



# THESE

**En vue de l'obtention du**

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE**

**Délivré par l'Université Paul Sabatier**

**Discipline ou spécialité : Physiopathologie en Réanimation**

Présentée et soutenue par **Hélène CHARBONNEAU**

**Le lundi 24 octobre 2016**

## **Rôle du récepteur B2 de la Bradykinine dans un modèle murin de choc hémorragique contrôlé**

**Ecole doctorale : Biologie, Santé, Biotechnologie**

**Unité de recherche : Inserm UMR-1048 équipe 12 et EA 4564**

**Directeurs de Thèse : Mr Ivan Tack (PU-PH) et Mr Vincent Minville (PU-PH)**

### **Rapporteurs :**

Mme Catherine Paugam-Burtz (PU-PH, Paris)

Mr Jacques Duranteau (PU-PH, Paris)

### **Membre(s) du jury :**

Mr François Alhenc-Gélas (DR, Paris)-Examinateur

Mr Jacques Duranteau (PU-PH, Paris)-Rapporteur

Mme Catherine Paugam-Burtz (PU-PH, Paris)-Rapporteur

Mr Jean-Pierre Girolami (DR, Toulouse)-Examinateur

Mr Vincent Minville (PU-PH, Toulouse)-Co-directeur

Mr Ivan Tack (PU-PH, Toulouse)-Directeur

## **Remerciements**

*Je remercie les membres du jury, les Professeurs Catherine Paugam-Burtz et Jacques Duranteau, et les Docteurs François Alhenc-Gelas, et Jean Pierre Girolami d'avoir accepté d'améliorer et de juger mon travail.*

*Je remercie avec beaucoup de reconnaissance mes directeurs de thèse, les Professeurs Ivan Tack et Vincent Minville. Je tiens à apporter tout particulièrement mes remerciements au Professeur Ivan Tack pour son soutien sincère et la confiance qu'il m'a apportée tout au long de cette thèse. Merci au professeur Vincent Minville de m'avoir permis de réaliser cette thèse. Je n'oublie pas non plus le Docteur Jean Pierre Girolami, qui m'a encadré durant ma première année, et qui est resté présent jusqu'à la fin. Merci pour ton aide et ta disponibilité dans la rédaction de cette thèse.*

*Ce travail a été encadré au sein de l'équipe 12 de l'I2MC en collaboration avec l'équipe d'accueil MATN. Je tiens à remercier en particulier Jean-Loup Bascands et Joost Peter Schanstra pour leurs aides logistiques et morales durant ces 4 années.*

*Merci infiniment à Marie Buléon et Nicolas Mayeur pour leur soutien et leur travail dans cette thèse. Sans vous, je n'y serai pas arrivée. Merci Marie, pour ta persévérance et ta constance, tu m'as donné le courage d'avancer et de continuer. Tu as su être présente même dans les moments difficiles. Merci Nicolas, sans qui cette thèse n'aurait pas eu lieu. C'est toi qui m'as donné le courage de me lancer dans cette aventure. Tu as été mon soutien infailible sur laquelle je me suis appuyée pour avancer. Merci à vous deux pour votre amitié sincère.*

*Merci aussi à Stanislas Faguer et Benoit Richard pour leur participation dans ce travail de thèse. Vous avez su résister aux harcèlements de messages pour avancer dans nos manip ou relectures. Bravo !*

*Je tiens à remercier Françoise Praddaude, Marie Pierre Groussous, Nelly Blaes pour leur présence durant mon M2R et leur soutien. Merci aussi à Acil Jaafar et Audrey Casemayo pour leur aide technique durant mon M2R et ma thèse.*

*Je tiens aussi à remercier chaleureusement toute l'équipe de CCV de Ranguel pour leur soutien moral dans l'avancement de cette thèse. Vous avez cru en moi jusqu'au bout, Merci !*

*Merci à tous les médecins du département d'Anesthésie Réanimation cardiovasculaire de la Clinique Pasteur pour leur accueil chaleureux. Je suis très fière d'avoir rejoint votre équipe.*

*Enfin, merci à tous ceux qui m'entourent et partagent ma vie,*

*A toute ma famille pour leur présence et leur amour. A ma mère, pour son soutien maternel et à mon père, le Pr Gérard Charbonneau, ancien vice-président de l'Université Paris XI, qui aurait été fier de moi.*

*A mon mari, Vincent, sans qui ma vie n'a pas de sens. Tu me pousses chaque jour à donner le meilleur de moi-même. Merci pour ton soutien moral mais aussi logistique (avec les enfants !) pendant cette thèse.*

*A mes 3 princesses, Mathilde, Clémence, et Camille qui sont le soleil de ma vie.*

# Table des matières

<b>Table des matières .....</b>	<b>3</b>
<b>Table des figures et des tableaux .....</b>	<b>6</b>
<b>Abréviations utilisées.....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>PARTIE I : RÔLE DU SYSTEME KININE-KALLICREINE EN ANESTHESIE- RÉANIMATION.....</b>	<b>13</b>
<b>I.1 Le système kinine-kallicréine .....</b>	<b>14</b>
I.1.1 L'histoire du système kinine-kallicréine.....	14
I.1.2 Les composants du système kinine-kallicréine .....	15
I.1.1.1 Kininogènes .....	15
I.1.1.2 Kallicréines .....	16
I.1.1.3 Kinines et kininases.....	18
I.1.1.4 Les récepteurs de la Bradykinine : RB1 et RB2.....	19
I.1.1.4.a Localisation et régulation du RB2 et RB1.....	20
I.1.1.4.b Voies de signalisation et effets .....	21
<b>I.2 Système kinine-kallicréine et système rénine-angiotensine .....</b>	<b>24</b>
I.2.1 Interaction entre deux systèmes .....	24
I.2.2 Rôle des inhibiteurs du SRA dans l'activation du SKK .....	25
<b>I.3 Invalidation génétique ou blocage pharmacologique du RB2 .....</b>	<b>27</b>
I.3.1 Invalidation génétique du RB2 .....	27
I.3.2 L'inhibition pharmacologique du RB2 .....	28
I.3.3 L'icatibant ou HOE-140.....	29
<b>I.4 Rôle du RB2 dans les maladies rénales.....</b>	<b>31</b>
<b>I.5 Système kinine-kallicréine et état de choc.....</b>	<b>33</b>
I.5.1 SKK et inflammation .....	33
I.5.2 SKK et choc septique.....	34
I.5.3 SKK et choc hémorragique.....	35
<b>I.6 Système kinine-kallicréine et anesthésie.....</b>	<b>37</b>
I.6.1 La pression artérielle est-elle régulée par le SKK lors d'une anesthésie générale? .....	37
I.6.2 Contribution personnelle : impact rénal du blocage du RB2 chez la souris anesthésiée.....	38
I.6.2.1 Description du schéma expérimental .....	38
I.6.2.2 Résultats et conclusion.....	39
<b>I.7 Conclusion.....</b>	<b>41</b>
<b>PARTIE II : RB2 ET AGRESSION RENALE AIGUE AU COURS D'UN CHOC HÉMORRAGIQUE CONTRÔLÉ.....</b>	<b>44</b>
<b>II.1 Le choc hémorragique.....</b>	<b>46</b>
II.1.1 Physiopathologie du choc hémorragique.....	46
II.1.1.1 Réponse neuro-hormonale.....	46
II.1.1.2 Réponse hémodynamique.....	47
II.1.1.2.a Phase sympatho-excitatrice .....	47
II.1.1.2.b Phase sympatho-inhibitrice .....	48
II.1.1.2.c Vers l'état de choc incontrôlé .....	48
II.1.1.3 L'anesthésie modifie la réponse hémodynamique au choc.....	49
II.1.2 Conséquences de l'état de choc hémorragique .....	50
II.1.2.1 Impact sur la microcirculation, la coagulation, l'inflammation et l'immunité.....	50
II.1.2.2 Rôle du territoire hépato-splanchnique.....	51
II.1.2.3 Impact cardio circulatoire.....	51

II.1.3	Le lactate artériel comme marqueur cellulaire de l'état de choc .....	52
II.1.4	Les différents modèles de choc hémorragique.....	53
II.1.4.1	Modèle à pression contrôlée .....	54
II.1.4.2	Modèle à volume contrôlé.....	54
II.1.4.3	Modèle à saignement incontrôlé.....	54
II.1.5	Utilisation d'un modèle murin de choc hémorragique à pression contrôlée conduisant à une agression rénale aiguë .....	55
	<b>II.2 Contribution personnelle : place du RB2 dans la protection contre l'agression rénale aiguë induite par un choc hémorragique à pression contrôlée.....</b>	<b>56</b>
II.2.1	Introduction.....	56
II.2.2	Description du schéma expérimental .....	56
II.2.3	Choc hémorragique à pression contrôlée.....	57
II.2.4	Paramètres étudiés .....	58
II.2.5	Impact hémodynamique du RB2 au cours du choc hémorragique à pression contrôlée.....	60
II.2.6	Place du RB2 dans l'agression rénale aiguë .....	61
II.2.6.1	Exploration fonctionnelle rénale.....	61
II.2.6.2	Immunohistochimie : marquage au Pimonidazole à J2 .....	63
II.2.6.3	Histologie à J2.....	63
II.2.6.4	Histologie à J21.....	64
II.2.7	RB2 et perméabilité vasculaire .....	65
	<b>II.3 Conclusion .....</b>	<b>66</b>
	<b>PARTIE III : IMPACT DU BLOCAGE DU RB2 SUR LES EFFETS DES IEC : APPLICATION À UN MODÈLE DE CHOC HEMORRAGIQUE CONTROLE.....</b>	<b>68</b>
	<b>III.1 Pharmacologie des IEC .....</b>	<b>70</b>
	<b>III.2 Les IEC dans le traitement des maladies cardiovasculaires .....</b>	<b>71</b>
III.2.1	IEC et HTA .....	71
III.2.2	IEC et insuffisance cardiaque.....	72
III.2.3	IEC et néphropathies .....	73
III.2.4	IEC et diabète .....	74
III.2.5	Conclusion.....	74
	<b>III.3 L'effet paradoxal des IEC .....</b>	<b>75</b>
III.3.1	Effets bénéfiques ou délétères des IEC ? .....	75
III.3.2	IEC et hypotension artérielle.....	76
III.3.2.1	IEC et Anesthésie .....	76
III.3.2.1.a	Anesthésie et hypotension artérielle.....	76
III.3.2.1.b	IEC et hypotension artérielle péri-opératoire.....	77
III.3.2.2	IEC et état de choc hémorragique .....	79
	<b>III.4 Contribution personnelle : Impact du blocage aigu du RB2 sur les effets hypotenseurs des IEC au cours d'un état de choc hémorragique.....</b>	<b>80</b>
III.4.1	Introduction.....	80
III.4.2	Description du schéma expérimental.....	81
III.4.3	Résultats et discussion .....	82
	<u>Manuscrit n°1.....</u>	<u>83</u>
	<u>Manuscrit n°2.....</u>	<u>88</u>
	<b>III.5 IEC et les médiateurs de l'hémodynamique.....</b>	<b>90</b>
III.5.1	Potentialisation de l'activation du RB2 par les IEC .....	90
III.5.2	Contribution personnelle : participation de la voie du NO dans les effets hypotenseurs des IEC au cours d'un état de choc hémorragique contrôlé .....	91
	<b>III.6 IEC et défaillance multi-viscérale.....</b>	<b>93</b>
III.6.1	Choc et défaillance multi-viscérale .....	93
III.6.2	Contribution personnelle : inflammation rénale et blocage aigu du RB2 au cours d'un choc hémorragique à objectif de volume chez des souris traitées par IEC.....	95
III.6.3	Contribution personnelle : Mortalité et impact organique du blocage aigu du RB2 au cours d'un choc hémorragique à objectif de volume chez des souris traitées au long cours par IEC.....	97

III.6.3.1	Introduction .....	97
III.6.3.2	Matériel et méthodes .....	98
III.6.3.2.a	Schéma expérimental .....	98
III.6.3.2.b	Paramètres étudiés .....	99
III.6.3.2.c	Analyses statistiques.....	99
III.6.3.3	RB2 et mortalité au cours du choc hémorragique.....	99
III.6.3.4	Impact organique du blocage du RB2.....	100
III.6.3.5	Conclusion .....	103
<b>PARTIE IV : CONCLUSION .....</b>		<b>104</b>
<b>PARTIE V : PERSPECTIVES .....</b>		<b>106</b>
V.1	Rôle du SKK au cours d'un choc hémorragique.....	106
V.2	Peut-on limiter les hypotensions artérielles par le blocage aigu du SKK en anesthésie réanimation? .....	108
Manuscrit n°3.....		109
<b>PARTIE VI : ANNEXES.....</b>		<b>114</b>
<b>REFERENCES.....</b>		<b>140</b>

## Table des figures et des tableaux

Figure 1 : Sites d'action des kallibréines tissulaire et plasmatique au niveau des kininogènes de haut et bas poids moléculaire. ....	16
Figure 2 : Système kinine-kallicréine. ....	17
Figure 3 : Représentation schématique de la séquence peptidique des récepteurs B1 et B2....	19
Figure 4 : Voie de signalisation des kinines. ....	23
Figure 5 : Interaction entre les systèmes rénine-angiotensine (SRA) et kallibréine-kinine (SKK). ....	25
Figure 6 : Possibilités d'activation du RB2 durant un traitement par un IEC ou un ARAII. ...	26
Figure 7 : Comparaison des structures protéolytiques de la bradykinine et de l'icatibant. ....	30
Figure 8 : Résultats des explorations fonctionnelles rénales à J2 d'une anesthésie. ....	40
Figure 9 : Immunohistochimie (marquage au Pimonidazole) de la jonction cortico-médullaire jusqu'au cortex. ....	41
Figure 10 : Protocole expérimental. ....	58
Figure 11 : Impact de l'invalidation génétique ou du blocage pharmacologique du RB2 au cours du choc hémorragique. ....	61
Figure 12 : Résultats des explorations fonctionnelles rénales (EFR). ....	62
Figure 13 : Immunohistochimie (marquage au Pimonidazole) de la jonction cortico-médullaire jusqu'au cortex. ....	63
Figure 14 : Histologie de la jonction cortico-médullaire à J2 après coloration par HE. ....	64
Figure 15 : Histologie de la jonction cortico-médullaire à J21 après coloration par le rouge Sirius. ....	65
Figure 16 : Variation de la perméabilité vasculaire rénale à J2 du choc hémorragique. ....	66
Figure 17 : Dosage de la production de nitrates et nitrites par méthode colorimétrique. ....	92
Figure 18 : Rôle de l'endothélium dans la migration leucocytaire : diapédèse. ....	94
Figure 19 : Quantification d'ARNm par qRT-PCR : cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL6), chémokines (CCL7, CCL2), et protéines d'adhésion (V-CAM, I-CAM).....	96
Figure 20 : Courbe de survie après un choc hémorragique « sévère ».....	100
Figure 21 : Pressions artérielles moyennes pendant le choc hémorragique à objectif de volume d'intensité modérée. ....	101
Figure 22 : Dosage de la cystatine C plasmatique et des ALAT après un choc hémorragique à objectif de volume d'intensité modérée.....	101
Figure 23 : Quantification d'ARNm par qRT-PCR de KIM1 ( <i>Kidney Inducible Molecule1</i> ) dans le rein, HGF ( <i>Hepatocyte Growth Factor</i> ) dans le foie, et ZO1 ( <i>Zonula Occludens 1</i> ) au niveau de l'iléon. ....	102
Tableau 1 : Résumé des propriétés des récepteurs B1 et B2 des kinines. ....	21
Tableau 2 : Résumé des principaux effets physiopathologiques du RB2 et des conséquences thérapeutiques de l'utilisation de son agoniste ou de son antagoniste. ....	43

## **Abréviations utilisées**

AMPC	Adénosine Mono-Phosphate cyclique
Ang I	Angiotensine 1
Ang II	Angiotensine 2
ALAT	Alanine aminotransférase
APP	Aminopectidase
ARA2	Antagonistes des Récepteurs AT1 de l'Angiotensine II
AT1	Récepteur de type I de l'Angiotensine II
AT2	Récepteur de type II de l'Angiotensine II
BK	Bradykinine
CCL	Chémokines
CIVD	Coagulation IntraVasculaire Disséminée
CML	Cellules Musculaires Lisses
CPN	carboxypeptidase N
CPM	carboxypeptidase M
DAG	Diacylglycérol
DFG	Debit de Filtration Glomérulaire
ECA	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
ECA 2	Enzyme de Conversion 2 de l'Angiotensine
EDHF	Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor
eNOS	NO-Synthase endothéliale
EO <sub>2</sub>	Extraction en Oxygène
GMPc	Guanosine Mono-Phosphate cyclique
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'Hydrogène
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HRE	Hypoxia Response Element
HTA	Hypertension artérielle
I-CAM	InterCellular Adhesion Molecule
IEC	Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion
IL	Interleukine

IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IRA	Insuffisance Rénale Aiguë
IVP	Inhibiteurs des vasopeptidases
KBPM	Kininogène de Bas Poids Moléculaire
KHPM	Kininogène de Haut Poids Moléculaire
KIM 1	Kidney Inducible Molecule 1
KOB2	Souris invalidées pour le récepteur B2 de la Bradykinine
L-NAME	N(G)-nitro-L-Arginine Methyl Ester, inhibiteur de la NOS
LPS	Lipopolysaccharide
LysBK	Lysbradykinine
MAP	Mitogen Activated Protein
NFκB	Nuclear Factor κB
NO	Monoxyde d'azote
NTAI	Nécrose Tubulaire Aiguë d'origine Ischémique
PAM	Pression Artérielle Moyenne
PKC	Protéine Kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PGI2	Prostaglandine I2
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
RB1	Récepteur B1 de la Bradykinine
RB2	Récepteur B2 de la Bradykinine
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
SKK	Système Kinine-Kallicréine
SRA	Système Rénine-Angiotensine
TaO2	Transport Artériel en Oxygène
TNF	Tumor Necrosis Factor
V-CAM	Vascular Cellular Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VO <sub>2</sub>	Consommation en Oxygène



## **INTRODUCTION**

**Le système kinine-kallicréine** est composé de peptides vasoactifs, les kinines, dont le plus connu est le nonapeptide bradykinine, qui agit via l'activation de deux récepteurs couplés aux protéines G : le RB2 (constitutif) et le RB1 (inductible). Elle est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques dont notamment la régulation de la pression artérielle, l'inflammation, la coagulation, et la nociception. Comme de nombreux facteurs paracrines, la bradykinine participe à la régulation de la pression artérielle, non pas en condition physiologique, mais en situation de stress métabolique, immunologique ou vasculaire. Par ses interactions avec le système rénine-angiotensine, elle contribue aux effets anti-hypertenseurs des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC). Cet effet hypotenseur résulte principalement de l'activation du RB2, même si l'induction du RB1 a aussi été observée.

Malgré une littérature abondante sur le système kinine-kallicréine, son implication en anesthésie-réanimation reste encore mal connue. Hors, il semble très probable que ce système soit impliqué dans la régulation de la pression artérielle en situation d'agression aiguë comme l'anesthésie ou lors d'un état de choc, en particulier hémorragique. En effet, d'un point de vue physiopathologique, la perte de sang conduit progressivement à une hypotension artérielle, à une diminution de la perfusion tissulaire, et à une hypoxie cellulaire qui est aussi responsable d'une activation de l'inflammation, de la coagulation et de l'immunité. Ces différents

éléments suggèrent donc fortement l'implication du système kinine-kallicréine (notamment du RB2) au cours du choc hémorragique.

**L'objectif** principal de ce travail était d'étudier le rôle du RB2 dans l'hypotension artérielle et les dysfonctions d'organe induites par un choc hémorragique. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles murins de choc hémorragique contrôlé: i) un modèle à pression contrôlée via un prélèvement de sang responsable d'une hypotension artérielle cible, afin d'évaluer l'impact hémodynamique, ii) un modèle à objectif de volume dans lequel un prélèvement de sang d'un volume constant a été réalisé pour évaluer le retentissement sur la défaillance d'organe.

Nous avons d'abord étudié l'impact du blocage du RB2 sur la sévérité de l'agression rénale aiguë induite par une anesthésie et un choc hémorragique à pression contrôlée. Pour cela, nous avons étudiées les conséquences de l'inactivation génique (souris KOB2 n'exprimant plus le RB2) ou du blocage pharmacologique du RB2 (antagoniste B2 (HOE-140)) sur la fonction rénale et les variations de la perméabilité vasculaire rénale. Dans un autre travail, nous avons étudié l'intérêt potentiel du blocage aigu du RB2 au cours d'un choc hémorragique lors d'une exposition préalable à un IEC. En effet, les IEC peuvent être à l'origine d'une aggravation des hypotensions artérielles au cours d'une anesthésie et *a fortiori* d'un choc hémorragique. Ces hypotensions artérielles sévères sont à l'origine d'une augmentation du nombre d'insuffisances rénales aiguës et de la mortalité périopératoire. En cas d'exposition préalable à un IEC, le blocage aigu du RB2 pourrait ainsi prévenir l'apparition d'hypotensions artérielles sévères au cours d'une anesthésie ou en cas d'état de choc. Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons évalué l'impact du blocage pharmacologique du RB2 sur la défaillance multi-organique et la mortalité dans un modèle de choc hémorragique à pression ou à volume contrôlé chez des souris préalablement traitées par un IEC.

Ce travail de thèse met en évidence l'implication du RB2 au cours d'un choc hémorragique, en particulier lorsque les effets de la bradykinine sont potentialisés par l'exposition à un IEC. Cela soulève de manière plus générale, la question du rôle de la bradykinine dans les effets hémodynamiques observés au cours du choc.

Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe 12 de l'I2MC (UMR1048, Toulouse) et en collaboration avec l'équipe d'accueil 4564 (faculté de médecine de l'Université Paul Sabatier). Il a permis la rédaction d'un article publié dans un journal international à comité de lecture, d'une correspondance en cours de soumission, et de deux communications orales au congrès de la société française d'anesthésie-réanimation (SFAR) et au congrès de physiologie et de biologie intégrative (CPBI). Il a également fait l'objet d'un dépôt de brevet en avril 2014.

Cette thèse est construite autour de ces travaux. La première partie s'attache à décrire le système kinine-kallicréine, et ses interactions avec le système rénine-angiotensine. Nous abordons aussi l'implication probable du système kinine-kallicréine lors d'un état de choc ou d'une anesthésie. La deuxième partie est consacrée au choc hémorragique, à la description physiopathologique de ce choc et aux différents modèles expérimentaux proposés dans la littérature. Cette partie sera l'occasion de présenter mon travail de M2R sur la place du RB2 dans l'agression rénale aiguë induite par un choc hémorragique contrôlé. Enfin la troisième partie est consacrée à l'impact du blocage du RB2 sur les effets hypotenseurs des IEC au cours d'un choc hémorragique contrôlé. Nous y détaillons d'abord la place centrale des IEC dans le traitement des maladies cardiovasculaires et rénales, mais aussi leurs effets potentiellement délétères en anesthésie-réanimation. Nous présentons nos travaux sur l'intérêt du blocage aigu du RB2 pour prévenir l'aggravation des hypotensions artérielles induites par les IEC au cours du choc hémorragique et son impact sur la mortalité et la défaillance d'organe. Enfin, nous avons souhaité partager nos premiers résultats concernant l'activation

des voies de signalisation (voie du NO) et de l'inflammation dans les modèles expérimentaux de choc hémorragique que nous avons mis en œuvre tout au long de nos travaux.

En espérant que vous prendrez plaisir à lire ce manuscrit, bonne lecture !

## **PARTIE I : RÔLE DU SYSTÈME KININE-KALLICREINE EN ANESTHÉSIE-RÉANIMATION**

Le système kinine-kallicréine (SKK) est un système peptidique vasoactif ayant une puissante action vasodilatatrice. Il est impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la régulation locale et systémique de la pression artérielle, la volémie, la perméabilité vasculaire, les réponses inflammatoires, la médiation de la douleur et le phénomène de coagulation. Il est composé d'enzymes activatrices, appelées kallicréines, de leurs substrats, les kininogènes et de peptides vasoactifs, appelés kinines agissant sur deux types de récepteurs : le RB1 et le RB2. L'inhibition de ces récepteurs par invalidation génétique ou par blocage pharmacologique a permis de mieux comprendre les actions et implications physiopathologiques complexes de ce système. Par ses interactions avec le système rénine-angiotensine (SRA), le SKK participe notamment aux mécanismes de l'action hypotensive et néphroprotectrice des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (IEC). Par ses implications dans la vasomotricité vasculaire et dans les réponses inflammatoires, le SKK joue un rôle encore mal défini dans le contrôle de la pression artérielle au cours d'une anesthésie et dans le développement des états de choc.

L'objectif de cette première partie est de décrire les composants du SKK, de comprendre ses interactions avec le SRA, et de décrire les implications potentielles de ce système en anesthésie-réanimation.

## I.1 Le système kinine-kallicréine

### I.1.1 L'histoire du système kinine-kallicréine

La première observation du système kinine-kallicréine (SKK) a été faite en 1909 par deux physiologistes toulousains, Abelous & Bardier, qui ont rapporté qu'une injection intraveineuse d'urine humaine entraînait une hypotension artérielle importante chez le chien (1). Sur la base de cette observation, le groupe de E. Werle du *Max Plank Institut* de Munich, en 1930, a mis en évidence des quantités importantes de cette substance hypotensive à partir d'extraits de pancréas, et la désigna sous le nom de « kallicréine » (du grec kallikreas, pancréas) (2). Il a été suggéré initialement que la kallicréine était une hormone synthétisée par le pancréas et éliminée dans l'urine. Cette hypothèse a ensuite été abandonnée avec la découverte des enzymes plasmatiques et tissulaires. En 1950, le groupe brésilien de Rocha e Silva (3) a découvert la bradykinine (BK) en montrant que la trypsine ou le venin du serpent *Bothrops jararaca*, mis en présence de globulines plasmatiques, induisait la libération d'un peptide fortement hypotenseur. Ces chercheurs ont attribué les noms de « bradykinine » à ce peptide, de « bradykininogène » à son précurseur, et de « kininogénases » aux enzymes telles que la kallicréine, la trypsine, et autres enzymes capables de libérer des kinines à partir de ce précurseur. En 1970, aux États-Unis, le groupe d'Erdös a découvert que l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) était à la fois capable de produire de l'angiotensine II vasoconstrictrice et d'inactiver la BK vasodilatatrice (4). Cette découverte ouvrit alors une importante voie de recherche pour l'industrie pharmaceutique dans le domaine de l'hypertension avec le développement des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC). Après plusieurs années de recherches sur la structure de la BK, Vavreck et Stewart de l'École de

Médecine de Denver synthétisaient le premier antagoniste compétitif de la BK (5). En 1980, D. Regoli et J. Barabe (6) proposaient, sur des bases exclusivement pharmacologiques, l'existence de deux récepteurs de la BK. Cette distinction fut confirmée en 1991 et 1994 par le clonage des ADNc de deux types de récepteurs distincts.

La découverte du SKK a fait l'objet de multiples recherches et de publications. A l'heure actuelle, on recense plus de 30 000 références sur le SKK indexées dans pubmed. Le système kinine-kallicréine joue un rôle physiologique important car il est situé à la croisée de plusieurs systèmes peptidiques et voies de signalisation telles que la cascade de la coagulation, les voies de la fibrinolyse, du complément ou le système rénine-angiotensine (SRA) (7). Tantôt bénéfique, tantôt délétère, les nombreuses facettes de ce système sont encore imparfaitement connues et restent à explorer.

## **I.1.2 Les composants du système kinine-kallicréine**

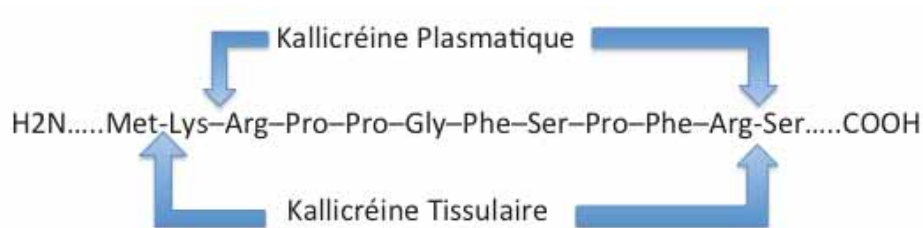
### ***I.1.1.1 Kininogènes***

Les kininogènes sont des glycoprotéines issues de l'épissage alternatif d'un seul gène de 11 exons localisé sur le 3<sup>ème</sup> chromosome chez l'homme. Il en existe deux types : le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM, 110 kDa) et le kininogène de bas poids moléculaire (KBPM, 66 kDa). Le KHPM est une  $\alpha$ -globuline et le KBPM est une  $\beta$ -globuline qui sont clivées respectivement par la kallikréine plasmatique et la kallikréine tissulaire (8). Ils sont synthétisés principalement au niveau du foie mais ont été également mis en évidence dans d'autres organes (rein, coeur, endothélium) et sont présents en quantité importante dans le plasma. Les deux types de kininogènes ont en commun leur chaîne lourde, constituée des domaines 1 à 4, qui leur confère des propriétés antiprotéasiques non spécifiques. Le domaine 4 constitue la partie kininogénique. Les kininogènes diffèrent par leur chaîne légère, de bas

ou de haut poids moléculaire. La chaîne légère de haut poids moléculaire confère ainsi à ce kininogène une propriété de cofacteur de la coagulation (activité procoagulante) alors que celle de bas poids moléculaire n'a pas de fonction connue.

### ***I.1.1.2 Kallicréines***

Les kinines sont libérées lors de l'hydrolyse enzymatique des kininogènes par des sérine-protéases : les kallicréines. Il existe au moins deux types d'enzymes kallicréines : la kallicréine plasmatique et la kallicréine tissulaire. Elles diffèrent par leurs propriétés physico-chimiques et fonctionnelles, leurs substrats et leurs localisations (9). Les deux hydrolysent, avec des affinités différentes, les kininogènes de haut et de bas poids moléculaire (figure 1).



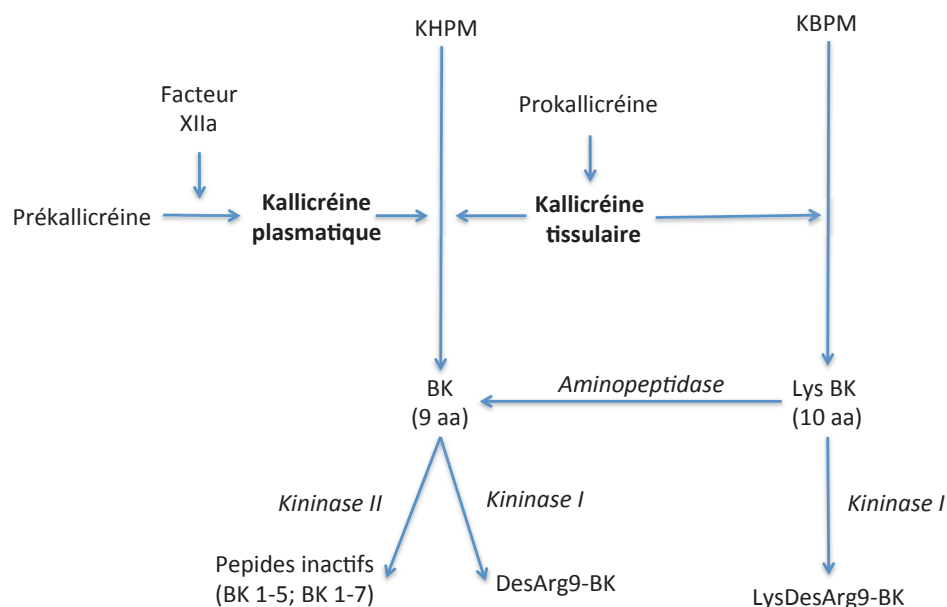
**Figure 1 : Sites d'action des kallicréines tissulaire et plasmatique au niveau des kininogènes de haut et bas poids moléculaire.**

La kallicréine plasmatique (60 kDa) est codée par un seul gène, elle est synthétisée au niveau du foie sous la forme d'un précurseur inactif, la prékallicréine, qui est la forme circulante. Elle est activée par le facteur Hageman (XIIa) ou par des protéases endothéliales en présence de zinc. La kallicréine plasmatique circule dans le sang sous la forme d'un complexe hétérodimérique. L'enzyme hydrolyse le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), au niveau des liaisons Lys-Arg et Arg-Ser, et libère la bradykinine (BK) (6) (figure 2). La kallicréine plasmatique est inhibée par des molécules situées au carrefour des voies de



la coagulation, de l'inflammation et du complément telles que l'antithrombine III, l' $\alpha$ 2-macroglobuline et le C1-inhibiteur (10).

Les kallicréines tissulaires, dont il existe actuellement quinze formes moléculaires différentes de 24 à 48 kDa, sont synthétisées par le pancréas, les reins, l'intestin, le cerveau, les glandes sous-maxillaires et les glandes sudoripares (10). Ces protéines sont codées par plusieurs gènes localisés sur un même chromosome. Chez l'homme, ces gènes sont placés en tandem sur le chromosome 19q13.4. Les kallicréines tissulaires sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, les prokallicréines (ProK) qui, sous l'action de la trypsine ou de la thermolysine, libèrent les kallicréines tissulaires matures. Les kallicréines hydrolysent les liaisons Met-Lys et Arg-Ser du kininogène de bas poids moléculaire (KBPM) pour libérer la LysBK ou kallidine (figure 1) et sont spécifiquement inhibées par une Serpin (serine protease inhibitor) : la kallistatine. Les kallicréines participent également à la dégradation du KHPM.



**Figure 2 : Système kinine-kallicréine.**

KHPM : kallicréine de haut poids moléculaire ; KBPM : kallicréine de bas poids moléculaire ; BK : bradykinine ; LysBK : Lysbradykinine (d'après Griffon C. et al., mt cardio n°1, voll)

### ***I.1.1.3 Kinines et kininases***

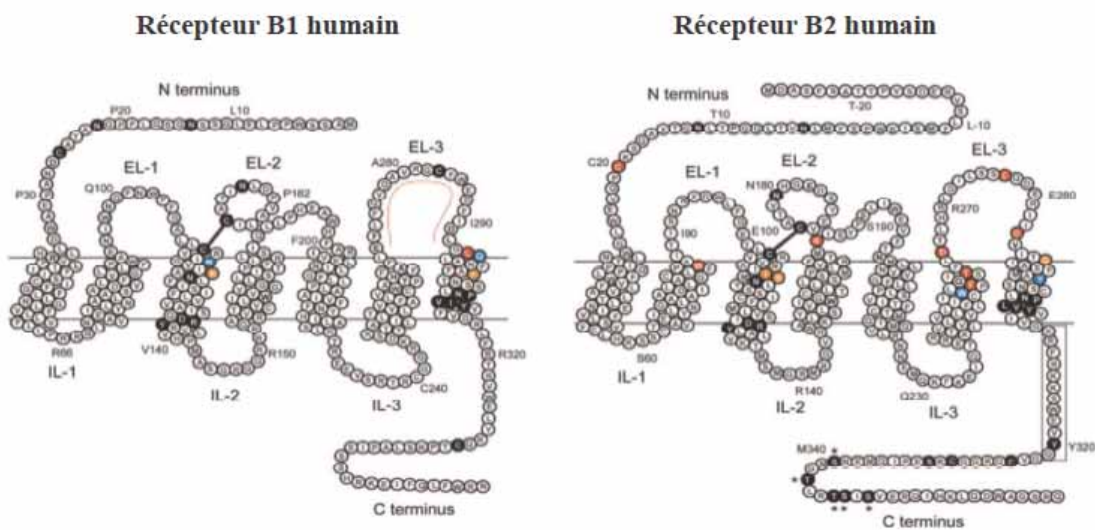
Les kinines sont des agents vasoactifs synthétisés *de novo* et présents dans la microcirculation. Les deux principales kinines sont la bradykinine (BK), et la kallidine (Lys-BK). Les kinines exercent leurs activités pharmacologiques en stimulant des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G : les récepteurs B2 (RB2) et B1 (RB1). La BK et la Lys-BK sont des agonistes endogènes des récepteurs B2 tandis que la des-Arg<sup>9</sup>-BK et la des-Arg<sup>10</sup>-lysBK sont les agonistes préférentiels des récepteurs B1. La spécificité pharmacologique de chacun de ces peptides réside dans leur partie carboxy-terminale.

Le temps de demi-vie des kinines dans le plasma est très court ; celui de la BK n'excède pas quelques secondes. Cette durée de vie courte corrobore l'observation selon laquelle les kinines exercent leurs actions essentiellement sur un mode autocrine/paracrine, en tout cas relativement proche de leur lieu de synthèse. En effet, les concentrations de BK tissulaires sont plus élevées que les concentrations plasmatiques (11). De plus, les différents éléments nécessaires à la synthèse de BK sont présents dans la paroi de certaines artères (12).

Les kinines subissent une dégradation métabolique rapide par des kininases qui aboutit à la production de plusieurs métabolites actifs ou inactifs. *In vivo*, quatre enzymes sont principalement impliquées dans cette dégradation : la kininase I, l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA ou kininase II), l'endopeptidase 24-11 ou endopeptidase neutre et l'aminopeptidase P. Il a été montré que l'ECA est la principale enzyme de dégradation des kinines plasmatiques chez l'homme (13). Ces kininases sont trouvées de façon ubiquitaire notamment dans les cellules endothéliales, les cellules de la bordure en brosse du tubule contourné proximal et du tubule distal rénal, et dans le sang.

### I.1.1.4 Les récepteurs de la Bradykinine : RB1 et RB2

Les kinines agissent sur 2 récepteurs : les récepteurs B1 et B2. La structure de ces 2 récepteurs est caractéristique des récepteurs couplés aux protéines G avec 7 domaines transmembranaires, un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire (figure 3). Ils sont codés par deux gènes différents chez tous les mammifères (14). Chez l'Homme, les gènes de ces deux récepteurs, localisés sur le chromosome 14 sont séparés par seulement 12 kb (8). L'homologie de structure entre les récepteurs B1 et B2 n'est que de 36% chez l'Homme, et de 30% chez la souris.



**Figure 3 : Représentation schématique de la séquence peptidique des récepteurs B1 et B2** (Leeb-Lundberg LM et al. (14))

Initialement, ces deux récepteurs ont été distingués et classés selon leurs propriétés pharmacologiques, en particulier selon leur affinité pour 2 différents ligands : la des-Arg<sup>9</sup> BK et la BK (6).

Le RB1 est activé préférentiellement par la des-Arg<sup>9</sup>-BK et la des-Arg<sup>10</sup>-lysBK, métabolites endogènes de la BK et de la lys-BK respectivement, après action de la kininase I. Il peut également être activé par la BK avec une moindre efficacité.

Le RB2, responsable de la majorité des effets physiologiques décrits de la BK (10), est quand à lui activé exclusivement par la BK et la lys-BK (14).

#### **I.1.1.4.a Localisation et régulation du RB2 et RB1**

Le récepteur B2 est constitutivement exprimé à la surface de nombreux types cellulaires, notamment les cellules endothéliales et musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules mésangiales et épithéliales (10). Au niveau cellulaire, la régulation du RB2 se fait essentiellement par la BK. La stimulation du RB2 induit une internalisation rapide de celui-ci, impliquant la phosphorylation de résidus sérine et thréonine de son extrémité C-terminale. Cependant l'endocytose induite par la BK est rapidement suivie d'un recyclage du RB2 vers la membrane. L'activation du RB2 entraîne donc un cycle endocytose/réexpression membranaire suite à la phosphorylation/déphosphorylation. La stimulation chronique du RB2 semble cependant diminuer son expression membranaire probablement du fait de modifications post-transcriptionnelles (15).

Contrairement au RB2, le RB1 est un récepteur essentiellement inductible. De ce fait, il est peu détectable dans les conditions physiologiques mais fortement exprimé au cours de certaines situations pathologiques (16). Son expression est induite en cas de lésions tissulaires, en présence d'endotoxines bactériennes, et au cours de certaines pathologies comme le diabète. Cette induction se fait au niveau transcriptionnel et implique des cytokines inflammatoires telles que l'interleukine-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  (17), ou encore l'activation des MAP-kinases, la mise en jeu du facteur de transcription nucléaire NF $\kappa$ B et la protéine kinase p38 (18). De façon très particulière, l'expression du RB1 peut être stimulée par son agoniste la

des-Arg<sup>9</sup>-BK ou des-Arg<sup>10</sup>-LysBK (19). Ce mécanisme d'up-régulation homologue pourrait expliquer certains effets B1 lors d'un traitement par des IEC. En effet, en bloquant la dégradation de la BK par l'ECA, les IEC favorisent la production de l'agoniste B1 par la kininase I. A la différence du RB2, le RB1 est associé à une lente dissociation du ligand, il n'est ni désensibilisé, ni internalisé (20). Le tableau 1 résume les propriétés des récepteurs B1 et B2 de la BK.

	<b>RB1</b>	<b>RB2</b>
Famille	RCPG	RCPG
Mode d'expression	Inductible et faiblement exprimé	Constitutif
Localisation	Cellules endothéliales, Cellules mésangiales, fibroblastes, CML	Ubiquitaire
Désensibilisation	Non	Oui
Internalisation	Non	Oui
Agonistes préférentiels	Des-arg9-Bradykinine Des-arg10-Kallidine	Bradykinine Kallidine

**Tableau 1 : Résumé des propriétés des récepteurs B1 et B2 des kinines.**

RCPG : récepteur couplé aux protéines G ; CML : cellules musculaires lisses

#### **I.1.1.4.b Voies de signalisation et effets**

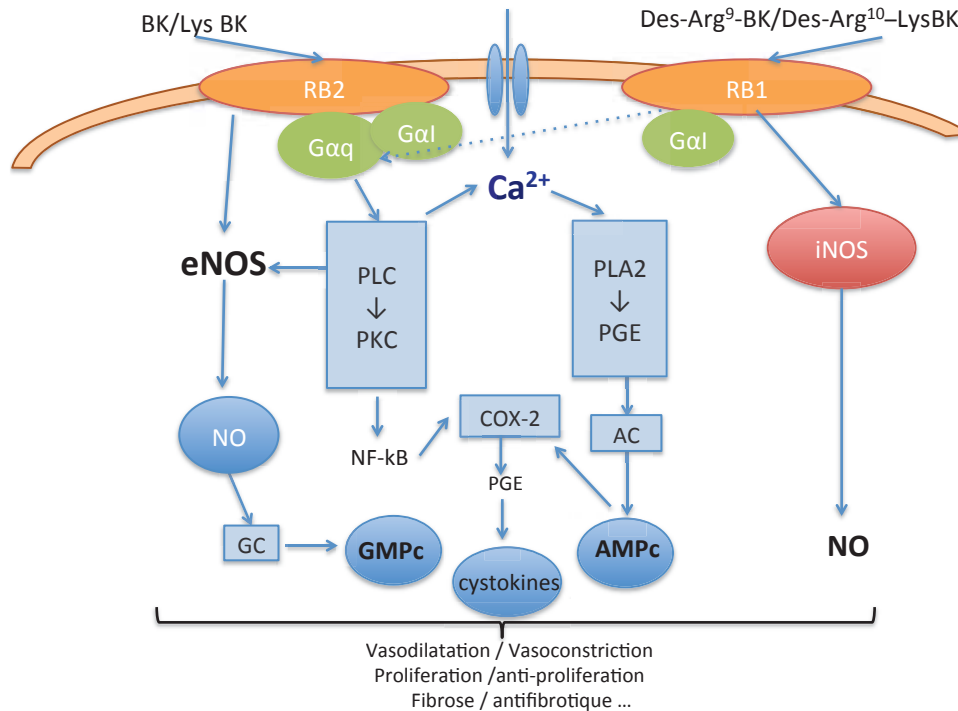
Le large spectre d'action de la BK est en rapport avec le nombre important de voies de signalisation induites par l'activation de ses récepteurs. La transduction des signaux pour les récepteurs des kinines est relayée par des systèmes de seconds messagers différents selon le type cellulaire, et implique l'activation de différentes protéines G. La liaison BK/RB2 est associée principalement à l'activation de la protéine G $\alpha_q$  responsable de l'activation de la cascade de la phospholipase C (PLC). La PLC stimule la formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol impliqués respectivement dans la libération du calcium intracellulaire (Ca<sup>2+</sup>) et dans l'activation de la protéine kinase C (PKC). Le calcium intracellulaire augmente l'activité de la NO synthase endothéliale (eNOS) et donc la

production de NO (21), et active la phospholipase A2 (PLA2) (14). Le NO produit dans la cellule endothéliale diffuse et active la guanylyl-cyclase soluble (GMPc). La synthèse de prostaglandines via l'activation du RB2, passe principalement par la cascade de la PLC qui conduit à la formation de PLA2 (22). La libération de prostaglandines active l'adénylate cyclase menant à la formation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Enfin, l'activation du RB2 peut aussi stimuler l'expression de COX-2 via l'activation de la voie de l'AMPc et NF-kB conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires.

Selon les conditions physiologiques et physiopathologiques, l'activation du récepteur B2 peut induire des effets biologiques opposés. Par exemple, au niveau de la cellule endothéliale, l'effet vasodilatateur induit par l'activation du RB2 provient de la production de NO/GMPc, de prostaglandines, et du facteur endothélial EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) par la PLA2 (23). L'effet systémique vasodilatateur puissant de la BK nécessite donc l'association cellule endothéliale/cellule musculaire lisse (CML) (23,24). Cependant, dans certaines situations associées à un dysfonctionnement ou à l'absence d'endothélium, la BK, en agissant directement sur la CML, devient un puissant vasoconstricteur (25). Un autre exemple des effets paradoxaux du RB2 est celui de l'activation de la voie du NO et du GMPc (assurant la protection de l'endothélium) parallèlement de l'activation de la voie NF-kB et AMPc conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires. Les multiples voies de signalisation activées par le RB2 expliquent ce double rôle, protecteur ou délétère, que l'on observe en fonction des situations cliniques (26).

Concernant le récepteur B1, celui-ci active principalement les protéines Gαq et Gαi qui activent des voies de signalisations similaires au récepteur B2. Cependant les modalités d'activation de ces voies peuvent être différentes. En effet, l'augmentation de calcium induite par l'activation du RB2 provient de la cellule alors que l'augmentation de calcium induit par

le RB1 provient du calcium extracellulaire. D'autre part, la production de NO induite par le RB1 est dépendante de la NO synthase inductible (iNOS) et non de la eNOS (27). Cette activation passe par la protéine G $\alpha$ i.



**Figure 4 : Voie de signalisation des kinines.**

NO : Monoxyde d'azote; eNOS: NO synthase endothéliale; iNOS : NO synthase inductible; PGE : prostaglandine, GC guanylyl cyclase; GMPc :guanylyl-cyclase soluble; AC :adénylyl cyclase; AMPc : adénosine monophosphate cyclique PLA2 :phospholipase A2; PLC :phospholipase C; PKC : protéine kinase C; COX-2 cyclooxygénase 2. Schéma représentant les récepteurs RB1 et le RB2, et les seconds messagers issus de leur activation. Le RB2 active principalement la voie de la PLC, PKC et MAP kinase via l'activation de la protéine G $\alpha$ q, entraînant la libération de calcium intracellulaire et l'activation de la voie de la PLA2 et des PGE. Le RB2 peut aussi activer directement la eNOS qui libère le NO. Le NO et les PGE activent respectivement la GC et l'AC produisant le GMPc et l'AMPc. L'activation de COX-2 peut être induite par l'AMPc et la voie d'NF- $\kappa$ B responsable de la production de la PGE et de cytokines pro-inflammatoires. Le RB1 active aussi les protéines G $\alpha$ q et G $\alpha$ i qui activent les mêmes voies de signalisation que le RB2. Le RB1 induit la production de NO par la iNOS. Les différents effets biologiques induits de l'activation de ces deux récepteurs dépendent du type cellulaire, de leur environnement, et des interactions entre ces différentes voies de signalisation.

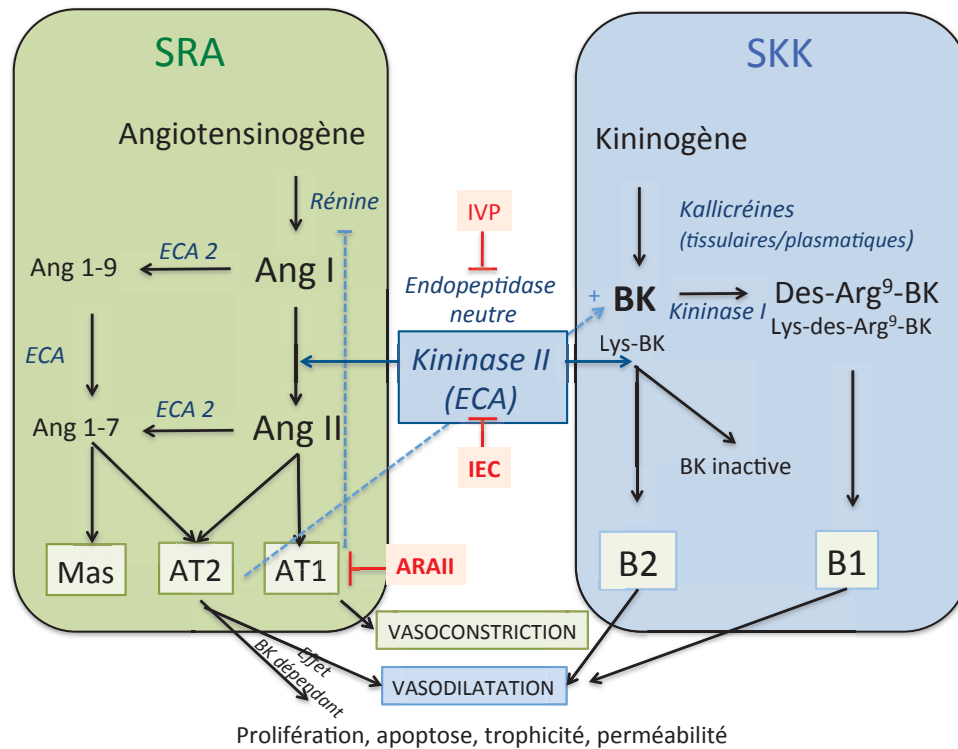
L'action vasodilatatrice des kinines sur les vaisseaux résulte principalement de l'activation endothéliale de cette « voie du NO », mais aussi de l'inhibition de la production d'anion superoxyde, de la libération de catécholamines par le système nerveux sympathique, et de l'inhibition de la libération d'endothéline par l'endothélium (28–30).

## **I.2 Système kinine-kallicréine et système rénine-angiotensine**

### **I.2.1 Interaction entre deux systèmes**

*In vivo*, la BK est rapidement inactivée par deux voies enzymatiques principales impliquant les kininases I et II. Sa demi-vie plasmatique est estimée à moins de 30 secondes. La kininase I, également connue sous le nom de carboxypeptidase N (CPN) dans le plasma ou carboxypeptidase M (CPM) sur la membrane plasmique des cellules vasculaires, génère la des-Arg9-BK. Celle-ci, agoniste préférentiel du récepteur B1, est responsable d'effets biologiques bien distincts de ceux de la BK. La kininase II (ou ECA) est la cible des IEC. Elle est capable d'une part de générer l'Ang II à partir d'Ang I et, d'autre part, de dégrader la BK en fragments BK1-5 et BK1-7 inactifs. L'ECA est une kininase plutôt qu'une angiotensinase. En effet, l'affinité de l'ECA purifiée pour la BK est environ cent fois supérieure à celle pour l'Ang I ; la BK constitue donc un substrat préférentiel pour l'ECA (31,32). Ce double rôle de l'enzyme de conversion, synthèse de l'Ang II et dégradation de la BK, constitue un lien étroit entre ces 2 puissants systèmes vasomoteurs (SRA et SKK). Le SKK est donc couplé négativement au SRA par l'enzyme de conversion qui active le SRA et inhibe le SKK. L'action vasomotrice des 2 systèmes dans un sens opposé en fait des systèmes organisés en contre-régulation, permettant de maintenir un ajustement fin du tonus vasculaire. L'organisation et l'intersection de ces deux systèmes sont représentées sur la figure 5.





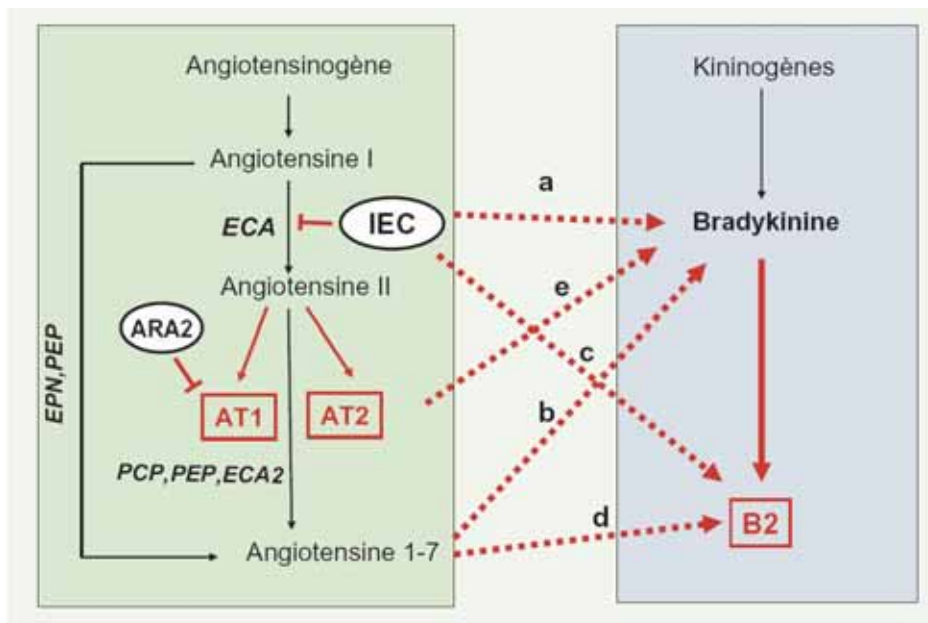
**Figure 5 : Interaction entre les systèmes rénine-angiotensine (SRA) et kallicréine-kinine (SKK).**  
 Ang : angiotensine ; AT1 ou AT2: Récepteur de type I ou II de l'Angiotensine II; ARAII : antagonistes du récepteur AT1 de l'angiotensine II; BK : Bradykinine ; ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine (ou kinase II), IEC : inhibiteurs de l'enzyme de conversion, IVP : inhibiteurs des vaso-peptidases.

## I.2.2 Rôle des inhibiteurs du SRA dans l'activation du SKK

L'inhibition du SRA par l'administration d'inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) ou par des antagonistes du récepteur AT1 de l'Ang II (ARAII) active de façon directe ou indirecte le SKK. En effet, les IEC inhibent la formation d'Ang II et la dégradation de la BK, tandis que les ARAII bloquent l'action de l'Ang II sur le récepteur AT1 laissant persister les effets du récepteur AT2 dont l'activité est partiellement BK dépendante (figure 5).

Les IEC sont aussi impliqués dans l'activation du RB2 par plusieurs mécanismes intriqués et additionnels (figure 6). Le principal d'entre eux est l'inhibition de la dégradation

de la BK, toutefois plusieurs autres mécanismes ont été proposés. Tout d'abord, l'ECA et le RB2 pourraient former un complexe (complexe ECA/RB2), qui augmenterait la sensibilité du RB2 pour la BK (33). Par ailleurs, l'inhibition de l'ECA entraîne l'accumulation d'Ang I dégradée en angiotensine 1-7. Celle-ci, en activant un récepteur spécifique associé à l'oncogène Mas (34), induit des effets hypotenseurs et vasodilatateurs (opposés à ceux de l'Ang II) qui peuvent être inhibés par des antagonistes du RB2 (35,36). L'angiotensine 1-7 peut aussi se comporter comme un inhibiteur de l'ECA (et donc augmenter la biodisponibilité de la BK), mais également agir sur le complexe ECA/RB2 et diminuer la désensibilisation du RB2 (37). Enfin, l'activation du récepteur AT2 par l'Ang II induit aussi des effets vasodilatateurs via une synthèse accrue de BK et une activation du RB2 (38).



**Figure 6 : Possibilités d'activation du RB2 durant un traitement par un IEC ou un ARAII.**

ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine II ; IEC : inhibiteurs de l'enzyme de conversion ; ARAII : antagonistes du récepteur AT1 de l'angiotensine II ; EPN : endopeptidase neutre ; PEP : prolyl endopeptidase. Au cours d'un traitement par les IEC : (a) l'IEC bloque la formation d'angiotensine II et inhibe la dégradation de la bradykinine favorisant ainsi l'activation du RB2, (b) certains IEC pourraient avoir une action directe sur l'activation du RB2 en formant un complexe. En l'absence de formation d'angiotensine II, il y a formation directe d'angiotensine 1-7 qui peut diminuer la dégradation de bradykinine (c), mais aussi stimuler directement le RB2 (d). Au cours d'un traitement par un ARAII, le blocage du récepteur AT1 favorise l'action de l'angiotensine II sur le récepteur AT2, dont l'activation est associée à celle de la kallicréine, ce qui entraîne la formation de bradykinine. Suite à l'accumulation d'angiotensine II (dont la formation n'est pas bloquée, comme c'est le cas en présence d'un IEC), on observe une formation accrue d'angiotensine 1-7 qui renforce la stimulation du RB2 (c et d). (Schéma d'après Marie Buléon, med sci 2007, vol 23 numéro 12)

L'augmentation de la biodisponibilité de la BK induite par les IEC active principalement le RB2 mais des données montrent qu'il existe également une augmentation de l'expression du RB1 au niveau rénal chez le rat et la souris normotendus (39) et au niveau aortique chez le rat hypertendu (40). Cet effet semble cependant transitoire (quelques jours) lors d'un traitement chronique par IEC (40).

### **I.3 Invalidation génétique ou blocage pharmacologique du RB2**

#### **I.3.1 Invalidation génétique du RB2**

Afin de mieux comprendre les effets physiopathologiques d'un gène, il est particulièrement intéressant de bloquer génétiquement sa transcription afin d'observer les conséquences physiologiques et cytologiques d'une telle suppression. C'est pourquoi les souris knock-out pour le RB2, le RB1 ou les 2, ont été largement étudiées.

Les souris déficientes pour le RB2 (KOB2) ont permis d'observer des effets contradictoires. En effet, certains travaux montrent que les souris KOB2 sont hypertendues et tachycardes (41,42), alors que d'autres travaux suggèrent que leur pression artérielle n'est pas modifiée par rapport aux souris sauvages (43). En fait, l'absence de RB2 semble avoir un impact sensible dans certaines conditions pathologiques notamment au niveau rénal. Par exemple, les souris KOB2 présentent une hypersensibilité aux régimes hypersodés (44). Un apport excessif de NaCl ainsi qu'un excès de minéralocorticoïdes provoquent une hypertension plus importante chez les souris KOB2 que chez des souris sauvages (45).

Les modèles de souris KO pour l'un des récepteurs de la BK présentent cependant une limite. En effet, plusieurs travaux ont montré que le récepteur non invalidé (RB1 chez les animaux KOB2 et inversement) était surexprimé (46,47). Cette surexpression pourrait correspondre à une adaptation physiologique destinée à compenser l'absence de l'autre récepteur. Duka et al (46) ont mis en évidence cette surexpression du RB1 chez les souris KOB2, le RB1 compensant alors la perte du RB2 en exerçant à sa place des effets vasodilatateurs.

### **I.3.2 L'inhibition pharmacologique du RB2**

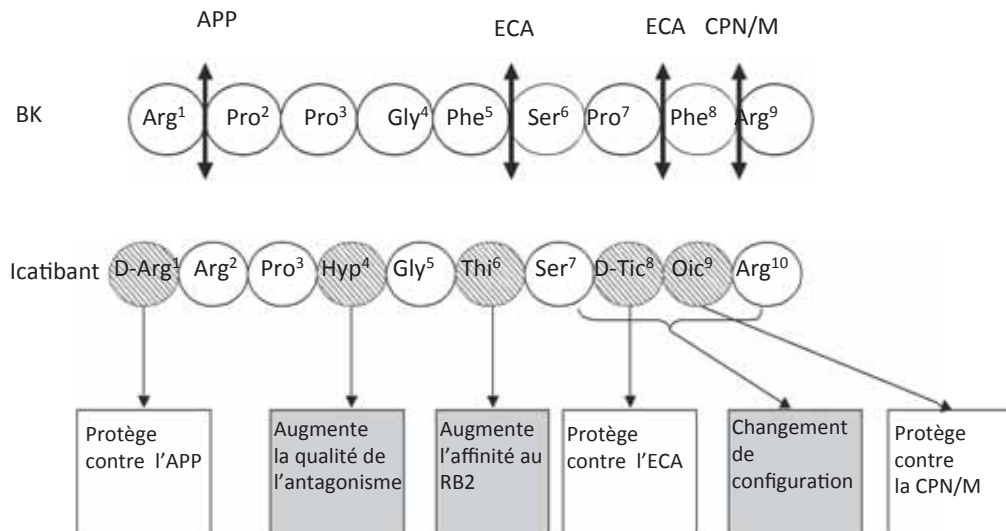
Les progrès dans la connaissance du SKK ont été stimulés par la découverte et la synthèse de molécules antagonistes à la fois plus stables et plus spécifiques de chaque type de récepteur. Il existe 3 types d'antagonistes caractérisés par leurs structures (48) : les antagonistes peptidiques dont la structure est très proche de celle de la BK, et qui ont de ce fait l'inconvénient d'avoir une demi-vie courte ; les antagonistes pseudo-peptidiques dont la demi-vie est plus longue car ils sont résistants à la dégradation par les pseudopeptidases ; les antagonistes non peptidiques qui ont l'inconvénient de traverser facilement la membrane cellulaire et d'induire pour certains des effets nucléaires (ex : le SSR640312, antagoniste du RB1).

Ces molécules aident à comprendre les « rouages » du SKK mais elles permettent également d'envisager des perspectives thérapeutiques dans de nombreuses pathologies. Régoli et al. furent les premiers à synthétiser un antagoniste du RB1, la Des-Arg9-Leu8-BK, qui a été caractérisé en utilisant des tests de contraction d'aortes isolées de lapin (car chez le lapin l'aorte exprime spontanément le RB1) (49). Cet antagoniste a été obtenu en remplaçant la phénylalanine C-terminale de l'agoniste B1 des-Arg9-BK, par un acide aminé aliphatique

la leucine. L'effort de recherche principal s'est néanmoins concentré sur le développement d'antagonistes du RB2, récepteur responsable de la plupart des effets biologiques de la BK. Le premier antagoniste B2 fut découvert par l'équipe de Vavrek et Stewart en 1985 (5). Le remplacement du résidu proline en position 7 par un résidu D-aromatique, dans la séquence de la BK lui confère une activité antagoniste B2. Le résidu aromatique utilisé dans la première génération d'antagonistes a été la phénylalanine (Phe), dans les générations suivantes, la phénylalanine a été remplacée par des acides aminés non naturels ayant des propriétés stériques favorables (50). Le plus utilisé des antagonistes est l'HOE-140 ou icatibant (figure 7) (51).

### **I.3.3 L'icatibant ou HOE-140**

L'icatibant fut développé en premier par Hoechst avec l'acronyme HOE-140. L'icatibant/HOE-140 est un décapeptide synthétique appartenant à la famille des antagonistes pseudopeptidiques. Sa structure comprend deux nouveaux acides aminés non naturels (figure 7) : l'acide D-tetrahydroisoquinidine-3-carboxylique (D-Tic) en position 7 et l'acide octahydroindole-2-carboxylique (Oic) en position 8. Ces changements conformationnels améliorent la demi-vie du produit *in vivo* en bloquant sa dégradation par les CPN et l'ECA. La partie C-terminale L-Arg est substituée par la D-Arg qui assure sa capacité de liaison au RB2 et inhibe sa dégradation par l'aminopeptidase (APP). Enfin, le remplacement de Pro3 par la L-hydroxyproline (Hyp3) améliore l'effet antagoniste de l'icatibant. Cette conformation confère à l'icatibant sa haute affinité et forte spécificité pour le RB2.



**Figure 7 : Comparaison des structures protéolytiques de la bradykinine et de l'icatibant.**

Conséquences des modifications conformationnelles de l'icatibant sur les effets antagonistes du RB2. APP : Aminopeptidase P ; RB2 : Récepteur B2 ; BK : Bradykinine ; CPN/M : Carboxypeptidase N/M. Figure adaptée de Charignon et al. (52).

L'icatibant a une affinité pour le RB2 plus grande que la BK (52). L'icatibant a aussi un effet antagoniste sur le RB1. Son affinité pour le RB1 est plus élevée que celle de la des-Arg<sup>9</sup>-BK pour le RB1 mais inférieure à celle pour le RB2 (30,32).

Un certain nombre de données expérimentales montrent que l'icatibant est capable *in vivo* d'abolir les effets de la BK : chez le rat, l'icatibant prévient l'extravasation de protéines induite par la BK (54), inhibe les effets hypotensifs de la BK (51), et diminue la bronchoconstriction (55) et la douleur induite par la BK (54).

L'effet antagoniste de l'icatibant sur les effets vasodilatateurs de la BK a ensuite fait l'objet d'une étude de phase I (56). Cette étude randomisée, contrôlée, et en double-aveugle a montré que l'icatibant était capable d'inhiber, de façon dose dépendante, les effets de la BK. Secondairement, l'icatibant a fait l'objet d'études de phase II et III. L'efficacité et l'innocuité

de l'icatibant ont été validées par 3 études majeures dans le traitement de l'angioedème de stade I et II: les études FAST (For Angioedema Subcutaneous Treatment). L'étude FAST-2 a démontré une supériorité de l'icatibant sur l'acide tranéxamique (57), tandis que l'étude FAST-3 une supériorité de l'icatibant contre placebo (58). Enfin, en 2015, une étude randomisée contrôlée a montré la supériorité de ce traitement par rapport au traitement conventionnel (glucocorticoïde et antihistaminique) dans le traitement de l'oedème angioneurotique induit par les IEC (59).

L'icatibant a obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2008 en Europe puis en 2011 aux Etats-Unis dans le traitement des crises aiguës d'angioedème héréditaire chez l'adulte ayant une carence en inhibiteur de la C1-estérase.

## **I.4 Rôle du RB2 dans les maladies rénales**

En plus de ses actions vasodilatatrices déjà détaillées, la BK exerce, principalement via le RB2, des effets natriurétiques qui impliquent soit l'inhibition de la synthèse d'AMPc (60,61), soit la synthèse de NO (61–63). Ces études suggèrent que l'inactivation du SKK favorise l'hypertension artérielle et le développement de ses complications rénales. Le SKK est donc rapidement apparu comme un système de défense contre les effets vasoconstricteurs du SRA.

De nombreux arguments suggèrent que la BK exerce un rôle néphroprotecteur, indépendant de son effet sur l'hypertension artérielle. Par exemple, la perfusion de kallicréine chez le rat Dahl hypertendu, à une dose qui n'a pas d'effet sur la pression artérielle systémique, réduit la protéinurie, augmente le débit de filtration glomérulaire, et prévient le développement de la fibrose glomérulaire et tubulaire (64,65). Ces effets sont dépendants de l'activation du RB2 puisqu'ils sont supprimés par la co-administration d'un antagoniste du

RB2 (HOE-140) (64). Plus récemment, un travail utilisant le même modèle, a montré que l'administration directe de BK protège de l'atteinte rénale induite par un excès de sel (66). En effet, ce traitement a permis de limiter la protéinurie, la glomérulosclérose et la dilatation tubulaire, mais aussi de réduire l'accumulation de collagène, l'inflammation et l'apoptose dans le rein.

La BK exerce aussi un rôle néphroprotecteur via la place centrale qu'elle occupe dans l'effet protecteur rénal des IEC. Dans un modèle de souris *db/db*, notre équipe a montré que l'effet néphroprotecteur des IEC, estimé par des paramètres fonctionnels (microalbuminurie, DFG) et structuraux (volume glomérulaire et glomérulosclérose), était diminué lors du blocage du RB2 par l'HOE-140. Ces résultats mettent en évidence le rôle central du RB2 dans l'effet néphroprotecteur induit par les IEC (67).

Enfin, la capacité de la BK à réduire le développement de la fibrose suggère qu'elle pourrait avoir une action bénéfique directe au cours des pathologies rénales fibrosantes. Le développement de modèles de souris transgéniques pour les différents constituants du SKK, en particulier les souris invalidées ou bloquées pharmacologiquement pour le RB2, a permis d'apporter des preuves expérimentales très fortes en faveur du rôle néphroprotecteur de la BK dans différentes situations pathologiques.

Si la BK et le RB2 ont été largement étudiés dans les pathologies rénales chroniques, cela est beaucoup moins vrai concernant les agressions rénales aiguës. En effet, une seule étude a été publiée en 2006 sur ce sujet (68). A partir d'un modèle d'ischémie reperfusion rénale (occlusion de l'artère rénale pendant 40 min chez le rat), cette étude montre que l'activation précoce du RB2 contribue paradoxalement à la production de radicaux libres durant la phase d'ischémie et de reperfusion. Cette génération de radicaux libres semble d'ailleurs corrélée au degré d'inflammation, et de nécrose. Les auteurs soulignent donc l'intérêt potentiel de l'utilisation d'un antagoniste spécifique du RB2 dans le cas d'une



agression rénale aiguë pour limiter les effets délétères engendrés par l'ischémie reperfusion (68).

Ce double rôle du RB2 tantôt protecteur, tantôt délétère, semble une fois de plus se retrouver ici. Cependant le nombre limité d'études sur ce sujet ne nous permet pas de conclure sur la place du RB2 au cours de l'agression rénale aiguë. L'objectif d'une partie de notre travail a donc été de préciser le rôle du RB2 au cours d'une agression rénale aiguë d'origine ischémique induite par un choc hémorragique à pression contrôlée (travail présenté dans la partie II.2).

## **I.5 Système kinine-kallicréine et état de choc**

### **I.5.1 SKK et inflammation**

La BK est considérée comme un médiateur important de l'inflammation, de l'œdème et du sepsis. Elle est impliquée précocement dans le syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SIRS), c'est pourquoi de nombreuses études se sont intéressées à l'intérêt du blocage des récepteurs de la BK pour limiter les effets délétères du SIRS. Le RB2 est impliqué dans l'initiation de la réponse inflammatoire alors que le RB1 est plutôt responsable de sa chronicisation (69,70).

Le RB2 est associé à une augmentation de la perméabilité vasculaire et à une augmentation du recrutement des polynucléaires neutrophiles responsables d'œdème et de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  ou l'IL1. Ainsi, l'intérêt du blocage du RB2 a été décrit pour limiter l'œdème cérébral après un traumatisme crânien ou un AVC (71,72), avec une amélioration du pronostic neurologique (73,74). Ces données ont été ensuite confortées par une étude interventionnelle en simple aveugle montrant que le

Deltibant (antagoniste du RB2) avait des effets favorables sur la contusion cérébrale via une réduction de la pression intra-cranienne et un moindre recours à la chirurgie (75). Enfin, l'intérêt du blocage du RB2 a aussi été montré dans le traitement de l'angioedème induit par déficit en C1-estérase, et plus récemment par la prise d'IEC (59).

A noter que l'effet pro-inflammatoire induit par la BK pourrait être paradoxalement contre balancé par un effet anti-inflammatoire. En effet, l'utilisation d'antagonistes du RB2 ou le blocage du NO pourrait paradoxalement aggraver, dans certaines situations, la réponse inflammatoire (76,77). Le rôle ambivalent du RB2 est une fois de plus retrouvé.

## **I.5.2 SKK et choc septique**

Une protéine issue du clivage du kininogène de haut poids moléculaire (la 47kD HK) a été proposée comme marqueur de sepsis témoignant de l'implication du SKK comme médiateur de l'inflammation et du sepsis. (78). Une étude récente a d'ailleurs montré, dans un modèle de sepsis chez le cochon, que la stimulation du RB1 et du RB2 par les kinines endogènes conduit à une vasodilatation responsable d'une hypotension artérielle sévère puis d'un état de choc (79). Il a aussi été montré que le blocage du RB2 par un antagoniste spécifique augmente la survie des rats et des lapins dans des modèles de choc endotoxinique (80,81). D'autres études n'ont retrouvé qu'une implication plus modérée du RB2 au cours du sepsis (82) et du choc septique (83). Enfin, les résultats d'une étude randomisée, contrôlée, en double aveugle ont montré que le blocage du RB2 a un effet bénéfique sur la survie des patients souffrant de SIRS (systemic inflammatory response syndrome) et de septicémie à bacille gram négatif (84). L'implication du RB2 semble donc varier au cours du temps et dépendrait du modèle inflammatoire utilisé.

Concernant le RB1, son rôle dans le sepsis reste controversé. En effet, selon les modèles expérimentaux étudiés, la surexpression du RB1 serait tantôt délétère ou tantôt bénéfique. Dans un modèle de rat transgénique exprimant le RB1 uniquement au niveau des cellules endothéliales, Merino et al. a montré que le RB1 exerce un rôle délétère au cours du choc endotoxinique (85). Ces données sont confortées par le fait que le blocage du RB2 diminue la mortalité induite par le choc au lipopolysaccharide (LPS) alors que le blocage combiné du RB1 et du RB2 réverse ces effets bénéfiques (86). Inversement, une autre étude, menée dans notre équipe, a montré que le RB1 pouvait avoir un rôle bénéfique contre les hypotensions artérielles induites pendant la phase initiale d'un choc endotoxinique au LPS (87). Ce rôle bénéfique du RB1 a d'ailleurs été retrouvé dans d'autres modèles (88). De ces différents résultats, nous pouvons conclure que la surexpression du RB1 joue un rôle plutôt négatif lorsqu'il est exprimé exclusivement à la surface des cellules endothéliales, alors qu'il joue un rôle plutôt bénéfique lorsqu'il est exprimé spontanément et activé en réponse à une hypotension induite par un choc au LPS.

Enfin, de façon intéressante, le fragment (1-5) de la BK (la BK (1-5)) semble aussi jouer un rôle protecteur en cas de septicémie (89,90).

Ces différents résultats parcellaires et parfois contradictoires, suggèrent que le SKK est bien impliqué par différents mécanismes dans la physiopathologie du sepsis.

### **I.5.3 SKK et choc hémorragique**

Contrairement au choc septique, l'implication du SKK au cours d'une hémorragie ou d'un état de choc hémorragique n'a jamais été vraiment étudiée. En effet, la littérature sur ce sujet est pauvre et ancienne.

D'un point de vue physiopathologique, la perte de sang conduit progressivement à une instabilité hémodynamique, à une diminution de la perfusion tissulaire, et à une hypoxie cellulaire (91). L'état de choc induit par une hémorragie aiguë, est aussi responsable d'une activation de l'inflammation, de la coagulation et de l'immunité. Compte tenu de l'impact du choc hémorragique sur l'inflammation et la microcirculation, plusieurs hypothèses peuvent être proposées concernant l'effet du choc hémorragique sur le SKK : 1) le SKK est probablement activé lors d'un choc hémorragique car il est impliqué dans la régulation de la pression artérielle via son action sur l'endothélium vasculaire ; 2) le SKK pourrait avoir un rôle délétère car son activation favorise la production de BK qui stimule préférentiellement le RB2 (constitutif et ubiquitaire), et induit ainsi une vasodilatation par la production de NO et de prostaglandines.

L'analyse de la littérature retrouve 3 articles concernant l'impact des récepteurs des opioïdes sur l'activation du SKK au cours d'un choc hémorragique (92–94). Ces articles mettent en évidence une activation du SKK via l'activation de la kallicréine plasmatique au cours du choc hémorragique. Cependant, ces données sont anciennes et ont été publiées avant que la dichotomie kallicréines plasmatique et tissulaire n'ait été mise en évidence. De façon comparable, une autre étude menée sur des rats a montré qu'un prétraitement par le facteur XIIa (Facteur Hageman), activateur du SKK plasmatique, était responsable d'une surmortalité lors d'un choc hémorragique (54).

Même si ces articles sont anciens et avec un faible niveau de preuve, ils mettent en évidence une activation du SKK avec un rôle potentiellement délétère au cours d'un choc hémorragique.

## **I.6 Système kinine-kallicréine et anesthésie**

### **I.6.1 La pression artérielle est-elle régulée par le SKK lors d'une anesthésie générale?**

La pression artérielle est une grandeur régulée alors que d'autres paramètres, comme le débit cardiaque, la volémie ou le tonus vasculaire, sont des grandeurs qui s'adaptent aux besoins. Le baroréflexe inclus dans le système nerveux autonome, sympathique et parasympathique, représente le système de régulation le plus anciennement connu (96). En fait, le maintien de la pression artérielle résulte d'un équilibre complexe entre plusieurs systèmes parmi lesquels on retient (97) : le système sympathique, le système rénine-angiotensine (SRA) et l'arginine-vasopressine. Le blocage de l'un ou de deux d'entre eux est le plus souvent compensé par le troisième (98). L'induction de l'anesthésie générale est généralement associée à une diminution de la pression artérielle du fait du sevrage brutal de la stimulation sympathique d'origine centrale et d'une altération du baroréflexe. Cette diminution de pression artérielle est étroitement dépendante du niveau d'activité sympathique avant l'induction. Les agents anesthésiques n'ont probablement pas d'effet direct sur le SRA, par contre, celui-ci est d'autant plus mis en jeu après l'induction que la diminution de pression artérielle provoquée par l'anesthésie générale est importante (patient hypertendu et/ou hypovolémique). Alors que la pression artérielle dépend peu de l'activité du SRA en cas d'isovolémie, sa contribution au maintien de la pression artérielle devient cruciale en cas d'hypovolémie (99,100).

La place du SRA a largement été mise en avant dans la régulation au long cours de la pression artérielle, à l'état basal mais aussi au cours d'une anesthésie (99–101). Cependant, la participation de ce système est, sans aucun doute, aussi étroitement liée au SKK via l'ECA.

En effet, l'ECA couple ces 2 systèmes en transformant l'Ang I en Ang II, et surtout en dégradant la BK. Ces effets ont largement été décrits dans des modèles d'hypertension artérielle (102–104) mais ils n'ont, à notre connaissance, jamais été étudiés au cours de l'anesthésie.

## **I.6.2 Contribution personnelle : impact rénal du blocage du RB2 chez la souris anesthésiée**

*Ce paragraphe correspond à une partie de mon travail de Master 2 recherche (M2R) qui a été réalisé au sein de l'équipe 12 UMR 1048 sous la direction des professeurs Ivan Tack et Vincent Minville.*

### ***I.6.2.1 Description du schéma expérimental***

Dans le cadre de ce travail, nous avons étudié l'impact hémodynamique et rénal deux jours après (J2) une anesthésie dans 3 groupes de souris : 1) sauvages (wild type, WT) ; 2) invalidées génétiquement pour l'expression du RB2 (KOB2) ; 3) ayant reçu un antagoniste du RB2 (ATB2). L'antagoniste utilisé était l'HOE-140 injecté en sous cutané 24 heures avant la procédure à la dose de 250 µg/kg. Pour ce protocole, les souris ont été anesthésiées pendant une durée d'environ 30 minutes par une injection intra-péritonéale de 0,01 ml/kg d'un mélange de kétamine/xylazine à des doses respectives de 125 mg/kg et 10 mg/kg. Un cathéter artériel a été placé dans l'artère fémorale pour le monitoring continu de la pression artérielle afin d'évaluer l'impact hémodynamique de l'anesthésie. Deux jours plus tard, l'évaluation de la fonction rénale a été réalisée par une étude fonctionnelle. Nous avons aussi recherché une souffrance rénale d'origine hypoxique induite par l'anesthésie à l'aide d'une technique

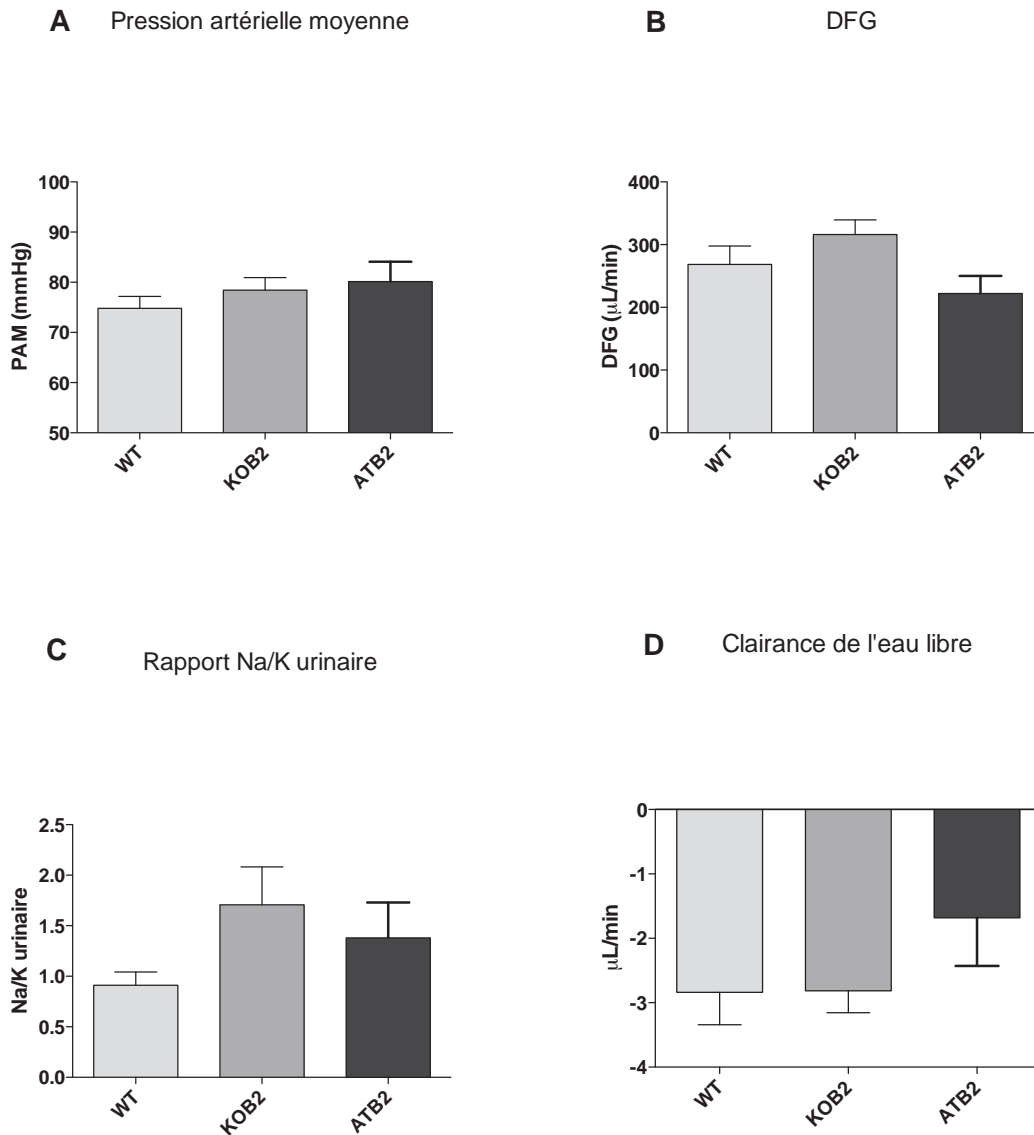
d'immunomarquage par le pimonidazole (Hydroxyprobe-1<sup>TM</sup>), marqueur exogène d'hypoxie spécifique qui est réduit en cas d'hypoxie intracellulaire. Les zones hypoxiques peuvent alors être détectées sur des coupes de reins par immunomarquage à l'aide d'un anticorps dirigé contre le pimonidazole.

### ***1.6.2.2 Résultats et conclusion***

Au cours d'une anesthésie, les pressions artérielles des souris invalidées génétiquement pour le RB2 (KOB2) ou bloquées pharmacologiquement pour le RB2 (ATB2) ont augmenté mais de façon non significative (figure 8A). Les résultats des explorations fonctionnelles rénales ne montrent pas de différence significative entre les souris sauvages (WT) ou les souris bloquées pour le RB2 (KOB2 et ATB2) (figure 8B, 8C, 8D). Il existe des réponses discordantes entre les souris KOB2 et ATB2. Ces discordances pourraient être en rapport avec la surexpression du RB1 dans le modèle de souris KOB2 comme nous l'avons évoqué précédemment. L'ajout d'un groupe de souris double KO pour le RB1 et RB2 permettrait en partie d'apporter des réponses à cette question.

Le marquage par le pimonidazole montre des lésions d'ischémie à la jonction cortico-médullaire chez les souris anesthésiées. L'importance de ces lésions est comparable entre les souris sauvages (WT) et les souris dont le RB2 a été invalidé ou bloqué (KOB2 ou ATB2) (figure 9).

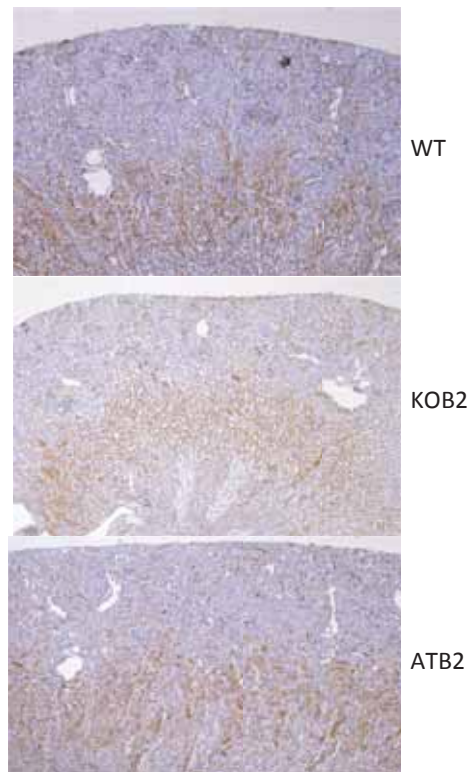
Les résultats de ce travail mettent en évidence qu'une anesthésie induit une agression rénale aiguë. En effet, l'hypotension artérielle induite par l'anesthésie est responsable d'une altération de la fonction rénale et surtout d'une hypoxie tissulaire rénale. Le blocage du RB2 ne semble pas influencer la sévérité de cette agression.



**Figure 8 : Résultats des explorations fonctionnelles rénales à J2 d'une anesthésie.**

A : Pression artérielle moyenne (PAM) ; B : Mesure du débit de filtration glomérulaire (DFG) ; C : Rapport Na/K urinaire. D : Mesure de la clairance de l'eau. \*  $p < 0,05$ . A J2 d'une anesthésie, les souris avaient une pression artérielle et une fonction rénale comparables entre les groupes ( $n = 7-13$ ).





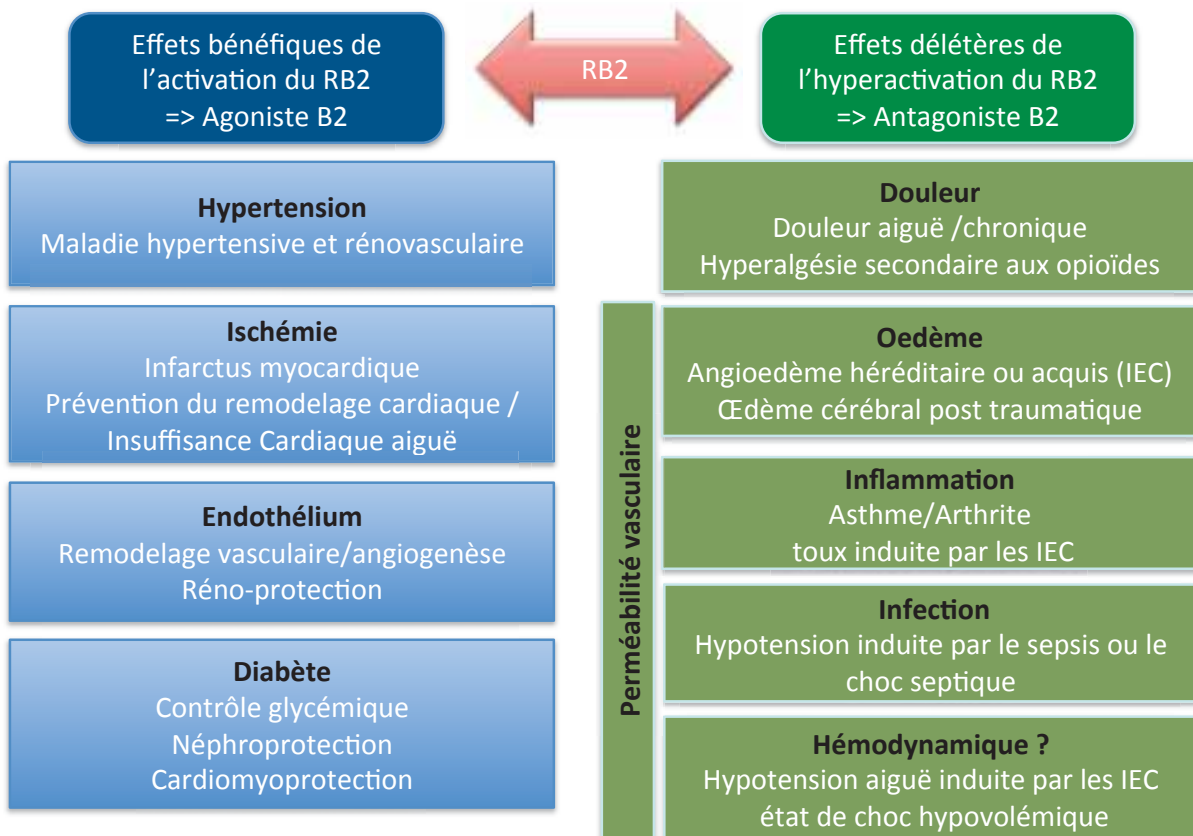
**Figure 9 : Immunohistochimie (marquage au Pimonidazole) de la jonction cortico-médullaire jusqu'au cortex.**

Microscopie optique x 50. L'anesthésie induit une hypoxie marquée à la jonction cortico-médullaire chez les souris WT, KOB2 et ATB2. Il n'a pas été constaté de différence significative entre les groupes (n=3-5)

## I.7 Conclusion

L'intérêt scientifique porté pour le système kinine-kallicréine (SKK) est en rapport avec la complexité et l'ambivalence de ce système (26,105). Par son implication dans de nombreuses fonctions physiologiques et physiopathologiques, le SKK joue un rôle difficile à définir. Il interagit étroitement avec le système rénine-angiotensine, et est impliqué dans plusieurs voies de signalisation telles que la cascade de la coagulation, les voies de la fibrinolyse et du complément. La bradykinine (BK), dont les effets sont principalement médiés par le récepteur B2 (RB2), est le peptide vasoactif central de ce système. Le RB2 induit l'activation de nombreuses voies de signalisation dont notamment la cascade du NO et des prostaglandines expliquant les effets bénéfiques vasculaires observés (effet vasodilatateur,

antiprolifératif, anti-oxydatif et anti-fibrotique du RB2). Le rôle cardiovasculaire protecteur du RB2 a donc fait l'objet de nombreuses publications montrant l'intérêt de son activation dans la prise en charge des pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle (102), l'ischémie et le remodelage myocardique (106), et les néphropathies chroniques (107) dont notamment la néphropathie diabétique (67,108). Paradoxalement, une suractivation du RB2 induit aussi la production de cytokines pro-inflammatoires responsables d'une activation de l'inflammation, du sepsis et de la douleur. L'utilisation d'antagonistes du RB2 a donc été proposée dans le traitement des angioedèmes (48,52,59), de l'œdème cérébral (71,72,75), des maladies inflammatoires chroniques (48), du sepsis (80,81,89,90) et des douleurs notamment l'hyperalgésie induite aux opioïdes (109). Le tableau 2 résume ainsi les principales implications physiopathologies du RB2 décrites dans la littérature. Ce double rôle, tantôt protecteur tantôt délétère, du SKK et en particulier du RB2 en fait une cible particulièrement intéressante dans le traitement de nombreuses pathologies grâce à l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes spécifiques. Cependant la détermination de l'indication, du dosage, et de la durée de ces traitements paraît d'un enjeu crucial pour la prise en charge de ces pathologies.



**Tableau 2 : Résumé des principaux effets physiopathologiques du RB2 et des conséquences thérapeutiques de l'utilisation de son agoniste ou de son antagoniste.**

Même si la littérature reste confidentielle sur le rôle du SKK en anesthésie-réanimation, ce système pourrait avoir cependant des implications importantes dans ce domaine. En effet, par ses actions sur la régulation de la pression artérielle, la volémie, la perméabilité vasculaire, les réponses inflammatoires, et la coagulation, le SKK participe à l'activation de voies de signalisation impliquées dans des situations d'agression telles que l'état de choc. En situation d'anesthésie « standard » (c'est à dire sans traitement associé ou état de choc), nous n'avons cependant pas retrouvé d'effet significatif du blocage du RB2 sur la pression artérielle ou la fonction rénale.

## **PARTIE II : RB2 ET AGRESSION RENALE AIGUE AU COURS D'UN CHOC HÉMORRAGIQUE CONTRÔLÉ**

L'état de choc hémorragique résulte d'une diminution du volume sanguin circulant qui est responsable d'une hypoperfusion tissulaire et d'une inadéquation entre les besoins cellulaires et les apports en oxygène. Les étiologies les plus fréquentes regroupent les hémorragies digestives, les hémorragies obstétricales et les polytraumatismes. La réponse adaptative initiale de l'organisme face au choc hémorragique consiste en une stimulation sympathique qui permet de redistribuer le volume sanguin restant vers les organes vitaux que sont le cerveau et le cœur. Par contre, cette réponse provoque une hypoperfusion des territoires vasculaires splanchniques, rénaux et musculocutanés avec une diminution des apports énergétiques (diminution des apports en oxygène et en glucose) vers ces territoires. Il existe alors un risque de déséquilibre entre les apports et les besoins énergétiques qui est susceptible d'induire des altérations des fonctions cellulaires et, par voie de conséquence, des altérations des fonctions des organes. Les lésions cellulaires sont d'autant plus sévères que la durée et l'intensité du choc sont importantes. L'hypoperfusion tissulaire résultante est alors responsable d'un syndrome de défaillance multiviscérale et d'une augmentation de la mortalité.

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) par nécrose tubulaire aiguë ischémique (NTAI) qui résulte de cet état de choc, est un facteur pronostic indépendant de mortalité (110,111). Des données récentes de la littérature montrent l'existence d'un dysfonctionnement

microcirculatoire responsable d'une hypoxie prolongée conduisant à la production de radicaux libres (112). La mise en jeu des facteurs micro rhéologiques, en particulier par une anomalie de la biodisponibilité du NO, pourrait ainsi jouer un rôle critique dans le développement de cette IRA (113–115).

La bradykinine (BK), par son action vasodilatatrice via la production de NO participe physiologiquement à la régulation de l'hémodynamique rénale (116). Son rôle néphroprotecteur dans le cadre des insuffisances rénales chroniques a été largement démontré (116–118). Par contre, son rôle en situation d'agression rénale aiguë reste encore inconnu.

Afin de mieux comprendre le rôle potentiel de la BK et du RB2 en situation d'IRA, nous avons étudié les effets de l'invalidation génétique ou du blocage pharmacologique du RB2 dans un modèle murin d'IRA par NTAI suite à un choc hémorragique contrôlé.

## **II.1 Le choc hémorragique**

### **II.1.1 Physiopathologie du choc hémorragique**

Les premières observations documentées sur les effets d'un choc hémorragique sont issues de la Seconde Guerre mondiale (119,120). Ces travaux soulignent la corrélation entre la perte sanguine, la fréquence cardiaque, la pression artérielle et le pronostic des patients en état de choc hypovolémique.

#### ***II.1.1.1 Réponse neuro-hormonale***

La régulation de la volémie est effectuée via les informations transmises aux barorécepteurs centraux et périphériques à haute et à basse et pression. Les réponses neuro-hormonales mises en œuvre lors de la réponse à l'hémorragie aiguë sont nombreuses : les hormones cortico-surréaliennes (121) en premier lieu mais également les opioïdes endogènes (122), les systèmes sérotoninergiques (123), les hormones sexuelles (124), et le NO (125). L'objectif de cette réponse est de maintenir la perfusion tissulaire, toutefois elle induit systématiquement des variations importantes de la perfusion tissulaire régionale.

Le modèle de choc hémorragique a d'ailleurs été essentiel pour l'analyse des débits sanguins régionaux et a permis de caractériser les circulations dites « vitales », qui alimentent des organes dits « nobles » : le cerveau, le myocarde et, à un moindre degré, le rein (126–129).

### **II.1.1.2 Réponse hémodynamique**

L'état de choc hémorragique comporte trois phases.

#### **II.1.1.2.a Phase sympatho-excitatrice**

La première étape de la réponse à une hémorragie chez l'Homme est induite par une réduction du volume de sang d'environ 15%. Ce qui provoque une augmentation modeste de la fréquence cardiaque (100 battements/min), et parallèlement une augmentation des résistances vasculaires périphériques qui compense la perte volémique et permet le maintien d'une pression artérielle normale (130,131). En effet, la boucle réflexe des barorécepteurs à haute et basse pressions ainsi que les chémorécepteurs aortiques sino-carotidiens ou centraux (stimulés par les conséquences de l'ischémie tissulaire) augmentent le tonus sympathique périphérique artériel (131). Cette augmentation de tonus touche également le territoire veineux, à forte capacitance, et permet de mobiliser une réserve de sang importante (jusqu'à 80% du volume sanguin total). Cette vasoconstriction a pour conséquence d'optimiser le débit sanguin tissulaire en privilégiant les circulations « vitales » au détriment des autres territoires (musculo-cutané, splanchnique). Cette redistribution régionale permet d'optimiser la consommation en oxygène (VO<sub>2</sub>) de l'organisme en abaissant le seuil de transport artériel en oxygène (TaO<sub>2</sub>) critique. Néanmoins, quand elle se prolonge, cette vasoconstriction régionale semble jouer un rôle dans l'apparition du syndrome de défaillance multi-organique. Elle induit en effet, dans les territoires sacrifiés, une ischémie tissulaire importante dont le retentissement peut devenir systémique (132).

#### **II.1.1.2.b Phase sympatho-inhibitrice**

La deuxième étape est marquée par une diminution des résistances et de la pression artérielle attribuée principalement au réflexe de Bezold-Jarisch (sympatho-inhibition) (133,134). Cette phase a été décrite comme survenant au-delà d'une spoliation de 50% de la masse sanguine initiale. Sander-Jensen et al. ont ainsi observé, chez des patients ayant présenté une déplétion sanguine importante, que la fréquence cardiaque était initialement faible et augmentait paradoxalement seulement après le début de la réanimation (135). Plusieurs phénomènes caractérisent cette phase : 1) une inhibition centrale de l'activation sympathique initialement présente ; 2) une sécrétion médullosurrénalienne de catécholamines (notamment l'adrénaline) ; 3) la libération d'hormone antidiurétique (ADH) à forte concentration ; 4) l'activation du SRA. Cette phase sympatho-inhibitrice est caractérisée en partie par une boucle réflexe vago-vagale, induite par les mécanorécepteurs intra-cardiaques. Cela permet d'optimiser le remplissage des cavités cardiaques en situation d'hypovolémie extrême. Cette phase précède le désamorçage cardiaque en l'absence de thérapeutique appropriée.

#### **II.1.1.2.c Vers l'état de choc incontrôlé**

Lorsque la perte de sang persiste, la pression artérielle diminue et une tachycardie plus importante se manifeste (120 battements/min). Cette troisième étape dite de reperfusion, reflète probablement la transition vers l'état de choc décompensé ou irréversible. Les lésions secondaires à l'ischémie et l'hypoxie tissulaire sont aggravées par le relargage brutal de médiateurs toxiques tels que les radicaux libres (stress oxydatif) (136). Ces derniers activent des voies de signalisation intracellulaires cytotoxiques et déterminent une réaction inflammatoire systémique via la production de cytokines ou l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (137). La dysfonction endothéliale résultante



est responsable d'une fuite capillaire. Ces phénomènes peuvent aboutir à la mort cellulaire et la prolongation de l'inflammation systémique. Plus l'ischémie est longue et la reperfusion brutale, plus les dégâts cellulaires et les défaillances d'organes sont importants. La prolongation de l'inflammation aboutit à un état de vasoplégie qui persiste malgré un remplissage vasculaire adéquat (138). S'en suit un syndrome hyperkinétique avec résistances artérielles basses et index cardiaque normal ou augmenté (139,140).

### ***II.1.1.3 L'anesthésie modifie la réponse hémodynamique au choc***

Les médicaments hypnotiques utilisés pour l'anesthésie générale modifient l'homéostasie hémodynamique. En effet, les agents anesthésiants induisent une diminution d'activité du système sympathique responsable d'une vasodilatation artérielle et veineuse associée à une diminution de la commande sympathique cardiaque (141–143). En conséquence, le baroréflexe est modifié sous anesthésie générale. Dans le cadre du choc hémorragique, il a été montré que la chute de pression artérielle au cours d'une hémorragie était identique chez des chiens dont les fibres participant au baroréflexe avaient été sectionnées, et chez des chiens sous anesthésie générale barbiturique (96). Ceci est globalement transposable à l'ensemble des produits anesthésiants, y compris ceux administrés par voie inhalée (141). Seul l'étomidate préserve l'activité sympathique centrale et périphérique sans modifier l'équilibre sympatho-vagal cardiaque et le baroréflexe (144).

## **II.1.2 Conséquences de l'état de choc hémorragique**

### ***II.1.2.1 Impact sur la microcirculation, la coagulation, l'inflammation et l'immunité***

L'inflammation et les modifications de la microcirculation jouent un rôle capital au cours de l'état de choc prolongé. Le choc prolongé aboutit ainsi à des obstructions capillaires irréversibles. Cette obstruction résulte de différents mécanismes : 1) oedème des cellules endothéliales et de l'interstitium qui conduit à une diminution de la lumière des capillaires et à une augmentation de leur résistance hydraulique (137), 2) adhésion des polynucléaires neutrophiles sur cet endothélium vasculaire et 3) altération des propriétés anticoagulantes de l'endothélium associée à une activation de facteurs procoagulants tels que le facteur tissulaire (145,146). Ces modifications sont associées à une coagulopathie qui résulte de la perte de l'effet anticoagulant de l'endothélium et qui peut se compliquer d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) aggravant l'obstruction microvasculaire (147). Ce cercle vicieux est essentiel pour la compréhension de la physiopathologie de la défaillance multiviscérale.

Enfin, à distance de l'épisode de choc, il est noté une profonde dépression de l'ensemble des fonctions macrophagiques mais également une altération des fonctions lymphocytaires aboutissant à une immunodépression (148,149). L'ensemble de ces phénomènes explique la fréquence des infections chez les patients en choc hémorragique, en particulier les polytraumatisés. La sévérité du choc hémorragique, plus que sa durée, semble responsable de l'importance de la dépression immunitaire observée.

### ***II.1.2.2 Rôle du territoire hépato-splanchnique***

La circulation hépato-splanchnique est particulièrement critique lors du choc hémorragique, car elle est sacrifiée précocement. Les conséquences de cette hypoperfusion hépato-splanchnique peuvent être catastrophiques : libération de facteurs dépresseurs myocardiques, translocation bactérienne, facilitation de l'endotoxémie. D'autre part, le choc hémorragique prolongé peut entraîner des altérations profondes et durables des fonctions hépatiques, en particulier des fonctions métaboliques et de détoxification.

L'ischémie intestinale altère la muqueuse intestinale, entraînant rapidement une rupture de cette barrière bactériologique. Ceci permet le passage de bactéries notamment vers les systèmes lymphatiques et mésentériques. Ce phénomène, appelé translocation bactérienne, survient au cours de tout état de choc entraînant une altération de la muqueuse intestinale, c'est en particulier le cas du choc hémorragique (150). La translocation bactérienne peut apparaître dès les premières heures du choc hémorragique, et son incidence croît sur les jours suivants. De plus, le choc hémorragique pourrait faciliter le passage d'endotoxines bactériennes.

L'hypoperfusion hépato-splanchnique participe peut-être également à l'intensité de la réaction inflammatoire (127,151). La restauration de cette perfusion est ainsi fréquemment prise en compte comme objectif complémentaire aux objectifs circulatoires systémiques lors de la réanimation de l'état de choc (152–154).

### ***II.1.2.3 Impact cardio circulatoire***

La contractilité myocardique est également altérée lorsque le choc hémorragique se prolonge. Il semble que la principale altération soit, dans cette situation, une atteinte de la fonction diastolique (155). En plus des impacts cardiaque et microcirculatoire, un impact vasculaire systémique apparaît lorsque l'état de choc se prolonge. L'existence d'une

vasodilatation proportionnelle à l'intensité du choc hémorragique a été bien illustrée dans le travail de Dalibon et al. (138). Le choc prolongé peut ainsi déclencher une défaillance de la vasoconstriction sympathique. Après la réanimation d'un choc hémorragique contrôlé et le retour à une volémie normale, il persiste ainsi une hypovolémie efficace qui justifie un remplissage vasculaire plus important que le volume initialement prélevé et probablement également l'utilisation de vasoconstricteurs (156).

### **II.1.3 Le lactate artériel comme marqueur cellulaire de l'état de choc**

L'hypoperfusion tissulaire faisant suite à l'état de choc entraîne rapidement une hypoxie cellulaire. Face à la diminution des apports en oxygène, les tissus mettent en place une série de mécanismes compensatoires visant à maintenir un équilibre entre production d'ATP et besoins métaboliques. L'augmentation de l'extraction en O<sub>2</sub> (EO<sub>2</sub>) permet, jusqu'à un certain seuil, de maintenir une consommation tissulaire en O<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub>) constante (157). Au-delà de ce seuil critique, l'augmentation de l'EO<sub>2</sub> ne permet plus le maintien de la VO<sub>2</sub>. Les cellules diminuent leur métabolisme et certaines synthèses pour maintenir leurs fonctions essentielles, puis elles utilisent le métabolisme anaérobie qui se traduit par la formation de lactate et de protons (158,159). Ce phénomène met en jeu la production mitochondriale de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (160). La privation d'O<sub>2</sub> conduit également à l'induction de la transcription d'un grand nombre de gènes cibles dans le but d'adapter le métabolisme à la déficience en O<sub>2</sub>. Parmi eux, le rôle majeur du facteur 1 induit par l'hypoxie (HIF-1) a récemment été mis en évidence comme activateur des éléments HRE (hypoxia response element) présents sur les gènes sensibles à l'hypoxie (161,162).

Le lactate artériel est donc un marqueur indirect du degré d'hypoperfusion tissulaire et de la sévérité des états de choc (163,164). L'évolution de ce paramètre permet de surveiller précocement l'adaptation de la réanimation cardiovasculaire entreprise et constitue un facteur pronostique dans le choc hémorragique. Chez les patients polytraumatisés, la normalisation de la concentration du lactate artériel dans les 24 premières heures de la prise en charge est un facteur de bon pronostic (165,166). Les dernières recommandations formalisées d'experts publiées en 2014 soulignent l'intérêt de suivre l'évolution de la concentration du lactate artériel et la nécessité d'incorporer ce dosage dans les algorithmes de prise en charge hémodynamique du choc hémorragique (167).

#### **II.1.4 Les différents modèles de choc hémorragique**

L'intérêt principal du choc hémorragique, en comparaison aux autres états de choc, est de pouvoir être « standardisé ». En effet, les autres types de choc (septique, cardiogénique, distributif) peuvent présenter de fortes variations inter-individuelles concernant le délai d'apparition, la sévérité de l'état de choc mais aussi les mécanismes d'adaptation mis en jeu lors de la phase de réanimation.

Le choc hémorragique a été initialement étudié par Cannon et Blalock (168). Quelques années plus tard, Wiggers et Guyton ont également développé une variété de modèles animaux de choc hémorragique contrôlé (169,170). D'autres modèles ont par la suite été décrits selon des procédés ou des objectifs de déplétion sanguine variables (171–173). Ces études ont permis de montrer que la gravité du choc était liée à la profondeur et à la durée de l'hypovolémie. Récemment, Deitch a classé ces modèles en trois catégories générales : saignement incontrôlé, volume contrôlé et pression artérielle contrôlée (174).

#### ***II.1.4.1      Modèle à pression contrôlée***

Dans ce modèle décrit par Wiggers, la spoliation sanguine est effectuée afin de diminuer la pression artérielle moyenne (PAM) jusqu'à une valeur cible. Cette pression est maintenue durant une période prolongée puis l'animal est réanimé en fin de choc avec restitution de son propre sang associé ou non à un volume de soluté de remplissage. Ce type de modèle permet d'étudier différentes intensités et durées de choc chez un animal, ainsi que leurs impacts multi-organiques. Un deuxième intérêt de ce type de modèle est de pouvoir prolonger le choc jusqu'à une phase durant laquelle il devient « décompensé », c'est-à-dire jusqu'à un stade aboutissant à un échec de la réanimation et au décès de l'animal.

#### ***II.1.4.2      Modèle à volume contrôlé***

Dans le modèle de choc hémorragique à volume contrôlé, la spoliation sanguine est prédéterminée et est réalisée progressivement, ce qui permet d'évaluer les mécanismes compensateurs mis en place par l'organisme (171). Ce type de modèle a notamment permis de définir les différentes phases de réponses neuro-hormonales à l'hypovolémie.

#### ***II.1.4.3      Modèle à saignement incontrôlé***

Ce dernier type de choc consiste à réaliser une spoliation incontrôlée par section d'un organe ou d'un vaisseau. Ce modèle est intéressant car c'est le mécanisme qui se rapproche le plus de ce que l'on peut observer en situation clinique humaine. En effet, chez l'humain, la perte sanguine n'est pas contrôlée. Elle est régulée par l'hémodynamique systémique et celle de la zone lésée. Néanmoins, le principal inconvénient de ce modèle est l'absence de standardisation et la forte variabilité inter-individuelle qui en résulte.

## **II.1.5 Utilisation d'un modèle murin de choc hémorragique à pression contrôlée conduisant à une agression rénale aiguë**

Nos travaux ont été réalisés à partir d'un modèle murin de choc hémorragique à pression contrôlée validé et publié par notre équipe (175). L'intérêt de ce modèle est qu'il induit une nécrose tubulaire aiguë ischémique (NTAI) dont les caractéristiques sont proches de celles observées chez l'homme (c'est à dire une nécrose principalement localisée à la jonction cortico-médullaire).

Pour valider ce modèle, il a été nécessaire d'apporter des modifications aux modèles de choc hémorragique. En plus du monitoring artériel par cathéter artériel fémoral, les souris ont bénéficié d'une anesthésie générale, d'une ventilation artificielle à faible volume courant, et de la pose d'un cathéter veineux central pour la sédation et la réanimation. L'objectif de ce modèle était de reproduire le plus fidèlement possible les conditions de prise en charge des patients en choc hémorragique. Il a été ensuite nécessaire de déterminer la profondeur, c'est à dire la pression artérielle moyenne (PAM) à atteindre (35 mmHg), et la durée du choc (2 heures) pour obtenir cette agression rénale aiguë produisant une NTAI. La validation de ce modèle a comporté l'évaluation de l'impact fonctionnel rénal, mais aussi l'étude des conséquences moléculaires et morphologiques avec un suivi de 21 jours après le choc.

Les résultats de ce travail ont permis de montrer qu'une hypotension artérielle avec une perte sanguine chez la souris était capable d'induire une IRA organique associée à une hypoxie et à des anomalies fonctionnelles tubulaires et morphologiques. Par ailleurs, il a été constaté qu'à 21 jours, il persistait certaines anomalies fonctionnelles tubulaires, et surtout une fibrose interstitielle malgré une reconstruction épithéliale *ad integrum* et une restauration du débit de filtration glomérulaire (DGF).

## **II.2 Contribution personnelle : place du RB2 dans la protection contre l'agression rénale aiguë induite par un choc hémorragique à pression contrôlée**

*Ce paragraphe correspond à mon travail de Master 2 recherche (M2R) réalisé au sein de l'équipe 12 de l'UMR 1048.*

### **II.2.1 Introduction**

Le rôle central de la BK via le RB2 dans l'hémodynamique rénale rend très probable son implication dans le développement de l'insuffisance rénale aiguë (IRA) par nécrose tubulaire aiguë d'origine ischémique (NTAI). Afin de mieux comprendre le rôle potentiel de la BK en situation d'IRA, nous avons utilisé un modèle murin d'IRA par NTAI induite par un choc hémorragique à pression contrôlée validé par notre équipe (175). L'objectif de notre travail était de déterminer le rôle du RB2 au cours de cette NTAI, et plus particulièrement de déterminer le degré d'hypoxie et les variations de perméabilité vasculaire rénale induites par ce choc hémorragique contrôlé.

### **II.2.2 Description du schéma expérimental**

Trois groupes de souris femelles C57/Bl6 d'âge compris entre 20 et 24 semaines ont été utilisés : 1) souris contrôle (wild-type, WT), 2) souris invalidées pour le récepteur B2 (KOB2) et 3) souris traitées par un antagoniste pharmacologique du RB2 (ATB2). L'antagoniste utilisé était l'HOE-140 injecté en sous cutané à la dose de 250 µg/kg 24 heures



avant le choc et maintenu jusqu'au sacrifice par une réinjection tous les 2 jours. Chacun de ces 3 groupes ont été subdivisé en 2 sous-groupes : souris sham et souris choquées (figure 10A). L'impact rénal a été évalué à 2 et 21 jours (J2 et J21) après la procédure de choc hémorragique, par une exploration fonctionnelle rénale et par une analyse histologique (figure 10B). L'évaluation à J2 a aussi permis d'évaluer le degré d'hypoxie rénale par la technique du pimonidazole, ainsi que les modifications de la perméabilité vasculaire par la technique du bleu Evans et par la mesure de la teneur en eau tissulaire. Les souris ont donc été sacrifiées soit à J2, soit à J21.

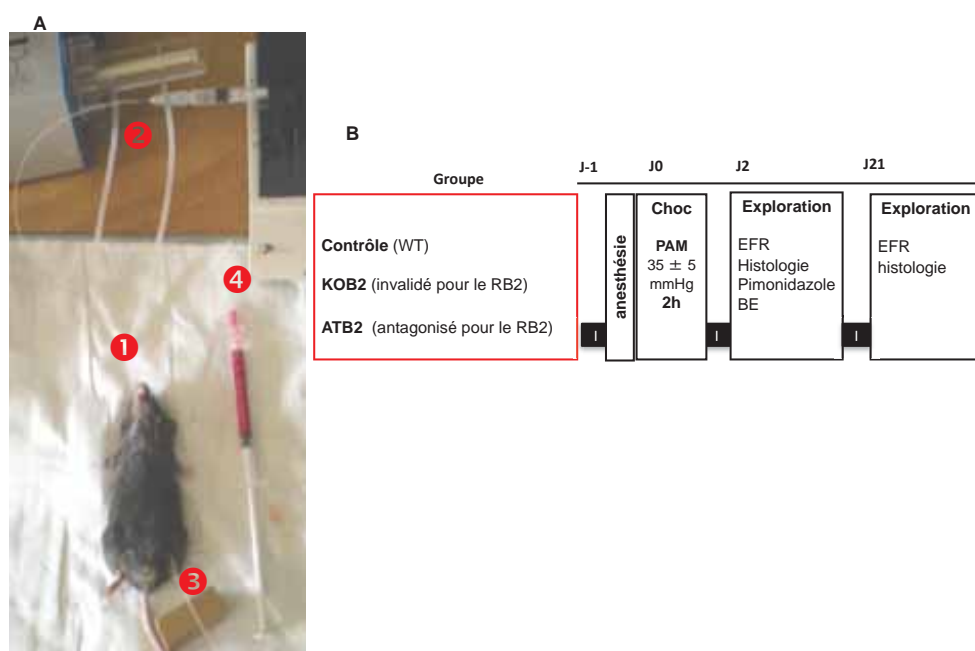
### **II.2.3 Choc hémorragique à pression contrôlée**

Le choc hémorragique a été réalisé comme précédemment décrit par Mayeur et al (175). Les souris ont été anesthésiées par une injection intra-péritonéale de 0,01 ml/kg d'un mélange kétamine/xylazine à des doses respectives de 125 mg/kg et 10 mg/kg. L'entretien de l'anesthésie a été ensuite maintenu jusqu'à la fin du choc avec de la kétamine intraveineuse (50 mg/kg/h). Un cathéter jugulaire interne gauche et un cathéter artériel fémoral gauche ont été insérés. Les souris ont été ensuite intubées puis ventilées mécaniquement (fréquence respiratoire 150/min et volume courant 9 ml/kg). La pression artérielle moyenne (PAM) a été monitorée en continu.

Le choc hémorragique a été réalisé par saignées (prélèvements de sang artériel via le cathéter artériel fémoral) jusqu'à obtenir une PAM de  $35 \pm 5$  mmHg. Cette PAM a été maintenue (par prélèvements ou réinjections du sang si nécessaire) pendant une durée de 2h. A la fin de cette période, le sang prélevé a été réinjecté par la voie veineuse centrale, à un débit compris entre 1,5 et 3,5 ml/h. La réanimation a été poursuivie par la perfusion de cristalloïde (Ringer lactate), d'un volume équivalent au volume de sang prélevé (figure 10A).

La surveillance hémodynamique a été poursuivie pendant toute la durée de la réanimation. Les cathéters ont été ensuite retirés, l'artère fémorale et la veine jugulaire ligaturées et la peau suturée. L'extubation a été réalisée dès les premiers signes de réveil et la reprise d'une ventilation spontanée efficace.

Les souris sham ont bénéficié du même protocole anesthésique et chirurgical mais sans subir de spoliation sanguine.



**Figure 10 : Protocole expérimental.**

A : souris choquée (❶ ventilation artificielle, ❷ voie veineuse, ❸ cathéter artériel, ❹ sang hépariné).  
B : schéma expérimental. EFR (explorations fonctionnelles rénales), BE (Bleu Evans) et PIM (Pimondazole). WT : Wild type; KOB2 : souris invalidées pour le récepteur B2 ; ATB2 : souris ayant reçu un antagoniste du RB2 (HOE-140) 24 heures avant le choc jusqu'au sacrifice. Chaque groupe a été subdivisé en 2 sous groupe : sham (souris anesthésiées non choquées) et choc (souris choquées).

## II.2.4 Paramètres étudiés

Nous avons étudié l'impact de l'agression rénale aiguë à J2 et J21 par une étude fonctionnelle (exploration fonctionnelle rénale) et morphologique (histologie). L'exploration

fonctionnelle rénale comprenait la mesure du Débit de Filtration Glomérulaire (DFG) par la mesure de la clairance de l'inuline, la détermination du rapport sodium/potassium urinaire et le calcul de la clairance de l'eau libre urinaire. L'analyse histologique rénale comprenait une coloration à l'hématoxyline-éosine à la recherche de lésions (vacuolisation des cellules, débris cellulaires intra-tubulaires et aspect de désépithélialisation). Le « Kidney Injury Score » nous a permis de caractériser l'intensité de la NTAI par une évaluation semi-quantitative de ces lésions : 0 : aucune lésion ; 1 : 1-10% ; 2 : 11-25% ; 3 : 26-45% ; 4 : 46-75% ; et 5 : >76% (176).

A J2, nous avons cherché à préciser le degré d'hypoxie rénale par une technique d'immunomarquage par le pimonidazole (Hydroxyprobe-1™). Celui-ci a été injecté par voie intra-péritonéale à la dose de 60 mg/kg une heure avant le sacrifice de l'animal.

La mesure de la perméabilité vasculaire aux macromolécules a été faite à J2 par la technique de coloration du Bleu Evans (BE) (177,178). Les animaux ont été sacrifiés 15 minutes après l'injection d'un bolus de 30 mg/kg de BE puis purgés par du sérum hépariné (20 UI/ml). Les reins prélevés ont été ensuite placés dans une solution de formamide pour l'extraction du colorant, puis broyés et laissés au bain marie 24 h à 24°C. La concentration de BE dans les surnageants a été déterminée par spectrophotométrie à 620 nm (Beckman DU 640), et les résultats calculés à partir d'une courbe standard de BE (0,5-25 mg/L) et exprimés en µg de BE/g de tissu sec. Les variations de la perméabilité aux macromolécules étant dépendantes de la pression hydrostatique et donc indirectement de la pression artérielle, celle-ci a été monitorée en continue pendant l'exploration.

Les variations d'eau intra-cellulaire ont été aussi étudiées par la mesure de la teneur en eau tissulaire. Pour cela, l'hydratation de chaque organe a été calculée en soustrayant son poids sec (après 24h à 37°C) à son poids humide (mesuré au moment du prélèvement). Cette valeur était ensuite rapportée au poids humide de chaque organe. Pour déterminer la variation

du contenu hydrique induite par le choc hémorragique, la moyenne des contenus hydriques des tissus contrôles correspondants (WT sham (WTs)) a été soustraite de la teneur en eau du tissu considéré. Le calcul de la variation de la teneur en eau tissulaire est la suivante :

$$[(PH - PS) / PH]_{\text{tissu étudié}} - \text{moyenne} [(PH - PS) / PH]_{\text{tissu WTs}}$$

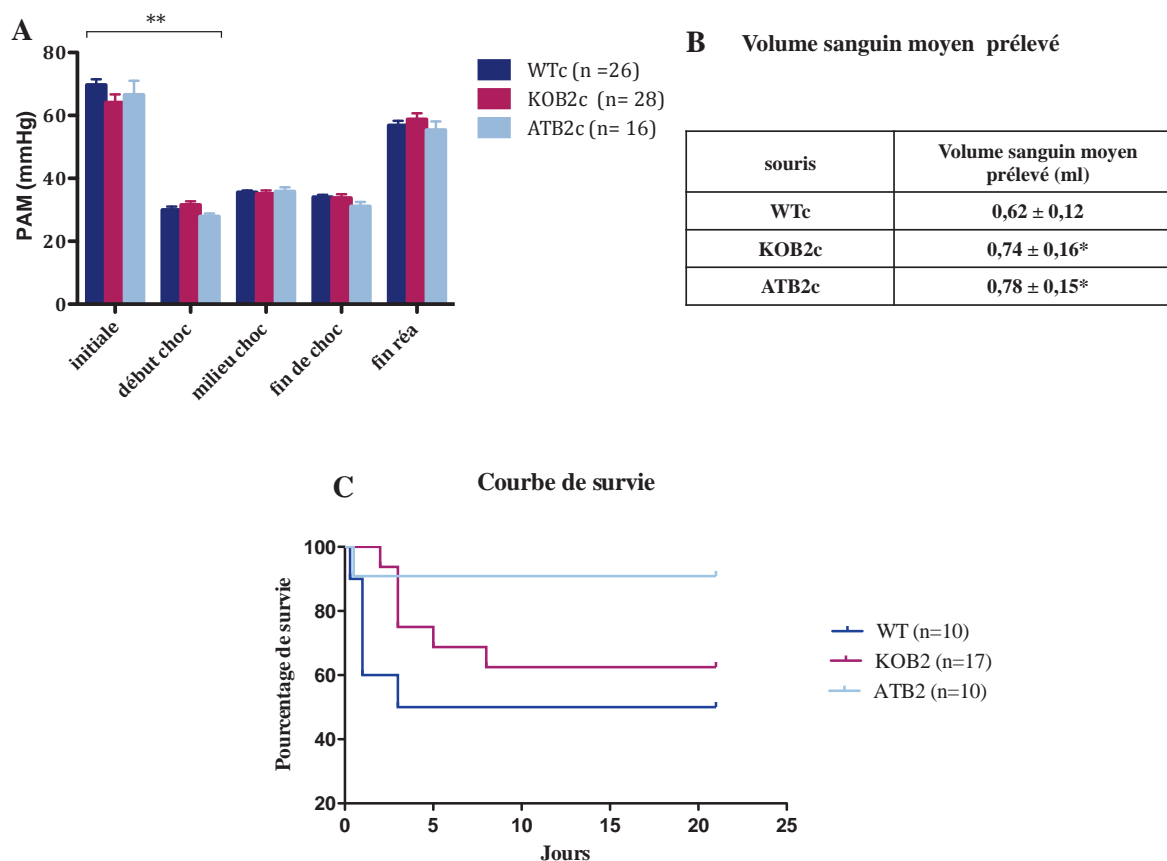
*PH est le poids humide, PS est le poids sec exprimé en g.*

*Les résultats ont été ensuite exprimés en pourcentage de variation par rapport aux WTs*

## **II.2.5 Impact hémodynamique du RB2 au cours du choc hémorragique à pression contrôlée**

La figure 11 montre la PAM pendant le choc dans les différents groupes, le volume moyen de sang prélevé nécessaire pour obtenir l'objectif de PAM ( $35 \pm 5$  mmHg), ainsi que la courbe de survie des souris choquées sacrifiées à J21.

Pour les souris choquées, l'objectif de pression artérielle fixé a été systématiquement atteint et, l'intensité du choc a été comparable entre les groupes (figure 11A). La spoliation sanguine nécessaire pour obtenir l'objectif de pression artérielle a été significativement plus importante dans les groupes KOB2 choc (KOBc) et ATB2 choc (ATB2c) par rapport au groupe WT choc (WTc) ( $p < 0,05$ ) (figure 11B). Enfin, la courbe de survie des souris choquées à J21 montre une augmentation significative de la survie des souris ATB2c par rapport aux souris WTc ( $p = 0,04$ ). Le blocage pharmacologique du RB2 semble donc avoir eu un effet protecteur chez les souris choquées.



**Figure 11 : Impact de l'inactivation génétique ou du blocage pharmacologique du RB2 au cours du choc hémorragique.**

A : Pression artérielle moyenne (PAM). B : Volume moyen de sang prélevé (moyenne ± écart type). C : courbe de survie des souris choquées sacrifiées à J21. WTc : Wild-type choquées ; KOB2c : souris invalidées pour le récepteur B2 et choquées ; ATB2c : souris ayant reçu un antagoniste du RB2 (HOE-140) et choquées. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,001$ . Augmentation significative de la tolérance des KOB2c et ATB2c à l'hypotension artérielle par rapport aux WTc. Augmentation significative de la survie à J21 des souris ATB2c par rapport aux souris WTc ( $p = 0,04$ ).

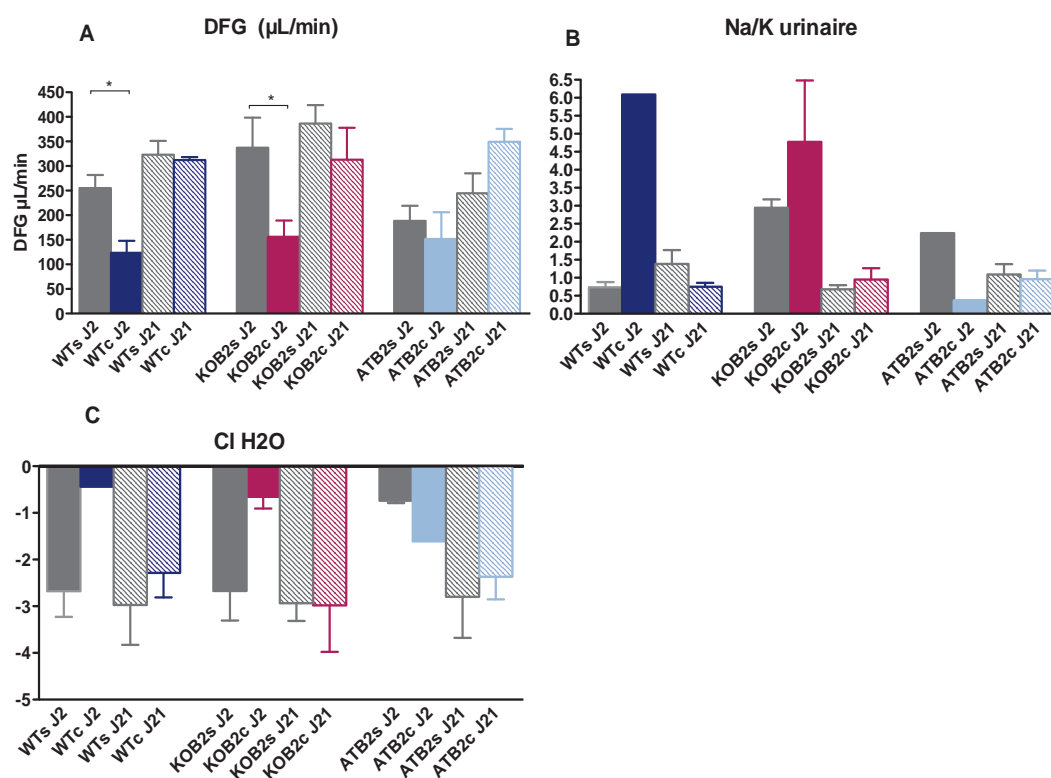
## II.2.6 Place du RB2 dans l'agression rénale aiguë

### II.2.6.1 Exploration fonctionnelle rénale

A J2, le DFG est significativement diminué dans les groupes WTc et KOB2c témoignant d'une IRA sévère précoce après le choc (figure 12A). La sévérité de cette IRA n'a pas été retrouvée dans le groupe ATB2c (figure 12A). A J21, la mesure du DFG ne montre

pas de différence significative entre les groupes choqués par rapport aux groupes contrôles, témoignant d'une récupération de la fonction rénale à 21 jours après le choc.

Concernant l'analyse urinaire à J2 du rapport Na/K et de la clairance de l'eau libre, ces paramètres doivent être interprétés avec précaution car l'agression rénale induite par le choc a été à responsable d'une oligo-anurie chez les souris choquées. Cela a rendu l'exploration des données urinaires très difficile malgré le nombre d'animaux (6-10 par groupe). Pour cette raison, aucune analyse statistique à J2 n'a été réalisée sur les figures 12B et 12C. A J21, les résultats montrent une normalisation de la capacité de réabsorption du sodium et de concentration des urines chez les souris choquées par rapport aux souris sham quelque soit le groupe (figures 12B et 12C).

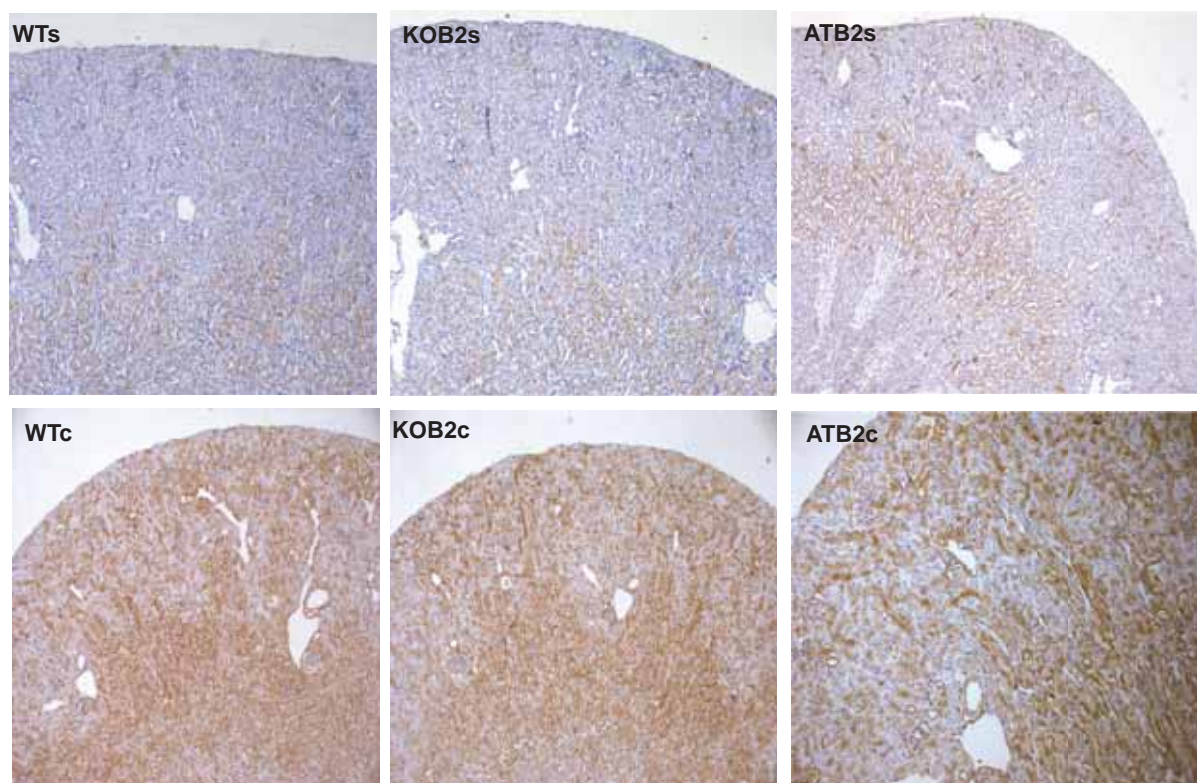


**Figure 12 : Résultats des explorations fonctionnelles rénales (EFR).**

A : Débit de Filtration Glomérulaire (DFG) à J2 et J21. B : Rapport Na/K. C : Mesure de la clairance de l'eau. Après agression rénale aiguë, les souris choquées WTc et KOB2c ont présenté une insuffisance rénale sévère à J2. La fonction rénale était normalisée à J21. WT : Wild type; KOB2 : souris invalidées pour le récepteur B2; ATB2: souris ayant reçu un antagoniste du RB2 (HOE-140); s : sham ; c : choc. n= 6-10/groupe. \*  $p < 0,05$ .

### **II.2.6.2 Immunohistochimie : marquage au Pimonidazole à J2**

Une coloration brune intense a été mise en évidence dans les zones corticales et cortico-médullaires chez les souris choquées contrairement aux souris sham (figure 13). Il n'a pas été constaté visuellement de différence entre les groupes WTc, KOB2c et ATB2c.



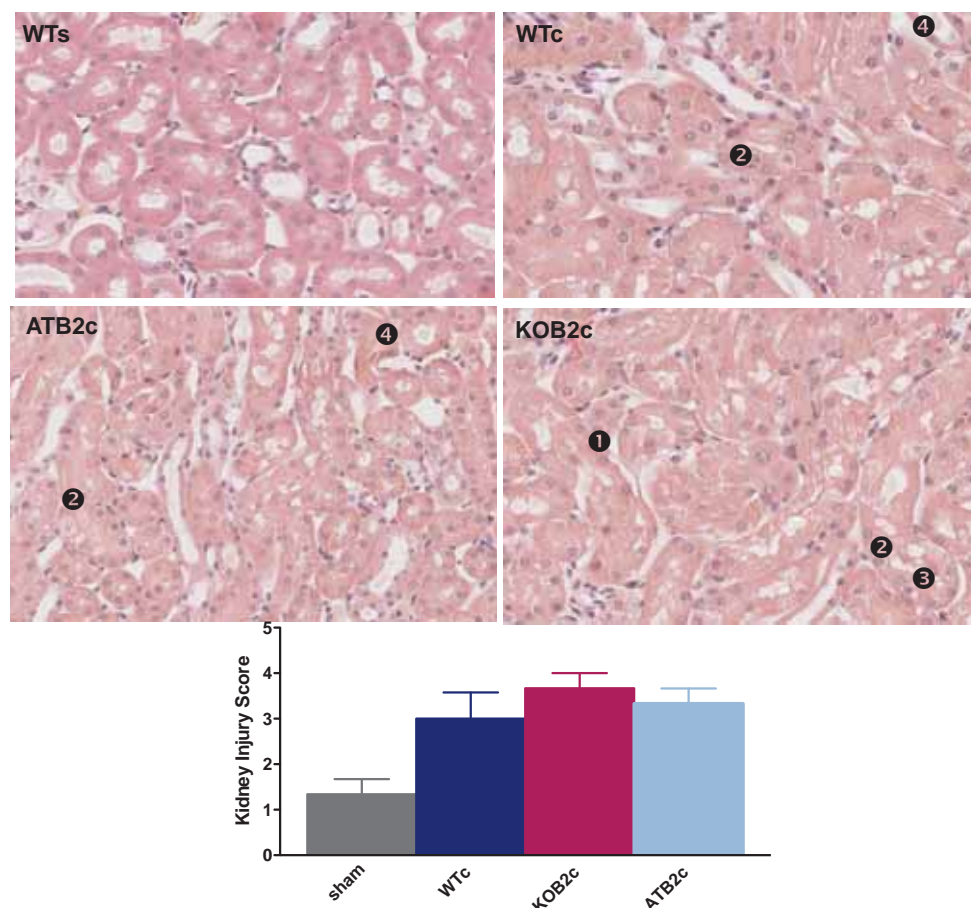
**Figure 13 : Immunohistochimie (marquage au Pimonidazole) de la jonction cortico-médullaire jusqu'au cortex.**

Histologie rénale réalisée à J2. Microscopie optique x50. WT : Wild-type ; KOB2 : souris invalidées pour le récepteur B2 ; ATB2 : souris traitées par un antagoniste du récepteur B2 ; s : sham ; c : choc (n = 3 à 5 par groupe). Le choc hémorragique induit une hypoxie plus massive et diffuse chez les souris choquées comparativement aux souris sham. Pas de différence constatée entre les WTc, KOB2c et ATB2c.

### **II.2.6.3 Histologie à J2**

Après coloration à l'Hématoxyline Eosine (HE), les souris WTc présentaient des lésions de type « turgescence cellulaire » (cell swelling) prédominantes à la jonction cortico-médullaire. Ces lésions de nécrose tubulaire aiguë associaient une vacuolisation des cellules,

la présence de débris cellulaires intratubulaires, et un aspect de désépithélialisation (figure 14). Après une évaluation semi quantitative, il n'a pas été constaté de différence significative entre les souris WTc, KOB2c et ATB2c.



**Figure 14 : Histologie de la jonction cortico-médullaire à J2 après coloration par HE.**

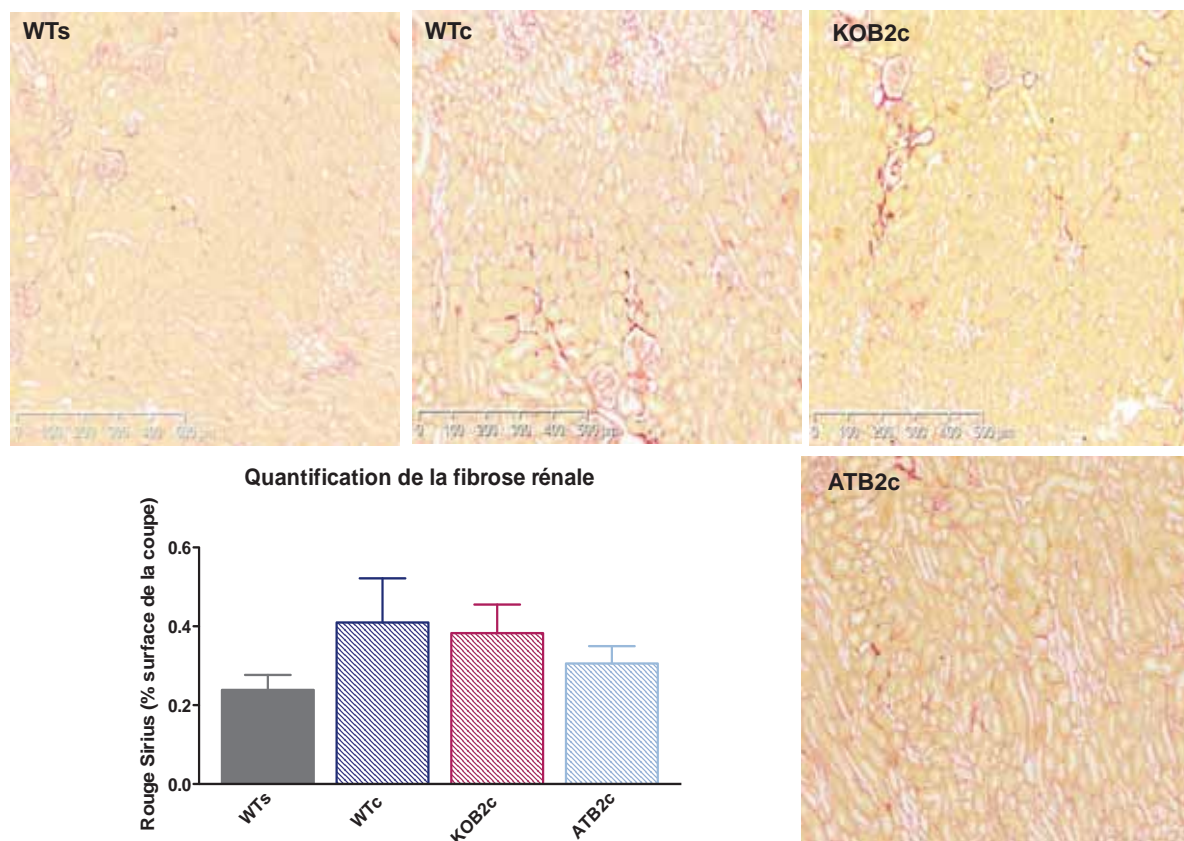
Microscopie optique x400. Mesure semi-quantitative des lésions histologiques par le Kidney Injury Score (n = 2 à 5). ❶ désépithélialisation ❷ œdème cellulaire ❸ vacuolisation cellulaire ❹ débris cellulaires intratubulaires. WTc : souris wild-type sham ; WTc : wild-type choquées. KOB2c : souris choquées invalidées pour le récepteur B2; ATB2c: souris ayant reçu un antagoniste du RB2. Lésions de NTAI à J2 du choc hémorragique chez les souris choquées. Pas de différence significative entre les groupes.

#### **II.2.6.4 Histologie à J21**

L'analyse morphologique rénale à J21 a montré la disparition des lésions d'agression tubulaire (coloration HE) initialement observées à J2. Une fibrose modérée a été constatée de façon prédominante à la jonction cortico-médullaire chez les souris choquées par rapport aux



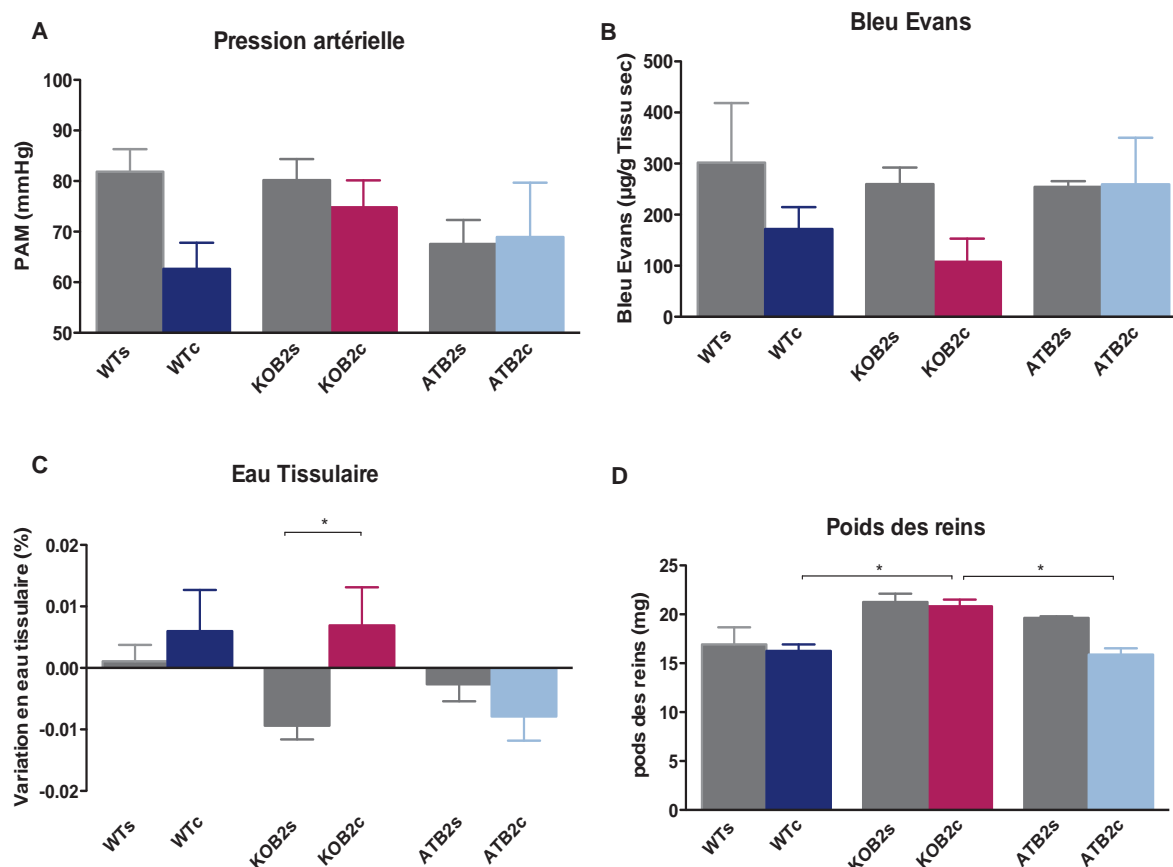
souris sham (coloration Rouge Sirius) (figure 15). Après quantification des lésions, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes. .



**Figure 15 : Histologie de la jonction cortico-médullaire à J21 après coloration par le rouge Sirius.** Microscopie optique x200. WT: souris wild-type; KOB2 : souris invalidées pour le récepteur B2 ; ATB2 : souris choquées traitées par un antagoniste du récepteur B2; s : sham; c : choc (n = 3 à 5). Après agression rénale aiguë, les souris choquées présentaient une fibrose modérée à la jonction cortico-médullaire. Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes.

## II.2.7 RB2 et perméabilité vasculaire

La perméabilité rénale aux macromolécules n'a pas été significativement altérée quelque soit le groupe (figure 16B) par contre la teneur en eau tissulaire des reins KOB2<sub>c</sub> a été significativement augmentée par rapport aux WT<sub>c</sub> (figure 16C). Contrairement aux KOB2<sub>c</sub>, les souris ATB2<sub>c</sub> ne semblent pas avoir de modification de la perméabilité vasculaire à J2 du choc hémorragique.



**Figure 16 : Variation de la perméabilité vasculaire rénale à J2 du choc hémorragique.**

A : Pression artérielle lors de l'exploration rénale à J2. B : Mesure de la perméabilité aux macromolécules par le Bleu Evans. C : Quantification de l'œdème cellulaire par la mesure des variations de la teneur en eau tissulaire (%). D : Poids des reins. n =3-5/groupe. \*p<0.05. WT : Wild type ; KOB2 : souris invalidées pour le récepteur B2 ; ATB2: souris ayant reçu un antagoniste du RB2; s : sham; c : choc. Augmentation de la perméabilité cellulaire des reins KOB2c par rapport aux WTc (augmentation de la teneur en eau tissulaire et augmentation du poids des reins). Contrairement aux KOB2c, les souris ATB2c ne semblent pas avoir de modification de la perméabilité vasculaire et cellulaire à J2 du choc hémorragique.

## II.3 Conclusion

Le modèle murin de choc hémorragique à pression contrôlée que nous avons utilisé, est un modèle suffisamment sévère pour conduire à une situation clinique d'IRA par NTAI. Contrairement à ce qui a été montré dans l'insuffisance rénale chronique, le RB2 ne semble pas jouer de rôle néphroprotecteur déterminant dans ce modèle. Par contre, par son action sur l'endothélium vasculaire, le RB2 semble avoir un impact important sur la réactivité

vasculaire. En effet, les souris choquées déficientes (KOB2) ou bloquées pharmacologiquement pour le RB2 (ATB2) ont présenté une meilleure tolérance à l'hypotension que les souris contrôles (WT). Ceci a été confirmé par l'augmentation significative du volume de sang nécessaire à prélever pour atteindre l'objectif de pression artérielle et par une réduction de la mortalité des souris ATB2 par rapport au groupe contrôle. L'implication du RB2 dans la régulation de la perméabilité vasculaire reste, par contre, moins claire. Nos résultats montrent que la perméabilité capillaire est augmentée chez les souris choquées KOB2, alors qu'elle a plutôt tendance à diminuer chez les souris choquées ATB2. Ces résultats contradictoires pourraient être en partie expliqués par la surexpression du RB1 qui a été décrite chez les souris KOB2 (46). Des investigations complémentaires sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

Nous avons montré que le RB2 participe donc bien à l'hypotension artérielle lors d'un choc hémorragique. De ce premier travail est né une réflexion nouvelle : quel serait l'impact du blocage du RB2 dans une situation où il serait suractivé, comme par exemple lors d'un traitement par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) ? Cette problématique a une application clinique importante car les IEC sont largement prescrits dans le traitement de l'hypertension artérielle, de l'insuffisance cardiaque et des maladies rénales chroniques. Cependant, ils peuvent être aussi à l'origine d'hypotensions artérielles sévères pendant l'anesthésie, et *a fortiori* en cas d'état de choc hémorragique. Dans ce cadre, le blocage aigu du RB2 pourrait donc être d'un intérêt majeur. L'objectif de la suite de ce travail a donc été d'évaluer l'intérêt de l'utilisation d'un antagoniste spécifique du RB2 pour limiter les effets hypotensifs délétères des IEC observés au cours d'une situation critique telle que l'état de choc hémorragique.

## **PARTIE III : IMPACT DU BLOCAGE DU RB2 SUR LES EFFETS DES IEC : APPLICATION À UN MODÈLE DE CHOC HÉMORRAGIQUE CONTRÔLÉ**

D'un point de vue hémodynamique, le système kinine-kallicréine (SKK) joue un rôle essentiellement vasodilatateur via l'endothélium tandis que le système rénine-angiotensine (SRA) exerce une action plutôt vasoconstrictrice. Ces 2 systèmes agissent donc de façon opposée mais aussi complémentaire. Les interactions entre ces 2 systèmes sont multiples, et l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) tient un rôle central dans ces interactions. La découverte de cette enzyme a rapidement fait naître une nouvelle classe thérapeutique : les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC).

D'un point de vue pharmacologique, nous rappellerons le rôle central de ce médicament dans la prise en charge des maladies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque chronique et les néphropathies chroniques (en particulier diabétiques). Nous expliquerons comment une classe thérapeutique aussi importante que les IEC peut être aussi responsable d'hypotensions artérielles sévères parfois même réfractaires au cours d'une anesthésie ou d'état de choc.

L'objectif de notre travail était d'évaluer l'impact du blocage aigu du RB2 sur les effets hypotensifs des IEC, dans une situation critique telle que l'état de choc hémorragique. Pour cela, nous avons évalué les effets de l'utilisation de l'HOE-140 (antagoniste du récepteur

B2) sur la pression artérielle, la défaillance multi-organique et la mortalité induite par les IEC lors d'un choc hémorragique murin à objectif de pression ou de volume.

### **III.1 Pharmacologie des IEC**

L'enzyme de conversion de l'angiotensine 1 (ECA) a été découverte par Skeggs et al. en 1956 (179), puis étudiée par Erdös dans les années 1960 (180). Vane et al. (181) ont ensuite mis en évidence les principales actions de l'ECA : production d'angiotensine II (Ang II) à partir de l'angiotensine I (Ang I) (182), mais aussi dégradation de la bradykinine (BK) (183). Ils ont par la suite décrit l'importance de l'endothélium vasculaire dans ces effets (184). La découverte de l'ECA permit rapidement la synthèse d'une nouvelle classe thérapeutique : les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) dont la première molécule, le captopril, a été synthétisée par Ondetti et Cushman dans les années 70 (185).

Les IEC agissent à la fois sur le SRA vasoconstricteur et le SKK vasodilatateur. Leurs effets bénéfiques, en particulier anti-hypertenseurs, ont été initialement rapportés à l'inhibition du SRA, mais des données plus récentes montrent que l'accumulation de BK joue un rôle sans doute aussi important (186,187). En effet, la biodisponibilité de l'Ang II n'est pas toujours modifiée lors d'un traitement par les IEC (188,189), car la synthèse d'Ang II peut être indépendante de l'ECA (190), et sa dégradation induite par l'enzyme de conversion 2 de l'angiotensine I (ECA 2). D'autre part, l'utilisation d'antagonistes du RB2 a aussi apporté des preuves expérimentales importantes en faveur l'implication de ce récepteur dans l'action des IEC (67,191,192).

Pharmacologiquement, les IEC se distinguent en 3 catégories : les sulfhydryles (captopril), les phosphonates (fosinopril) et les dicarboxylates (énalapril). Ces 3 groupes de composés diffèrent notamment par leur durée d'action, qui, pour une dose thérapeutique moyenne de captopril est de 6 à 8 h contre 12 à 18 h pour l'énalapril (193).

Les IEC sont responsables d'une diminution des résistances vasculaires périphériques, et par suite d'une chute de la pression artérielle. Cette hypotension artérielle s'accompagne de

faibles variations de la fréquence cardiaque et du débit cardiaque, contrairement à celle induite par d'autres vasodilatateurs (par exemple les inhibiteurs calciques) qui provoquent une tachycardie (194,195).

## **III.2 Les IEC dans le traitement des maladies cardiovasculaires**

Les IEC sont l'une des classes thérapeutiques les plus prescrites dans le monde. Ils sont recommandés par les sociétés savantes européennes et internationales dans le traitement de l'hypertension artérielle chronique (HTA), de l'insuffisance cardiaque chronique et de l'insuffisance rénale chronique (196–198). L'intérêt porté aux IEC, et de manière plus générale aux inhibiteurs du SRA, est sans aucun doute en rapport avec les effets bénéfiques spectaculaires obtenus (en particulier la réduction de la mortalité) dans le traitement des maladies cardiovasculaires.

D'un point de vue physiopathologique, ces effets bénéfiques ont longtemps été rapportés uniquement au blocage du SRA (199,200). Les nombreuses données cliniques et expérimentales précédemment citées prouvent que ces effets passent aussi par l'activation du SKK et en particulier du RB2 (186,187).

### **III.2.1 IEC et HTA**

Selon les recommandations de la société française d'hypertension en 2013, il est recommandé d'utiliser un IEC en première intention dans le traitement des patients

hypertendus diabétiques ou insuffisants cardiaques. Il est aussi recommandé d'utiliser en première intention un IEC plutôt qu'un ARAII, du fait de la supériorité des IEC sur le contrôle tensionnel.

C'est initialement Swartz et al. en 1979, qui ont suspecté le rôle important de la BK dans les effets hypotensifs des IEC (201). La contribution du SKK dans le contrôle tensionnel induit par les IEC a ensuite été mise en évidence dans de nombreux modèles d'hypertension artérielle chronique chez l'animal (souris (202), rat (191,203–205), et chien (206)) comme chez l'homme (207,208), en particulier grâce à l'utilisation d'antagonistes du RB2.

### **III.2.2 IEC et insuffisance cardiaque**

Les IEC représentent actuellement une des bases du traitement de l'insuffisance cardiaque. Depuis plus de 15 ans, de nombreux essais contrôlés ont largement montré que les IEC améliorent la qualité de la vie, réduisent les symptômes des patients, augmentent l'aptitude à l'effort et diminuent la mortalité. Les IEC ralentissent l'évolution des dysfonctions ventriculaires gauches. Le captopril et l'énalapril ont, les premiers, prouvé leur efficacité sur la réduction de la mortalité à moyen terme (209–212). Désormais, le traitement de l'insuffisance cardiaque congestive ne se conçoit plus sans IEC.

Les IEC sont aussi largement recommandés dans la prise en charge des infarctus du myocarde pendant la phase aigüe car ils limitent l'ischémie myocardique et le remodelage cardiaque. Ils permettent aussi de prévenir les dommages qui pourraient être causés par le syndrome d'ischémie-reperfusion (213,214).

Ces effets cardioprotecteurs ont été mis en évidence initialement par des études expérimentales, dont une partie montrent l'implication du RB2 dans ces effets, que ce soit dans le cadre de l'insuffisance cardiaque chronique (38,215,216) ou aigüe (217).



### **III.2.3 IEC et néphropathies**

L'effet protecteur rénovasculaire des IEC a été démontré dans plusieurs grandes études cliniques. L'étude REIN (The Ramipril Efficacy In Nephropathy (218)) a montré que le traitement par IEC (ramipril) chez des patients protéinuriques permettait, malgré une pression artérielle identique, de ralentir le déclin du débit de filtration glomérulaire, et de réduire le risque de développer une insuffisance rénale terminale. L'effet protecteur rénal des IEC serait supérieur à celui des autres molécules anti-hypertensives. L'étude HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation (219)) a montré que le traitement par le ramipril était associé à une réduction de la mortalité et de la morbidité cardio-vasculaires chez les patients à haut risque cardio-vasculaire. Ce bénéfice est encore plus important chez les patients présentant des pathologies rénales, ce qui suggère un effet spécifique des IEC sur la protéinurie, indépendamment de leur effet hypotenseur (220). Au niveau rénal, les IEC augmentent le débit sanguin rénal et diminuent la fraction de filtration glomérulaire, en réduisant le tonus de l'artère efférente glomérulaire et la pression intra glomérulaire (221,222). L'administration chronique d'IEC permet de diminuer la pression artérielle, non seulement chez les patients hypertendus à rénine haute, mais aussi chez les patients à rénine normale ou basse (223,224). Dans ces groupes de patients hypertendus et dans ceux souffrant d'insuffisance cardiaque, les effets bénéfiques des IEC dépendent en grande partie de l'activité des kinines. En effet, plusieurs études ont montré que les effets bénéfiques des IEC étaient considérablement réduits lors de l'antagonisation du RB2 par l'icatibant (102,225,226).

### **III.2.4 IEC et diabète**

Dans une revue de la littérature, McFarlane et al. ont mis en évidence la place centrale des IEC dans le contrôle du syndrome cardio-métabolique (associant diabète de type 2, hypertension et obésité) (199). De nombreuses études montrent que ces effets bénéfiques sont liés au blocage du SRA (199), mais aussi à une suractivation du SKK (216,217).

Le SKK joue un rôle important dans certaines fonctions « métaboliques » d'organes comme le pancréas ou le rein soulignant ainsi son action paracrine (186,227,228). Les kinines facilitent le transport du glucose et augmentent son utilisation par les cellules. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer les interactions entre BK et insuline : 1) le RB2 stimulerait la sécrétion d'insuline par les cellule Béta du pancréas ; 2) le RB2 augmenterait la consommation cellulaire du glucose en présence ou absence d'insuline ; 3) le RB2 faciliterait la phosphorylation du récepteur de l'insuline (186,199).

A l'heure actuelle, l'intérêt des IEC a largement été démontré dans le contrôle de la microangiopathie et de la macroangiopathie liées au diabète. Ils sont aujourd'hui recommandés en première intention dans le traitement et dans la prévention des angiopathies liées au diabète (229).

### **III.2.5 Conclusion**

Cette revue de la littérature permet de conclure que les IEC sont des médicaments précieux et efficaces dans le traitement des maladies cardiovasculaires. Les IEC et ARAII sont parmi des médicaments les plus étudiés et les plus utilisés au long cours avec une observance optimale car responsables de peu d'effets secondaires (230).

### **III.3 L'effet paradoxal des IEC**

#### **III.3.1 Effets bénéfiques ou délétères des IEC ?**

Les IEC, comme tous les traitements, sont associés à des effets secondaires. Certains de ces effets sont liés au radical sulfhydryle présent chez tous les IEC. Ces principaux effets secondaires sont les suivants :

- La toux est l'effet secondaire le plus fréquent. Elle est sèche, irritative et isolée. Elle survient dans environ 15% des cas, quelque soit l'IEC et la dose administrés, et elle cesse à l'arrêt de la thérapeutique. Son mécanisme d'action reste mal connu mais l'accumulation de substance P ou de BK et la stimulation de fibres vagues de type C ont été incriminées (231). Bien que relativement peu invalidante, cette toux liée à la prise des IEC impose le plus souvent de renoncer au maintien de ce traitement.

- L'hyperkaliémie est exceptionnelle chez les patients dont la fonction rénale est normale ou en l'absence d'une autre cause d'hyperkaliémie (supplémentation en potassium, diurétiques épargneurs de potassium). Elle est liée à une diminution de la sécrétion d'aldostérone. Les IEC peuvent aussi être responsables de l'aggravation d'une insuffisance rénale, en particulier chez les patients avec une hypertension rénovasculaire ou chez les patients avec une sténose des artères rénales. Cette dégradation est liée à la levée de l'action vasconstrictrice de l'Ang II sur l'artériole efférente du glomérule, ce qui entraîne une diminution de la pression d'ultrafiltration. Les IEC sont donc contre-indiqués chez les patients avec une sténose bilatérale des artères rénales.

- De façon plus rare, les IEC peuvent être associés à des réactions allergiques (comme des rash cutanés) (1%) ou à des angioedèmes (0,1-0,2%) (194). Les mécanismes responsables de ces angio-oedèmes restent mal connus, mais ils semblent impliquer l'augmentation de la production de BK via la stimulation du récepteur AT<sub>2</sub>, ou l'inhibition de sa dégradation (232).

Les résultats récents d'une étude randomisée sur l'utilisation d'un antagoniste du RB2 (icatibant) dans le traitement des œdèmes induits par les IEC confortent cette hypothèse (59).

- Enfin, les IEC sont à l'origine paradoxalement à des hypotensions artérielles parfois délétères. Ces hypotensions sont observées en particulier chez les patients dont le SRA est activé, comme par exemple lors d'un traitement par diurétique, d'un régime hyposodé, ou chez les patients insuffisants cardiaques. Elles peuvent conduire à des hypotensions artérielles sévères voir réfractaires chez les patients anesthésiés (233,234). Ces hypotensions artérielles sévères peuvent être responsables d'insuffisance rénale postopératoire et d'une augmentation de la mortalité périopératoire (234).

### **III.3.2 IEC et hypotension artérielle**

#### ***III.3.2.1 IEC et Anesthésie***

##### **III.3.2.1.a Anesthésie et hypotension artérielle**

L'hypotension artérielle en anesthésie est très mal définie car il n'existe pas de définition consensuelle. Ainsi, JB Bijker et al. ont montré qu'il existe plus de 50 définitions différentes de l'hypotension artérielle périopératoire dans 130 études publiées entre 2000 et 2007 (235). L'effet de l'anesthésie générale sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque résulte à la fois d'un effet indirect, lié à l'effet central de l'anesthésie sur l'activité de base du système sympathique, d'un effet direct des agents anesthésiques sur le système cardiovasculaire et d'une altération de la capacité d'adaptation à ces variations, par un effet

sur la fonction baroréflexe. Plusieurs études récentes rapportent des conséquences graves des variations hémodynamiques périopératoires sur le devenir à court et moyen terme des patients. Ainsi, dans le travail de Lienhart et al. sur la mortalité liée à l'anesthésie en France, une prise en charge non optimale de l'hypotension peropératoire (non définie) était une cause de mortalité, identifiée par les experts dans 39 % des dossiers analysés (236). Dans le travail de Rohrig et al. (237), une association significative entre la survenue d'une variation hémodynamique et la mortalité était trouvée, mais le lien de causalité ne pouvait être établi (mortalité en l'absence de variation hémodynamique = 1,0 % vs en cas de variation = 2,1 %,  $p < 0,001$ ). Monk et al. (238) ont recherché les facteurs indépendants de mortalité à 1 an chez 1 000 patients opérés de chirurgie générale. Ils ont montré, comme beaucoup d'autres auteurs, que les comorbidités étaient un facteur de risque indépendant majeur dans la mortalité postopératoire (OR [IC 95 %] = 16 [10–34], OR : odds ratio (OR) IC : intervalle de confiance), mais aussi que chaque minute passée avec une pression artérielle systolique < 80 mm Hg augmentait le risque de décès à 1 an (OR [IC 95 %] = 1,036 [1,01–1,06]).

La survenue d'une hypotension artérielle en anesthésie, quelle qu'en soit la cause, est associée à une augmentation de la morbi-mortalité. L'association d'une anesthésie (et *a fortiori* d'un état de choc) avec la prise d'un traitement anti-hypertenseur comme les IEC a été étudiée afin d'évaluer le retentissement périopératoire et adapter la gestion de ces traitements.

### **III.3.2.1.b IEC et hypotension artérielle péri-opératoire**

Le rôle central des IEC dans le traitement de l'hypertension artérielle, de l'insuffisance cardiaque et de l'insuffisance rénale chronique a suscité une augmentation constante du nombre de patients traités par IEC. La question de la gestion des IEC en période périopératoire s'est donc posée. Il a été initialement proposé d'administrer, comme pour les bêtabloquants, les IEC le matin de l'intervention chirurgicale. Rapidement, des épisodes

d'hypotension artérielle sévères au cours de l'anesthésie, en particulier après l'intubation orotrachéale ont été observés (233,239–241). La fréquence et la sévérité des hypotensions artérielles, ainsi que les complications associées à ces hypotensions, ont été étudiées en chirurgie cardiaque (242,243) et non cardiaque (233,239–241). Certaines études ont montré une relation entre le maintien des inhibiteurs du SRA et la survenue d'une insuffisance rénale aiguë (244,245), d'une fibrillation auriculaire (246), voir même une augmentation de la mortalité périopératoire (233,234). Malgré ces effets délétères, la poursuite des IEC en périopératoire reste discutée (234,247). En effet, les études précédemment citées ont été ensuite controversées par des études plus récentes qui montrent l'absence d'effet délétère des inhibiteurs du SRA en chirurgie générale et cardiaque malgré le nombre plus fréquent d'hypotension artérielle (248,249).

Compte tenu de ces différentes données, de nouvelles recommandations ont été proposées en 2013 et 2014 par les sociétés européennes (ESC) (250) et américaines (AHA) (251) pour la gestion des patients sous inhibiteurs du SRA en périopératoire. Il semble « raisonnable » par la société américaine de les poursuivre (recommandation de classe IIa, accord de niveau B). En cas d'arrêt des inhibiteurs du SRA, il est aussi recommandé de reprendre ce traitement le plus tôt possible (accord de niveau C). Concernant la société européenne, elle stratifie les patients en deux groupes selon que les patients sont hypertendus ou insuffisants cardiaques chroniques. Il est recommandé de maintenir les inhibiteurs du SRA en périopératoire chez les patients insuffisants cardiaques, voir même de les introduire une semaine avant la chirurgie (recommandations de classe IIa, accord de niveau C) pour éviter une éventuelle décompensation cardiaque périopératoire. Chez les patients hypertendus chroniques, il est recommandé d'interrompre le traitement par inhibiteurs de SRA en préopératoire compte tenu du nombre et de l'importance des hypotensions artérielles périopératoire (recommandations de classe IIa, niveau C).

Ces nouvelles recommandations vont conduire dans les années à venir à une augmentation du nombre de patients sous inhibiteurs du SRA en périopératoire. Cependant la gestion périopératoire des hypotensions artérielles sévères induites par les inhibiteurs du SRA reste empirique et basée sur une expansion volémique et l'utilisation de vasopresseurs (252).

### ***III.3.2.2 IEC et état de choc hémorragique***

Lors d'un choc hémorragique, l'organisme met en jeu plusieurs systèmes de régulation visant à maintenir la perfusion des organes « nobles », comme le cerveau et le cœur (253), au détriment d'autres territoires comme les territoires splanchnique, rénal et musculo-cutané (131). Quelques travaux anciens se sont intéressés à l'impact des IEC au cours du choc hémorragique et suggèrent un effet potentiellement bénéfique des IEC grâce à une amélioration de la perfusion tissulaire. Dans une étude publiée en 1984, Freeman et al. ont montré chez le chat qu'une injection d'acide enalaprilic (IEC non commercialisé aujourd'hui) augmentait (paradoxalement) la pression artérielle et améliorait la perfusion d'organe (254). Dans une autre étude publiée en 1982, Rosenfeld et al. ont montré que l'utilisation d'un IEC (captopril) améliorait les lésions d'ischémie-reperfusion au niveau intestinal observées au cours d'un choc hémorragique chez le chat (255). Ces données anciennes (avec un faible niveau de preuve) n'ont pas été confortées par de nouvelles études. En revanche, les nombreuses publications en anesthésie montrent que l'aggravation des hypotensions artérielles induite par les IEC peut être potentiellement délétère et donc *a fortiori* au cours d'un état de choc hémorragique.

### **III.4 Contribution personnelle : Impact du blocage aigu du RB2 sur les effets hypotenseurs des IEC au cours d'un état de choc hémorragique**

*Ce travail a fait l'objet de 2 communications orales au congrès de la société française d'anesthésie-réanimation (SFAR) et au congrès de physiologie et de biologie intégrative (CPBI) (annexe 1). Il a été ensuite valorisé par une publication dans le journal Critical Care Medicine (256), ainsi par le dépôt d'un brevet en avril 2014 (annexe 2).*

#### **III.4.1 Introduction**

Comme décrit précédemment dans la partie II, nous avons étudié la place du RB2 dans la protection contre l'agression rénale aiguë induite par un choc hémorragique à pression contrôlée dans un modèle de souris knockout pour le RB2 ou bloquées pharmacologiquement par un antagoniste du RB2 (HOE-140). Dans ce premier travail, nous avons montré que : 1) le RB2 est impliqué dans les effets hémodynamiques induits par le choc hémorragique ; 2) le blocage pharmacologique du RB2 semble avoir un effet protecteur puisqu'il diminue la mortalité des souris choquées ATB2.

L'intérêt de ce deuxième travail est né d'une triple réflexion : 1) le blocage du RB2 pourrait exercer un effet protecteur lors d'un choc hémorragique ; 2) plusieurs études ont montré dans des modèles d'hypertension artérielle chronique (191,202–204) ou d'insuffisance cardiaque chronique (206), que les effets hypotenseurs des IEC peuvent être limités par le blocage du RB2 ; 3) chez les patients anesthésiés et/ou en état de choc traités par IEC, la survenue d'une hypotension artérielle sévère, parfois même réfractaire, est responsable d'une augmentation de la morbi-mortalité périopératoire (233,234).



En conséquence, l'hypothèse de ce troisième travail était que le blocage aigu du RB2, dans une situation critique comme l'état de choc hémorragique, limite l'aggravation des effets hypotensifs délétères des IEC.

### **III.4.2 Description du schéma expérimental**

Pour répondre à cette question, nous avons étudié l'impact des IEC et du blocage aigu du RB2 par l'HOE-140 dans 2 protocoles de choc hémorragique contrôlé : un choc hémorragique à objectif de pression ( $35 \pm 5$  mmHg) pour évaluer l'impact hémodynamique, et un choc hémorragique à objectif de volume (0,3 mL) pour étudier le retentissement sur la défaillance d'organe. L'impact des différents traitements a été analysé à l'aide de 5 groupes : 1) un groupe de souris sham correspondant aux souris anesthésiées-opérées mais non choquées (sham) ; 2) un groupe de souris choquées non traitées dites contrôles (contrôle) ; 3) un groupe de souris choquées traitées pendant 7 jours précédents le choc par IEC (Ramipril) (IEC) ; 4) un groupe de souris choquées traitées par IEC pendant 7 jours précédents le choc et par une injection d'HOE-140 juste avant le choc (IEC+HOE) ; 5) un groupe de souris choquées traitées par une injection d'HOE-140 juste avant le choc hémorragique (HOE).

L'impact des IEC et du blocage du RB2 par l'HOE-140 a été étudié au niveau hémodynamique par la mesure de la pression artérielle moyenne, et au niveau de la perfusion tissulaire systémique par la mesure de la lactatémie.

### **III.4.3 Résultats et discussion**

Nos résultats apportent plusieurs informations: 1) ils confirment l'implication du RB2 dans la régulation de la pression artérielle et dans les effets hypotensifs induits par les IEC ; 2) le blocage aigu du RB2 par l'HOE-140 permet de limiter l'aggravation des effets hypotensifs des IEC au cours d'un état de choc hémorragique ; 3) cet effet bénéfique hémodynamique s'accompagne d'une augmentation moins importante de la lactatémie ; 4) cet effet est immédiat et obtenu après une seule injection d'HOE-140.

Ce travail met en évidence pour la première fois l'intérêt potentiel de l'utilisation d'un antagoniste du RB2 pour limiter l'aggravation des effets hypotensifs induits par des IEC au cours d'une situation critique telle que l'état de choc.

**Manuscrit n°1**

**Acute bradykinin receptor blockade during hemorrhagic shock in mice prevents the worsening hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor.**

Hélène Charbonneau, Marie Buléon, Vincent Minville, Stanislas Faguer, Jean-Pierre Girolami, Jean-Loup Bascands, Ivan Tack, Nicolas Mayeur.

# Acute Bradykinin Receptor Blockade During Hemorrhagic Shock in Mice Prevents the Worsening Hypotensive Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor

Hélène Charbonneau, MD<sup>1-4</sup>; Marie Buléon, PhD<sup>1,2</sup>; Vincent Minville, MD, PhD<sup>3,4</sup>;  
Stanislas Faguer, MD, PhD<sup>1,2</sup>; Jean-Pierre Girolami, PhD<sup>1,2</sup>; Jean-Loup Bascands, PhD<sup>1,2</sup>;  
Ivan Tack, MD, PhD<sup>1,2</sup>; Nicolas Mayeur, MD, PhD<sup>1-4</sup>

**Objectives:** Angiotensin-converting enzyme inhibitors are associated with deleterious hypotension during anesthesia and shock. Because the pharmacologic effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors are partly mediated by increased bradykinin B2 receptor activation, this study aimed to determine the impact of acute B2 receptor blockade during hemorrhagic shock in angiotensin-converting enzyme inhibitor-treated mice.

**Design:** In vivo study.

**Setting:** University research unit.

**Subjects:** C57/Bl6 mice.

**Interventions:** The hemodynamic effect of B2 receptor blockade using icatibant (B2 receptor antagonist) was studied using a pressure-targeted hemorrhagic shock and a volume-targeted hemorrhagic shock. Animals were anesthetized with ketamine and xylazine (250 mg/kg and 10 mg/kg, respectively), intubated

using intratracheal cannula, and ventilated (9 mL/kg, 150 min<sup>-1</sup>). Five groups were studied: 1) sham-operated animals, 2) control shocked mice, 3) shocked mice treated with ramipril for 7 days (angiotensin-converting enzyme inhibitors) before hemorrhagic shock, 4) shocked mice treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors and a single bolus of icatibant (HOE-140) immediately before anesthesia (angiotensin-converting enzyme inhibitors + icatibant), and 5) shocked mice treated with a single bolus of icatibant. One hour after volume-targeted hemorrhagic shock, blood lactate was measured to evaluate organ failure.

**Measurements and Main Results:** During pressure-targeted hemorrhagic shock, the mean blood volume withdrawn was significantly lower in the angiotensin-converting enzyme inhibitor group than in the other groups ( $p < 0.001$ ). During volume-targeted hemorrhagic shock, icatibant prevented blood pressure lowering in the angiotensin-converting enzyme inhibitor group ( $p < 0.001$ ). Blood lactate was significantly higher in the angiotensin-converting enzyme inhibitor group than in the other groups, particularly the HOE groups.

**Conclusions:** During hemorrhagic shock, acute B2 receptor blockade significantly attenuates the deleterious hemodynamic effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment in mice. This beneficial effect of B2 receptor blockade is rapidly reached and sustained with a single bolus of icatibant. This benefit could be of interest in angiotensin-converting enzyme inhibitor-treated patients during both emergency anesthesia and resuscitation. (*Crit Care Med* 2016; XX:00-00)

**Key Words:** angiotensin-converting enzyme inhibitor; arterial hypotension; blood lactate; bradykinin receptor; hemorrhagic shock; icatibant

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1048, Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires, Toulouse, France.

<sup>2</sup>Université Paul Sabatier Toulouse III, Toulouse, France.

<sup>3</sup>EA 4564 "Modélisation de l'agression tissulaire et nociceptive", Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

<sup>4</sup>Pôle Anesthésie-Réanimation, CHU Purpan, Toulouse, France.

All authors contributed to this study, which was designed by Drs. Charbonneau, Tack, and Mayeur. Drs. Charbonneau and Buléon performed the experimental procedures and recovered the data. Drs. Charbonneau, Buléon, Minville, Faguer, Girolami, Bascands, Tack, and Mayeur helped draft this report or helped critically revise the draft. All authors reviewed and approved the final version of this report.

Dr. Charbonneau received support for this article research from the National Institutes of Health and disclosed government work. Dr. Bascands disclosed government work. Dr. Mayeur received support for this article research from the Faculté médecine Toulouse/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. The remaining authors have disclosed that they do not have any potential conflicts of interest.

For information regarding this article, E-mail: helenecharbs@hotmail.com

Copyright © 2016 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

DOI: 10.1097/CCM.0000000000001646

Angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEi) is one of the recommended therapeutic classes of drugs in the treatment of hypertension and chronic heart or kidney diseases (1). However, ACEi is also responsible for

Charbonneau et al

severe hypotension during anesthesia and are associated with increased renal failure and mortality (2). The pharmacologic effects of ACEi are mediated by both a decrease in angiotensin II formation and an increase in bradykinin (BK) bioavailability. This increase is believed to act on the constitutive B2 receptor (B2R), which leads to the formation of nitric oxide and vasodilator prostaglandins, in addition to other molecules (3).

HOE-140 (icatibant) is a high affinity, specific B2R antagonist (4). Icatibant received Food and Drug Administration approval in 2011 for the treatment of acute attacks of hereditary angioedema in adults, and so far, no detrimental clinical side effects have been reported. Icatibant also attenuates the hypotensive effect of ACEi in different models of hypertension (5, 6) and in normal men (7, 8). Nevertheless, the ability of icatibant to rapidly suppress the hypotensive effect of ACEi during critical conditions, such as anesthesia or shock, is unknown. This effect could be of great value for ACEi-treated patients during both emergency anesthesia and resuscitation. This study investigated the impact of acute B2R blockade with icatibant during volume-targeted hemorrhagic shock (VTS) or pressure-targeted hemorrhagic shock (PTS) in ACEi-treated mice for the first time.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

The animal experiments were performed according to the National and Institutional Animal Care and Ethical Guidelines and were approved by the local board.

### Protocol Design

Based on our recently published hemorrhagic shock model (9), we studied the hemodynamic and biologic effects of icatibant in ACEi-treated mice using two protocols: 1) a PTS protocol and 2) a VTS protocol.

The animals used in this study were 18- to 24-week-old C57/BL6 wild-type mice (Harlan, Gannat, France) with an average body weight of  $20.6 \pm 1.3$  g. The mice were randomly assigned to the following groups: 1) sham-operated animals who underwent the same anesthetic and surgical procedures but not PTS or VTS (sham,  $n = 7$  for PTS and VTS), 2) control shocked mice (control,  $n = 10$  for PTS and VTS), 3) shocked mice treated with ACEi (ACEi,  $n = 6$  for PTS and  $n = 12$  for VTS), 4) shocked mice treated with ACEi and a single bolus of icatibant (ACEi + HOE,  $n = 6$  for PTS and  $n = 10$  for VTS), and 5) shocked mice treated with a single bolus of icatibant (HOE,  $n = 7$  for PTS and VTS). The experimental groups were identical for the two protocols. ACEi (ramipril, Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was given at a dose of 1 mg/kg per day in drinking water (at a concentration of 5  $\mu$ g/mL) during the 7 days prior to shock. The drinking bottles were weighed to ensure that ramipril was consumed. The average water intakes in the ACEi-treated and control mice were not different. Icatibant (Sigma) was subcutaneously administered at a dose of 250  $\mu$ g/kg immediately before anesthesia. The mice were sacrificed at 2 days and 1 hour after the shock procedure for PTS and VTS, respectively.

### Hemorrhagic Shock Protocols

Hemorrhagic shock was induced as previously described (9). Briefly, the animals were anesthetized with ketamine and xylazine (250mg/kg and 10mg/kg, respectively) and intubated using an intratracheal cannula. Mechanical ventilation (9 mL/kg, 150/min) was carried out, without any ventilator setting modification during the procedure, with a specific ventilator Minivent 845 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany). The left jugular vein and femoral artery were catheterized, and ketamine (20 mg/kg/hr) was continuously infused until the end of the shock procedure. Throughout the procedure, femoral arterial blood pressure was monitored using a blood pressure analyzer (IOX, EMKA Technologie, Paris, France).

PTS: blood was withdrawn through the femoral arterial line until the targeted arterial blood pressure (mean arterial pressure [MAP]) of 35 mm Hg was reached, and hypotension was maintained for 2 hours by successive blood withdrawal or replacement (by steps of 0.025 mL).

VTS: a systematic blood volume of 0.30 mL was withdrawn through the femoral arterial line. This volume corresponds to the mean volume of blood withdrawn in the ACEi-treated mice during PTS. As in PTS, the blood was stored in 0.10 mL heparinized serum.

In both protocols, the blood that was previously removed and stored was reinfused at the end of the 2-hour period of shock with the addition of a lactated Ringer solution (the volume of the initial blood withdrawn) to ensure appropriate fluid volume restoration.

### Hemodynamic Analysis

MAP was recorded in all animals for the duration of the experiment. Six values are reported here: 1) during anesthesia immediately before shock, 2) at the beginning of shock (initial MAP), 3) the lowest MAP during shock (lowest MAP) for VTS protocol, 4) the average of MAP during shock (average MAP), 5) at the end of the shock (end MAP) for PTS protocol, and 6) at the end of resuscitation (resuscitation). In the PTS protocol, the volume of blood withdrawn was systematically reported. Only hemodynamic data from surviving mice were included for analysis.

### Biologic Analysis

At the end of the procedure, a catheter was introduced into the abdominal aorta, and blood was collected. A biologic analysis was performed on arterial whole blood. Blood lactate, a prognostic marker of severity, was measured at the time of sacrifice to evaluate organ failure.

### Statistical Analysis

Data are presented as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between groups were performed using the nonparametric Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by the post hoc Dunn test. The results with  $p$  value less than 0.05 were considered statistically significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA).

**RESULTS**

**Icatibant Increases Tolerance to Blood Volume Depletion**

For the PTS protocol, the MAP values for the control, ACEi, ACEi + HOE, and HOE groups are reported in **Figure 1A**. The ACEi group had a significantly lower MAP during anesthesia and before shock than the ACEi + HOE group ( $p < 0.01$ ). MAP during resuscitation was significantly lower in the ACEi group than in the HOE group ( $p < 0.05$ ). As expected, no difference in MAP was observed between any of the groups during hemorrhagic shock (Fig. 1A).

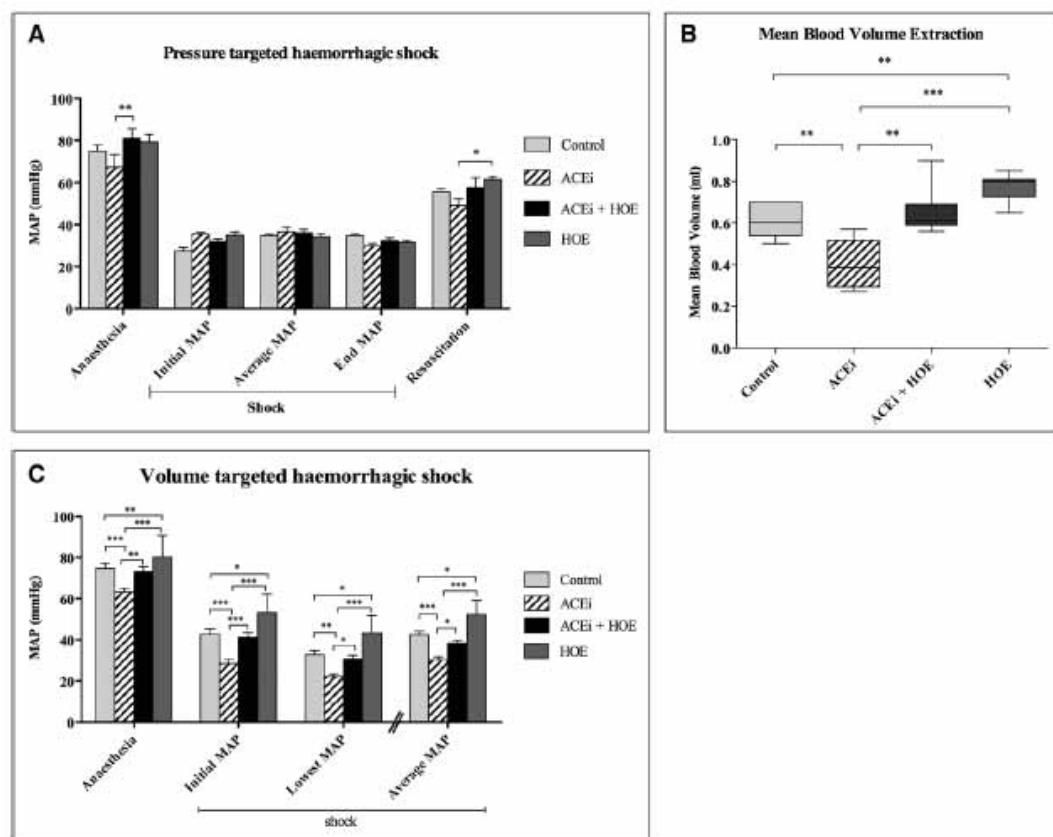
The mean blood volumes withdrawn during the PTS protocol (Fig. 1B) were  $612 \pm 118 \mu\text{L}$  in the control group,  $402 \pm 117 \mu\text{L}$  in the ACEi group,  $631 \pm 124 \mu\text{L}$  in the ACEi + HOE group, and  $773 \pm 63 \mu\text{L}$  in the HOE group. The mean blood volume

withdrawn was significantly lower in the ACEi group than in the other groups.

**Icatibant Prevents ACEi-Induced Decreases in MAP**

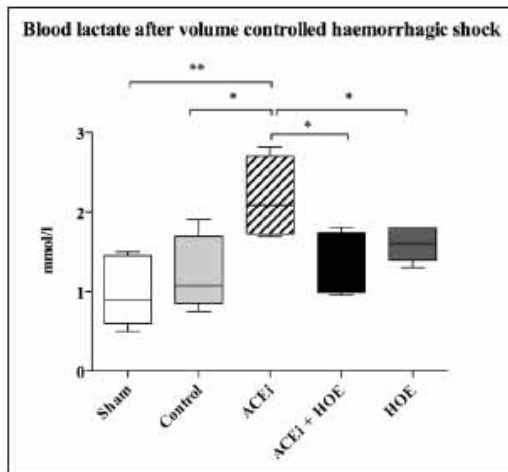
For the VTS protocol, the MAP values in the control, ACEi, ACEi + HOE, and HOE groups are reported in **Figure 1C**. At each time point, MAP was significantly lower in the ACEi group than in the control, ACEi + HOE, and HOE groups. No difference in MAP was observed between the control and ACEi + HOE groups.

During the VTS protocol, no deaths were observed in the sham, control, or HOE groups. In the ACEi group, four of the 12 mice died (two at the beginning of shock and two during resuscitation). In the ACEi + HOE group, two of the 10 mice died during resuscitation. Despite a lower number of mice, the



**Figure 1.** Hemodynamic impacts of icatibant during pressure-targeted hemorrhagic shock (PTS) and volume-targeted hemorrhagic shock (VTS) in mice under prolonged treatment with angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi). Control: control shocked mice; ACEi: shocked mice treated with ACEi; ACEi + HOE: shocked mice treated with both ACEi and a single injection of icatibant (HOE); and HOE: shocked mice treated with a single injection of icatibant (HOE). **A**, Mean arterial blood pressure (MAP) values in the PTS protocol before shock (anesthesia), during shock (initial MAP, average MAP, and end MAP), and at the end of resuscitation (resuscitation) ( $n = 6-10$  per group). **B**, Mean blood volume withdrawn to reach a targeted arterial blood pressure of 35 mm Hg in PTS ( $n = 6-10$  per group). **C**, MAP values in VTS protocol before shock (anesthesia) and during shock (initial MAP, lowest MAP, and average MAP) ( $n = 7-10$  per group). Only surviving mice were included in the hemodynamic analysis. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ .

Charbonneau et al



**Figure 2.** Determination of blood lactate after volume-targeted hemorrhagic shock. Sham: sham-operated animals underwent the same anesthetic and surgical procedures, but neither hemorrhage nor fluid resuscitation was performed. Control: control shocked mice; angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) shocked mice treated with ACEi; ACEi + HOE shocked mice treated with both ACEi and a single bolus of icatibant (HOE); HOE: shocked mice treated with a single bolus of icatibant (HOE) ( $n = 6-8$ ).  $^*p < 0.05$ .

mortality in the ACEi + HOE group was not different from that of the ACEi group ( $p = 0.673$ ).

#### Protective Effect of Icatibant Against Organ Failure

One hour after VTS, blood lactate was significantly higher in the ACEi group than in the other groups, particularly the ACEi + HOE group (Fig. 2).

#### DISCUSSION

Here, for the first time, we report the observation that acute B2R blockade by icatibant attenuates the deleterious hypotensive effect of prolonged ACEi treatment during hemorrhagic shock in mice. The beneficial effect of icatibant on arterial blood pressure was demonstrated using two different protocols. The aim of the PTS experiment was to determine the hemodynamic impact of icatibant, whereas the aim of the VTS experiment was to assess the impact of icatibant on hemorrhagic shock outcome in ACEi-treated mice.

ACEi is a valuable therapy for the management of hypertension, cardiac failure, and chronic kidney diseases (1). Growing evidence indicates that the antihypertensive and cardioprotective effects of ACEi are partially related to an increase in endogenous BK bioavailability, which leads to enhanced B2R activation (3). The hemodynamic effect of B2R blockade by icatibant has been studied in normal men during acute (7) and chronic (8) ACEi treatment. Those studies showed that BK is involved in the regulation of arterial blood pressure and that B2R antagonism can attenuate the effect of ACEi on MAP. This study was the first to extend these observations to critical conditions, specifically VTS and PTS. Our results show that

B2R blockade by icatibant exerts a significant protective effect on systemic hemodynamic. Indeed, for both protocols, acute B2R blockade significantly attenuated the worsening effect of ACEi on hypotension. This beneficial effect of B2R blockade is quickly reached and sustainable with a single shot of icatibant. Our results show that icatibant in ACEi-treated mice prevents the increase in plasma lactate, a prognostic marker of morbidity and mortality during shock (10). Icatibant also improved the tolerance to blood volume depletion and, as a consequence, reduced the total fluid volume requirement during resuscitation. Taken together, these results suggest that icatibant could be of high interest for preventing hypotension in ACEi-treated patients during both emergency anesthesia and resuscitation. However, further work is necessary to determine the pathophysiological impact of icatibant on organ failure in this model before any anthropomorphism.

#### CONCLUSIONS

During hemorrhagic shock, acute B2R blockade significantly attenuates the deleterious hemodynamic effect of ACEi treatment in mice. This beneficial effect of B2R blockade is rapidly reached and sustained with a single bolus of icatibant. This benefit of icatibant could be of interest in ACEi-treated patients during both emergency anesthesia and resuscitation.

#### REFERENCES

- James PA, Oparil S, Carter BL, et al: 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: Report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 2014; 311:507-520
- Auron M, Harte B, Kumar A, et al: Renin-angiotensin system antagonists in the perioperative setting: Clinical consequences and recommendations for practice. *Postgrad Med J* 2011; 87:472-481
- Rhaleb NE, Yang XP, Carretero OA: The kallikrein-kinin system as a regulator of cardiovascular and renal function. *Compr Physiol* 2011; 1:971-993
- Rhaleb NE, Rouissi N, Jukic D, et al: Pharmacological characterization of a new highly potent B2 receptor antagonist (HOE 140: D-Arg-[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Orn8]bradykinin). *Eur J Pharmacol* 1992; 210:115-120
- Linz W, Schölkens BA: A specific B2-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br J Pharmacol* 1992; 105:771-772
- Bulson M, Allard J, Jaafar A, et al: Pharmacological blockade of B2-kinin receptor reduces renal protective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in db/db mice model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294:F1249-F1256
- Squire IB, O'Kane KP, Anderson N, et al: Bradykinin B(2) receptor antagonism attenuates blood pressure response to acute angiotensin-converting enzyme inhibition in normal men. *Hypertension* 2000; 36:132-136
- Gainer JV, Morrow JD, Loveland A, et al: Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N Engl J Med* 1998; 339:1285-1292
- Mayeur N, Minville V, Jaafar A, et al: Morphologic and functional renal impact of acute kidney injury after prolonged hemorrhagic shock in mice. *Crit Care Med* 2011; 39:2131-2138. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21572325>. Accessed May 28, 2011
- Manikis P, Jankowski S, Zhang H, et al: Correlation of serial blood lactate levels to organ failure and mortality after trauma. *Am J Emerg Med* 1995; 13:619-622

**Manuscrit n°2**

**BR2 antagonist for use in the prevention of the hypotensive effect of patient treated with  
angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi)**

**Inventeur(s)** Charbonneau Hélène ; Mayeur Nicolas ; Tack Ivan

**Demandeur(s)** INSERM; Université Paul Sabatier Toulouse; Centre Hospitalier universitaire  
de Toulouse; Assistance publique hôpitaux de Paris

Numéro de demande WO2015EP57800 20150410

Numéro de priorité: EP20140305523 20140410

**(Annexe n°2)**





Espacenet

### Données bibliographiques: WO2015155323 (A1) — 2015-10-15

**BR2 ANTAGONIST FOR USE IN THE PREVENTION OF THE HYPOTENSIVE EFFECT OF PATIENT TREATED WITH ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORS (ACEI)**

**Inventeur(s)** CHARBONNEAU HÉLÈNE [FR]; MAYEUR NICOLAS [FR]; TACK IVON [FR] + (CHARBONNEAU, HÉLÈNE, ; MAYEUR, NICOLAS, ; TACK, IVON)

**Demandeur(s)** INSERM INST NAT DE LA SANTÉ ET DE LA RECH MÉDICALE [FR]; UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III [FR]; CT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE TOULOUSE [FR]; ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS AHP [FR] + (INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE), ; UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III, ; CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE TOULOUSE, ; ASSISTANCE PUBLIQUE-HÔPITAUX DE PARIS (AHP))

**Classification:** - internationale A61K31/402; A61K31/445; A61K31/4709; A61K31/496; A61K38/08; A61P9/00  
- coopérative A61K31/402; A61K31/445; A61K31/4709; A61K31/496; A61K38/08

**Numéro de demande** WO2015EP57800 20150410

**Numéro(s) de priorité:** EP20140305523 20140410

**Abrégé pour WO2015155323 (A1)**

The present invention relates to a method of preventing and/or treating the hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) in a patient treated with ACEI, said patient being under a critical condition. More specifically, it concerns the use of a Bradykinin 2 receptor (BR2) antagonist for the prevention and treatment of the hypotensive effect of ACEI in a patient treated with ACEI undergoing emergency anaesthesia or shock resuscitation like hypovolemic shock (i.e. hemorrhagic shock (HS), or vasoplegic shock (i.e. septic shock).

## **III.5 IEC et les médiateurs de l'hémodynamique**

### **III.5.1 Potentialisation de l'activation du RB2 par les IEC**

Du fait de l'équipement enzymatique spécifique de la cellule endothéliale, en particulier de la présence de la forme endothéliale de la synthase du monoxyde d'azote (eNOS), l'activation du RB2 se traduit par des effets vasomoteurs relaxant puissants (23). Par ailleurs, plusieurs données expérimentales montrent une interaction moléculaire entre l'ECA et le RB2 responsable d'une potentialisation des effets du RB2 (257–261). Par exemple, en utilisant des cellules endothéliales humaines et bovines en culture, Wiemer et al. ont montré une augmentation de la production de NO et PGI<sub>2</sub> induite par les IEC grâce à l'accumulation importante de BK endogène (257). La production de NO a été évaluée indirectement par la mesure du GMPc intracellulaire, et de la PGI<sub>2</sub> par un dosage radio-immunologique spécifique. L'augmentation de la production de GMPc induite par les IEC a été inhibée par l'utilisation d'un antagoniste spécifique du RB2 ou par le blocage de la production du NO avec le L-NAME. Ces données indiquent que des cellules endothéliales en culture provenant de différentes espèces sont capables de produire et de libérer de la BK dans le milieu extracellulaire. La BK est alors responsable d'une stimulation prolongée de la formation de NO et de PGI<sub>2</sub>, à condition que sa dégradation ait été bloquée par un IEC. Ces données ont été aussi étayées par le fait que la demi-vie de la BK exogène est augmentée en présence d'un IEC (258).

Par ailleurs, Minshall et al. (259) ont montré, en utilisant une préparation d'oreillette de cobaye, que les IEC sont capables de potentialiser les effets inotropes de la BK. Cette propriété semble indépendante de l'action de l'inhibiteur sur le métabolisme de la BK, et a été

attribuée à une moindre désensibilisation du récepteur correspondant. Ces observations ont été confirmées dans un modèle de cellules CHO (*Chinese hamster ovary*) transfectées avec les gènes codant l'ECA et le RB2 (260,261). Dans ce modèle cellulaire, la présence d'un IEC augmente le nombre de RB2, augmente leur affinité pour la BK, et prévient leur désensibilisation et leur endocytose. Cet effet des IEC entraîne une formation accrue d'IP3 intracellulaire et d'acide arachidonique (260,261).

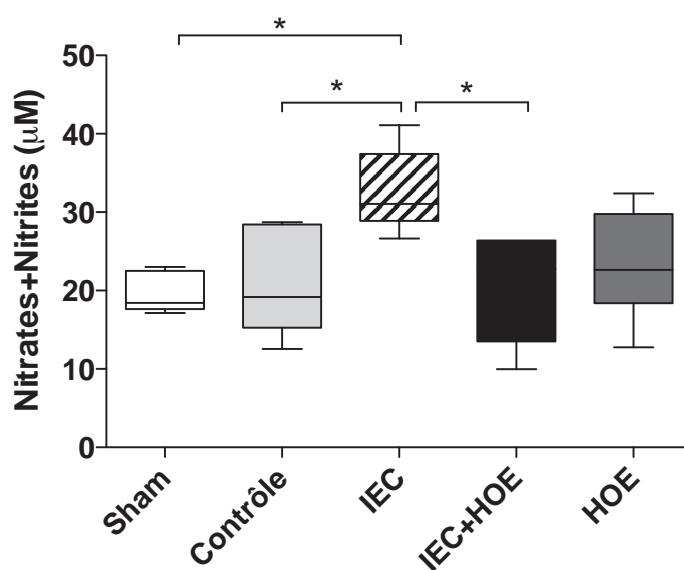
Les effets pharmacologiques des IEC sont donc bien liés à l'inhibition de la dégradation de la BK. L'accumulation de BK qui résulte de cet effet potentialise l'activité du RB2 et par suite, augmente la production de NO et de prostaglandines.

### **III.5.2 Contribution personnelle : participation de la voie du NO dans les effets hypotenseurs des IEC au cours d'un état de choc hémorragique contrôlé**

Nous avons montré, dans un modèle murin de choc hémorragique à objectif de pression, puis un modèle à objectif de volume, qu'il était possible d'inhiber les effets hypotenseurs des IEC par l'injection d'une dose d'icatibant (HOE-140) avant le début du choc. Afin de mieux comprendre par quel mécanisme cet effet a été obtenu et compte tenu des données de la littérature précédemment citées, nous avons fait le choix d'étudier l'effet du blocage aigu du RB2 sur l'activation de la voie du NO au cours d'un état de choc hémorragique à objectif de volume. Pour cela, nous avons étudié la voie du NO à 3 niveaux : 1) par l'analyse de l'expression de la eNOS par la technique du western blot, 2) par le dosage du GMPc, et 3) par le dosage des nitrites ( $\text{NO}^{2-}$ ) et nitrates ( $\text{NO}^{3-}$ ) issus de la dégradation du NO. De façon comparable au protocole précédent, nous avons analysé 5 groupes : 1) un groupe de souris

sham correspondant aux souris anesthésiées-opérées mais non choquées (sham) ; 2) un groupe de souris choquées dites contrôles (contrôle) ; 3) un groupe de souris choquées traitées pendant 7 jours par IEC (IEC) ; 4) un groupe de souris choquées traitées par IEC pendant 7 jours et par une injection d'HOE-140 avant le choc hémorragique (IEC+HOE) ; 5) un groupe de souris choquées traitées par une injection d'HOE-140 avant le choc hémorragique (HOE).

Le dosage des nitrates et nitrites a été fait par une technique colorimétrique. Les résultats montrent qu'au cours d'un choc hémorragique à volume contrôlé, la production de nitrates et de nitrites a été significativement plus importante dans le groupe des souris sous IEC par rapport aux autres groupes et que cet effet a été inhibé par le blocage aigu du RB2 par l'HOE-140 (figure 17).



**Figure 17 : Dosage de la production de nitrates et nitrites par méthode colorimétrique.**

Sham : souris anesthésiées non choquées ; contrôle: souris choquées ; IEC : souris choquées prétraitées pendant 7 jours par IEC ; IEC+HOE : souris choquées prétraitées par IEC pendant 7 jours et par une injection d'HOE-140 avant le choc hémorragique ; HOE : souris choquées traitées par une injection d'HOE-140 avant le début du choc. \* p<0,05

Concernant l'expression de la eNOS et les dosages de GMPC, nous avons eu des problèmes techniques qui ne nous permettent pas aujourd'hui de présenter nos résultats. De nouvelles expériences sont en cours.

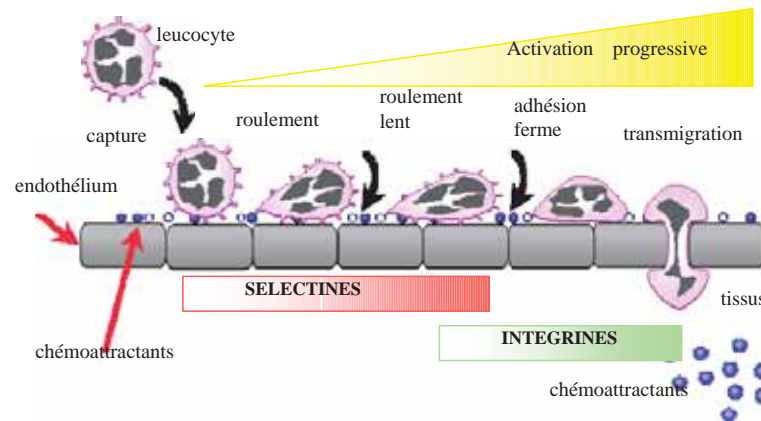
Malgré ces résultats partiels, les premières données obtenues sur le dosage des nitrates/nitrites semblent suggérer que la voie du NO est suractivée chez les souris sous IEC et que le blocage du RB2 permettrait de limiter cet effet. L'effet protecteur de l'HOE-140 pourrait donc être en partie expliqué par une moindre activation de cette voie vasodilatatrice.

## **III.6 IEC et défaillance multi-viscérale**

### **III.6.1 Choc et défaillance multi-viscérale**

Nous avons vu que l'état de choc hémorragique était défini par une défaillance aiguë du transport et/ou de l'utilisation de l'oxygène aboutissant à des défaillances d'organes. L'hypoxie se manifeste au niveau de tous les organes et entraîne la libération dans le sang de substances vaso-actives (prostaglandines, NO...) qui auto-entretiennent et aggravent la défaillance circulatoire. La diminution brutale des apports en O<sub>2</sub> et en glucose expose les cellules à des lésions irréversibles par diminution du potentiel de membrane mitochondrial, et accumulation de calcium dans le cytosol (262). La phase d'ischémie, mais également la phase de reperfusion, peuvent être à l'origine de ces lésions cellulaires (263). La production de radicaux libres est l'un des déterminants majeurs de l'initiation des voies de signalisation intracellulaires cytotoxiques (136). Les radicaux libres stimulent également la réponse inflammatoire par l'activation de la production de cytokines et par l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (264,265).

Si l'hypoxie joue un rôle certain dans les mécanismes de souffrance cellulaire et d'activation de la réponse inflammatoire systémique, l'endothélium contribue lui aussi largement à l'activation de cette réponse inflammatoire. En effet, l'interaction entre les leucocytes (Polynucléaires Neutrophiles) et l'endothélium favorise la migration des leucocytes dans les tissus (diapédèse) (figure 18), conduisant à cette réponse inflammatoire et au syndrome de défaillance multiviscérale qui s'en suit. L'atteinte de l'intégrité de l'endothélium contribue à l'altération de la fonction de « barrière » de l'endothélium et à la survenue d'une perméabilité vasculaire et d'une fuite capillaire.



**Figure 18 : Rôle de l'endothélium dans la migration leucocytaire : diapédèse**  
(d'après McIntyre et al. (266))

Le rôle central de l'endothélium au cours du choc hémorragique a d'ailleurs fait l'objet de nombreuses publications. Dans un modèle murin de choc hémorragique, Van Meurs et al. ont étudié l'expression et la cinétique d'apparition de ces molécules d'adhésion dans plusieurs organes (foie, rein, poumon, cœur, cerveau) (267). Cette étude a mis en évidence la spécificité et l'importance de ces molécules d'adhésion dans l'apparition de cette réponse inflammatoire systémique responsable de la défaillance multi-viscérale. Ces résultats témoignent d'un intérêt

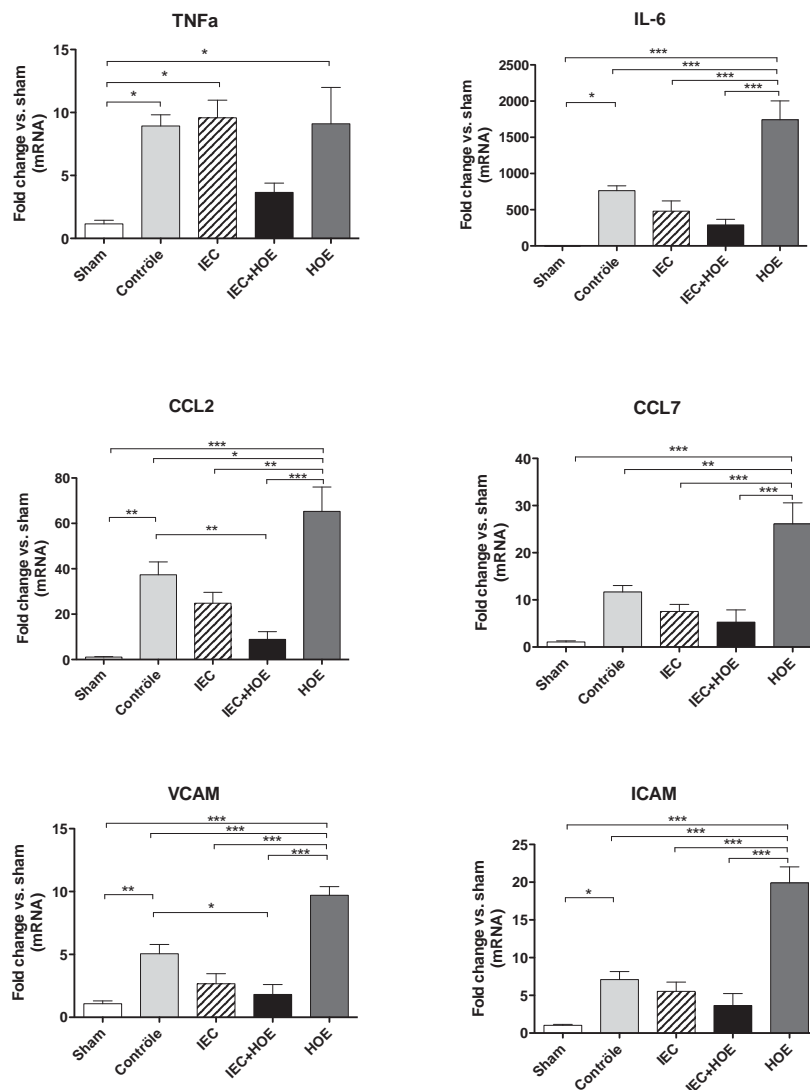
potentiel d'agir sur cette phase précoce inflammatoire pour limiter la gravité du choc. Dans une autre étude publiée par la même équipe, il a été de nouveau souligné l'importance de cette réponse inflammatoire (par rapport au processus hypoxique) dans les mécanismes d'activation de l'endothélium (268).

### **III.6.2 Contribution personnelle : inflammation rénale et blocage aigu du RB2 au cours d'un choc hémorragique à objectif de volume chez des souris traitées par IEC.**

Dans la suite de notre travail, nous avons cherché à comprendre comment évoluaient les paramètres de l'inflammation lors du blocage aigu du RB2 au cours d'un choc hémorragique à objectif de volume chez des souris traitées par IEC. De façon comparable aux travaux précédents, nous avons étudié 5 groupes : 1) sham ; 2) Contrôle ; 3) IEC ; 4) IEC+HOE ; 5) HOE. Les cibles de l'inflammation étudiées ont été : des cytokines pro-inflammatoires (IL6, TNF $\alpha$ ), des chémokines (CCL2, CCL7) et des protéines d'adhésion (V-CAM et I-CAM). Nous avons quantifié l'expression de leurs ARNm par technique de qRT-PCR (*quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*) 3 heures après le début du choc hémorragique à objectif de volume.

Nos résultats (figure 19) montrent que l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires, des chémokines et des protéines d'adhésion étudiées est significativement augmentée pendant la phase précoce du choc hémorragique ; que l'expression de ces ARNm tend à diminuer lorsque les souris sont préalablement traitées par des IEC ; et que l'ajout de l'antagoniste du RB2 (HOE-140) chez ces souris, limite encore plus l'importance de cette réaction inflammatoire. De façon paradoxale, l'expression de ces ARNm est significativement

augmentée lorsque les souris choquées ne sont traitées que par l'HOE-140, suggérant ainsi une activation importante du RB2 au cours du choc hémorragique. Ces résultats sont toutefois à interpréter avec précaution pour deux raisons : d'une part, ces paramètres n'ont été étudiés qu'à un seul temps après le choc (H3) ; d'autre part, les résultats du groupe HOE-140 incitent vivement à étudier l'implication du RB1 au cours du choc hémorragique. En effet, le blocage du RB2 pourrait favoriser le recrutement d'un effet RB1. Des explorations complémentaires sont donc nécessaires pour permettre d'apporter des réponses à ces résultats préliminaires.



**Figure 19 : Quantification d'ARNm par qRT-PCR : cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL6), chémokines (CCL7, CCL2), et protéines d'adhésion (V-CAM, I-CAM)**

Sham : souris anesthésiées non choquées ; Contrôle: souris choquées ; IEC : souris choquées prétraitées pendant 7 jours par IEC ; IEC+HOE : souris choquées prétraitées par IEC pendant 7 jours et par une injection d'HOE-140 avant le choc hémorragique ; HOE : souris choquées traitées par une injection d'HOE-140 avant le début du choc. n=6-7/groupe. \* p<0,005 ; \*\* p<0,001 ; \*\*\* p<0,0001



### **III.6.3 Contribution personnelle : Mortalité et impact organique du blocage aigu du RB2 au cours d'un choc hémorragique à objectif de volume chez des souris traitées au long cours par IEC**

*Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Benoît Richard dans le cadre son M2R au sein de l'équipe 12 UMR 1048.*

#### **III.6.3.1 Introduction**

Nous avons montré dans un premier travail (manuscrit n°1, (256)), que le blocage du RB2 par une injection d'HOE-140 permettait de restaurer la pression artérielle des souris choquées traitées au long cours par IEC et diminuait aussi les signes indirects d'hypoxie tissulaire (lactate artériel). Ce travail a été réalisé avec un modèle de choc hémorragique contrôlé à objectif de pression ( $35 \pm 5$  mmHg) dans le but d'évaluer l'impact hémodynamique de ce blocage et avec un modèle de choc hémorragique à objectif de volume (0,3 mL) pour évaluer le retentissement organique systémique par le dosage du lactate artériel. Ce travail a permis de confirmer le rôle du RB2 dans l'aggravation de l'hypotension artérielle induite par les IEC, et a montré l'intérêt potentiel de l'utilisation de l'HOE-140 dans l'antagonisation des effets délétères des IEC au cours d'un état de choc. Dans ce travail, nous n'avons pas retrouvé d'effet bénéfique de l'HOE-140 sur la mortalité, car la diminution du nombre de souris décédées dans le groupe IEC+HOE par rapport aux souris sous IEC seul était non significative ( $p = 0,673$ ). Nous avons suspecté que ce résultat était lié à un manque de puissance (effectif trop faible ou incidence de l'évènement trop faible).

L'objectif de ce troisième travail était d'évaluer de nouveau l'impact sur la mortalité et la défaillance multi-viscérale (atteinte hépatique, rénale et digestive) du blocage aigu du RB2 au cours d'un choc hémorragique à objectif de volume chez des souris traitées au long cours par des IEC.

### **III.6.3.2 Matériel et méthodes**

#### **III.6.3.2.a Schéma expérimental**

De façon comparable aux travaux précédents, nous avons étudié 5 groupes : 1) sham ; 2) Contrôle ; 3) IEC ; 4) IEC+HOE ; 5) HOE. Nous avons réalisé deux protocoles de choc hémorragique contrôlé à objectif de volume d'intensités différentes : un choc dit « sévère » (0,6 mL de volume prélevé) pour évaluer la mortalité et un choc dit « modéré » (0,3 mL) pour évaluer la défaillance multi-viscérale. En effet, suite à nos premiers résultats sur la mortalité, nous avons choisi de majorer l'intensité du choc pour augmenter le taux de mortalité. Pour cela, nous nous sommes fixés un volume de 0,6 mL correspondant au volume moyen prélevé lors de la validation de notre modèle de choc hémorragique à objectif de pression pour obtenir une nécrose tubulaire aiguë (175). Nous avons choisi d'étudier la défaillance multi-organique en utilisant le protocole de choc hémorragique « modéré » afin d'avoir moins de mortalité et garder le plus grand nombre de souris possible, en particulier dans le groupe IEC.

De façon comparable à notre premier travail (256), les animaux subissant le choc hémorragique dit « sévère » ont été sacrifiés à H3 après le début du choc. La mortalité a été étudiée par une courbe de survie du début du choc jusqu'au sacrifice. Les animaux subissant le choc hémorragique dit « modéré » ont été sacrifiés seulement à H24 afin d'étudier l'impact tissulaire du choc hémorragique.

### **III.6.3.2.b Paramètres étudiés**

Une analyse biochimique a été réalisée pour évaluer l'atteinte rénale par la mesure de la cystatine C plasmatique (technique ELISA), et l'atteinte hépatique par le dosage des Alamine Amino Transferase (ALAT) dans le sérum (analyseur biochimique PENTRA 400).

Une analyse moléculaire par qRT-PCR a été réalisée pour quantifier l'expression de KIM1 (*Kidney Inducible Molecule 1*) dans le rein, l'expression de HGF (*hepatocyte growth factor*) dans le foie, et l'expression de ZO1 (*Zonula occludens 1*) et l'interleukine 22 dans l'intestin (iléon).

Enfin, une analyse histologique après coloration par l'hématoxyline-éosine a été réalisée au niveau rénal, hépatique et intestinal (colon distal) afin d'évaluer la sévérité du choc. La quantification des lésions a été évaluée par des scores spécifiques de chaque organe : le « kidney injury score » pour le rein (176), le score de « Thoolen » pour le foie (269), et le score de « CHIU » pour le colon (270).

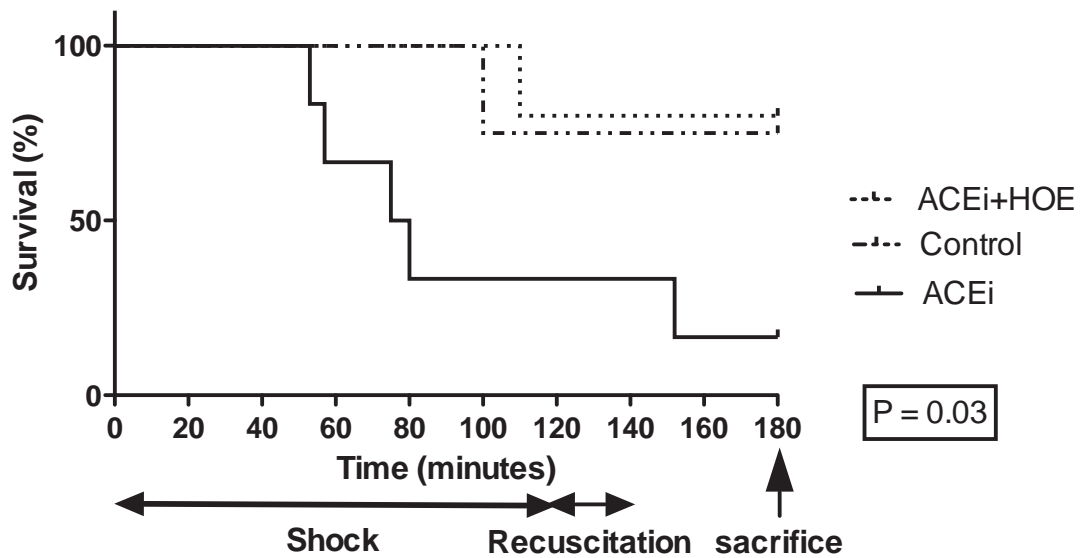
### **III.6.3.2.c Analyses statistiques**

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type. Les comparaisons intergroupes ont été réalisées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis, puis du test de Dunn's lorsque celui-ci était significatif. Les résultats ont été considérés comme significativement différents lorsque  $p < 0,05$ . L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism (version 4.02).

### **III.6.3.3 RB2 et mortalité au cours du choc hémorragique**

Après un choc hémorragique sévère, les PAM des souris sous IEC (IEC) ( $25,5 \pm 2,1$  mmHg) ont été significativement plus faibles par rapport à celle des groupes contrôle ( $38,0 \pm$

3,2 mmHg) et IEC+HOE ( $34,2 \pm 0,6$  mmHg) ( $p = 0,008$ ). Dans le groupe IEC, 5 souris sur 6 sont mortes (4 pendant le choc et 1 à la fin de la réanimation). Dans le groupe IEC+HOE ( $n = 5$ ) et dans le groupe contrôle ( $n = 4$ ), seulement une souris de chaque groupe est décédée à la fin de la réanimation. La mortalité a été significativement plus importante dans le groupe sous IEC comparativement aux autres groupes ( $p = 0.03$ ) (figure 20).



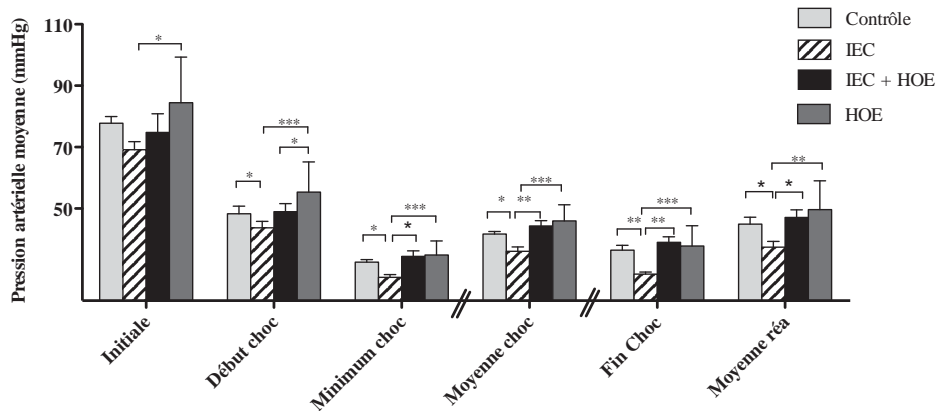
**Figure 20 : Courbe de survie après un choc hémorragique « sévère »**

Contrôle : souris choquées ; IEC : souris choquées prétraitées pendant 7 jours par IEC ; IEC+HOE : souris choquées prétraitées par IEC pendant 7 jours et par une injection d'HOE-140 avant le choc hémorragique.  $n = 4-6$  par groupe.

### **III.6.3.4 Impact organique du blocage du RB2**

Les PAM mesurées au cours du choc hémorragique d'intensité modérée ont été représentées figure 21. Les PAM pendant le choc ont été respectivement de  $41,8 \pm 2,8$  mmHg,  $36,6 \pm 4,6$  mmHg,  $43,8 \pm 5,1$  mmHg, et  $46,6 \pm 5,2$  mmHg pour les groupes contrôle, IEC, IEC+HOE, et HOE.

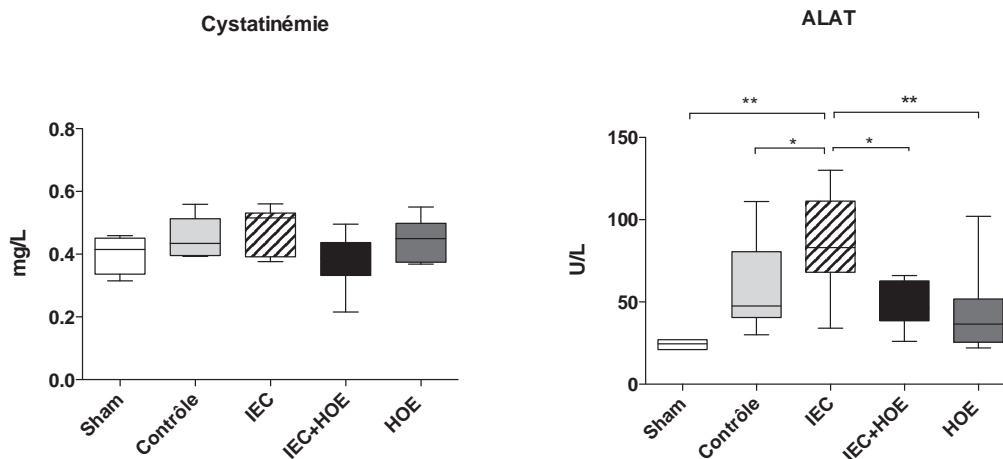
*Impact du blocage du RB2 sur les effets des IEC : application à un modèle de choc hémorragique contrôlé*



**Figure 21 : Pressions artérielles moyennes pendant le choc hémorragique à objectif de volume d'intensité modérée.**

Prélèvement de 0,3 mL de sang. Contrôle: souris choquées ; IEC : souris choquées prétraitées pendant 7 jours par IEC ; IEC+HOE : souris choquées prétraitées par IEC pendant 7 jours et par une injection d'HOE-140 avant le choc ; HOE : souris choquées traitées par une injection d'HOE-140 avant le début du choc. n=9-10 par groupe. \* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,001

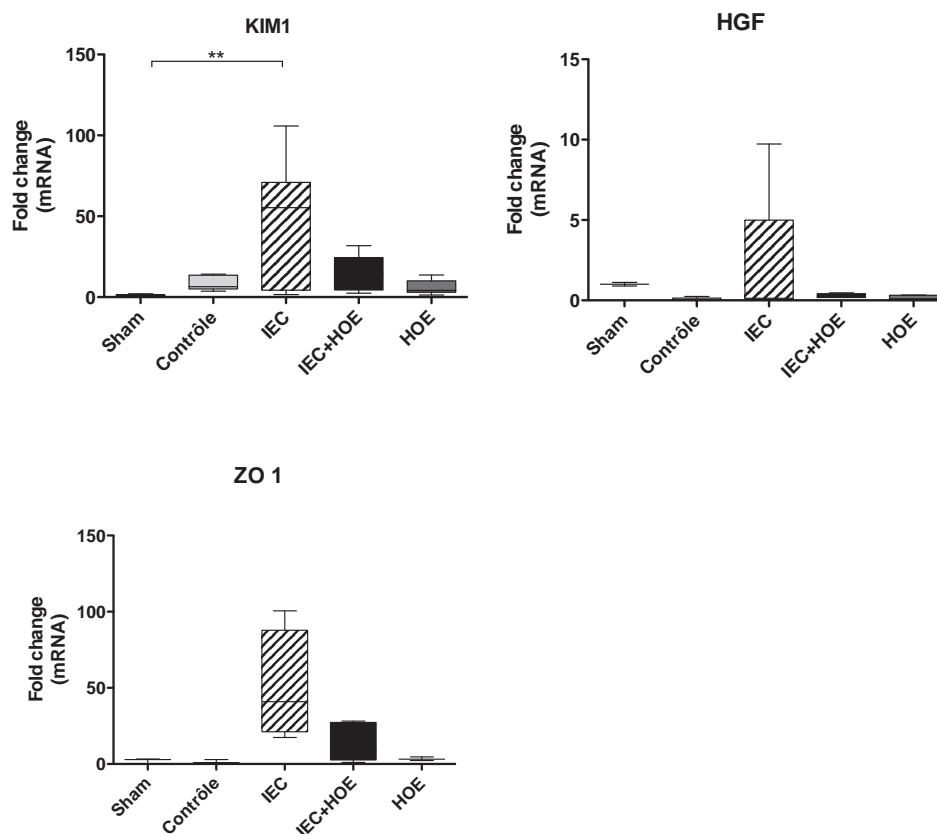
Les résultats des dosages biologiques montrent une augmentation du taux d'ALAT dans le groupe sous IEC seul comparativement aux souris contrôle et IEC+HOE. Aucune différence significative n'a été retrouvée pour le dosage de la cystatine C plasmatique (figure 22).



**Figure 22 : Dosage de la cystatine C plasmatique et des ALAT après un choc hémorragique à objectif de volume d'intensité modérée.**

Prélèvement de 0,3 mL de sang. Contrôle : souris choquées ; IEC : souris choquées prétraitées pendant 7 jours par IEC ; IEC+HOE : souris choquées prétraitées par IEC pendant 7 jours et par une injection d'HOE-140 avant le choc ; HOE : souris choquées traitées par une injection d'HOE-140 avant le début du choc. n=9-10 par groupe. \* p<0,05 ; \*\* p<0,01.

Les résultats des qRT-PCR sont présentés figure 23. L'expression des ARNm de KIM1, HGF, et ZO1 a été augmentée dans le groupe sous IEC comparativement aux autres groupes même si aucune différence statistique n'a été retrouvée. Malgré plusieurs tentatives, la quantification de l'interleukine 22 n'a pu être réalisée car aucune amplification n'a été obtenue.



**Figure 23 : Quantification d'ARNm par qRT-PCR de KIM1 (*Kidney Inducible Molecule1*) dans le rein, HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) dans le foie, et ZO1 (*Zonula Occludens 1*) au niveau de l'iléon.**

Contrôle : souris choquées ; IEC : souris choquées prétraitées pendant 7 jours par IEC ; IEC+HOE : souris choquées prétraitées par IEC pendant 7 jours et par une injection d'HOE-140 avant le choc ; HOE : souris choquées traitées par une injection d'HOE-140 avant le début du choc. n = 4-5 par groupe. \*\* p<0,01.

L'analyse histologique après coloration par l'hématoxyline éosine ne montre aucune lésion au niveau rénal, hépatique et digestif quelque soit le groupe étudié.

### **III.6.3.5 Conclusion**

Les principaux résultats de ce travail montrent qu'une injection d'HOE-140 avant un choc hémorragique « sévère » permet de réduire de façon significative la mortalité des souris traitées par IEC ( $p = 0,03$ ). L'évaluation de la défaillance d'organe induite par un choc hémorragique d'intensité « modérée » n'a pas permis de mettre en évidence de dommage significatif et donc de différence entre les groupes. Seule l'évaluation biologique hépatique par le dosage des ALAT plasmatiques montre de façon significative que l'agression est moins importante dans le groupe IEC+HOE comparativement au groupe IEC seul. Ces résultats sont probablement expliqués par l'intensité trop faible du choc hémorragique et par un effectif trop faible à l'origine d'un manque de sensibilité. Afin de pouvoir répondre à la question initiale posée sur la défaillance d'organe, il serait donc souhaitable d'utiliser le modèle de choc hémorragique sévère (0,6 mL) en incluant plus d'animaux pour compenser la mortalité importante de certains groupes. Il pourrait aussi être envisagé de choisir des techniques plus spécifiques pour évaluer les défaillances d'organe (par exemple : évaluer la qualité de la perfusion digestive par la technique de trans-illumination, ou utiliser des marqueurs d'hypoxie ou d'apoptose en immunohistochimie).

Par ce travail, nous confirmons le caractère protecteur de l'HOE-140 sur la mortalité. Concernant l'agression hépatique, rénale et digestive induite par les IEC, nos résultats sont en faveur d'un effet protecteur de l'HOE-140 au cours d'un choc hémorragique à volume contrôlé. Cependant ces résultats nécessitent confirmation par d'autres explorations, fonctionnelles et histologiques. Enfin, ces résultats confirment aussi une suractivation du RB2 par l'augmentation de la production de BK au cours du choc hémorragique.

## **PARTIE IV : CONCLUSION**

L'objectif de ce travail était d'étudier le rôle du RB2 dans l'hypotension artérielle et les dysfonctions d'organe induites par un choc hémorragique. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles murins de choc hémorragique : un premier modèle à pression contrôlée suffisamment sévère pour induire une nécrose tubulaire aiguë d'origine ischémique (NTAI) et un deuxième modèle de choc hémorragique à volume contrôlé pour évaluer l'impact hémodynamique et organique. Afin de préciser le rôle du RB2 au cours du choc hémorragique, nous avons d'abord évalué l'impact rénal du blocage aigu du RB2 dans le modèle de choc à pression contrôlée. Nous avons ensuite potentialisé l'impact du blocage aigu du RB2 au cours du choc hémorragique par un prétraitement avec un IEC. Les effets pharmacologiques des IEC étant liés en partie au blocage de la dégradation de la bradykinine et à l'activation du RB2, nous avons secondairement cherché à préciser s'il était possible de limiter l'aggravation des effets hypotensifs délétères des IEC en bloquant le RB2 au cours du choc hémorragique. L'impact hémodynamique et organique du blocage aigu du RB2 lors d'un prétraitement par IEC a alors été évalué dans les deux modèles de choc hémorragique à pression ou à volume contrôlé.

Nous avons montré dans un premier temps que le blocage génétique ou pharmacologique du RB2 n'influencait pas la gravité de la NTAI. Par contre, le blocage pharmacologique aigu du RB2 a un effet bénéfique important dans ce modèle puisqu'il réduit



la sévérité de l'hypotension artérielle induite par le choc hémorragique et augmente la survie des souris.

Nous avons montré dans un deuxième travail que, lors d'un prétraitement par des IEC, le blocage pharmacologique du RB2 avant le choc hémorragique permet de limiter la sévérité des hypotensions induites par les IEC et réduit de façon significative la lactatémie observée au cours du choc. Enfin, ces effets hémodynamiques bénéfiques ont été confortés dans un troisième travail, dans lequel nous avons montré une réduction significative de la mortalité chez les souris choquées sous IEC bloquées pour le RB2 comparativement aux souris choquées sous IEC seul. L'évaluation de l'impact organique (hépatique, rénal et digestif) de ce blocage suggère un effet protecteur du RB2 même si nos résultats sont à ce jour incomplets.

Ce travail de thèse met en évidence l'implication du RB2 au cours du choc hémorragique, en particulier en cas d'exposition préalable à un traitement chronique par des IEC. Ceci suggère donc que le SKK est bien stimulé au cours du choc et qu'il entraîne une augmentation de la production de BK. Cette augmentation de la concentration de la BK peut être expliquée par un blocage de sa dégradation par l'enzyme de conversion mais également par une augmentation de sa production par l'activation des kalllicréines. A notre connaissance, aucun de ces deux mécanismes n'a encore été documenté en anesthésie-réanimation tant en situation expérimentale qu'en situation clinique.

## **PARTIE V : PERSPECTIVES**

Ce travail offre d'intéressantes perspectives sur le bénéfice potentiel du blocage aigu du SKK chez l'humain en situation d'agression hémodynamique aiguë. Il nous apparaît intéressant d'en développer 2 axes : 1) approfondir les connaissances sur le rôle du SKK au cours du choc hémorragique; 2) déterminer si l'on peut limiter les hypotensions artérielles en bloquant le SKK dans le cadre de l'anesthésie-réanimation.

### **V.1 Rôle du SKK au cours d'un choc hémorragique**

L'effet bénéfique du blocage du RB2 au cours d'un choc hémorragique étaye l'hypothèse que l'accumulation de BK participe à l'hypotension artérielle induite par la spoliation sanguine. L'accumulation de BK peut être expliquée par une diminution de l'activité de l'enzyme de conversion ou par une augmentation de l'activité des kallicréines. Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur des kallicréines pourrait être une alternative intéressante. Ces inhibiteurs réduiraient la production de BK et par la suite les effets biologiques qui en découlent. Mais, cette idée soulève cependant une autre problématique : laquelle des kallicréines (tissulaire ou plasmatique) est activée au cours du choc hémorragique ?

D'autre part, l'implication du RB1 n'a pas été étudiée dans ce travail de thèse. Hors, il est probable que ce récepteur inductible participe également aux effets hémodynamiques et inflammatoires observés. Il est le plus souvent admis que les effets bénéfiques du SKK sont

liés au RB2 tandis que les effets négatifs seraient liés au RB1 (186). Cependant, plusieurs études montrent que le RB1 participe, conjointement au RB2, aux effets bénéfiques du SKK dans le traitement des maladies cardiovasculaires (228,271,272). Ces résultats suggèrent que le RB1 joue un rôle aussi essentiel que le RB2, grâce notamment à l'activation de la voie des prostaglandines (273,274). Cette hypothèse est confortée par le fait qu'au cours d'un traitement chronique par IEC, le RB1 serait surexprimé en raison d'une augmentation endogène de kinines et d'une activation allogénique du RB1 (275). Enfin, plusieurs travaux expérimentaux ont montré l'implication du RB1 dans les effets vasculaires observés au cours du choc septique au LPS (85–87). Ces différentes données suggèrent que le RB1 pourrait aussi jouer un rôle dans les hypotensions induites par un choc hémorragique et que ces effets pourraient être majorés lors d'un traitement chronique par IEC.

Pour améliorer la compréhension de l'implication du SKK au cours du choc hémorragique, plusieurs axes de recherche peuvent donc être proposés : 1) mesurer l'activité de l'ECA ou directement la production tissulaire de BK (mais cela est plus difficile car la BK a une demi-vie très courte) ; 2) étudier les effets de l'utilisation d'un inhibiteur des kallicréines, et préciser quelle kallicréine (tissulaire ou plasmatique) pourrait participer à la production de BK dans ce modèle ; 3) étudier le rôle du RB1 en utilisant un antagoniste du RB1 ; 4) enfin, étudier l'implication de la voie du NO dans les effets observés, par la quantification notamment de la production de GMPc et de NOx.

## **V.2 Peut-on limiter les hypotensions artérielles par le blocage aigu du SKK en anesthésie réanimation?**

Nous avons montré dans un modèle murin de choc hémorragique que le blocage aigu du RB2 permet de limiter les hypotensions artérielles induites par les IEC et réduit significativement la mortalité. La suite logique de notre travail est donc d'évaluer les effets de ce blocage dans d'autres situations cliniques telles que l'état de choc septique ou dans une situation beaucoup plus fréquente : l'anesthésie. Cette situation est d'autant plus intéressante que les dernières recommandations européennes (222) et nord-américaines (251) préconisent le maintien des IEC en périopératoire afin d'éviter d'éventuels décompensations cardiaques ou pics hypertensifs péri-opératoires. Cependant, le maintien des IEC expose comme nous l'avons précédemment montré, à des hypotensions artérielles sévères qui peuvent être délétères. L'utilisation d'un antagoniste du RB2 comme l'HOE-140 (Icatibant, Firazir®) permettrait donc d'apporter un traitement spécifique à ces hypotensions. Nous avons d'ailleurs suggéré cette idée dans une lettre que nous avons soumise dans le journal *Anesthesiology* (manuscrit 3).

Ces perspectives amènent donc à la problématique beaucoup plus large du rôle de la BK lors de l'anesthésie ou au cours des états de choc, indépendamment d'un prétraitement par un IEC.

**Manuscrit n°3**

**Can anesthesiologists use Icatibant to quickly abolish the deleterious hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi)?**

Authors:

Hélène Charbonneau, Benoit Richard, Marie Buléon, Vincent Minville, Ivan Tack, Nicolas Mayeur

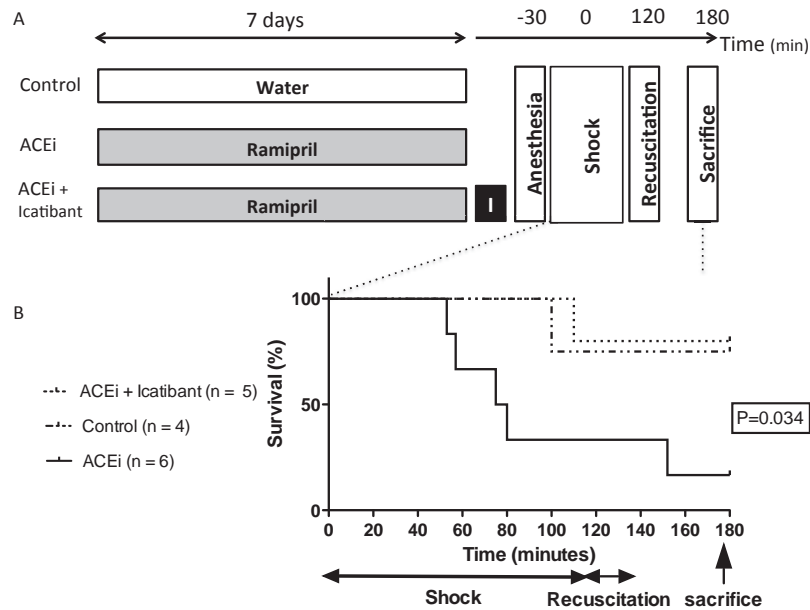
Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) are recommended and extensively used in patients with hypertension, chronic heart and kidney diseases.<sup>1</sup> However, the continuation of ACEi in the perioperative setting, remains controversial in the literature.<sup>2</sup> As a matter of fact, ACEi cause severe arterial hypotension during anesthesia.<sup>3</sup> Hypotension severity is related to the delay of ACEi interruption and their half-life. In high hemorrhagic risk surgery, there are evidence linking an increased incidence of acute kidney injury and 30-day mortality in patient with ongoing ACEi therapy.<sup>4</sup> However, withholding ACEi therapy preoperatively generates a concern regarding a rebound hypertension and its potential consequences (i.e. worsening cardiac failure or myocardial infarction).<sup>5</sup> Guidelines have been introduced for the management of non-cardiac surgery patients, especially for patients treated by ACEi.<sup>6,7</sup> European Society Cardiology recommendations<sup>7</sup> differentiates management for hypertensive patients and those with heart failure. In heart failure patients, ongoing ACEi therapy is recommended under close monitoring. For hypertensive patients, the Task Force recommends transient discontinuation of ACEi therapy before non-cardiac surgery because of hypotension encountered with the continuation of these agents. The American Heart Association Task Force<sup>6</sup> go further and recommends continuation of ACEi perioperatively in all patients (class IIa recommendation, level of evidence: B). They also recommend restarting ACEi therapy as soon as possible (level: C).

Based on these new perioperative guidelines, the number of ACEi-anesthetized patients will increase. To our knowledge, no specific treatments for ACEi-induced hypotension during anesthesia are available. In daily practice, only empiric volume expansion and systemic vasoconstrictor are used to treat these refractory hypotensions.<sup>8</sup>

Because the pharmacological effects of ACEi therapy are partly mediated by increasing bradykinin B2 receptor (B2R) activation, we hypothesized that acute B2R blockade decreased the worsening of ACEi-induced arterial hypotension in an murine model of hemorrhagic shock

(HS). Icatibant, a high affinity and specific B2R antagonist was used.<sup>9</sup> It is a safe drug that has been approved by the Food and Drug Administration in 2011 for the treatment of acute attacks of hereditary angioedema in adult. So far, no detrimental side effects of icatibant have been reported. In a previous published study,<sup>10</sup> we analysed the impact of acute B2R blockade in volume and pressure-targeted HS models in ACEi-treated mice. In this model, ACEi-shocked mice were more susceptible to hypotension and hyperlactatemia than the control mice. These effects were corrected by B2R blockade initiation. In the present study, we tested the hypothesis that acute B2R blockade corrects mortality of ACEi in a murine model of volume-targeted HS. We showed that mortality in the ACEi-shocked group was higher in the ACEi group (83%) than in the control group (25%). Furthermore, survival in both, control and ACEi group treated with icatibant, were significantly higher than in the ACEi group ( $p = 0.034$ ). The figure 1 describes the protocol design (figure 1A) and shows the survival curve from the beginning of shock to the sacrifice (figure 1B). This impressive life-saving benefit of B2R blockade was quickly achieved and sustained with a single shot of icatibant injected during induction of anesthesia.

Based on these original and promising results, acute B2R blockade offers a, specific and safe therapeutic approach for preventing or treating the hypotensive effect of ACEi. Icatibant could become a novel therapeutic option in the management of anesthesia or resuscitation in patients treated with ACEi. As anesthesiologists and physiologists, we suggest moving forward in this field.



**Figure 1: A.** Protocol design. **B.** Survival curve in volume-targeted hemorrhagic shock (HS). HS was performed as previously described.<sup>10</sup> Briefly, the animals were anesthetized with ketamine and xylazine, and intubated using an intratracheal cannula. The left jugular vein and femoral artery were catheterized, and ketamine was continuously infused until the end of the shock procedure. A 0.6 ml of blood was withdrawn through the femoral arterial line in order to induce HS. The blood was reinfused at the end of the 2-hour period of shock with the addition of an equal lactated Ringer's solution to ensure appropriate fluid volume restoration. The mice were sacrificed at 1 hour after the shock procedure. ACEi (ramipril) was given at a dose of 1 mg/kg per day in drinking water (at a concentration of 5  $\mu$ g/ml) during the 7 days prior to shock. Icatibant was subcutaneously administered at a dose of 250  $\mu$ g/kg at the same time of anesthesia. Control: control shocked mice; ACEi: shocked mice treated with ACEi; ACEi + Icatibant: shocked mice treated with both ACEi and a single injection of icatibant at the same time of anaesthesia.



## Reference

1. James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O, Smith SC, Svetkey LP, Taler SJ, Townsend RR, Wright JT, Narva AS, Ortiz E: 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 2014; 311:507–20
2. Mets B: To stop or not? *Anesth Analg* 2015; 120:1413–9
3. Coriat P, Richer C, Douraki T, Gomez C, Hendricks K, Giudicelli JF, Viars P: Influence of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on anesthetic induction. *Anesthesiology* 1994; 81:299–307
4. Railton CJ, Wolpin J, Lam-McCulloch J, Belo SE: Renin-angiotensin blockade is associated with increased mortality after vascular surgery. *Can J Anaesth* 2010; 57:736–44
5. Rosenman DJ, McDonald FS, Ebbert JO, Erwin PJ, LaBella M, Montori VM: Clinical consequences of withholding versus administering renin-angiotensin-aldosterone system antagonists in the preoperative period. *J Hosp Med* 2008; 3:319–25
6. Fleisher LA, Fleischmann KE, Auerbach AD, Barnason SA, Beckman JA, Bozkurt B, Davila-Roman VG, Gerhard-Herman MD, Holly TA, Kane GC, Marine JE, Nelson MT, Spencer CC, Thompson A, Ting HH, Uretsky BF, Wijeyesundera DN, American College of Cardiology, American Heart Association: 2014 ACC/AHA guideline on perioperative cardiovascular evaluation and management of patients undergoing noncardiac surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2014; 64:e77-137
7. Kristensen SD, Knuuti J, Saraste A, Anker S, Bøtker HE, De Hert S, Ford I, Juanatey JRG, Gorenek B, Heyndrickx GR, Hoeft A, Huber K, Iung B, Kjeldsen KP, Longrois D, Luescher TF, Pierard L, Pocock S, Price S, Roffi M, Sirnes PA, Uva MS, Voudris V, Funck-Brentano C, AuthorsTask Force Members: 2014 ESC/ESA Guidelines on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management: The Joint Task Force on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Anaesthesiology (ESA). *Eur J Anaesthesiol* 2014 doi:10.1097/EJA.000000000000150
8. Mets B: Management of hypotension associated with angiotensin-axis blockade and general anesthesia administration. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2013; 27:156–67
9. Rhaleb NE, Rouissi N, Jukic D, Regoli D, Henke S, Breipohl G, Knolle J: Pharmacological characterization of a new highly potent B2 receptor antagonist (HOE 140: D-Arg-[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Qic8]bradykinin). *Eur J Pharmacol* 1992; 210:115–20
10. Charbonneau H, Buléon M, Minville V, Faguer S, Girolami J-P, Bascands J-L, Tack I, Mayeur N: Acute Bradykinin Receptor Blockade During Hemorrhagic Shock in Mice Prevents the Worsening Hypotensive Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor. *Crit Care Med* 2016 doi:10.1097/CCM.0000000000001646

## **PARTIE VI : ANNEXES**

**Annexe n°1 :** Poster présenté au congrès de la société française d'anesthésie-réanimation (SFAR) et au congrès de physiologie et de biologie intégrative (CPBI).

**Annexe n°2 :** Demande de brevet : « BR2 antagonist for use in the prevention of the hypotensive effect of patient treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) »



## Acute Bradykinin Receptor blockage during hemorrhagic shock prevents worsening of hypotension in Angiotensin-converting enzyme inhibitor treated mice

H Charbonneau <sup>1,2</sup>, M Buléon <sup>2</sup>, N Mayeur <sup>1</sup>, JL Bascand <sup>2</sup>, JP Girolami, V Minville <sup>1</sup>, I Tack <sup>2</sup>  
 1- Modélisation de l'Aggression Tissulaire et de la Nociception, EA 4564  
 2- IZMC, UMR 1048, équipe 12

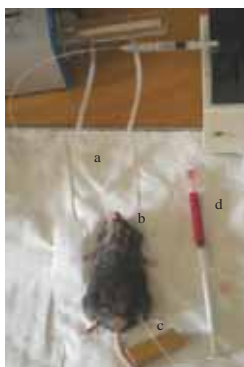


### Introduction

Association of angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi) with most anesthetic drugs results in hypotension, a situation potentially life-threatening in case of emergency anesthesia during hemorrhagic shock (HS). Since pharmacological effects of ACEi are partly mediated by increased bradykinin B2 receptor (B2R) activation, the present study aimed to determine the impact of acute B2R blockade during HS in ACEi treated mice.

### Material and Methods

Hemodynamic effect of B2R blockage using Icatibant (B2R antagonist) was studied using a pressure targeted HS (PTS) and a volume targeted HS (VTS). Protocols study were shown in figure 1 and 2. Three groups were studied for each condition: 1/ Wild type (WT) shocked mice (Cont), 2/ Shocked mice treated with Ramipril (ACEi) for 7 days and 3/ Shocked mice treated with ACEi, receiving one shot of icatibant immediately before anesthesia (ACEi+HOE). ACEi (Ramipril) was given at a dose of 1mg/kg/j in drinking water 7 days before shock and icatibant was administrated at a dose of 250 µg/kg subcutaneously just before anesthesia.

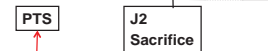


**Figure 1:** Hemorrhagic shock protocol  
 a. Mechanical ventilation; b. left jugular vein; c. femoral artery; d. blood withdrawn through the femoral arterial line

#### Pressure targeted hemorrhagic shock (PTS) (MAP ± 35mmHg)

##### Groups

Cont (n=13) : WT + shock  
 ACEi (n=5) : ACEi + shock  
 ACEi+HOE (n=6) : ACEi+ icatibant + shock

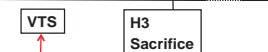


Blood was withdrawn through the femoral arterial line until the targeted arterial blood pressure (MAP) of 35 mmHg was reached

#### Volume targeted hemorrhagic shock (VTS) (=0,3ml)

##### Groups

Cont (n=10) : WT + shock  
 ACEi (n=8) : ACEi + shock  
 ACEi+HOE (n=8) : ACEi + icatibant + shock



A systematic blood volume of 0.30 mL was withdrawn through the femoral arterial line.

**Figure 2:** Description of Pressure (PTS) and Volume targeted hemorrhagic shock (VTS)

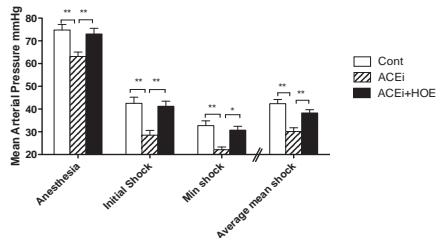
### Results

#### Pressure targeted hemorrhagic shock protocol (PTS)



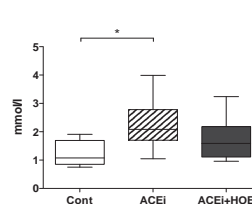
**Figure 3 :** Hemodynamic impacts of icatibant during pressure controlled hemorrhagic shock (HS) in chronic ACEi treated mice. Figure 3a shows the mean arterial blood pressure (MAP) at different times of pressure targeted HS. Figure 3b shows the mean blood volume withdrawn until the targeted MAP of 35 mmHg was reached. \*\* p<0.01.

#### Volume targeted hemorrhagic shock protocol (VTS)



**Figure 4 :** VTS protocol assess the impact of icatibant on HS outcome in chronic ACEi treated mice. Icatibant allowed restoring the MAP during anesthesia and HS in ACEi shocked mice.\* p<0.005, \*\* p< 0.001. Average mean shock: average mean arterial blood pressure during shock.

#### Lactate acid



**Figure 5 :** Determination of blood lactate acid after 3 hours after volume controlled hemorrhagic shock in mice. Lactate acid was significantly higher in the ACEi group compared to control group. n = 8-9.\* p<0.005.

### Conclusion

During HS, acute B2R blockade significantly attenuates the deleterious haemodynamic effect of ACEi in mice. This beneficial effect of B2R blockade is rapidly reached and sustainable with a single shot of icatibant. This benefit could be of interest in ACEi-treated patients during both emergency anesthesia and resuscitation.

**BR2 ANTAGONIST FOR USE IN THE PREVENTION OF THE HYPOTENSIVE  
EFFECT OF PATIENT TREATED WITH ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME  
INHIBITORS (ACEI)**

---

5

**FIELD OF THE INVENTION:**

The present invention relates to a method of preventing and/or treating the hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) in a patient treated with ACEI, said patient being under a critical condition. More specifically, it concerns the use of a  
10 Bradykinin 2 receptor (BR2) antagonist, for the prevention and treatment of the hypotensive effect of ACEI in a patient treated with ACEI undergoing emergency anaesthesia and/or hypovolemic (i.e. hemorrhagic) or vasoplegic (i.e. septic) shocks resuscitation.

**BACKGROUND OF THE INVENTION:**

15 Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) are among the most frequently used therapeutic classes for the treatment of hypertension, chronic heart and chronic kidney diseases (1,2). However, ACEi are also responsible for severe hypotension during anesthesia (3). According to recent data, this perioperative hypotensive effect seems to be associated with increased renal failure and mortality (4).

20 Accordingly, there is a need for a new therapeutic strategy that inhibits hypotensive effect of ACEi, for patients treated with ACEi under a critical condition, particularly in case of emergency anaesthesia and/or hypovolemic (i.e. hemorrhagic) or vasoplegic (i.e. septic) shocks resuscitation.

Angiotensin-converting enzyme (ACE) not only catalyzes the conversion of  
25 angiotensin I (Ang I) to angiotensin II (Ang II) but is also responsible for bradykinin (BK) degradation. BK is a potent vasodilator (5,6), thus, the pharmacological effects of ACEi are in part mediated through the increase in BK bioavailability in addition to the reduction of Ang II formation (7). There are 2 BK receptor subtypes, B1 and B2 (B1R and B2R, respectively). Miscellaneous biological effects of BK are related to the activation of the B2R (8) which  
30 leads, among others, to the formation of NO (9) and vasodilator prostaglandins (10).

HOE-140 (icatibant) is a specific and high affinity B2R antagonist blocking, with high potency, numerous B2-mediated effects (11,12). Icatibant is actually indicated for the treatment of acute attacks of hereditary angioedema in adult. But icatibant has been also previously studied in others situations. Icatibant attenuates hypotensive effect of ACEi in

chronic hypertensive animal models (13–16) and inhibits BK-induced vasodilatation in a dose-dependent manner in human vascular beds in vivo (17). Icatibant exhibits a prolonged inhibitor effect: its half-life protective effect against BK-induced hypotension in rats is around 5 hours (11, 15).

5            Nevertheless, the ability of a B2R antagonist to rapidly and significantly inhibit chronic hypotensive effect of ACEi during critical condition, such as anesthesia or hemorrhagic shock is unknown and was unpredictable. This effect could be of great interest in ACEi treated patients during either emergency anesthesia or resuscitation. The original purpose of this invention was to study the impact of acute B2R blockade using B2R  
10 antagonist (i.e) icatibant during hemorrhagic shock (HS) in ACEi treated mice.

#### **SUMMARY OF THE INVENTION:**

By using murine models treated with ACEi, the inventors showed that B2R blockade efficiently and rapidly inhibited hypotensive effect of ACEi during hemorrhagic shock (HS).  
15 Thus, blocking B2R constitutes a new therapeutic approach for preventing the hypotensive effect of ACEi in patients under critical conditions and allows restoring a normal arterial blood pressure.

The present invention provides antagonists of B2R, for a novel use in the prevention and treatment of the hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI)  
20 in a patient treated with an ACEI, whereas said patent is under critical condition.

#### **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:**

In a first aspect the invention provides an antagonist of the Bradykinin 2 receptor (B2R), for use in the prevention or treatment of the hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) in a patient treated with an ACEI, whereas said patent is  
25 under critical condition.

In an embodiment, the critical condition is selected from emergency anaesthesia or shock resuscitation.

In a specific embodiment, shock resuscitation is selected from the group consisting of:  
30 hypovolemic (i.e. hemorrhagic), or vasoplegic (i.e. septic) shocks.

In a preferred embodiment the critical condition is hemorrhagic shock or septic shock.

In still another embodiment, the antagonist of BR2 according to the invention binds to the Bradykinin 2 receptor, thereby blocking the binding of Bradykinin on B2R. To identify an antagonist able to block the interaction between Bradykinin and B2R, it may be used a test

based on the effect of the B2R antagonist candidate on the induction of vasoconstriction or increasing arterial blood pressure as explained in the examples (figure 1). See also test described in Barbe F, et al .. Am. J. Physiol. 1996 Jun;270(6 Pt 2):H1985–1992 or in ref. 14, 15, 16.

5

Typically, a B2R antagonist according to the invention includes but is not limited to:

- i. NPC-349, HOE140, CP-0127, B9430, B9870 (peptideBR2antagonists);
- ii. FR173657, LF16-0687, Bradyzyde, MEN16132, BKM-570 (non peptide BR2 antagonists); and derived compounds.

10

In another aspect the invention provides a pharmaceutical composition, comprising an antagonist of B2R, for use in the prevention of the hypotensive effect of ACEIs, in a patient treated with an ACEI, said patient is under critical conditions.

#### **Definitions:**

15

Throughout the specification, several terms are employed and are defined in the following paragraphs.

The term “bradykinin” has its general meaning in the art and refers to kinin bradykinin and lysil-bradykinin. Kinin, bradykinin and lysil-bradykinin refer to endogenous nona- and deca-peptide that are generated by cleavage of the precursor polypeptide (kininogen) by specific proteases (kallikreins) within numerous tissues of the body (Regoli, D. and Barabe, J. Pharmacol. Rev., 1980, 32, 1-46; Hall, J. M., Pharmacol. Ther., 1992, 56, 131-190; Leeb-Lundberg et al., Pharmacol. Rev. 2005, 57: 27-77). Certain enzymes of the kininase family degrade bradykinin and related peptides and thus inactivate these peptides. Kinins exert their actions through two different G protein-coupled seven transmembrane domains receptors, called B1 and B2.

25

The term “B2-receptor” has its general meaning in the art and refers to kinin receptor type B2 or bradykinin receptor type B2 such as the B2-receptor expressed in endothelial cell. B2-receptor is a G protein-coupled receptor (GPCR)

A "receptor" or "receptor molecule" is a soluble or membrane bound/associated protein or glycoprotein comprising one or more domains to which a ligand binds to form a receptor-ligand complex. By binding the ligand, which may be an agonist or an antagonist the receptor is activated or inactivated and may initiate or block pathway signaling.

30

By "ligand" or "receptor ligand" is meant a natural or synthetic compound which binds a receptor molecule to form a receptor-ligand complex. The term ligand includes agonists, antagonists, and compounds with partial agonist/antagonist action.

5 An "agonist" or "receptor agonist" is a natural or synthetic compound which binds the receptor to form a receptor-agonist complex by activating said receptor and receptor-agonist complex, respectively, initiating a pathway signaling and further biological processes.

By "antagonist" or "receptor antagonist" is meant a natural or synthetic compound that has a biological effect opposite to that of an agonist. An antagonist binds the receptor and blocks the action of a receptor agonist by competing with the agonist for receptor. An  
10 antagonist is defined by its ability to block the actions of an agonist or/and any biological consequences of receptor activation.

The term "B2-receptor antagonist" or "bradykinin B2 receptor antagonist" or "B2R antagonisit" has its general meaning in the art and refers to a compound that selectively blocks the action of a B2 receptor agonist (kinin bradykinin and lysil-bradykinin). As used herein,  
15 the term "selectively blocks" refers to a compound that preferentially binds to (and inactivates B2-receptor) with a greater affinity and potency, respectively, than its interaction with the other sub-types or isoforms of the bradykinin receptor family (B1-receptor). Compounds that prefer B2-receptor, but that may also block other bradykinin receptor sub-types, as partial or full antagonists, and thus that may block multiple bradykinin receptor activities, are  
20 contemplated. Typically, a B2-receptor antagonist is a small organic molecule a peptide (or a peptide analog) or a chemical entity.

"B2R antagonist" refers to any B2R antagonist that is currently known in the art or that will be identified in the future, and includes any chemical entity that, upon administration to a patient, results in inhibition of a biological activity associated with activation of the B2R in  
25 the patient (in particularly vasoconstriction and inhibition of the hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) as shown in the example), including any of the downstream biological effects otherwise resulting from the binding to B2R of its natural ligand. Such B2R antagonist include any agent (peptide, chemical entity (peptidic analog), ...)  
30 that may block B2R activation or any of the downstream biological effects of B2R activation.

In one embodiment of the invention, the compound which is a B2-receptor antagonist may be a peptide, such as NPC-349, HOE140 (Icatibant/Ficazir), CP-0127 Bradicior/Deltibant), B9340, B9430 or B9870 (CU201/Breceptin), which are lead peptide B2R antagonists. Such peptides and derived compounds are described, for example, in

US5935932 (NPC349), EP0413277, EP04551133, US5648333 (HOE140), WO9217201, US5416191 (CP0127), WO9616081 (B9340, B9430), US5849863 WO9709347 (B9870).

5 A B2-receptor antagonist also includes peptide mimetics, metabolically and/or conformationally stabilized peptide analogs, derivatives, and pseudo-peptides with one or more non-peptide bonds, especially containing D-amino acids and/or at least one non-peptide bond. Bradykinin and related peptides, and other peptides, mimetics and/or metabolically and/or conformationally stabilized peptide analogs and/or derivatives or pseudopeptides with one or more non-peptide bonds, especially containing D-amino acids and/or at least one non-peptide bond, of the invention are useful in the prevention or treatment of the hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) in a patient treated with an ACEI.

In one embodiment, the B2-receptor antagonist may be a small chemical entity such as the following compounds: FR173657, LF16-0687 (Anatibant), Bradyzyde, MEN16132 15 (Fastibant), BKM-570 and derived compounds described, for example, in. EP 06223618 (FR173657) WO9824783, EP0944618 (LF16-0687) Burgess GM et al (Br J Pharmacol 2000; 129: 77-86) and Dziadulewicz EK et al (J Med Chem. 2000 Mar 9;43(5):769-71) (for Bradyzyde) W02006040004 W02003103671 (MEN16132), Gera L, et al. In. Peptides 2000 (Proceedings of the 26th European Peptide Symposium); Montpellier, EDK, Paris; 2001. 20 pages 637-8 Martinez J, Fehrentz J-A, editors. (BKM-570)

Examples of B2R antagonists include but are not limited to any of the B2R antagonists described in Whalley E.T. et al. (Exp Opin. Drug Discov. 2012 7(12) page 1129-1148) in Dziadulewicz EK (Exp Opin. Ther. Patents. 2005 15(7) page 829-589) in Fincham CI et al 25 (Exp Opin. Ther. Patents. 2009 19(7) page 919-941) all of which are herein incorporated by reference.

As used herein, the term "patient" denotes a mammal, such as a rodent, a feline, a canine, and a primate. Preferably a subject according to the invention is a human.

In the context of the present invention, the term "under critical condition" means the 30 situation where the patient has hypotension during any medical or surgical emergencies such as emergency anaesthesia or shock resuscitation like hypovolemic (i.e. hemorrhagic), or vasoplegic (i.e. septic) shocks. (see Weil MH, Henning RJ. New concepts in the diagnosis and fluid treatment of circulatory shock. Thirteenth annual Becton, Dickinson and Company Oscar Schwidetsky Memorial Lecture. Anesth Analg. 1979 Mar-Apr;58(2):124-32).



In a preferred embodiment the critical condition is hemorrhagic shock and septic shock.

As used herein, the term "ACEi" or "angiotensin-converting enzyme inhibitors" means a pharmaceutical drug used primarily for the treatment of hypertension and congestive heart failure. This group of drugs causes dilatation of blood vessels, which results in lower blood pressure. ACE inhibitors inhibit angiotensin-converting enzyme (a component of the blood pressure-regulating renin-angiotensin system), thereby decreasing the tension of blood vessels and blood volume, thus lowering blood pressure. Frequently prescribed ACE inhibitors include perindopril, captopril, enalapril, lisinopril, and ramipril.

10

### **Therapeutic methods and uses**

The present invention provides for methods and compositions for use in the treatment and prevention of the hypotensive effect of ACEIs, in a patient treated with an ACEI, said patient being under a critical condition.

15

Thus, an object of the invention is a B2R antagonist for use in the prevention of the hypotensive effect of ACEIs, in a patient treated with an ACEI, said patient is under a critical condition.

In an embodiment, the critical condition is selected from emergency anaesthesia or shock resuscitation.

20

In a specific embodiment, shock resuscitation is selected from the group consisting of: hypovolemic (i.e. hemorrhagic), or vasoplegic (i.e. septic) shocks.

In a preferred embodiment the critical condition is hemorrhagic shock or septic shock.

B2R antagonists according to the invention include but are not limited to:

25

i. NPC-349, HOE140, CP-0127, B9430, B9870 (peptide BR2 antagonists);

ii. FR173657, LF16-0687, Bradyzyde, MEN16132, BKM-570 (non peptide BR2 antagonists); and derived compounds.

30

In first embodiment, the B2R antagonist is a peptide (or a modified peptide).

Peptide B2R antagonists that may be used in the invention include NPC-349, HOE140 (Icatibant/Ficazir), CP-0127 (Bradicior<sup>TM</sup>/Deltibant), B9340, B9430 and B9870 (CU201/Breceptin), which are lead peptide B2R antagonists. Such peptides and derived compounds are described, for example, in: US5935932 (NPC349), EP0413277, EP04551133, 5 US5648333 (HOE140), WO9217201, US5416191 (CP0127), WO9616081 (B9340, B9430), US5849863, WO9709347 (B9870).

A specific example of a peptide B2R antagonist that may be used according to the present invention is NPC-349 (DPhe<sup>7</sup>-BK substituted with  $\beta$ -(2-thienyl)-alanine with incorporation of an N-terminal D-arginine and 4-hydroxyproline at position 3) the 'first- 10 generation' B2R peptide antagonist. NPC-349 and derived compound are disclosed in Patent US5935932). NPC-349 has the following sequence:

(D)Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser-(D)Phe-Thi-Arg (SEQ ID N°1)

Another specific example of a peptide B2R antagonist that may be used according to 15 the present invention is HOE140 (Icatibant / Firazyr®) Shire Pharmaceuticals) a 'second-generation' B2R peptide antagonist that successfully incorporated rigidity, stability, enhanced binding and potency and lacked partial agonist activity. In this molecule, DPhe<sup>7</sup> was replaced by the conformationally constrained analog tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (DTic) and Thi<sup>8</sup> by octahydroindole-2-carboxylic acid (Oic) (DArg-[Hyp<sup>3</sup>,Thi<sup>5</sup>,DTic<sup>7</sup>,Oic<sup>8</sup>]-BK). DTic 20 and Oic are tertiary amides similar to proline and hydroxyproline but are resistant to endo- and exopeptidase activity and this, along with DArg at the amino terminus gave these molecules extreme stability. HOE140 displays an impressive pharmacodynamic (PD) and pharmacokinetic (PK) profile in a vast array of in vitro and in vivo studies, including humans demonstrating high potency, stability and duration of action in most standard mammalian 25 assay systems. HOE140 and derived compound are disclosed in patent applications EP0413277, EP04551133, US5648333. HOE140 has the following sequence:

(D)Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-Ser-(D)Tic-Oic-Arg (SEQ ID N°2)

Another specific example of a peptide B2R antagonist that may be used according to 30 the present invention is CP-0127 (Bradicior<sup>TM</sup>/Deltibant by Cortech Inc.), the homodimer of DArg<sup>0</sup>-[Hyp<sup>3</sup>,Thi<sup>5</sup>,Cys<sup>6</sup>,DPhe<sup>7</sup>,Leu<sup>8</sup>]-BK linked together through Cys<sup>6</sup> by bis-succinimido-hexane (BSH). CP-0127 had moderate potency in several assays, improved stability and efficacy in several in vivo models of trauma (Cheronis JC, et al. J Med Chem

1992;35: pages 1563-72). CP-0127 and derived compound are disclosed in Patent applications WO9217201, US5416191). CP-0127 has the following sequence:

(D)Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Cys-(D)Phe-Leu-Arg (SEQ ID N°3)  
|BSH

5 (D)Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Phe-Cys-(D)Phe-Leu-Arg (SEQ ID N°3)

Another specific example of a peptidic B2R antagonist that may be used according to the present invention is B9430. B9430 (and its derivatives like B9340) comprises  $\alpha$ -(2-indanyl)glycine (Igl) at positions 5 and 7 (Gera L, Stewart JM. Immunopharmacology 1996;33: pages174-7). B9430 and derived compounds which showed high potency on both  
10 B1R and B2R over a wide range of animal and human cells and bioassay systems, were highly resistant to kininases and had very long duration of action in vivo (Stewart JM, Gera L, Hanson W, et al. Immunopharmacology 1996;33:51-60). B9430 and derived compound are disclosed in Patent application WO9616081. B9430 has the following sequence:

15 (D)Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-IgI-Ser-(D)Igl-Oic-Arg (SEQ ID N°4)

Another specific example of a peptidic B2R antagonist that may be used according to the present invention is B9870 (CU201 / Breceptin), formed by crosslinking B-9430 with a suberimidyl (SUIM) linker at the amino end and which retained almost the same B2R and  
20 B1R receptor binding profile in guinea pig and human as the monomer and additionally introduced potent anticancer activity into the peptide. B9870 and derived compound are disclosed in patent applications US5849863 WO9709347). B9870 has the following sequence:

(D)Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-IgI-Ser-(D)Igl-Oic-Arg (SEQ ID N°4)  
25 | SUIM  
(D)Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-IgI-Ser-(D)Igl-Oic-Arg (SEQ ID N°4)

In the preferred embodiment, a peptidic B2R antagonist is HOE140.

30 In second embodiment, the B2R antagonist is a non peptidic entity such as small chemical entity.

Non peptide antagonists that may be used in the invention include, FR173657, LF16-0687(Anatibant), Bradyzyde, MEN16132 (Fastibant), BKM-570 and derived compounds described, for example, in. EP 06223618 (FR173657) WO9824783, EP0944618 (LF16-0687)

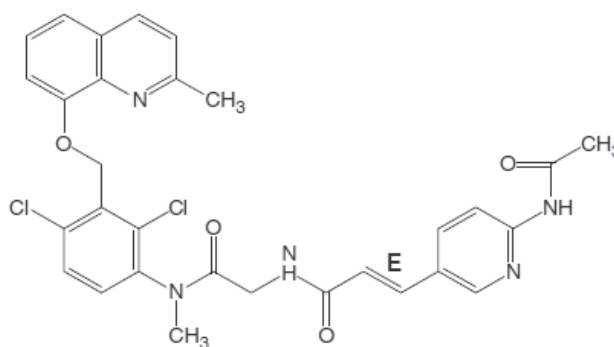
Burgess GM et al (Br J Paharmacol 2000; 129: 77-86) and Dziadulewicz EK et al (J Med Chem. 2000 Mar 9;43(5):769-71) (for Bradyzyde) W02006040004 W02003103671 (MEN16132), Gera L, et al. In. Peptides 2000 (Proceedings of the 26th European Peptide Symposium); Montpellier, EDK, Paris; 2001. p. 637-8 Martinez J, Fehrentz J-A, editors) (for BKM-570).

Additional non-limiting examples of non peptidic B2R antagonists include any of the B2R antagonists described in Dziadulewicz EK. (Exp Opin. Ther. Patents. 2005 15(7) page 829-589) in Fincham CI et al (Exp Opin. Ther. Patents 2009 19(7) page 919-941), all of which are herein incorporated by reference.

10

A specific example of a non peptidic B2R antagonist that may be used according to the present invention is FR173657 ((2E)-3-[6-(acetylamino)-3-pyridinyl]-N-[2-[[2, 4-dichloro-3-[[2-methyl-8-quinolinyl]oxy]methyl]phenyl] methylamino]-2-oxoethyl]-2-propenamamide (CAS: 167838-64-4)). FR173357 and related molecules showed high affinity and selectivity for B2Rs(Aramori I, Zenkoh J, Morikawa N, et al. Mol Pharmacol 1997;51:171-6). In vivo, they potently inhibited BK-induced bronchoconstriction in guinea pigs, reduced carrageenan-induced paw edema, caerulein-induced pancreatitis in rats and alleviated kaolin-induced pain in mice by oral administration (Asano M. et al. Immunopharmacology 1999;43:163-8). FR173657 and derived compound are disclosed in Patent Application EP 06223618. FR173657 has the following structure:

20

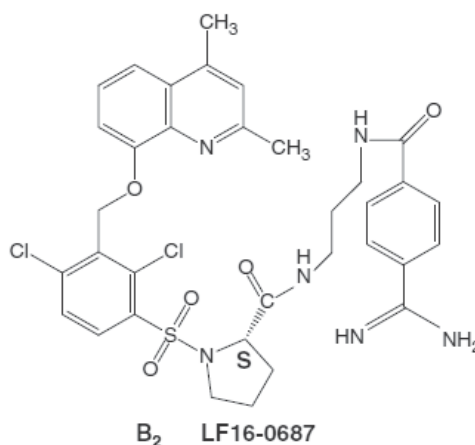


**B<sub>2</sub> FR173657**

Another specific example of non peptidic B2R antagonist that is used according to the present invention is LF16-0687 (((2S)-N-[3-[[4-(aminoiminomethyl)benzoyl]amino] propyl]-1-[[2,4-dichloro-3-[[2,4-dimethyl-8-quinolinyl]oxy] methyl] phenyl]sulfonyl]-2-pyrrolidinecarboxamide (CAS: 209 733-45-9)) (also known as Anatibant or XY2405) from

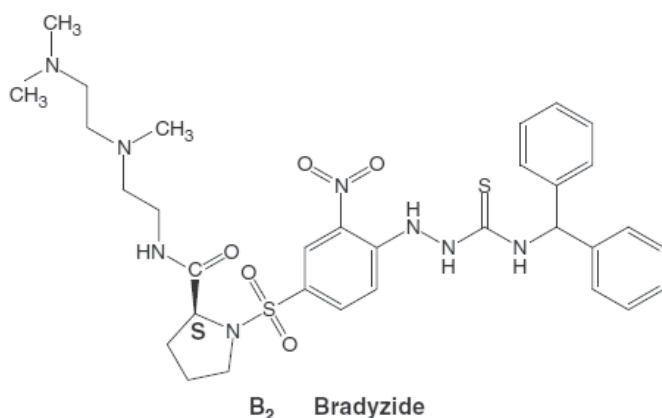
25

Fournier Pharma; LF16-0687 had an impressive pharmacological profile with high affinity across species (Pruneau D, et al. Immunopharmacology 1999;43:187-94) and efficacy in multiple models of head trauma and ischemic brain injury (IBI) (Zweckberger K, et al. Neurosci Lett 2009;454(2):115-17). LF16-0687 and derived compound are disclosed in Patent Applications WO9824783, EP0944618. LF16-0687 has the following structure:



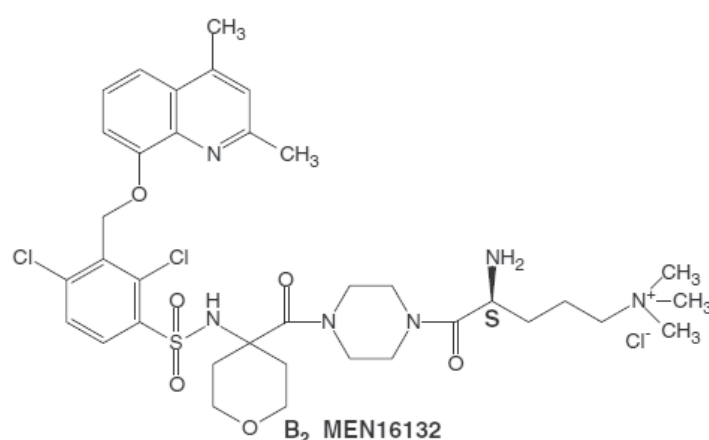
Another specific example of a non peptidic B<sub>2</sub>R antagonist is Bradyzide ((2*S*)-N-[2-[[2-(dimethylamino) ethyl] methylamino] ethyl]-1-[[4-[2-[[[(diphenylmethyl)amino] thioxomethyl] hydrazinyl]-3-nitrophenyl]sulfonyl]-2-pyrrolidinecarboxamide (CAS: 263011-13-8) from Novartis is an orally active molecule, highly effective in animal models of pain and is interesting in that it showed exceptional selectivity for the rat versus the human B<sub>2</sub>R (Burgess GM et al (Br J Paharmacol 2000; 129: 77-86) and Dziadulewicz EK et al (J Med Chem. 2000 Mar 9;43(5):769-71). Bradyzide has the following structure:

15

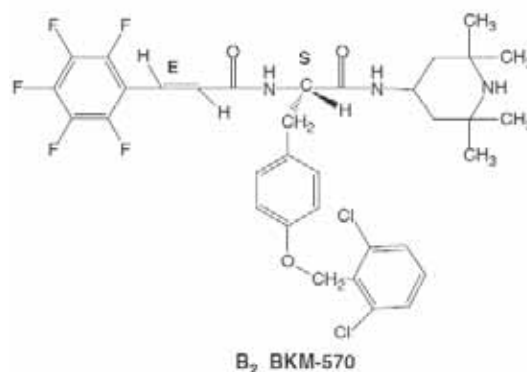


Another suitable non peptidic B<sub>2</sub>R antagonist is MEN16132 ((also known as Fastibant); (dS)-d-amino-4-[[4-[[[2,4-dichloro-3-[(2,4-dimethyl-8-quinolinyloxy)methyl]phenyl]sulfonyl]amino]tetrahydro-2H-pyran-4-yl]carbonyl]-N,N,N-trimethyl-1-piperazinepentanaminium chloride (CAS: 869880-33-1)) having a K<sub>i</sub> of 10.5 nM at the human B<sub>2</sub>R and excellent efficacy in a range of animal models of inflammation (Valenti C, et al. J Pharmacol Exp Ther 2005;315:616-23). Based on these studies, MEN16132 underwent a Ph II clinical trial for knee pain in osteoarthritis. MEN16132 and derived compounds are disclosed in Patent Applications W02006040004 W02003103671). MEN16132 has the following structure:

10



Another suitable non peptidic B<sub>2</sub>R antagonist is BKM-570 ((aS)-4-[(2,6-dichlorophenyl)methoxy]-a-[[1-oxo-3-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-2-propen-1-yl]amino]-N-(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidiny)benzenepropanamide (CAS: 259885-54-6)) is a lead molecule that demonstrates impressive antitumor activity in small cell lung cancer (SCLC) SHP-77 and good activity in prostate cancer PC-3 xenografts (Gera L, et al. In: Peptides 2000 (Proceedings of the 26th European Peptide Symposium); Montpellier, EDK, Paris; 2001. p. 637-8 Martinez J, Fehrentz J-A, editors.). BKM-570 and has the following structure:



Another object of the invention relates to a method for preventing or treating the hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) in a patient treated with an ACEI, whereas said patent is under critical condition comprising administering a subject in need thereof with a therapeutically effective amount of a B2R antagonist as described above.

In the context of the invention, the term "treating" or "treatment", as used herein, means reversing, alleviating, inhibiting the progress of, or preventing the disorder or condition to which such term applies, or one or more symptoms of such disorder or condition.

According to the invention, the term "patient", is intended for a human or non-human mammal affected or likely to be affected with the hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) in a patient treated with an ACEI, whereas said patent is under critical condition.

By a "therapeutically effective amount" of the antagonist or inhibitor of expression as above described is meant a sufficient amount of the B2R antagonist to treat or prevent the hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) in a patient treated with an ACEI, whereas said patent is under critical condition at a reasonable benefit/risk ratio applicable to any medical treatment. It will be understood, however, that the total daily usage of the compounds and compositions of the present invention will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular patient will depend upon a variety of factors including the disorder being treated and the severity of the disorder; activity of the specific compound employed; the specific composition employed, the age, body weight, general health, sex and diet of the patient; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the specific compound employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific polypeptide employed; and like factors well known in the

medical arts. For example, it is well within the skill of the art to start doses of the compound at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day.

5 Preferably, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the patient to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, preferably from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to

10 about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

**Pharmaceutical compositions:**

The B2R antagonist of the invention as above defined may be combined with

15 pharmaceutically acceptable excipients, to form therapeutic compositions for use in preventing or treating the hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) in a patient treated with an ACEI, whereas said patent is under critical condition.

In an embodiment, the critical condition is selected from emergency anaesthesia or shock resuscitation.

20 In a specific embodiment, shock resuscitation is selected from the group consisting of: hypovolemic (i.e. hemorrhagic), or vasoplegic (i.e. septic) shocks.

In a preferred embodiment the critical condition is hemorrhagic shock or septic shock.

In an embodiment, B2R antagonist according to the invention of the pharmaceutical

25 composition includes but is not limited to:

i. NPC-349, HOE140, CP-0127, B9430, B9870 (peptideBR2antagonists);

ii. FR173657, LF16-0687, Bradyzyde, MEN16132, BKM-570 (non peptide BR2 antagonists);

and derived compounds.

30 In preferred embodiment, the B2R antagonist of the pharmaceutical composition is HOE140 and the critical condition is hemorrhagic shock.



"Pharmaceutically" or "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to a mammal, especially a human, as appropriate. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, 5 encapsulating material or formulation auxiliary of any type.

In the pharmaceutical compositions of the present invention for oral, sublingual, subcutaneous, intramuscular, intravenous, transdermal, local or rectal administration, the active principle, alone or in combination with another active principle, may be administered in a unit administration form, as a mixture with conventional pharmaceutical supports, to 10 animals and human beings. Suitable unit administration forms comprise oral-route forms such as tablets, gel capsules, powders, granules and oral suspensions or solutions, sublingual and buccal administration forms, aerosols, implants, subcutaneous, transdermal, topical, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, subdermal, transdermal, intrathecal and intranasal administration forms and rectal administration forms.

15 Preferably, the pharmaceutical compositions contain vehicles which are pharmaceutically acceptable for a formulation capable of being injected. These may be in particular isotonic, sterile, saline solutions (monosodium or disodium phosphate, sodium, potassium, calcium or magnesium chloride and the like or mixtures of such salts), or dry, especially freeze-dried compositions which upon addition, depending on the case, of sterilized 20 water or physiological saline, permit the constitution of injectable solutions.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions; formulations including sesame oil, peanut oil or aqueous propylene glycol; and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases, the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy 25 syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi.

Solutions comprising compounds of the invention as free base or pharmacologically acceptable salts may be prepared in water suitably mixed with a surfactant, such as 30 hydroxypropylcellulose. Dispersions may also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

The B2R antagonist of the invention may be formulated into a composition in a neutral or salt form. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts (formed with the

free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups may also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like.

The carrier may also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity may be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms may be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions may be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminium monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active polypeptides in the required amount in the appropriate solvent with several of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

Upon formulation, solutions are administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms, such as the type of injectable solutions described above, but drug release capsules and the like may also be employed.

For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the solution is suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, sterile

aqueous media that may be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. For example, one dosage could be dissolved in 1 ml of isotonic NaCl solution and either added to 1000 ml of hypodermoclysis fluid or injected at the proposed site of infusion. Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

The B2R antagonist of the invention may be formulated within a therapeutic mixture to comprise about 0.0001 to 1.0 milligrams, or about 0.001 to 0.1 milligrams, or about 0.1 to 1.0 or even about 10 milligrams per dose or so. Multiple doses may also be administered.

In addition to the compounds of the invention formulated for parenteral administration, such as intravenous or intramuscular injection, other pharmaceutically acceptable forms include, e.g. tablets or other solids for oral administration; liposomal formulations; time-release capsules; and any other form currently used.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

#### **FIGURES:**

##### **Figure 1 Pressure targeted hemorrhagic shock**

Hemodynamic impacts of HOE-140 during pressure controlled hemorrhagic shock (HS) in chronic Angiotensin converting enzyme inhibition treated mice (ACEi); ACEi: wild type shocked mice treated with chronic ACEi; ACEi+HOE: wild type shocked mice treated with both chronic ACEi and HOE-140; HOE: wild type shocked mice treated with HOE-140 alone. n=5-13.\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001. Initial blood pressure was significantly lower in ACEi mice when compared to ACEi+HOE (figure 1a, mean  $\pm$  SEM). The mean volume of blood withdrawal was lower in ACEi group when compared to other group (Figure 1b, box plot).

##### **Figure 2 Volume targeted hemorrhagic shock**

Targeted volume hemorrhagic shock (HS) protocol assesses the impact of HOE-140 on HS outcome in chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) treated mice. WT: wild type shocked mice; ACEi: wild type shocked mice treated with chronic ACEi; ACEi+HOE: wild type shocked mice treated with both chronic ACEi and HOE-140. n=8-10 \* p<0.005, \*\* p< 0.001. HOE 140 allowed restoring the mean arterial blood pressure during

anesthesia and HS in ACEi shocked mice. Min shock: minimal mean arterial blood pressure during shock. Mean shock: mean arterial blood pressure during shock

**Figure 3 Biological consequence of hemorrhagic shock**

Determination of blood lactate after volume controlled hemorrhagic shock in mice.

- 5 WT: wild type shocked mice; ACEi: wild type shocked mice treated with chronic ACEi; ACEi+HOE: wild type shocked mice treated with both chronic ACEi and HOE-140. n = 6-8.\* p<0.005.

**EXAMPLE:**

10 **Material & Methods**

Animals. C57/BL6 wild-type mice were obtained from Harlan (Harlan France, Gannat, France). Animal experimentations were performed according to national and institutional animal care and ethical guidelines and were approved by local board.

- 15 Protocol Design. Based on recently published HS model (18), the hemodynamic and biological effects of icatibant in ACEi treated mice were studied by a dual protocol: 1) a pressure targeted hemorrhagic shock protocol (PTS) and 2) a volume targeted hemorrhagic shock protocol (VTS). The aim of PTS was to determine the hemodynamic impact of icatibant compared to the inventors' previous investigations whereas the objective of VTS  
20 was to assess the impact of icatibant on HS outcome in ACEi treated mice.

- Experimental groups were performed using 18 wk-old mice randomly assigned as follows: 1/ Wild type (WT) shocked mice (WT, n = 13 for PTS and n = 10 for VTS), 2/ WT shocked mice treated with 7 days of ACEi (ACEi, n = 5 for PTS and 8 for VTS) and 3/ WT shocked mice treated with 7 days of ACEi and one shot of icatibant before anesthesia,  
25 (ACEi+HOE, n = 6 for PTS and n = 8 for VTS). Experimental groups were identical for the 2 protocols. ACEi (Ramipril, Aventis Pharma, Germany) was given at a dose of 1mg/kg/j in drinking water 7 days before shock and icatibant (Aventis Pharma, Germany) was administrated at a dose of 250 µg/kg subcutaneously just before anesthesia. After shock procedure, mice were sacrificed at 2 days for PTS and at 3 hours for VTS.

30

HemorrhagicShockProtocols. HS was induced as previously described (18). Briefly, animals were anesthetized with ketamine and xylazine (125 mg/kg and 10 mg/kg, respectively) and intubated using an intratracheal canula. Mechanical ventilation (9 mL/kg, 150 breath/min) was carried out with a specific ventilator Minivent 845 (Hugo Sachs

Elektronik, March-Hugstetten, Germany). The left jugular vein and femoral artery were catheterized and anesthesia was maintained with ketamine (20 mg/kg/hr) until the end of shock. Animal body temperature was continuously monitored and maintained at 37°C. All along the procedure, femoral arterial blood pressure was monitored using a blood pressure analyzer (IOX, EMKA technologie, France).

5                   - Pressure targeted HS (PTS). Blood was withdrawn through the femoral arterial line until the targeted arterial blood pressure (MAP) of 35 mmHg was reached. Blood was stored in 0.15 mL of heparinized serum. MAP was maintained at  $35 \pm 5$  mmHg for 2 hours by successive blood withdrawal or replacement (by steps of 0.025 mL).

10                  - Volume targeted HS (VTS). A systematic blood volume of 0.30 mL was withdrawn through the femoral arterial line. This volume was the mean volume withdrawal in ACEi treated mice during PTS. As in PTS, blood was stored in 0.15 mL of heparinized serum.

                    At the end of 2 hours shock in the 2 protocols, the blood previously stored and a lactated Ringer's solution (twice the initial blood volume) was infused to provide appropriate  
15   fluid resuscitation.

Hemodynamic analysis. MAP (Mean Arterial Blood Pressure) was reported during anesthesia, just before shock (MAPi), at the beginning of the shock (MAPis), during shock with the measurement of the lowest MAP (MAPmin), and at the end of the resuscitation  
20   (MAPf). The average mean MAP during shock was also reported (MAPm). In the PTS protocol, blood volume withdrawn was systematically reported.

Biological analysis. At the end of the procedure, a catheter was introduced into the abdominal aorta and blood was collected. Biological analysis was performed on whole blood.  
25   Lactic acid, a prognostic marker of severity, was measured to evaluate organ failure.

Statistical methods. Data are provided as means  $\pm$  SEM. Comparisons between groups were performed using the nonparametric Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by a post hoc Dunn's test. Results with  $p < 0.05$  were considered as statistically  
30   significant. Analyses were performed using GraphPad Prism 4 (Graphpad Software Inc, San Diego, CA).

## **Results**

### Hemodynamic impact of HOE-140 during HS.

In PTS protocol (Fig 1a and 1b), MAPi in WT, ACEi, and ACEi+HOE groups were 75.1±9.5, 67.2±13.5, and 81.2±9.8 mmHg, respectively. ACEi group exhibited significantly lower MAPi when compared to ACEi+HOE group. At the end of the resuscitation, MAPf in WT, ACEi, and ACEi+HOE mice were 55.7±5.5, 42.0±3.2, and 48.6±6.0 mmHg, respectively. As expected, no difference in MAP during HS was observed between groups (Figure 1a).

Means blood withdrawn during PTS protocol were 612±118 µl in the WT group, 402±117 µl in the ACEi group, and 631±124 µl in the ACEi+HOE group. The mean blood volume withdrawal was lower in ACEi group when compared to other group (Figure 1b).  
10 Icatibant attenuated also hypotensive effects of ACEi during HS.

In VTS protocol (Figure 2), MAPi in WT, ACEi, and ACEi+HOE groups were 74.8±9.4, 63.1±8.4, and 73.0±8.8 mmHg, respectively. MAPmin and MAPm of these same groups were 32.7±9.5 and 42.4±9.4, 22.1±8.3 and 30.1±8.3, and 30.7±8.8 and 38.3±8.8 mmHg, respectively. At each time, MAP was significantly lower in ACEi group, when compared to WT and ACEi+HOE groups. No difference for MAP was observed between WT and ACEi+HOE group. Interestingly, icatibant allowed restoring the MAP during anesthesia and HS in ACEi shocked mice.

#### Biological impact of HOE-140 during HS.

20 Three hours after VTS, lactate acid was significantly higher in the ACEi group compared to others groups (Figure 3).

### **Conclusions**

25 The results show that acute B2R blockade significantly attenuates deleterious hypotensive effect of ACEi during HS mice. This beneficial effect of B2R blockade is quickly reached and sustainable with a single shot of icatibant, a highly specific B2R antagonist. This hemodynamic effect of icatibant on HS mice pre-treated for 7 days with ACEi was validated by 2 protocols (PTS and VTS). The results also support that the beneficial hemodynamic  
30 effect of icatibant in ACEi treated mice could reduce plasma lactate acid, a prognostic marker of severity during shock.

**REFERENCES:**

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

1. Von Lueder TG, Krum H. RAAS inhibitors and cardiovascular protection in large scale trials. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013 Apr;27(2):171–9.
2. St Peter WL, Odum LE, Whaley-Connell AT. To RAS or Not to RAS? The Evidence for and Cautions with Renin-Angiotensin System Inhibition in Patients with Diabetic Kidney Disease. *Pharmacotherapy.* 2013 May;33(5):496–514.
3. Coriat P, Richer C, Douraki T, Gomez C, Hendricks K, Giudicelli JF, et al. Influence of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on anesthetic induction. *Anesthesiology.* 1994 Aug;81(2):299–307.
4. Auron M, Harte B, Kumar A, Michota F. Renin-angiotensin system antagonists in the perioperative setting: clinical consequences and recommendations for practice. *Postgrad Med J.* 2011 Jul;87(1029):472–81.
5. Collier JG, Nachev C, Robinson BF. Effect of catecholamines and other vasoactive substances on superficial hand veins in man. *Clin Sci.* 1972 Sep;43(3):455–67.
6. FOX RH, GOLDSMITH R, KIDD DJ, LEWIS GP. Bradykinin as a vasodilator in man. *J. Physiol. (Lond.).* 1961 Aug;157:589–602.
7. Brunner HR, Waeber B, Nussberger J. What we would like to know about the antihypertensive mechanisms of angiotensin converting enzyme inhibition. *J Hypertens Suppl.* 1988 Dec;6(3):S1–5.
8. Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 1980 Mar;32(1):1–46.
9. Cherry PD, Furchgott RF, Zawadzki JV, Jothianandan D. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1982 Mar;79(6):2106–10.
10. Schini VB, Boulanger C, Regoli D, Vanhoutte PM. Bradykinin stimulates the production of cyclic GMP via activation of B2 kinin receptors in cultured porcine aortic endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990 Feb;252(2):581–5.
11. Wirth K, Hock FJ, Albus U, Linz W, Alpermann HG, Anagnostopoulos H, et al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br. J. Pharmacol.* 1991 Mar;102(3):774–7.

12. Rhaleb NE, Rouissi N, Jukic D, Regoli D, Henke S, Breipohl G, et al. Pharmacological characterization of a new highly potent B2 receptor antagonist (HOE 140: D-Arg-[Hyp3,Thi5,D-Tic7,Qic8]bradykinin). *Eur. J. Pharmacol.* 1992 Jan 14;210(2):115–20.
13. Barbe F, Su JB, Guyene TT, Crozatier B, Ménard J, Hittinger L. Bradykinin pathway is involved in acute hemodynamic effects of enalaprilat in dogs with heart failure. *Am. J. Physiol.* 1996 Jun;270(6 Pt 2):H1985–1992.
14. Linz W, Schölkens BA. A specific B2-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br. J. Pharmacol.* 1992 Apr;105(4):771–2.
15. Bouaziz H, Joulin Y, Safar M, Benetos A. Effects of bradykinin B2 receptor antagonism on the hypotensive effects of ACE inhibition. *Br. J. Pharmacol.* 1994 Nov;113(3):717–22.
16. Buléon M, Allard J, Jaafar A, Praddaude F, Dickson Z, Ranera M-T, et al. Pharmacological blockade of B2-kinin receptor reduces renal protective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in db/db mice model. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2008 May;294(5):F1249–1256.
17. Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Brett SE, Bender N, Ritter JM. Inhibition of bradykinin-induced vasodilation in human forearm vasculature by icatibant, a potent B2-receptor antagonist. *Br J Clin Pharmacol.* 1994 Oct;38(4):317–21.
18. Mayeur N, Minville V, Jaafar A, Allard J, Al Saati T, Guilbeau-Frugier C, et al. Morphologic and functional renal impact of acute kidney injury after prolonged hemorrhagic shock in mice. *Crit Care Med [Internet]*. 2011 May 12 [cited 2011 May 28]



**CLAIMS:**

1. An antagonist of the Bradykinin 2 receptor (BR2) for use in the prevention or treatment of the hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEi) in a patient treated with an ACEi, whereas said patient is under critical condition.  
5
2. The antagonist of BR2 for use according to Claim 1, wherein critical conditions is selected from emergency anaesthesia or shock resuscitation.
3. The antagonist of BR2 for use according to Claim 2, wherein shock resuscitation is selected from the group consisting of: hypovolemic (i.e. hemorrhagic), or vasoplegic (i.e. septic) shocks.  
10
4. The antagonist of BR2 for use according to any one of Claims 1 to 3, wherein critical conditions is hemorrhagic shock or septic shock.
5. The antagonist of BR2 for use according to any one of Claims 1 to 4, which is selected from the group consisting of:  
15
  - i.; NPC-349, HOE140, CP-0127, B9430, B9870
  - ii. FR173657, LF16-0687, Bradyzyde, MEN16132, BKM-570.
6. The antagonist of BR2 according to any one of Claim 1 to 5, wherein the antagonist of BR2 is HOE140 and critical condition is hemorrhagic shock.
7. A pharmaceutical composition, comprising an antagonist of BR2 according to any one of Claims 1-4, for use in the prevention of the hypotensive effect of ACEIs, in a patient treated with an ACEI, said patient is under critical conditions.  
20
8. The pharmaceutical composition for use according of Claim 7, wherein critical conditions is selected from emergency anaesthesia or shock resuscitation.
9. The pharmaceutical composition for use according to Claim 8 wherein shock resuscitation is selected from the group consisting of: hypovolemic (i.e. hemorrhagic), or vasoplegic (i.e. septic) shocks.  
25

10. The pharmaceutical composition for use according to any one of Claim 7 to 9, wherein critical conditions is hemorrhagic shock or septic shock.
11. The pharmaceutical composition for use according to any one of Claim 7 to 10, wherein the antagonist of BR2 is selected from the group consisting of
- 5           i.; NPC-349, HOE140, CP-0127, B9430, B9870;
- ii. FR173657, LF16-0687, Bradyzyde, MEN16132, BKM-570.
12. The pharmaceutical composition for use according to any one of Claim 7 to 11, wherein the antagonist of BR2 is HOE140 and critical condition is hemorrhagic shock.

### **ABSTRACT OF THE INVENTION**

5           BR2 ANTAGONIST FOR USE IN THE PREVENTION OF THE HYPOTENSIVE EFFECT OF PATIENT TREATED WITH ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME INHIBITORS (ACEI)

10           The present invention relates to a method of preventing and/or treating the hypotensive effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEI) in a patient treated with ACEI, said patient being under a critical condition. More specifically, it concerns the use of a Bradykinin 2 receptor (BR2) antagonist for the prevention and treatment of the hypotensive effect of ACEI in a patient treated with ACEI undergoing emergency anaesthesia or shock resuscitation like hypovolemic shock (i.e. hemorrhagic shock (HS), or vasoplegic shock (i.e. 15           septic shock).

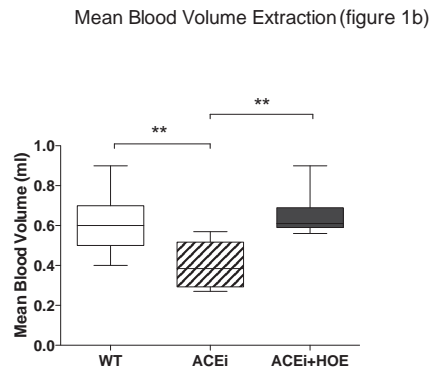
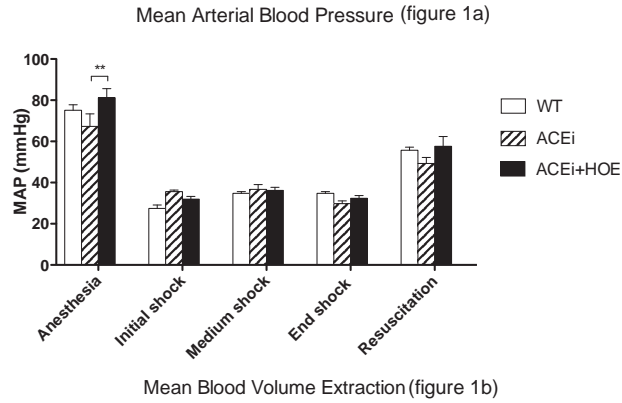


Figure 2

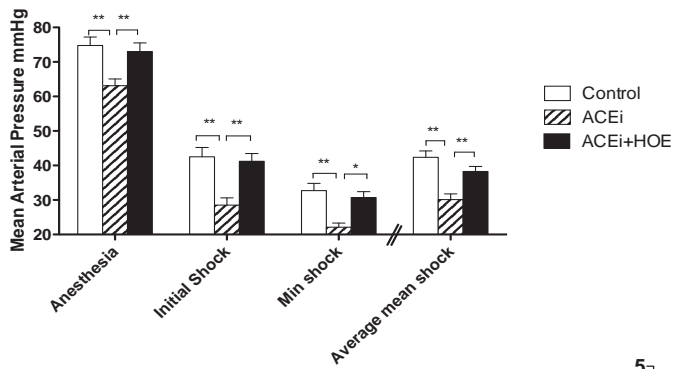
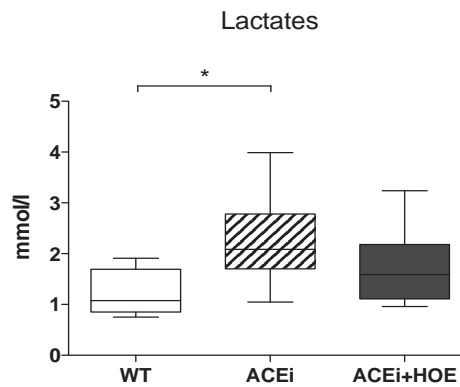


Figure 3



## REFERENCES

1. Abelous JE, Bardier E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *CR Soc Biol.* 1909;66:511-2.
2. Kraut H, Frey EK, Werle E. Der Nachweiseines Kreislauf Hormons in der Pankreasdrüse. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem.* 1930;189:97-106.
3. Rocha E Silva M, Beraldo WT, Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol.* 1949 Feb;156(2):261-73.
4. Yang HY, Erdös EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta.* 1970 Aug 21;214(2):374-6.
5. Vavrek RJ, Stewart JM. Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides.* 1985 Apr;6(2):161-4.
6. Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev.* 1980 Mar;32(1):1-46.
7. Schmaier AH. The kallikrein-kinin and the renin-angiotensin systems have a multilayered interaction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Jul;285(1):R1-13.
8. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci.* 2005 Sep;99(1):6-38.
9. Nakanishi S. Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations, and regulation. *Physiol Rev.* 1987 Oct;67(4):1117-42.
10. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.* 1992 Mar;44(1):1-80.
11. Campbell DJ, Kladis A, Duncan AM. Bradykinin peptides in kidney, blood, and other tissues of the rat. *Hypertension.* 1993 Feb;21(2):155-65.
12. Nolly HL, Lama MC, Carretero OA, Scicli AG. The kallikrein--kinin system in blood vessels. *Agents Actions Suppl.* 1992;38 ( Pt 3):1-9.
13. Kuoppala A, Lindstedt KA, Saarinen J, Kovanen PT, Kokkonen JO. Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Apr;278(4):H1069-1074.
14. Leeb-Lundberg LMF, Marceau F, Müller-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 Mar;57(1):27-77.
15. Blaukat A, Micke P, Kalatskaya I, Faussner A, Müller-Esterl W. Downregulation of bradykinin B2 receptor in human fibroblasts during prolonged agonist exposure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Jun;284(6):H1909-1916.
16. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev.* 1998 Sep;50(3):357-86.
17. Haddad EB, Fox AJ, Rousell J, Burgess G, McIntyre P, Barnes PJ, et al. Post-transcriptional regulation of bradykinin B1 and B2 receptor gene expression in human

- lung fibroblasts by tumor necrosis factor-alpha: modulation by dexamethasone. *Mol Pharmacol.* 2000 Jun;57(6):1123-31.
18. Campos MM, Souza GE, Calixto JB. In vivo B1 kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. *Br J Pharmacol.* 1999 Aug;127(8):1851-9.
  19. Schanstra JP, Bataillé E, Marin Castaño ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, et al. The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest.* 1998 May 15;101(10):2080-91.
  20. Marceau F, Adam A, Houle S, Bouthillier J, Bachvarova M, Bachvarov DR. Ligand-mediated regulation of kinin receptors in the rabbit. *Biol Chem.* 2001 Jan;382(1):131-3.
  21. Busse R, Fleming I. Molecular responses of endothelial tissue to kinins. *Diabetes.* 1996 Jan;45 Suppl 1:S8-13.
  22. Lal MA, Proulx PR, Hébert RL. A role for PKC epsilon and MAP kinase in bradykinin-induced arachidonic acid release in rabbit CCD cells. *Am J Physiol.* 1998 Apr;274(4 Pt 2):F728-735.
  23. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995;35:679-705.
  24. Auch-Schwelk W, Kuchenbuch C, Claus M, Walther B, Bossaller C, Friedel N, et al. Local regulation of vascular tone by bradykinin and angiotensin converting enzyme inhibitors. *Eur Heart J.* 1993 Nov;14 Suppl I:154-60.
  25. Briner VA, Tsai P, Schrier RW. Bradykinin: potential for vascular constriction in the presence of endothelial injury. *Am J Physiol.* 1993 Feb;264(2 Pt 2):F322-327.
  26. Blaes N, Girolami J-P. Targeting the "Janus face" of the B2-bradykinin receptor. *Expert Opin Ther Targets.* 2013 Oct;17(10):1145-66.
  27. Kuhr F, Lowry J, Zhang Y, Brovkovych V, Skidgel RA. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides.* 2010 Apr;44(2):145-54.
  28. Feng J, Yamaguchi N, Foucart S, Chahine R, Lamontagne D, Nadeau R. Transient ischemia inhibits nonexocytotic release of norepinephrine following sustained ischemia in rat heart: is bradykinin involved? *Can J Physiol Pharmacol.* 1997 Jun;75(6):665-70.
  29. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol.* 1999 Jan;31(1):61-74.
  30. Momose N, Fukuo K, Morimoto S, Ogihara T. Captopril inhibits endothelin-1 secretion from endothelial cells through bradykinin. *Hypertension.* 1993 Jun;21(6 Pt 2):921-4.
  31. Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem.* 1993 May 5;268(13):9496-503.
  32. Jaspard E, Alhenc-Gelas F. Catalytic properties of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme on the cell surface. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995 Jun 15;211(2):528-34.
  33. Chen Z, Deddish PA, Minshall RD, Becker RP, Erdös EG, Tan F. Human ACE and bradykinin B2 receptors form a complex at the plasma membrane. *FASEB J.* 2006 Nov;20(13):2261-70.
  34. Lemos VS, Silva DMR, Walther T, Alenina N, Bader M, Santos RAS. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005

Sep;46(3):274–9.

35. Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB. Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension*. 1997 Jan;29(1 Pt 2):394–400.
36. Tom B, Dendorfer A, Danser AHJ. Bradykinin, angiotensin-(1-7), and ACE inhibitors: how do they interact? *Int J Biochem Cell Biol*. 2003 Jun;35(6):792–801.
37. Chen Z, Tan F, Erdös EG, Deddish PA. Hydrolysis of angiotensin peptides by human angiotensin I-converting enzyme and the resensitization of B2 kinin receptors. *Hypertension*. 2005 Dec;46(6):1368–73.
38. Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists in rats with heart failure. Role of kinins and angiotensin II type 2 receptors. *J Clin Invest*. 1997 Apr 15;99(8):1926–35.
39. Marin-Castaño ME, Schanstra JP, Neau E, Praddaude F, Pecher C, Ader J-L, et al. Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation*. 2002 Feb 5;105(5):627–32.
40. Duguay D, Der Sarkissian S, Kouz R, Ongali B, Couture R, deBlois D. Kinin B2 receptor is not involved in enalapril-induced apoptosis and regression of hypertrophy in spontaneously hypertensive rat aorta: possible role of B1 receptor. *Br J Pharmacol*. 2004 Feb;141(4):728–36.
41. Madeddu P, Milia AF, Salis MB, Gaspa L, Gross W, Lippoldt A, et al. Renovascular hypertension in bradykinin B2-receptor knockout mice. *Hypertension*. 1998 Sep;32(3):503–9.
42. Madeddu P, Emanuelli C, Maestri R, Salis MB, Minasi A, Capogrossi MC, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade prevents cardiac remodeling in bradykinin B(2) receptor knockout mice. *Hypertension*. 2000 Jan;35(1 Pt 2):391–6.
43. Milia AF, Gross V, Plehm R, De Silva JA Jr, Bader M, Luft FC. Normal blood pressure and renal function in mice lacking the bradykinin B(2) receptor. *Hypertension*. 2001 Jun;37(6):1473–9.
44. Alfie ME, Sigmon DH, Pomposiello SI, Carretero OA. Effect of high salt intake in mutant mice lacking bradykinin-B2 receptors. *Hypertension*. 1997 Jan;29(1 Pt 2):483–7.
45. Emanuelli C, Fink E, Milia AF, Salis MB, Conti M, Demontis MP, et al. Enhanced blood pressure sensitivity to deoxycorticosterone in mice with disruption of bradykinin B2 receptor gene. *Hypertension*. 1998 Jun;31(6):1278–83.
46. Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, Gavras H. Vasoactive potential of the b(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circ Res*. 2001 Feb 16;88(3):275–81.
47. Duka I, Duka A, Kintsurashvili E, Johns C, Gavras I, Gavras H. Mechanisms mediating the vasoactive effects of the B1 receptors of bradykinin. *Hypertension*. 2003 Nov;42(5):1021–5.
48. Whalley ET, Figueroa CD, Gera L, Bhoola KD. Discovery and therapeutic potential of kinin receptor antagonists. *Expert Opin Drug Discov*. 2012 Dec;7(12):1129–48.
49. Regoli D, Barabé J, Park WK. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can J Physiol Pharmacol*. 1977 Aug;55(4):855–67.
50. Stewart JM, Gera L, York EJ, Chan DC, Bunn P. Bradykinin antagonists: present progress and future prospects. *Immunopharmacology*. 1999 Sep;43(2–3):155–61.
51. Wirth K, Hock FJ, Albus U, Linz W, Alpermann HG, Anagnostopoulos H, et al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br J Pharmacol*.

- 1991 Mar;102(3):774-7.
52. Charignon D, Späth P, Martin L, Drouet C. Icatibant , the bradykinin B2 receptor antagonist with target to the interconnected kinin systems. *Expert Opin Pharmacother*. 2012 Oct;13(15):2233-47.
53. Hess JF, Borkowski JA, Macneil T, Stonesifer GY, Fraher J, Strader CD, et al. Differential pharmacology of cloned human and mouse B2 bradykinin receptors. *Mol Pharmacol*. 1994 Jan;45(1):1-8.
54. Lembeck F, Griesbacher T, Eckhardt M, Henke S, Breipohl G, Knolle J. New, long-acting, potent bradykinin antagonists. *Br J Pharmacol*. 1991 Feb;102(2):297-304.
55. Sakamoto T, Elwood W, Barnes PJ, Chung KF. Effect of Hoe 140, a new bradykinin receptor antagonist, on bradykinin- and platelet-activating factor-induced bronchoconstriction and airway microvascular leakage in guinea pig. *Eur J Pharmacol*. 1992 Mar 31;213(3):367-73.
56. Cockcroft JR, Chowieńczyk PJ, Brett SE, Bender N, Ritter JM. Inhibition of bradykinin-induced vasodilation in human forearm vasculature by icatibant, a potent B2-receptor antagonist. *Br J Clin Pharmacol*. 1994 Oct;38(4):317-21.
57. Cicardi M, Banerji A, Bracho F, Malbrán A, Rosenkranz B, Riedl M, et al. Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema. *N Engl J Med*. 2010 Aug 5;363(6):532-41.
58. Lumry WR, Li HH, Levy RJ, Potter PC, Farkas H, Moldovan D, et al. Randomized placebo-controlled trial of the bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist icatibant for the treatment of acute attacks of hereditary angioedema: the FAST-3 trial. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011 Dec;107(6):529-37.
59. Baş M, Greve J, Stelter K, Havel M, Strassen U, Rotter N, et al. A randomized trial of icatibant in ACE-inhibitor-induced angioedema. *N Engl J Med*. 2015 Jan 29;372(5):418-25.
60. Dixon BS, Breckon R, Fortune J, Sutherland E, Simon FR, Anderson RJ. Bradykinin activates protein kinase C in cultured cortical collecting tubular cells. *Am J Physiol*. 1989 Nov;257(5 Pt 2):F808-817.
61. Hébert RL, Regoli D, Xiong H, Breyer MD, Plante GE. Bradykinin B2 type receptor activation regulates fluid and electrolyte transport in the rabbit kidney. *Peptides*. 2005 Aug;26(8):1308-16.
62. Matsumura Y, Tadano K, Yamasaki T. Renal haemodynamic and excretory responses to bradykinin in anaesthetized dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999 Aug;26(8):645-50.
63. Lortie M, Regoli D, Rhaleb NE, Plante GE. The role of B1- and B2-kinin receptors in the renal tubular and hemodynamic response to bradykinin. *Am J Physiol*. 1992 Jan;262(1 Pt 2):R72-76.
64. Hirawa N, Uehara Y, Suzuki T, Kawabata Y, Numabe A, Gomi T, et al. Regression of glomerular injury by kallikrein infusion in Dahl salt-sensitive rats is a bradykinin B2-receptor-mediated event. *Nephron*. 1999 Feb;81(2):183-93.
65. Uehara Y, Hirawa N, Numabe A, Kawabata Y, Ikeda T, Gomi T, et al. Long-term infusion of kallikrein attenuates renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Hypertens*. 1997 May;10(5 Pt 2):83S-88S.
66. Chao J, Li H-J, Yao Y-Y, Shen B, Gao L, Bledsoe G, et al. Kinin infusion prevents renal inflammation, apoptosis, and fibrosis via inhibition of oxidative stress and mitogen-activated protein kinase activity. *Hypertension*. 2007 Mar;49(3):490-7.
67. Buléon M, Allard J, Jaafar A, Pradde F, Dickson Z, Ranera M-T, et al. Pharmacological blockade of B2-kinin receptor reduces renal protective effect of

- angiotensin-converting enzyme inhibition in db/db mice model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 May;294(5):F1249-1256.
68. Chiang W-C, Chien C-T, Lin W-W, Lin S-L, Chen Y-M, Lai C-F, et al. Early activation of bradykinin B2 receptor aggravates reactive oxygen species generation and renal damage in ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 2006 Oct 15;41(8):1304-14.
69. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2001 Oct 19;429(1-3):161-76.
70. Duchene J, Ahluwalia A. The kinin B(1) receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Apr;9(2):125-31.
71. Kaplanski J, Pruneau D, Asa I, Artru AA, Azez A, Ivashkova Y, et al. LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces brain edema and improves long-term neurological function recovery after closed head trauma in rats. *J Neurotrauma*. 2002 Aug;19(8):953-64.
72. Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N, Baethmann A. Effects of LF 16-0687 Ms, a bradykinin B(2) receptor antagonist, on brain edema formation and tissue damage in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 2002 Sep 20;950(1-2):268-78.
73. Ivashkova Y, Svetnitsky A, Mayzler O, Pruneau D, Benifla M, Fuxman Y, et al. Bradykinin B2 receptor antagonism with LF 18-1505T reduces brain edema and improves neurological outcome after closed head trauma in rats. *J Trauma*. 2006 Oct;61(4):879-85.
74. Kläsner B, Lumenta DB, Pruneau D, Zausinger S, Plesnila N. Therapeutic window of bradykinin B2 receptor inhibition after focal cerebral ischemia in rats. *Neurochem Int*. 2006 Oct;49(5):442-7.
75. Narotam PK, Rodell TC, Nadvi SS, Bhoola KD, Troha JM, Parbhoosingh R, et al. Traumatic brain contusions: a clinical role for the kinin antagonist CP-0127. *Acta Neurochir (Wien)*. 1998;140(8):793-802-803.
76. Gross GJ, Baker JE, Moore J, Falck JR, Nithipatikom K. Abdominal surgical incision induces remote preconditioning of trauma (RPCT) via activation of bradykinin receptors (BK2R) and the cytochrome P450 epoxygenase pathway in canine hearts. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2011 Dec;25(6):517-22.
77. Yeh C-H, Chen T-P, Wang Y-C, Lin Y-M, Fang S-W. Cardiomyocytic apoptosis limited by bradykinin via restoration of nitric oxide after cardioplegic arrest. *J Surg Res*. 2010 Sep;163(1):e1-9.
78. Asmis LM, Asmis R, Sulzer I, Furlan M, Lämmle B. Contact system activation in human sepsis - 47kD HK, a marker of sepsis severity? *Swiss Med Wkly*. 2008 Mar 8;138(9-10):142-9.
79. Schmid A, Eich-Rathfelder S, Whalley ET, Cheronis JC, Scheuber HP, Fritz H, et al. Endogenous B1 receptor mediated hypotension produced by contact system activation in the presence of endotoxemia. *Immunopharmacology*. 1998 Aug;40(2):131-7.
80. Wilson DD, de Garavilla L, Kuhn W, Togo J, Burch RM, Steranka LR. D-Arg-[Hyp3-D-Phe7]-bradykinin, a bradykinin antagonist, reduces mortality in a rat model of endotoxic shock. *Circ Shock*. 1989 Feb;27(2):93-101.
81. Whalley ET, Solomon JA, Modafferi DM, Bonham KA, Cheronis JC. CP-0127, a novel potent bradykinin antagonist, increases survival in rat and rabbit models of endotoxin shock. *Agents Actions Suppl*. 1992;38 ( Pt 3):413-20.
82. Barratt-Due A, Johansen HT, Sokolov A, Thorgersen EB, Hellerud BC, Reubsæet JL,



- et al. The role of bradykinin and the effect of the bradykinin receptor antagonist icatibant in porcine sepsis. *Shock*. 2011 Nov;36(5):517–23.
83. Féléto M, Jamonneau I, Germain M, Thurieau C, Fauchère JL, Villa P, et al. Bradykinin B2 receptor involvement in rabbit and murine models of septic shock. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996 Apr;27(4):500–7.
84. Fein AM, Bernard GR, Criner GJ, Fletcher EC, Good JT, Knaus WA, et al. Treatment of severe systemic inflammatory response syndrome and sepsis with a novel bradykinin antagonist, deltibant (CP-0127). Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CP-0127 SIRS and Sepsis Study Group. *JAMA*. 1997 Feb 12;277(6):482–7.
85. Merino VF, Todiras M, Campos LA, Saul V, Popova E, Baltatu OC, et al. Increased susceptibility to endotoxic shock in transgenic rats with endothelial overexpression of kinin B(1) receptors. *J Mol Med*. 2008 Jul;86(7):791–8.
86. Siebeck M, Spannagl E, Schorr M, Stumpf B, Fritz H, Whalley ET, et al. Effect of combined B1 and B2 kinin receptor blockade in porcine endotoxin shock. *Immunopharmacology*. 1996 Jun;33(1–3):81–4.
87. Seguin T, Buleon M, Destrube M, Ranera MT, Couture R, Girolami JP, et al. Hemodynamic and renal involvement of B1 and B2 kinin receptors during the acute phase of endotoxin shock in mice. *Int Immunopharmacol*. 2008 Feb;8(2):217–21.
88. Desposito D, Potier L, Chollet C, Gobeil F, Roussel R, Alhenc-Gelas F, et al. Kinin receptor agonism restores hindlimb postischemic neovascularization capacity in diabetic mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015 Feb;352(2):218–26.
89. Doggrell SA. A daughter of bradykinin that protects against septicaemia. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001 Aug;10(8):1567–9.
90. Morinelli TA, Webb JG, Jaffa AA, Privitera PJ, Margolius HS. A metabolic fragment of bradykinin, Arg-Pro-Pro-Gly-Phe, protects against the deleterious effects of lipopolysaccharide in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Jan;296(1):71–6.
91. Durham RM, Moran JJ, Mazuski JE, Shapiro MJ, Baue AE, Flint LM. Multiple organ failure in trauma patients. *J Trauma*. 2003 Oct;55(4):608–16.
92. Slepuchkin VD, Grössler J, Kuhne H, Scheuch DW. [The effect of agonists and antagonists of opiate receptors on the activity of the kallikrein-kinin system in hemorrhagic shock]. *Anesteziol Reanimatol*. 1992 Jun;(3):19–22.
93. Kühne H, Grässler J, Steinke M, Slepuchkin VD, Zoloev GK. [Effect of enkephalins and naloxone on the activity of the kallikrein-kinin system in experimental hemorrhagic shock]. *Z Med Lab Diagn*. 1990;31(3):165–8.
94. Grässler J, Kühne H, Slepuchkin VD, Zoloev GK, Scheuch DW. Effect of intravenous enkephalin administration on kallikrein-kinin system in experimental hemorrhagic shock. Evidence for activation of kallikrein-kinin system by naloxone. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1988 Dec;10(12):755–60.
95. Taucher M, Grässler J, Kühne H, Scheuch DW. Effect of kallikrein-kinin system activation by factor XII f pretreatment on experimental hemorrhagic shock. *Z Med Lab Diagn*. 1990;31(1):13–7.
96. Vatner SF, Braunwald E. Cardiovascular control mechanisms in the conscious state. *N Engl J Med*. 1975 Nov 6;293(19):970–6.
97. Reid IA. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *Am J Physiol*. 1992 Jun;262(6 Pt 1):E763-778.
98. Brand PH, Metting PJ, Britton SL. Support of arterial blood pressure by major pressor systems in conscious dogs. *Am J Physiol*. 1988 Sep;255(3 Pt 2):H483-491.

99. Miller ED, Ackerly JA, Peach MJ. Blood pressure support during general anesthesia in a renin-dependent state in the rat. *Anesthesiology*. 1978 Jun;48(6):404–8.
100. Miller ED, Longnecker DE, Peach MJ. The regulatory function of the renin-angiotensin system during general anesthesia. *Anesthesiology*. 1978 Jun;48(6):399–403.
101. Kaukinen S, Kataja J, Ylitalo P. Circulatory effects of renin-angiotensin system antagonists during halothane anaesthesia in hypertensive rats. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1983 Feb;27(1):81–6.
102. 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 Aug;291(2):E268-274.
103. Alfie ME, Yang XP, Hess F, Carretero OA. Salt-sensitive hypertension in bradykinin B2 receptor knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jul 25;224(3):625–30.
104. Cervenka L, Maly J, Karasová L, Simová M, Vítko S, Hellerová S, et al. Angiotensin II-induced hypertension in bradykinin B2 receptor knockout mice. *Hypertension*. 2001 Mar;37(3):967–73.
105. Couture R, Blaes N, Girolami J-P. Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014 Mar;12(2):223–48.
106. Wall TM, Sheehy R, Hartman JC. Role of bradykinin in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Aug;270(2):681–9.
107. Ardiles L, Cardenas A, Burgos ME, Droguett A, Ehrenfeld P, Carpio D, et al. Antihypertensive and renoprotective effect of the kinin pathway activated by potassium in a model of salt sensitivity following overload proteinuria. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013 Jun 15;304(12):F1399-1410.
108. Allard J, Buléon M, Cellier E, Renaud I, Pecher C, Praddaude F, et al. ACE inhibitor reduces growth factor receptor expression and signaling but also albuminuria through B2-kinin glomerular receptor activation in diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Oct;293(4):F1083-1092.
109. Grastilleur S, Mouledous L, Bedel J, Etcheverry J, Bader M, Girolami J-P, et al. Role of kinin B2 receptors in opioid-induced hyperalgesia in inflammatory pain in mice. *Biol Chem*. 2013 Mar;394(3):361–8.
110. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA*. 2005 Aug 17;294(7):813–8.
111. Bagshaw SM, George C, Dinu I, Bellomo R. A multi-centre evaluation of the RIFLE criteria for early acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008 Apr;23(4):1203–10.
112. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute kidney injury. *Lancet*. 2008 Nov 29;372(9653):1863–5.
113. Barakat N, Hussein A-AM, Abdel-Maboud M, El-Shair MA, Mostafa A, Abol-Enein H. Ischaemia-reperfusion injury in renal transplantation: the role of nitric oxide in an experimental rat model. *BJU Int*. 2010 Oct;106(8):1230–6.
114. Ishikawa K, Bellomo R, May CN. The impact of intrarenal nitric oxide synthase inhibition on renal blood flow and function in mild and severe hyperdynamic sepsis. *Crit Care Med*. 2011 Apr;39(4):770–6.
115. Miloradović Z, Mihailović-Stanojević N, Milanović JG, Ivanov M, Jerkić M, Jovović E. Nitric Oxide Supplementation in Postischemic Acute Renal Failure: Normotension Versus Hypertension. *Curr Pharm Biotechnol* [Internet]. 2011 May 10 [cited 2011 May 28]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21554222>
116. Buléon M, Mehrenberger M, Pécher C, Praddaude F, Couture R, Tack I, et al. [New

- perspectives for bradykinin in nephroprotection]. *Med Sci (Paris)*. 2007 Dec;23(12):1141-7.
117. Schanstra JP, Neau E, Drogoz P, Arevalo Gomez MA, Lopez Novoa JM, Calise D, et al. In vivo bradykinin B2 receptor activation reduces renal fibrosis. *J Clin Invest*. 2002 Aug;110(3):371-9.
118. Kakoki M, Takahashi N, Jennette JC, Smithies O. Diabetic nephropathy is markedly enhanced in mice lacking the bradykinin B2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Sep 7;101(36):13302-5.
119. McMichael J. Practical Management of Wound Shock. *Br Med J*. 1942 Dec 5;2(4274):671-3.
120. Grant RT. Memorandum on the Observations Required in Cases of Wound Shock. *Br Med J*. 1941 Sep 6;2(4209):332-6.
121. Hoen S, Asehnoune K, Brailly-Tabard S, Mazoit J-X, Benhamou D, Moine P, et al. Cortisol response to corticotropin stimulation in trauma patients: influence of hemorrhagic shock. *Anesthesiology*. 2002 Oct;97(4):807-13.
122. Faden AI, Holaday JW. Opiate antagonists: a role in the treatment of hypovolemic shock. *Science*. 1979 Jul 20;205(4403):317-8.
123. Elam R, Bergmann F, Feuerstein G. The use of antiserotonergic agents for the treatment of acute hemorrhagic shock of cats. *Eur J Pharmacol*. 1985 Jan 2;107(2):275-8.
124. Remmers DE, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Testosterone receptor blockade after trauma-hemorrhage improves cardiac and hepatic functions in males. *Am J Physiol*. 1997 Dec;273(6 Pt 2):H2919-2925.
125. Smail N, Catania RA, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Gut and liver: the organs responsible for increased nitric oxide production after trauma-hemorrhage and resuscitation. *Arch Surg*. 1998 Apr;133(4):399-405.
126. Scalia SV, Taheri PA, Force S, Ozmen V, Lui D, Fish J, et al. Mesenteric microcirculatory changes in nonlethal hemorrhagic shock: the role of resuscitation with balanced electrolyte or hypertonic saline/dextran. *J Trauma*. 1992 Aug;33(2):321-5.
127. Scannell G, Clark L, Waxman K. Regional flow during experimental hemorrhage and crystalloid resuscitation: persistence of low flow to the splanchnic organs. *Resuscitation*. 1992 Jul;23(3):217-25.
128. Scharf SM, Bark H, Einhorn S, Tarasiuk A. Blood flow to the canine diaphragm during hemorrhagic shock. *Am Rev Respir Dis*. 1986 Feb;133(2):205-11.
129. Horton JW, Poehlmann DS. Regional coronary blood flow in canine hemorrhagic shock. *Circ Shock*. 1987;23(4):271-83.
130. Jacobsen J, Secher NH. Heart rate during haemorrhagic shock. *Clin Physiol*. 1992 Nov;12(6):659-66.
131. Schadt JC, Ludbrook J. Hemodynamic and neurohumoral responses to acute hypovolemia in conscious mammals. *Am J Physiol*. 1991 Feb;260(2 Pt 2):H305-318.
132. Schlichtig R, Kramer DJ, Pinsky MR. Flow redistribution during progressive hemorrhage is a determinant of critical O<sub>2</sub> delivery. *J Appl Physiol*. 1991 Jan;70(1):169-78.
133. Murray RH, Thompson LJ, Bowers JA, Albright CD. Hemodynamic effects of graded hypovolemia and vasodepressor syncope induced by lower body negative pressure. *Am Heart J*. 1968 Dec;76(6):799-811.
134. Matzen S, Perko G, Groth S, Friedman DB, Secher NH. Blood volume distribution during head-up tilt induced central hypovolaemia in man. *Clin Physiol*. 1991 Sep;11(5):411-22.

135. Sander-Jensen K, Secher NH, Bie P, Warberg J, Schwartz TW. Vagal slowing of the heart during haemorrhage: observations from 20 consecutive hypotensive patients. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1986 Feb 8;292(6517):364–6.
136. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2002 Feb;282(2):C227-241.
137. Terada LS. Oxidative stress and endothelial activation. *Crit Care Med*. 2002 May;30(5 Suppl):S186-191.
138. Dalibon N, Schlumberger S, Saada M, Fischler M, Riou B. Haemodynamic assessment of hypovolaemia under general anaesthesia in pigs submitted to graded haemorrhage and retransfusion. *Br J Anaesth*. 1999 Jan;82(1):97–103.
139. Smail N, Messiah A, Edouard A, Descorps-Declère A, Duranteau J, Vigué B, et al. Role of systemic inflammatory response syndrome and infection in the occurrence of early multiple organ dysfunction syndrome following severe trauma. *Intensive Care Med*. 1995 Oct;21(10):813–6.
140. Smaïl N, Descorps Declère A, Duranteau J, Vigué B, Samii K. Left ventricular function after severe trauma. *Intensive Care Med*. 1996 May;22(5):439–42.
141. Saeki Y, Hasegawa Y, Shibamoto T, Yamaguchi Y, Hayashi T, Tanaka S, et al. The effects of sevoflurane, enflurane, and isoflurane on baroreceptor-sympathetic reflex in rabbits. *Anesth Analg*. 1996 Feb;82(2):342–8.
142. Ebert TJ, Muzi M. Propofol and autonomic reflex function in humans. *Anesth Analg*. 1994 Feb;78(2):369–75.
143. Berdeaux A, Duranteau J, Pussard E, Edouard A, Giudicelli JF. Baroreflex control of regional vascular resistances during simulated orthostatism. *Kidney Int Suppl*. 1992 Jun;37:S29-33.
144. Ebert TJ, Muzi M, Berens R, Goff D, Kampine JP. Sympathetic responses to induction of anesthesia in humans with propofol or etomidate. *Anesthesiology*. 1992 May;76(5):725–33.
145. Barroso-Aranda J, Schmid-Schönbein GW, Zweifach BW, Engler RL. Granulocytes and no-reflow phenomenon in irreversible hemorrhagic shock. *Circ Res*. 1988 Aug;63(2):437–47.
146. Levi M, de Jonge E, van der Poll T, ten Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*. 1999 Aug;82(2):695–705.
147. Frith D, Cohen MJ, Brohi K. Animal models of trauma-induced coagulopathy. *Thromb Res*. 2012 May;129(5):551–6.
148. Schmand JF, Ayala A, Chaudry IH. Effects of trauma, duration of hypotension, and resuscitation regimen on cellular immunity after hemorrhagic shock. *Crit Care Med*. 1994 Jul;22(7):1076–83.
149. Ayala A, Ertel W, Chaudry IH. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. *Shock*. 1996 Feb;5(2):79–90.
150. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med*. 1992;23(3–4):217–44.
151. Foëx BA. Bacterial translocation in hemorrhagic shock: Are we any wiser? *Crit Care Med*. 2005 May;33(5):1166–7.
152. Palizas F, Dubin A, Regueira T, Bruhn A, Knobel E, Lazzeri S, et al. Gastric tonometry versus cardiac index as resuscitation goals in septic shock: a multicenter, randomized, controlled trial. *Crit Care*. 2009;13(2):R44.
153. Calzia E, Radermacher P, Matejovic M. Splanchnic resuscitation revisited: combining hyperoxia and hypertonic saline during early goal-directed treatment. *Crit*

- Care Med. 2006 Nov;34(11):2858–60.
154. Poeze M, Takala J, Greve JW, Ramsay G. Pre-operative tonometry is predictive for mortality and morbidity in high-risk surgical patients. *Intensive Care Med.* 2000 Sep;26(9):1272–81.
155. Walley KR, Cooper DJ. Diastolic stiffness impairs left ventricular function during hypovolemic shock in pigs. *Am J Physiol.* 1991 Mar;260(3 Pt 2):H702-712.
156. Voelckel WG, Wenzel V. Managing hemorrhagic shock: fluids on the way out--drugs on the way in? *Crit Care Med.* 2003 Oct;31(10):2552–3.
157. Schumacker PT, Cain SM. The concept of a critical oxygen delivery. *Intensive Care Med.* 1987;13(4):223–9.
158. Arai AE, Pantely GA, Anselone CG, Bristow J, Bristow JD. Active downregulation of myocardial energy requirements during prolonged moderate ischemia in swine. *Circ Res.* 1991 Dec;69(6):1458–69.
159. Arai AE, Grauer SE, Anselone CG, Pantely GA, Bristow JD. Metabolic adaptation to a gradual reduction in myocardial blood flow. *Circulation.* 1995 Jul 15;92(2):244–52.
160. Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 1998 May 8;273(19):11619–24.
161. Hierholzer C, Billiar TR. Molecular mechanisms in the early phase of hemorrhagic shock. *Langenbecks Arch Surg.* 2001 Jul;386(4):302–8.
162. Hierholzer C, Harbrecht BG, Billiar TR, Tweardy DJ. Hypoxia-inducible factor-1 activation and cyclo-oxygenase-2 induction are early reperfusion-independent inflammatory events in hemorrhagic shock. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2001;121(4):219–22.
163. Arnold RC, Shapiro NI, Jones AE, Schorr C, Pope J, Casner E, et al. Multicenter study of early lactate clearance as a determinant of survival in patients with presumed sepsis. *Shock.* 2009 Jul;32(1):35–9.
164. Sammour T, Kahokehr A, Caldwell S, Hill AG. Venous glucose and arterial lactate as biochemical predictors of mortality in clinically severely injured trauma patients--a comparison with ISS and TRISS. *Injury.* 2009 Jan;40(1):104–8.
165. Manikis P, Jankowski S, Zhang H, Kahn RJ, Vincent JL. Correlation of serial blood lactate levels to organ failure and mortality after trauma. *Am J Emerg Med.* 1995 Nov;13(6):619–22.
166. Régnier M-A, Raux M, Le Manach Y, Asencio Y, Gaillard J, Devilliers C, et al. Prognostic significance of blood lactate and lactate clearance in trauma patients. *Anesthesiology.* 2012 Dec;117(6):1276–88.
167. Duranteau, Asehnoune, Pierre, Ozier, Leone, Lefrant, et al. Recommandations sur la réanimation du choc hémorragique. *Anesth Reanimation.* 2015;1:62–74.
168. Blalock A. Shock: further studies with particular reference to the effects of hemorrhage. 1934. *Arch Surg.* 2010 Apr;145(4):393–4.
169. Wiggers HC, Ingraham RC. HEMORRHAGIC SHOCK: DEFINITION AND CRITERIA FOR ITS DIAGNOSIS. *J Clin Invest.* 1946 Jan;25(1):30–6.
170. Crowell JW, Guyton AC. Evidence favoring a cardiac mechanism in irreversible hemorrhagic shock. *Am J Physiol.* 1961 Nov;201:893–6.
171. Traverso LW, Moore CC, Tillman FJ. A clinically applicable exsanguination shock model in swine. *Circ Shock.* 1984;12(1):1–7.
172. Fleisher GR, Templeton J, Delgado-Paredes C. An animal model for the study of hemorrhagic shock from abdominal trauma in children. *Pediatr Emerg Care.* 1987 Mar;3(1):18–21.

173. Mittmann U, Schmidt HD, Schmier J, Wirth RH. Hemorrhagic shock with fixed hypotension and with spontaneous recovery of blood pressure. A comparison of two shock models. *Basic Res Cardiol*. 1976 Feb;71(1):47–59.
174. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock*. 1998 Jan;9(1):1–11.
175. Mayeur N, Minville V, Jaafar A, Allard J, Al Saati T, Guilbeau-Frugier C, et al. Morphologic and functional renal impact of acute kidney injury after prolonged hemorrhagic shock in mice. *Crit Care Med [Internet]*. 2011 May 12 [cited 2011 May 28]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21572325>
176. Melnikov VY, Faubel S, Siegmund B, Lucia MS, Ljubanovic D, Edelstein CL. Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. *J Clin Invest*. 2002 Oct;110(8):1083–91.
177. Rogers DF, Boschetto P, Barnes PJ. Plasma exudation. Correlation between Evans blue dye and radiolabeled albumin in guinea pig airways in vivo. *J Pharmacol Methods*. 1989 Jul;21(4):309–15.
178. Michel CC, Curry FE. Microvascular permeability. *Physiol Rev*. 1999 Jul;79(3):703–61.
179. Skeggs LT, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med*. 1956 Mar 1;103(3):295–9.
180. Erdös EG. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension*. 1990 Oct;16(4):363–70.
181. Vane JR. The release and fate of vaso-active hormones in the circulation. *Br J Pharmacol*. 1969 Feb;35(2):209–42.
182. Ng KK, Vane JR. Conversion of angiotensin I to angiotensin II. *Nature*. 1967 Nov 25;216(5117):762–6.
183. Ferreira SH, Vane JR. The disappearance of bradykinin and eledoisin in the circulation and vascular beds of the cat. *Br J Pharmacol Chemother*. 1967 Jun;30(2):417–24.
184. Vane JR. The Croonian Lecture, 1993. The endothelium: maestro of the blood circulation. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*. 1994 Jan 29;343(1304):225–46.
185. Ondetti MA, Williams NJ, Sabo EF, Pluscec J, Weaver ER, Kocy O. Angiotensin-converting enzyme inhibitors from the venom of *Bothrops jararaca*. Isolation, elucidation of structure, and synthesis. *Biochemistry*. 1971 Oct 26;10(22):4033–9.
186. Couture R, Girolami J-P. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol*. 2004 Oct 1;500(1–3):467–85.
187. Regoli D, Plante GE, Gobeil F Jr. Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther*. 2012 Jul;135(1):94–111.
188. Lakkis J, Lu WX, Weir MR. RAAS escape: a real clinical entity that may be important in the progression of cardiovascular and renal disease. *Curr Hypertens Rep*. 2003 Oct;5(5):408–17.
189. Murakami M, Matsuda H, Kubota E, Wakino S, Honda M, Hayashi K, et al. Role of angiotensin II generated by angiotensin converting enzyme-independent pathways in canine kidney. *Kidney Int Suppl*. 1997 Dec;63:S132-135.
190. Tom B, Garrelts IM, Scalbert E, Stegmann APA, Boomsma F, Saxena PR, et al. ACE-versus chymase-dependent angiotensin II generation in human coronary arteries: a matter of efficiency? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Feb 1;23(2):251–6.
191. Bouaziz H, Joulin Y, Safar M, Benetos A. Effects of bradykinin B2 receptor

- antagonism on the hypotensive effects of ACE inhibition. *Br J Pharmacol.* 1994 Nov;113(3):717–22.
192. Linz W, Schölkens BA. A specific B2-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br J Pharmacol.* 1992 Apr;105(4):771–2.
193. Williams GH. Converting-enzyme inhibitors in the treatment of hypertension. *N Engl J Med.* 1988 Dec 8;319(23):1517–25.
194. Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Circulation.* 1998 Apr 14;97(14):1411–20.
195. Düsing R, Kayser G, Wagner S, Scherf H, Glänzer K, Predel HG, et al. Baroreflex setting and sensitivity in normal subjects: effects of pharmacologic inhibition of the angiotensin I converting enzyme. *Am J Cardiol.* 1987 Apr 24;59(10):50D–54D.
196. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2013 Jul;34(28):2159–219.
197. Kjeldsen S, Feldman RD, Lisheng L, Mourad J-J, Chiang C-E, Zhang W, et al. Updated national and international hypertension guidelines: a review of current recommendations. *Drugs.* 2014 Nov;74(17):2033–51.
198. McMurray J, Cohen-Solal A, Dietz R, Eichhorn E, Erhardt L, Hobbs FDR, et al. Practical recommendations for the use of ACE inhibitors, beta-blockers, aldosterone antagonists and angiotensin receptor blockers in heart failure: putting guidelines into practice. *Eur J Heart Fail.* 2005 Aug;7(5):710–21.
199. McFarlane SI, Kumar A, Sowers JR. Mechanisms by which angiotensin-converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2003 Jun 19;91(12A):30H–37H.
200. Cravedi P, Ruggenti P, Remuzzi G. Which antihypertensive drugs are the most nephroprotective and why? *Expert Opin Pharmacother.* 2010 Nov;11(16):2651–63.
201. Swartz SL, Williams GH, Hollenberg NK, Moore TJ, Dluhy RG. Converting enzyme inhibition in essential hypertension: the hypotensive response does not reflect only reduced angiotensin II formation. *Hypertension.* 1979 Apr;1(2):106–11.
202. Sabatini RA, Guimarães PB, Fernandes L, Reis FCG, Bersanetti PA, Mori MA, et al. ACE activity is modulated by kinin B2 receptor. *Hypertension.* 2008 Mar;51(3):689–95.
203. Bao G, Gohlke P, Qadri F, Unger T. Chronic kinin receptor blockade attenuates the antihypertensive effect of ramipril. *Hypertension.* 1992 Jul;20(1):74–9.
204. Danckwardt L, Shimizu I, Bönner G, Rettig R, Unger T. Converting enzyme inhibition in kinin-deficient brown Norway rats. *Hypertension.* 1990 Oct;16(4):429–35.
205. Linz W, Schölkens BA. A specific B2-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br J Pharmacol.* 1992 Apr;105(4):771–2.
206. Barbe F, Su JB, Guyene TT, Crozatier B, Ménard J, Hittinger L. Bradykinin pathway is involved in acute hemodynamic effects of enalaprilat in dogs with heart failure. *Am J Physiol.* 1996 Jun;270(6 Pt 2):H1985–1992.
207. Gainer JV, Morrow JD, Loveland A, King DJ, Brown NJ. Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N Engl J Med.* 1998 Oct 29;339(18):1285–92.
208. Squire IB, O’Kane KP, Anderson N, Reid JL. Bradykinin B(2) receptor antagonism attenuates blood pressure response to acute angiotensin-converting enzyme inhibition in normal men. *Hypertension.* 2000 Jul;36(1):132–6.

209. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N Engl J Med.* 1987 Jun 4;316(23):1429–35.
210. Konstam MA, Rousseau MF, Kronenberg MW, Udelson JE, Melin J, Stewart D, et al. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dysfunction in patients with heart failure. SOLVD Investigators. *Circulation.* 1992 Aug;86(2):431–8.
211. Konstam MA, Kronenberg MW, Rousseau MF, Udelson JE, Melin J, Stewart D, et al. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on the long-term progression of left ventricular dilatation in patients with asymptomatic systolic dysfunction. SOLVD (Studies of Left Ventricular Dysfunction) Investigators. *Circulation.* 1993 Nov;88(5 Pt 1):2277–83.
212. Pouleur H, Rousseau MF, van Eyll C, Stoleru L, Hayashida W, Udelson JA, et al. Effects of long-term enalapril therapy on left ventricular diastolic properties in patients with depressed ejection fraction. SOLVD Investigators. *Circulation.* 1993 Aug;88(2):481–91.
213. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study. *Circulation.* 1996 Aug 1;94(3):258–65.
214. Pfeffer MA. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Annu Rev Med.* 1995;46:455–66.
215. Wang DZ, Chao L, Chao J. Hypotension in transgenic mice overexpressing human bradykinin B2 receptor. *Hypertension.* 1997 Jan;29(1 Pt 2):488–93.
216. Liu X, Lukasova M, Zubakova R, Lewicka S, Hilgenfeldt U. Kallidin-like peptide mediates the cardioprotective effect of the ACE inhibitor captopril against ischaemic reperfusion injury of rat heart. *Br J Pharmacol.* 2006 Jul;148(6):825–32.
217. Sharma JN, Abbas SA. A bradykinin antagonist abolishes beneficial effect of captopril on duration of survival after acute coronary artery ligation in hypertensive rats. *Pharmacol Res.* 2005 Sep;52(3):211–5.
218. Remuzzi G, Chiurciu C, Ruggenti P. Proteinuria predicting outcome in renal disease: nondiabetic nephropathies (REIN). *Kidney Int Suppl.* 2004 Nov;(92):S90–96.
219. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *Lancet.* 2000 Jan 22;355(9200):253–9.
220. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 2000 Jan 20;342(3):145–53.
221. Andersson L, Nilsoon IM, Colleen S, Granstrand B, Melander B. Role of urokinase and tissue activator in sustaining bleeding and the management thereof with EACA and AMCA. *Ann N Y Acad Sci.* 1968 Jun 28;146(2):642–58.
222. Zatz R, Dunn BR, Meyer TW, Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Prevention of diabetic glomerulopathy by pharmacological amelioration of glomerular capillary hypertension. *J Clin Invest.* 1986 Jun;77(6):1925–30.
223. Given BD, Taylor T, Hollenberg NK, Williams GH. Duration of action and short-term hormonal responses to enalapril (MK 421) in normal subjects. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984 Jun;6(3):436–41.



224. Waeber B, Gavras I, Brunner HR, Cook CA, Charocopos F, Gavras HP. Prediction of sustained antihypertensive efficacy of chronic captopril therapy: relationships to immediate blood pressure response and control plasma renin activity. *Am Heart J*. 1982 Mar;103(3):384–90.
225. Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev*. 1995 Mar;47(1):25–49.
226. Su JB. Kinins and cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des*. 2006;12(26):3423–35.
227. Dietze G. [New aspects of the blood flow-augmenting and insulin-like activity of muscle exercise: possible involvement of the kallikrein-kinin-prostaglandin system (author's transl)]. *Klin Wochenschr*. 1982 May 3;60(9):429–44.
228. Kakoki M, McGarrah RW, Kim H-S, Smithies O. Bradykinin B1 and B2 receptors both have protective roles in renal ischemia/reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 May 1;104(18):7576–81.
229. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002 Feb;39(2 Suppl 1):S1-266.
230. Mancia G, Laurent S, Agabiti-Rosei E, Ambrosioni E, Burnier M, Caulfield MJ, et al. Reappraisal of European guidelines on hypertension management: a European Society of Hypertension Task Force document. *J Hypertens*. 2009 Nov;27(11):2121–58.
231. Israili ZH, Hall WD. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. A review of the literature and pathophysiology. *Ann Intern Med*. 1992 Aug 1;117(3):234–42.
232. Roskiewicz F, Andriamanana I, Gras-Champel V, Andrejak M, Massy ZA. [Iatrogenic angioedema: the role of angiotensin converting enzyme inhibitor and angiotensin II receptor blockers]. *Nephrol Ther*. 2007 Jun;3(3):89–95.
233. Coriat P, Richer C, Douraki T, Gomez C, Hendricks K, Giudicelli JF, et al. Influence of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on anesthetic induction. *Anesthesiology*. 1994 Aug;81(2):299–307.
234. Auron M, Harte B, Kumar A, Michota F. Renin-angiotensin system antagonists in the perioperative setting: clinical consequences and recommendations for practice. *Postgrad Med J*. 2011 Jul;87(1029):472–81.
235. Bijker JB, van Klei WA, Kappen TH, van Wolfswinkel L, Moons KGM, Kalkman CJ. Incidence of intraoperative hypotension as a function of the chosen definition: literature definitions applied to a retrospective cohort using automated data collection. *Anesthesiology*. 2007 Aug;107(2):213–20.
236. Lienhart A, Auroy Y, Péquignot F, Benhamou D, Warszawski J, Bovet M, et al. Survey of anesthesia-related mortality in France. *Anesthesiology*. 2006 Dec;105(6):1087–97.
237. Röhrig R, Junger A, Hartmann B, Klasen J, Quinzio L, Jost A, et al. The incidence and prediction of automatically detected intraoperative cardiovascular events in noncardiac surgery. *Anesth Analg*. 2004 Mar;98(3):569–577, table of contents.
238. Monk TG, Saini V, Weldon BC, Sigl JC. Anesthetic management and one-year mortality after noncardiac surgery. *Anesth Analg*. 2005 Jan;100(1):4–10.
239. McCarthy GJ, Hainsworth M, Lindsay K, Wright JM, Brown TA. Pressor responses to tracheal intubation after sublingual captopril. A pilot study. *Anaesthesia*. 1990 Mar;45(3):243–5.
240. Brabant SM, Bertrand M, Eyraud D, Darmon PL, Coriat P. The hemodynamic

- effects of anesthetic induction in vascular surgical patients chronically treated with angiotensin II receptor antagonists. *Anesth Analg*. 1999 Dec;89(6):1388–92.
241. Schirmer U, Schürmann W. [Preoperative administration of angiotensin-converting enzyme inhibitors]. *Anaesthesist*. 2007 Jun;56(6):557–61.
242. Tuman KJ, McCarthy RJ, O'Connor CJ, Holm WE, Ivankovich AD. Angiotensin-converting enzyme inhibitors increase vasoconstrictor requirements after cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg*. 1995 Mar;80(3):473–9.
243. Deakin CD, Dalrymple-Hay MJ, Jones P, Monro JL. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on systemic vascular resistance and vasoconstrictor requirements during hypothermic cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1998 May;13(5):546–50.
244. Cittanova ML, Zubicki A, Savu C, Montalvan C, Nefaa N, Zaier K, et al. The chronic inhibition of angiotensin-converting enzyme impairs postoperative renal function. *Anesth Analg*. 2001 Nov;93(5):1111–5.
245. Miceli A, Capoun R, Fino C, Narayan P, Bryan AJ, Angelini GD, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy on clinical outcome in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Nov 3;54(19):1778–84.
246. Magee MJ, Herbert MA, Dewey TM, Edgerton JR, Ryan WH, Prince S, et al. Atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting surgery: development of a predictive risk algorithm. *Ann Thorac Surg*. 2007 May;83(5):1707–1712; discussion 1712.
247. Mets B. To stop or not? *Anesth Analg*. 2015 Jun;120(6):1413–9.
248. Comfere T, Sprung J, Kumar MM, Draper M, Wilson DP, Williams BA, et al. Angiotensin system inhibitors in a general surgical population. *Anesth Analg*. 2005 Mar;100(3):636–644, table of contents.
249. Drenger B, Fontes ML, Miao Y, Mathew JP, Gozal Y, Aronson S, et al. Patterns of use of perioperative angiotensin-converting enzyme inhibitors in coronary artery bypass graft surgery with cardiopulmonary bypass: effects on in-hospital morbidity and mortality. *Circulation*. 2012 Jul 17;126(3):261–9.
250. Kristensen SD, Knuuti J, Saraste A, Anker S, Bøtker HE, De Hert S, et al. 2014 ESC/ESA Guidelines on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management: The Joint Task Force on non-cardiac surgery: cardiovascular assessment and management of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Anaesthesiology (ESA). *Eur J Anaesthesiol*. 2014 Aug 11;
251. Fleisher LA, Fleischmann KE, Auerbach AD, Barnason SA, Beckman JA, Bozkurt B, et al. 2014 ACC/AHA guideline on perioperative cardiovascular evaluation and management of patients undergoing noncardiac surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Dec 9;64(22):e77-137.
252. Mets B. Management of hypotension associated with angiotensin-axis blockade and general anesthesia administration. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2013 Feb;27(1):156–67.
253. Edouard AR, Degrémont AC, Duranteau J, Pussard E, Berdeaux A, Samii K. Heterogeneous regional vascular responses to simulated transient hypovolemia in man. *Intensive Care Med*. 1994 Jul;20(6):414–20.
254. Freeman JG, Hock CE, Edmonds JS, Lefer AM. Anti-shock actions of a new converting enzyme inhibitor, enalaprilic acid, in hemorrhagic shock in cats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1984 Dec;231(3):610–5.
255. Rosenfeld LM, Cooper HS. Captopril and the intestinal response to hemorrhagic

- shock. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 1982 Sep;259(1):144–52.
256. Charbonneau H, Buléon M, Minville V, Faguer S, Girolami J-P, Bascands J-L, et al. Acute Bradykinin Receptor Blockade During Hemorrhagic Shock in Mice Prevents the Worsening Hypotensive Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor. *Crit Care Med*. 2016 Mar 17;
257. Wiemer G, Popp R, Schölkens BA, Gögelein H. Enhancement of cytosolic calcium, prostacyclin and nitric oxide by bradykinin and the ACE inhibitor ramiprilat in porcine brain capillary endothelial cells. *Brain Res*. 1994 Feb 28;638(1–2):261–6.
258. Gräfe M, Bossaller C, Graf K, Auch-Schwelk W, Baumgarten CR, Hildebrandt A, et al. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on bradykinin metabolism by vascular endothelial cells. *Am J Physiol*. 1993 May;264(5 Pt 2):H1493–1497.
259. Minshall RD, Erdös EG, Vogel SM. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors potentiate bradykinin's inotropic effects independently of blocking its inactivation. *Am J Cardiol*. 1997 Aug 4;80(3A):132A–136A.
260. Minshall RD, Tan F, Nakamura F, Rabito SF, Becker RP, Marcic B, et al. Potentiation of the actions of bradykinin by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. The role of expressed human bradykinin B2 receptors and angiotensin I-converting enzyme in CHO cells. *Circ Res*. 1997 Nov;81(5):848–56.
261. Deddish PA, Marcic B, Jackman HL, Wang HZ, Skidgel RA, Erdös EG. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension*. 1998 Apr;31(4):912–7.
262. Ferrari R. Oxygen-free radicals at myocardial level: effects of ischaemia and reperfusion. *Adv Exp Med Biol*. 1994;366:99–111.
263. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996 Nov;271(5 Pt 1):C1424–1437.
264. Jarrar D, Wang P, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH. Critical role of oxygen radicals in the initiation of hepatic depression after trauma hemorrhage. *J Trauma*. 2000 Nov;49(5):879–85.
265. Jarrar D, Song GY, Kuebler JF, Rue LW, Bland KI, Chaudry IH. The effect of inhibition of a major cell signaling pathway following trauma hemorrhage on hepatic injury and interleukin 6 levels. *Arch Surg*. 2004 Aug;139(8):896–901.
266. McIntyre TM, Prescott SM, Weyrich AS, Zimmerman GA. Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions. *Curr Opin Hematol*. 2003 Mar;10(2):150–8.
267. van Meurs M, Wulfert FM, Knol AJ, De Haes A, Houwertjes M, Aarts LPHJ, et al. Early organ-specific endothelial activation during hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock*. 2008 Feb;29(2):291–9.
268. van Meurs M, Wulfert FM, Jongman RM, Schipper M, Houwertjes MC, Vaneker M, et al. Hemorrhagic shock-induced endothelial cell activation in a spontaneous breathing and a mechanical ventilation hemorrhagic shock model is induced by a proinflammatory response and not by hypoxia. *Anesthesiology*. 2011 Sep;115(3):474–82.
269. Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, Nyska A, Rousseaux C, Nolte T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol*. 2010 Dec;38(7 Suppl):5S–81S.
270. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg*. 1970 Oct;101(4):478–83.
271. Liu YH, Yang XP, Sharov VG, Sigmon DH, Sabbath HN, Carretero OA. Paracrine systems in the cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Hypertension*. 1996 Jan;27(1):7–13.

272. Yao Y-Y, Yin H, Shen B, Chao L, Chao J. Tissue kallikrein and kinin infusion rescues failing myocardium after myocardial infarction. *J Card Fail.* 2007 Sep;13(7):588–96.
273. McLean PG, Perretti M, Ahluwalia A. Inducible expression of the kinin B1 receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg<sup>9</sup>bradykinin-induced coronary vasodilation. *Br J Pharmacol.* 1999 Sep;128(2):275–82.
274. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 2006 Jan;86(1):279–367.
275. Erdös EG, Tan F, Skidgel RA. Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension.* 2010 Feb;55(2):214–20.

## Abstract

**The kallikrein-kinin system (SKK)** is a peptide vasoactive system, its vasodilator action is mediated through activation of two G-protein coupled receptors (R) for bradykinin (BK): B2R (constitutive) and B1R (inducible). They are involved in many physiological functions such as local and systemic regulation of blood pressure, blood volume and vascular permeability. BK interacts with the renin-angiotensin system (RAS) and contributes to the therapeutic effects of angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI) and angiotensin II receptor antagonists. The SKK involvement in blood pressure control during anaesthesia or shock, especially during haemorrhage remains poorly documented. **The aim of this study** was to investigate the role of B2R in hypotension and organ dysfunction induced by haemorrhagic shock. Two models of controlled haemorrhagic shock in mice were used: i) a pressure controlled model to assess the hemodynamic impact, ii) a controlled volume model to assess the impact on the organ failure. We investigated first the effect B2R blockade (by gene knockout or pharmacological blockade) on the severity of acute renal injury and changes in renal vascular permeability induced by a controlled pressure haemorrhagic shock. In this model, the B2R does not play a nephroprotective role. By contrast, B2R blockage improves low blood pressure tolerance and reduces mortality induced by haemorrhagic shock. Then, we investigated the hemodynamic effect of B2R blockage on pressure or volume controlled hemorrhagic shock models in ACEI-pretreated mice. In fact, ACEI can be associated with severe deleterious hypotension during anaesthesia as well as during haemorrhagic shock. We showed B2R blockade before hemorrhagic shock induction decreased the worsening of ACEI-induced arterial hypotension and decrease blood lactate. Finally, we investigated the impact of pharmacological blockade of B2R on mortality and multi-organs failure during volume controlled hemorrhagic shock model in ACEI-pre-treated mice. We showed blocking the B2R significantly reduces mortality in ACEI-pre-treated mice. However, under our experimental conditions, B2R blockade does not alter significantly the impact of hemorrhagic shock on liver, kidney and intestine. **In conclusion**, the B2R does not play a nephroprotective role in a murine hemorrhagic shock. However, the beneficial effect of B2R blockade points out the involvement of BK accumulation during hemorrhagic shock-induced hypotension. According to the benefits observed regarding mortality, acute SKK blockage using a B2R antagonist should be considered in patients treated by RAS blockers and that require emergency anaesthesia and intensive care.



---

**AUTEUR : Dr H el ene CHARBONNEAU**

**TITRE DE LA THESE : Rôle du Récepteur B2 de la Bradykinine dans un modèle murin de choc hémorragique contrôlé**

**DIRECTEURS DE THESE : Pr Ivan Tack et Pr Vincent Minville**

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : le 24 octobre 2016 à Toulouse**

---

**RESUME**

**Le système kinine-kallicréine (SKK)** est un système peptidique vasoactif dont l'action vasodilatatrice est médiée par l'activation de deux récepteurs de la bradykinine (BK): le RB2 (constitutif) et le RB1 (inductible). Ils sont impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques telles que la régulation locale et systémique de la pression artérielle, la volémie et la perméabilité vasculaire. Par ses interactions avec le système rénine-angiotensine (SRA), la BK participe aux effets thérapeutiques des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC). Le SKK joue un rôle encore mal connu dans le contrôle de la pression artérielle lors d'une anesthésie ou d'un état de choc, en particulier hémorragique. **L'objectif de ce travail**  tait d'étudier le rôle du RB2 dans l'hypotension artérielle et les dysfonctions d'organe induites par un choc hémorragique. Deux modèles murins de choc hémorragique contrôlé ont été utilisés: i) un modèle à pression contrôlée afin d'évaluer l'impact hémodynamique, ii) un modèle à volume contrôlé pour évaluer le retentissement sur la défaillance d'organe. Nous avons d'abord étudié l'impact du blocage du RB2 (par invalidation génique ou blocage pharmacologique) sur la sévérité de l'agression rénale aiguë et la perméabilité vasculaire rénale induite par un choc hémorragique à pression contrôlée. Dans ce modèle, le RB2 ne joue pas de rôle néphroprotecteur. Par contre, son blocage améliore la tolérance à l'hypotension et réduit la mortalité induite par le choc hémorragique. Nous avons ensuite étudié, dans un modèle comportant une exposition préalable à un IEC, l'impact hémodynamique du blocage pharmacologique du RB2 au cours d'un choc hémorragique à pression ou à volume contrôlé. En effet, l'imprégnation préalable par un IEC peut être à l'origine d'hypotensions artérielles réfractaires délétères pendant l'anesthésie et *a fortiori* en cas d'état de choc hémorragique. Nos résultats mettent en évidence que le blocage du RB2 juste avant le choc permet de limiter l'aggravation des hypotensions artérielles induite par les IEC et diminue la lactatémie. Dans cette même situation, nous avons étudié l'impact du blocage du RB2 sur la mortalité et la défaillance d'organe induites par un choc hémorragique à volume contrôlé. Nous avons montré que le blocage du RB2 réduit significativement la mortalité des souris préalablement traitées par un IEC par rapport aux souris sous IEC seul. Dans nos conditions expérimentales, le blocage du RB2 ne semble pas modifier l'impact hépatique, rénal et digestif du choc. **En conclusion**, le RB2 n'exerce pas spontanément de rôle néphroprotecteur au cours du choc hémorragique. Par contre, l'effet hémodynamique bénéfique de son blocage au cours d'un choc hémorragique indique que l'accumulation de BK participe à l'hypotension artérielle observée dans cette circonstance. Compte tenu des bénéfices en terme de mortalité, le blocage aigu du SKK par un antagoniste du RB2 mérite d'être étudié chez les patients traités au long cours par des inhibiteurs du SRA et qui nécessitent une prise en charge en urgence en anesthésie-réanimation.

---

**MOTS CLEFS : Choc hémorragique, hypotension artérielle, récepteur de la bradykinine, antagoniste du récepteur B2, icatibant, inhibiteur de l'enzyme de conversion**

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Physiopathologie en Réanimation**

**Cette Thèse a été réalisée au sein de l'I2MC ( quipe INSERM n 12) et de l'EA 4564   Rangueil, TOULOUSE**