analogues of bradykinin B2 receptor antagonist. 30th European Peptide Symposium. Helsinki, Finlande, 31 Août-5 Septembre 2008. Présentation par affiche.

Côté J, Lepage M, Gobeil F jr., Fortin D (2008). MRI assessment of kinin B1 receptor-mediated blood-brain barrier disruption in a F98 glioma rat model. Association Canadienne des Neurosciences (CAN-ACN), Montreal (QC) Canada, 26-28 Mai 2008. Présentation par affiche.

Côté J, Lepage M, Gobeil F jr., Fortin D (2008). Les kinines pour perméabiliser de façon selective et sécuritaire la barrière hémato-encéphalique dans le traitement des gliomes. CNS, Sherbrooke, Canada, 11 avril 2008. Présentation orale.

Côté J (2007). Caractérisation de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par des agonistes des récepteurs B1 et B2 des kinines à l'IRM. ANCQ, Mont Tremblant (QC) Canada, 26-27 Octobre 2007. Prix: Meilleure présentation orale.

Côté J, Bélanger S, Morin J, Neugebauer W, Bovenzi V, Savard M, Gobeil F jr. (2007) Novel kinin B1 receptor agonists with improved pharmacological profile. *Kinin 2007*, Berlin, Allemagne, 30 mai au 2 juin 2007. Présentation orale.

Gobeil F jr., Côté J, Bélanger S, Tremblay L, Lepage M, Fortin D (2007) Real-time monitoring of kinin B1 receptor-mediated selective blood brain tumor barrier opening using MRI. *Kinins 2007*, Allemagne, 30 mai au 2 juin 2007. Prix: Meilleure présentation par affiche.

Côté J, Tremblay L, Fortin D, Gobeil F jr., Lepage M (2007) MRI assessment of bradykinin B2 receptor-mediated selective blood-brain barrier disruption in a F98 glioma rat model *ISMRRM 2007*, Berlin, Allemagne, 19 au 25 mai 2007. Présentation par affiche.

Côté J, Lepage M, Tremblay L, Fortin D, Gobeil F jr. (2007) Le récepteur B1 des kinines : une nouvelle cible potentielle dans la thérapie adjuvante des tumeurs cérébrales. Journée scientifique de la FMSS. Université de Sherbrooke. Sherbrooke (QC) Canada. 22 mars 2007. Présentation orale.

Côté J, Fortin D, Tremblay L, Lepage M, Gobeil F jr. (2007) Ouverture sélective de la barrière hémato-encéphalique tumorale à l'aide d'un nouvel agoniste synthétique du récepteur B1 des kinines visualisée avec l'imagerie par résonance magnétique. Journée de la recherche 2007. Université de Sherbrooke. Sherbrooke (QC) Canada. 14 février 2007. **Prix: Meilleure présentation orale.**

Côté J, Bélanger S, Neugebauer W, Bovenzi V, Gobeil F jr. (2006) Nouveaux agonistes des récepteurs B1 des kinines avec profil pharmacologique amélioré. 48e réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec (CRCQ), Lac-à-l'eau-claire (QC) Canada. 21 au 23 septembre 2006. Présentation par affiche.

Neugebauer WA, Côté J, Fortier A, Bkaily G, Avedanian L, Jacques D, Gobeil F jr. (2005) Steroid-Peptide Conjugates. 19th American Peptide Symposium, San Diego, CA, USA. 18 au 23 juin 2005. Présentation par affiche.

Côté J, Fortier A, Morin J, Neugebauer W, Barbaz D, Bélanger S, Gobeil F jr. (2005) Novel kinin B1 receptor agonists exerting vasomotor activities on human vessels. 13th Annual Meeting of North East Smooth Muscle Society (NESMS), Sherbrooke (QC) Canada. 28-29 octobre 2005. Présentation par affiche.