



HAL
open science

Phénotypes biologiques de l'angioedème à kinine

Delphine Charignon

► **To cite this version:**

Delphine Charignon. Phénotypes biologiques de l'angioedème à kinine. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2014. Français. NNT : 2014GRENV042 . tel-01558861

HAL Id: tel-01558861

<https://theses.hal.science/tel-01558861>

Submitted on 10 Jul 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Virologie Microbiologie Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Delphine CHARIGNON

Thèse dirigée par le **Professeur Christian Drouet**

préparée au sein du **Laboratoire GREPI/AGIM 3405 CNRS UJF**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

**Phénotypes biologiques de
l'angioedème à kinine**

Thèse soutenue publiquement le **19 décembre 2014**

devant le jury composé de :

Monsieur Gilles DEVOUASSOUX

Professeur, Faculté de Médecine, Université Claude Bernard Lyon, Rapporteur

Monsieur Bernard BONNOTTE

Professeur, Faculté de Médecine, Université de Bourgogne Dijon, Rapporteur

Monsieur Hervé WATIER

Professeur, Faculté de Médecine, Université François Rabelais Tours, Membre

Monsieur Walter WUILLEMIN

Professeur, Medizinische Fakultät der Universität Bern, Suisse, Membre

Monsieur Ludovic MARTIN

Professeur, Faculté de Médecine, l'UNAM Angers, Membre

Monsieur Christian DROUET

Professeur, Faculté de Pharmacie, Université Joseph Fourier Grenoble, Directeur de thèse

Madame Françoise MOREL

Professeur, Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier Grenoble, Présidente du jury



Résumé

L'angioedème (AO) à kinine est caractérisé par la survenue spontanée et récurrente d'œdèmes des tissus sous cutanés et sous muqueux, conséquence de l'accumulation des kinines sur l'endothélium vasculaire. La sévérité des AO dépend de leur localisation, ils sont déformants sur les tissus sous cutanés, douloureux au niveau de la muqueuse digestive et peuvent mettre en jeu le pronostic vital s'ils affectent le larynx. L'AO à kinine a d'abord été associé au déficit pour C1 Inhibiteur (C1Inh) puis des formes sans déficit pour C1Inh ont été décrites. L'AO est décrit comme une maladie multifactorielle pour laquelle l'ensemble des facteurs décisionnels n'est pas encore identifié. Ce travail a permis (1) de définir des paramètres stratégiques de la production des kinines pour l'AO, (2) d'identifier les paramètres impliqués et décisionnels pour la survenue des crises et leur sévérité, (3) de repérer des phénotypes biologiques des sujets atteints d'AO.

Mots clés : Angioedèmes à kinine, critères diagnostics, phénotypes biologiques

Abstract

Kinin mediated angioedema (AO) is characterized by spontaneous and recurrent oedema affecting subcutaneous and submucosal tissue. Oedemas develop subsequently to kinin accumulation on vascular endothelium. AO severity is depending on localisation, they are warping on subcutaneous tissue, painful on digestive mucous and life treating when affected the larynx. Kinin mediated AO was first associated with C1 Inhibitor (C1Inh) deficiency and thereafter AO without C1Inh deficiency has been described. AO is a multifactorial disease for which all the decision-making factor(s) is(are) not yet identified. As results of this work, have emerged (1) a characterization of strategic parameters of the kinin production for AO, (2) an identification of significant and decision-making parameters for the attack onset and severity, (3) a cover of biological phenotypes of the AO patients.

Keywords: Kinin mediated angioedema, diagnostic criterion, biological phenotypes

Ce travail a été préparé sous la direction du Pr Christian Drouet en partenariat entre le groupe d'étude des processus inflammatoire (GREPI) appartenant à l'équipe CNRS/UJF AGIM (Andrologie Gérotechnologie Inflammation Modélisation) et le laboratoire d'exploration de l'angioedème du CHU de Grenoble, situés aux adresses suivantes :

GREPI AGIM 3405 CNRS/UJF

EFS Site de Grenoble,

29, avenue du Maquis de Grésivaudan, BP 35

38701 La Tronche cedex

Laboratoire d'exploration fonctionnelle de l'angioedème

Pôle de Biologie et pathologie

Centre hospitalier universitaire de Grenoble

C.S. 10217

38043 Grenoble Cedex 09

Remerciements

En premier lieu, je remercie sincèrement le Professeur Christian Drouet de m'avoir accueillie au sein de l'équipe du GREPI et du laboratoire d'exploration de l'angioedème. Merci pour votre encadrement, votre patience, vos conseils, vos enseignements, la confiance et l'autonomie que vous m'avez offert.

Je remercie chaleureusement l'intégralité des membres du GREPI actuels et anciens ainsi que ceux du laboratoire d'exploration l'angioedème. Merci pour votre bonne humeur et votre disponibilité. Un grand merci à tous ceux qui ont répondu à mes questions quotidiennes, qui m'ont m'aiguiller, encourager et soutenue. Un merci particulier à Arije et Federica pour le quotidien partagé !

Je souhaite exprimer ma reconnaissance envers les Professeurs Ludovic Martin, Peter Spaeth et Sven Cichon pour leurs échanges et corrections aux cours des différents manuscrits écrits ensemble. Merci pour vos collaborations et vos remarques précieuses.

Au Dr Denise Ponard, merci pour nos échanges et réflexions, vous savez stimuler nos neurones !

Merci aux membres du jury d'avoir accepté avec enthousiasme d'évaluer mon travail. Un merci particulier aux Professeurs Devouassoux et Bonnotte, qui ont accepté la charge de rapporter ce travail.

Merci au Dr Philippe Bulet et Pr Christophe Ribuot pour avoir accepté de participer à mes comités de suivi de thèse. Ces réunions m'ont permis de prendre du recul afin de ne pas perdre de vue la cible, merci pour vos conseils.

Un merci particulier aux membres d'Innov'Doc et aux encadrants du Label R2I, cette aventure m'a ouvert les yeux, merci pour tous ce que vous m'avez apporté.

Une dédicace particulière aux internes IPR grenoblois avec lesquels j'ai traversé cette double thèse. Nous avons partagé nos repas, nos questions et inquiétudes pendant 5 ans, merci pour votre soutien. Un merci particulier à Sébastien, pour son aide précieuse pour les statistiques.

A mes amis drômois, merci d'être toujours présents autour de moi.

A la mes amis grenoblois « la meute », merci pour cette jolie troupe déguisée que nous formons !

A ma belle-famille, merci pour votre accueil et votre curiosité pour mon travail.

Un grand merci à mes parents et ma sœur pour leur soutien.

Je remercie Emilien, mon mari, pour tous ce qu'il m'apporte au quotidien.

Je dédicace ce travail à ma petite cacahuète, mon grand projet à venir.

Sommaire

RESUME	4
ABSTRACT.....	4
SOMMAIRE.....	9
LISTE DES TABLEAUX	11
LISTE DES ANNEXES	11
LISTE DES FIGURES	12
ABREVIATIONS.....	14
INTRODUCTION :	17
1. LA FORMATION DES KININES ET LEUR CONTROLE	18
1.1 <i>Les précurseurs des kinines</i>	19
1.1.1 Le kininogène de haut poids moléculaire	21
1.1.2 Le kininogène de bas poids moléculaire	22
1.2 <i>Les protéases de la phase contact et les kalllicréines plasmatique et tissulaires</i>	22
1.2.1 Le facteur XII ou facteur Hageman	24
1.2.2 Les kalllicréines	26
1.2.3 Plasminogène et Plasmine	29
1.2.4 Prolylcarboxypeptidase.....	30
1.3 <i>Les déficits portant sur la phase contact</i>	30
1.4 <i>Le contrôle de la phase contact et des kalllicréines tissulaires</i>	31
1.4.1 Le contrôle des protéases plasmatiques	33
1.4.2 Le contrôle des protéases tissulaires	36
2. LE CATABOLISME DES KININES	37
2.1 <i>Enzyme de Conversion de l'Angiotensine-I</i>	39
2.2 <i>Amino peptidase P</i>	40
2.3 <i>Carboxypeptidase M et N</i>	41
2.4 <i>Dipeptidyl-Peptidase IV</i>	41
2.5 <i>Endopeptidase Neutre ou Néprilysine</i>	42
3. LES RECEPTEURS DES KININES	43
3.1 <i>Le récepteur B2</i>	43
3.1 <i>Le récepteur B1</i>	44
4. LES AGONISTES ET ANTAGONISTES DES RECEPTEURS B1 ET B2	47
4.1 <i>Les agonistes des récepteurs B1 et B2</i>	47
4.1.1 Les agonistes du récepteur B2	47
4.1.2 Les agonistes du récepteur B1	47
4.2 <i>Les antagonistes des récepteurs B1 et B2</i>	48
4.2.1 Les antagonistes du récepteur B2	48
4.2.1 Les antagonistes du récepteur B1	51
5. LES EFFETS PHYSIOPATHOLOGIQUES DES KININES	54
5.1 <i>Les kinines médiateurs de l'inflammation et de l'immunité</i>	54
5.2 <i>L'angioedème à kinine</i>	57
5.2.1 Classification des angioedèmes à kinine.....	57

5.2.2	Exploration biologique des angioedèmes à kinine	59
5.2.3	Rôle des facteurs déclencheurs	62
5.2.4	Traitement des angioedèmes à kinine	63
5.2.5	Diagnostics différentiels	65
5.3	<i>Les autres implications physiopathologiques des kinines</i>	65
6.	LES AUTRES MEDiateURS VASODILATATEURS ET VASOPERMEANTS	70
6.1	<i>L'histamine</i>	70
6.1.1	Les mastocytes	70
6.1.2	Les effets physiopathologiques de l'histamine	72
6.1.3	Le suivi biologique de l'activation des mastocytes	73
6.2	<i>Les leucotriènes</i>	73
	OBJECTIF	76
	PARTIE 1 : APPLICATION DES CONNAISSANCES DU SYSTEME KALLICREINE-KININE A L'ANGIOEDEME :	77
	CONTACT SYSTEM ACTIVATION IN PATIENTS WITH HAE AND NORMAL C1 INHIBITOR FUNCTION	78
	ICATIBANT, THE BRADYKININ B2 RECEPTOR ANTAGONIST WITH TARGET TO THE INTERCONNECTED KININ SYSTEMS	80
	PARTIE 2: DEMONSTRATION D'UNE MALADIE MULTIFACTORIELLE	83
	HEREDITARY ANGIOEDEMA WITH <i>F12</i> MUTATION: FACTORS MODIFYING CLINICAL PHENOTYPE	84
	FIRST HEREDITARY ANGIOEDEMA WITH MUTATIONS ON BOTH THE <i>SERPING1</i> AND <i>F12</i> GENES	87
	PARTIE 3: DEVELOPPEMENT D'OUTILS DIAGNOSTICS DE L'ANGIOEDEME A KININE	96
	ENZYMATIC ASSAYS FOR THE DIAGNOSIS OF BRADYKININ-DEPENDENT ANGIOEDEMA	97
	HIGH MOLECULAR WEIGHT KININOGEN CLEAVAGE BY KALLIKREIN: KINETICS, MATHEMATICAL MODEL, AND APPLICATIONS FOR BIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF ANGIOEDEMA	99
	DISCUSSION GENERALE	141
	CONCLUSION	151
	PERSPECTIVES	153
	BIBLIOGRAPHIE	159
	ANNEXE	173

Liste des tableaux

Tableau I: Activités relatives de contrôle de la phase contacte par différents inhibiteurs [32][33].....	31
Tableau II : Propriétés des récepteurs B1 et B2.	43
Tableau III : Affinités des kinines et de l'icatibant pour les récepteurs B1 et B2.	48
Tableau IV : Classification étiologique des angioedèmes (AO).	58
Tableau V : Effets des leucotriènes.	75

Liste des annexes

Annexe 1 : Arbre décisionnel pour l'exploration biologique d'un angioedème à kinine .	173
---	-----

Liste des Figures

Figure 1 : Séquences peptidiques des kinines.	18
Figure 2 : Kininogènes de haut et de bas poids moléculaire : domaines structuraux.	19
Figure 3 : Fonction des différents domaines du kininogènes de haut poids moléculaire....	20
Figure 4 : Kininogène de haut poids moléculaire : formes native et clivée.	21
Figure 5 : Kininogène de bas poids moléculaire : formes native et clivée.....	22
Figure 6 : Mécanisme de libération de la bradykinine (BK).....	23
Figure 7 : Domaines structuraux du facteur XII (FXII) [11][21].....	25
Figure 8 : Modèle structural de la prékallitréine et de la kallitréine plasmatique.....	27
Figure 9 : Domaines structuraux du plasminogène et de la plasmine [27].	30
Figure 10 : Mécanisme de l'inhibition par un inhibiteur des protéases à Sérine [36].....	33
Figure 11 : Modèle de C1 Inhibiteur.	34
Figure 12 : Catabolisme de la bradykinine (BK) et de <i>desArg</i> ⁹ -BK.....	37
Figure 13 : Sites d'intervention des enzymes du catabolisme des kinines.....	38
Figure 14 : Implication de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine-I (ECA) dans le système kallitréine–kinine et le système rénine-angiotensine.....	40
Figure 15 : Séquence peptidique des récepteurs B1 et B2 humains.....	45
Figure 16 : Voies de signalisations et transduction des signaux associés à l'activation des récepteurs B1 (B1R) et B2 (B2R) [60].....	46
Figure 17 : Molécule HOE-140, Icatibant, Firazyr®.....	49
Figure 18 : Structure de la molécule WIN 64338.	50
Figure 19 : Modèle de pharmacophore pour les antagonistes du récepteur B2 [68].....	51
Figure 20 : Antagoniste non peptidique de RB2 ayant un motif 1,4-pipérazine : Bradyzide	51
Figure 21 : Structure de la molécule SSR240612	52
Figure 22 : Structure de la molécule MK-0686.....	53
Figure 23 : Effet de l'administration intra-artérielle de bradykinine.	55
Figure 24 : Représentation de l'effet des kinines sur le système nerveux central (SNC) [88].	56
Figure 25 : Interconnexions entre le système kallitréine-kinine, la coagulation, le complément et la fibrinolyse [135]......	66
Figure 26 : Schéma de l'implication de la bradykinine (BK) dans les tumeurs [143].	68
Figure 27 : Mastocyte : coloration par le bleu de toluidine [154].....	70
Figure 28 : Schéma d'activation d'une cellule mastocytaire par le pontage d'immunoglobulines de type E fixées à leur récepteur FcεRI [154].....	71

Figure 29 : Métabolisme des leucotriènes [156].	74
Figure 30 : Applications potentielles des antagonistes des récepteurs des kinines [81].	81
Figure 31 : Schéma montrant les réactions possibles de deux génotypes (ligne et pointillé) pour la sévérité d'une pathologie [135].	142
Figure 32 : Effets indésirables associés à l'application de l'icatibant.	143
Figure 33 : Les différents phénotypes biologiques du métabolisme des kinines associés à l'angioedème à kinine. D'après Björkqvist <i>et al</i> [182].	152
Figure 34 : Système Transwell®.	154
Figure 35 : Perméabilité de l'endothélium : mesure du transfert du traceur par le système Transwell®.	155
Figure 36 : Perméabilité endothéliale suivie par le clivage et la libération de VE-Cadhérine sous l'influence des kinines et de l'icatibant.	156
Figure 37 : Augmentation de l'activation de la phase contact par le surnageant des mastocytes activés.	157

Abréviations

5-Lox : 5-lipoxygénase,	DPPIV : dipeptidyl peptidase IV,
α_1 -AT : α_1 -antitrypsine,	EA.hy926 : cellule endothéliale en lignée issue de la fusion des cellules endothéliale primaire (HUVEC) avec des cellules d'adénocarcinome de poumon,
α_2 -AP : α_2 -antiplasmine,	ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine-I,
α_2 -M : α_2 -macroglobuline,	EGF : facteur de croissance épidermique,
aa : acides aminés,	Fc γ RIII : récepteur pour les immunoglobulines de type G,
AMM : autorisation de mise sur le marché,	Fc ϵ RI : récepteur pour les immunoglobulines de type E,
Ang-I : angiotensine-I,	FGF : facteur de croissance des fibroblastes,
Ang-II : angiotensine-II,	Fn : domaine de type fibronectine,
Ag : antigène,	FXI : facteur XI,
AO : angioedème,	FXII : facteur XII ou facteur Hageman,
AOA : angioedème acquis,	FXIIa : facteur XII protéase,
AOH: angioedème héréditaire,	gC1qR : récepteur de la tête globulaire de C1q,
AOH-C1Inh : angioedème héréditaire avec déficit pour C1 Inhibiteur,	GPI : glycosylphosphatidylinositol,
AOH-FXII : angioedème héréditaire avec mutation sur le gène <i>F12</i> ,	HK : kininogène de haut poids moléculaire,
AOH-nC1Inh : angioedème héréditaire avec fonction normale de C1 Inhibiteur,	hK1 : kallicréine tissulaire,
APM : aminopeptidase M,	HOE-140 : Firazyr [®] , icatibant,
APP : aminopeptidase P,	HSP90 : protéine du choc thermique,
ATP : adénosine triphosphate,	HUVEC : HUVEC : cellule endothéliale humaine recouvrant la veine du cordon ombilical,
ATIII : antithrombine III,	IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I,
BK : bradykinine,	Ig : immunoglobuline,
C1Inh : C1 Inhibiteur,	IL : interleukine,
C3aR : récepteur de C3a,	IFN : interféron,
C5aR : récepteur de C5a,	
Ca : calcium,	
CK1 : cytokératine-1,	
CPN/M : carboxypeptidase N/M,	
DAG : diacylglycérol,	
<i>desArg</i> ⁹ -BK : <i>desArg</i> ⁹ -bradykinine,	
<i>desArg</i> ¹⁰ -KD : <i>desArg</i> ⁹ -kallidinine,	

IP3 : 1,2,5-triphosphate,
KD : kallidine,
KK : kallicréine,
K_m : constante de Michaelis,
LK : kininogène de bas poids moléculaire,
LT : leucotriène,
LUVA : lignée de cellules mastocytaires,
MASP : protéases associées à la lectine fixant le mannose,
NEP : endopeptidase neutre ou néprilysine,
NO : oxyde nitrique,
OMIM : base de données en ligne sur l'héritage mendélien chez l'Homme ou online mendelian inheritance in Man,
ORL : oto-rhino-laryngologie,
PAF : facteur activateur des plaquettes,
pKK : prékallicréine,
PG : prostaglandine,
PPL : phospholipase,
PRCP : prolylcarboxypeptidase,
RB1 : récepteur B1,
RB2 : récepteur B2,
ROC : de l'anglais « Receiver Operating Characteristic »,
SNC : système nerveux central,
Sub P : substance P,
TCA : temps de céphaline activée,
TNF- α : facteur α de nécrose tumorale,
tPA : activateur tissulaire du plasminogène,
uPA : activateur du plasminogène de type urokinase,
uPAR : récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase.

Introduction

L'existence des kinines a été découverte en 1909 par Abelous et Bardier [1]. Ces deux physiologistes français découvrirent les propriétés hypotensives de l'urine humaine injectée chez le chien. En 1928, Frey et Kraut identifièrent la substance hypotensive et la nommèrent « facteur H » [2]. En 1930, Kraut retrouva de fortes concentrations de cette substance au niveau du pancréas et la rebaptisa kallibréine (KK, du grec *kallikras*, pancréas). En 1949, Rocha e Silva isola et caractérisa la bradykinine (BK), substance peptidique de courte demi-vie [3].

Aujourd'hui le terme kinine regroupe différents peptides ayant des propriétés de vasodilatation et de vasoperméation : BK, Kallidine (KD) substance P (sub P), Kininogène de haut poids moléculaire (HK) et de bas poids moléculaire (LK), Eledoisin, kassinin, Neurokinine A, Neurokinine B, Physalaemin. Dans la suite de l'exposé les kinines considérées seront limitées à BK et KD ainsi que leurs métabolites.

1. La formation des kinines et leur contrôle

BK et KD sont des peptides générés *in situ* à partir de leurs précurseurs, respectivement HK (120 kDa) et LK (64 kDa), sous l'action d'enzymes appelées kininogénases.

KD est le décapeptide tissulaire, homologue de BK, le nonapeptide plasmatique. KD et BK partagent la même séquence peptidique à la différence que KD dispose d'un acide aminé (aa) Lysine supplémentaire en position 1 (Figure 1). L'aminopeptidase M (APM) converti KD en BK et *desArg*¹⁰-KD (métabolite actif de KD) en *desArg*⁹-BK (métabolite actif de BK) en retirant le résidu Lys¹, permettant ainsi la conversion des peptides tissulaires en peptides plasmatiques [4].

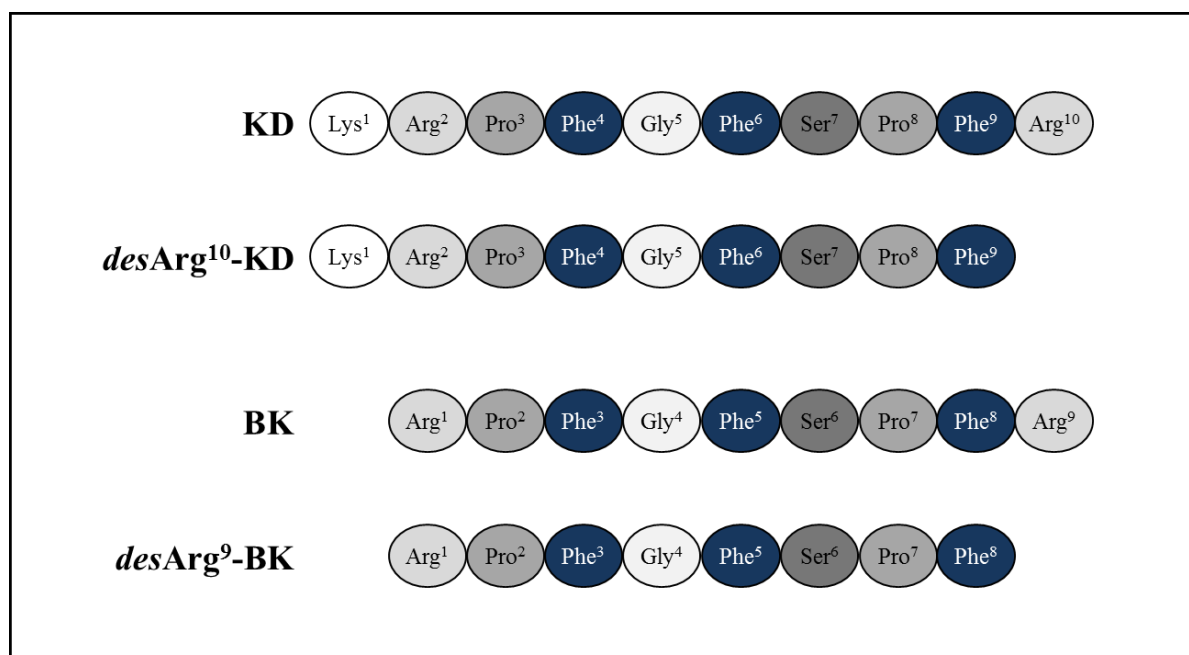


Figure 1 : Séquences peptidiques des kinines.

KD (Kallidine) ; BK (bradykinine). KD et *desArg*¹⁰-KD, son métabolite, sont les kinines tissulaires converties par l'aminopeptidase M en BK et *desArg*⁹-BK, les kinines plasmatiques.

1.1 Les précurseurs des kinines

HK et LK sont issus de l'épissage alternatif d'un même gène, *KNG1* (11 exons) situé sur le chromosome 3q26 (Figure 2). HK et LK ont en commun les 3 premiers domaines (D1 à D3) du côté N-terminal (exons 1 à 9) qui correspondent à la chaîne lourde ainsi qu'une partie de l'exon 10 correspondant au domaine 4 clivé pour libérer BK ou KD. Par contre HK et LK diffèrent au niveau de leurs chaînes légères, la fin de l'exon 10 associé à l'exon 11 formant la chaîne légère de HK (56 kDa) et l'exon 11 seul, formant la chaîne légère de LK (4 kDa, Figure 2) [5].

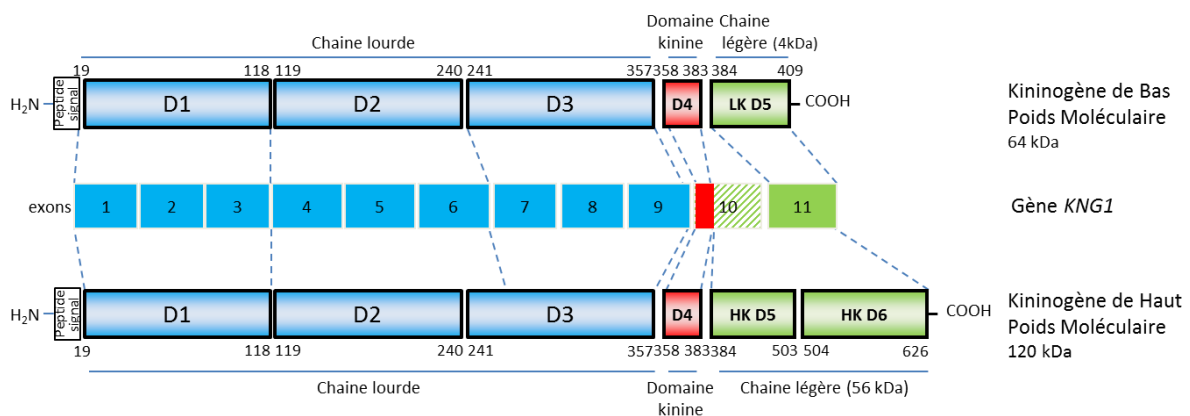


Figure 2 : Kininogènes de haut et de bas poids moléculaire : domaines structuraux.

LK : kininogène de bas poids moléculaire ; HK : kininogène de haut poids moléculaire.

HK et LK sont issus de l'épissage alternatif du gène *KNG1*. Ils ont en commun les domaines 1 à 3 (chaîne lourde), codés par les exons 1 à 9 ainsi qu'une partie du domaine 4 codé par l'exon 10 contenant le domaine kinine. La chaîne légère de HK (56 kDa) correspond à la fin de l'exon 10 associé à l'exon 11. La chaîne légère de LK (4 kDa) correspond à l'exon 11 seul.

Les domaines 2 et 3 contiennent une séquence spécifique QVVAG, douée de propriété inhibitrice des protéases à Cystéine telles que calpaïne, papaïne et cathepsine-L [5]. Les domaines 3, 4 et 5 portent les propriétés de fixation à la surface des cellules endothéliales

(Figure 3). La fixation de HK à la surface cellulaire est assurée par l'intermédiaire de 3 récepteurs distincts : le récepteur à la tête globulaire de C1q (gC1qR), la cytokératine-1 (CK1) et le récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPAR) dans les rapports décroissants d'affinité (gC1qR>CK1>uPAR, Figure 3) [6]. Le domaine 3 inhibe la fixation de la thrombine aux plaquettes ce qui confère au kininogène des propriétés anti-thrombotique [5]. Le domaine 4, contient la séquence des kinines qui est sensible à la protéolyse par les kininogénases.

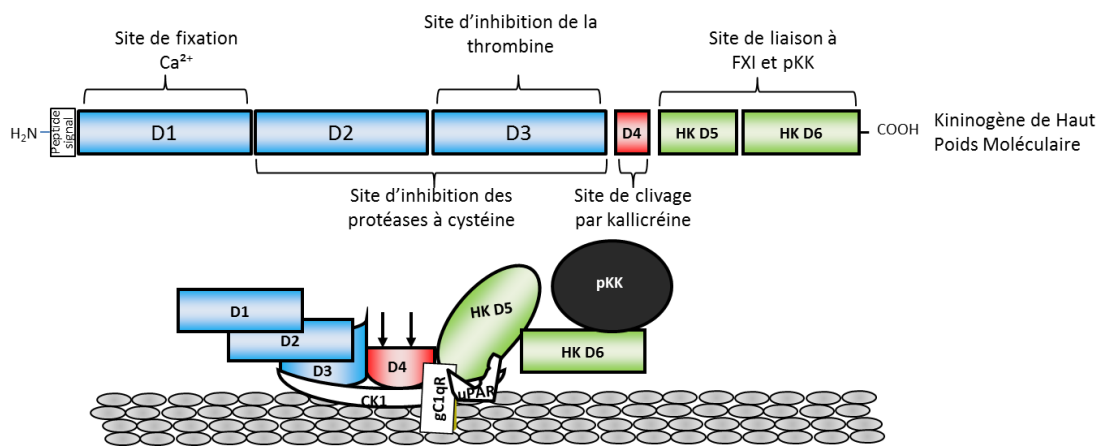


Figure 3 : Fonction des différents domaines du kininogènes de haut poids moléculaire.

FXI : facteur XI ; pKK : prékallibréine ; gC1qR : récepteur à la tête globulaire de C1q ; HK : kininogène de haut poids moléculaire ; CK1 : cytokératine-1 ; uPAR : récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase.

Le domaine 1 de HK est capable de fixer le calcium sans que la fonctionnalité de cette fixation ne soit établie. Les domaines 2 et 3, contiennent une séquence inhibitrice des protéases à Cystéine. Les domaines 3, 4 et 5 portent les propriétés de fixation à la surface des cellules endothéliales par l'intermédiaire de gC1qR, de CK1 et d'uPAR. Le domaine 3 inhibe la fixation de la thrombine aux plaquettes. Le domaine 4, contient la séquence des kinines qui est sensible à la protéolyse par les kininogénases. Et les domaines 5 et 6 se lient au FXI et à pKK.

1.1.1 Le kininogène de haut poids moléculaire

HK est une α -globuline, synthétisée et sécrétée par le foie, dont la concentration plasmatique est de 70 à 90 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (0,58 à 1 μM).

La protéolyse de HK par KK s'effectue en 3 temps. La première et la seconde étape correspondent à la coupure de HK entre les résidus Lys³⁸¹ et Arg³⁸² et entre Arg³⁹⁰ et Ser³⁹¹ (KK ne possède pas d'ordre préférentielle pour effectuer ces deux clivages), libérant BK et formant deux chaînes, l'une de 64 kDa et l'autre de 56 kDa, reliées par un pont disulfure entre les positions Cys²⁹ et Cys⁵⁹⁵ (Figure 4). La troisième étape consiste à la stabilisation de la chaîne légère par un dernier clivage, qui forme la chaîne légère clivée (45 kDa) [7].

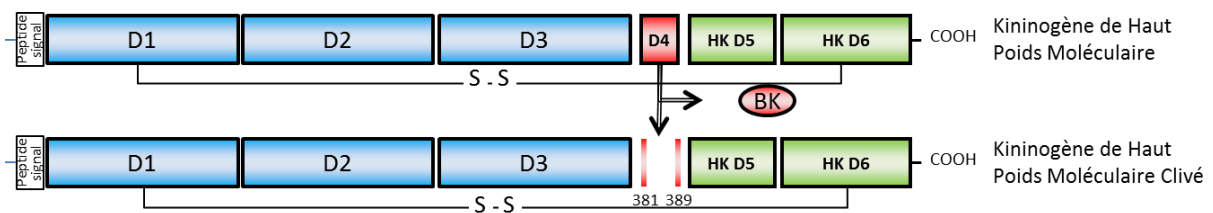


Figure 4 : Kininogène de haut poids moléculaire : formes native et clivée.

Le clivage de HK par KK entre les résidus Lys³⁸¹ et Arg³⁸² et entre Arg³⁹⁰ et Ser³⁹¹ libère bradykinine (BK). Les deux chaînes lourdes et légères restent associées par un pont disulfure.

1.1.2 Le kininogène de bas poids moléculaire

LK est une β globuline de 64 kDa (Figure 2), dont la concentration plasmatique est de $160 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($2,4 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). LK est clivé entre les résidus Met³⁶¹ et Lys³⁶² et entre les résidus Arg³⁷¹ et Ser³⁷² [8], par la kallibréine tissulaire (hK1), libérant KD (Figure 5) [5].

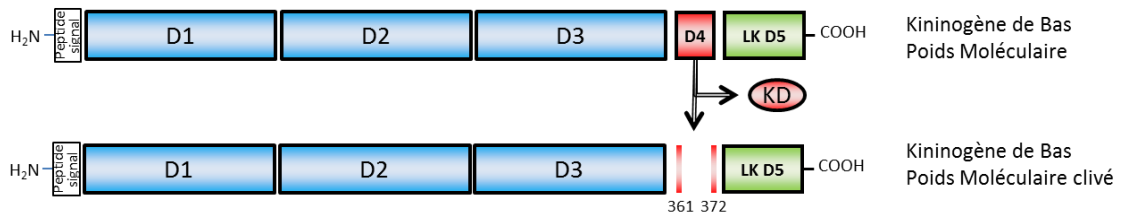


Figure 5 : Kininogène de bas poids moléculaire : formes native et clivée.

Le clivage de LK par hK1 entre les résidus Met³⁶¹ et Lys³⁶² et entre Arg³⁷¹ et Ser³⁷² libère Kallidine (KD).

1.2 Les protéases de la phase contact et les kallibréines plasmatique et tissulaires

La description classique de la phase contact considère le clivage de HK sous l'action de la KK, issue elle-même de l'activation du proenzyme prékallibréine (pKK) sous l'action du Facteur XII protéase (FXIIa, Figure 6). Mais d'autres protéases, bien que minoritaires, peuvent participer aux activités enzymatiques associées à la libération des kinines telles que la Prolylcarboxypeptidase (PRCP) [9], la plasmine ou les protéines de choc thermique comme HSP90 (Figure 6) [10].

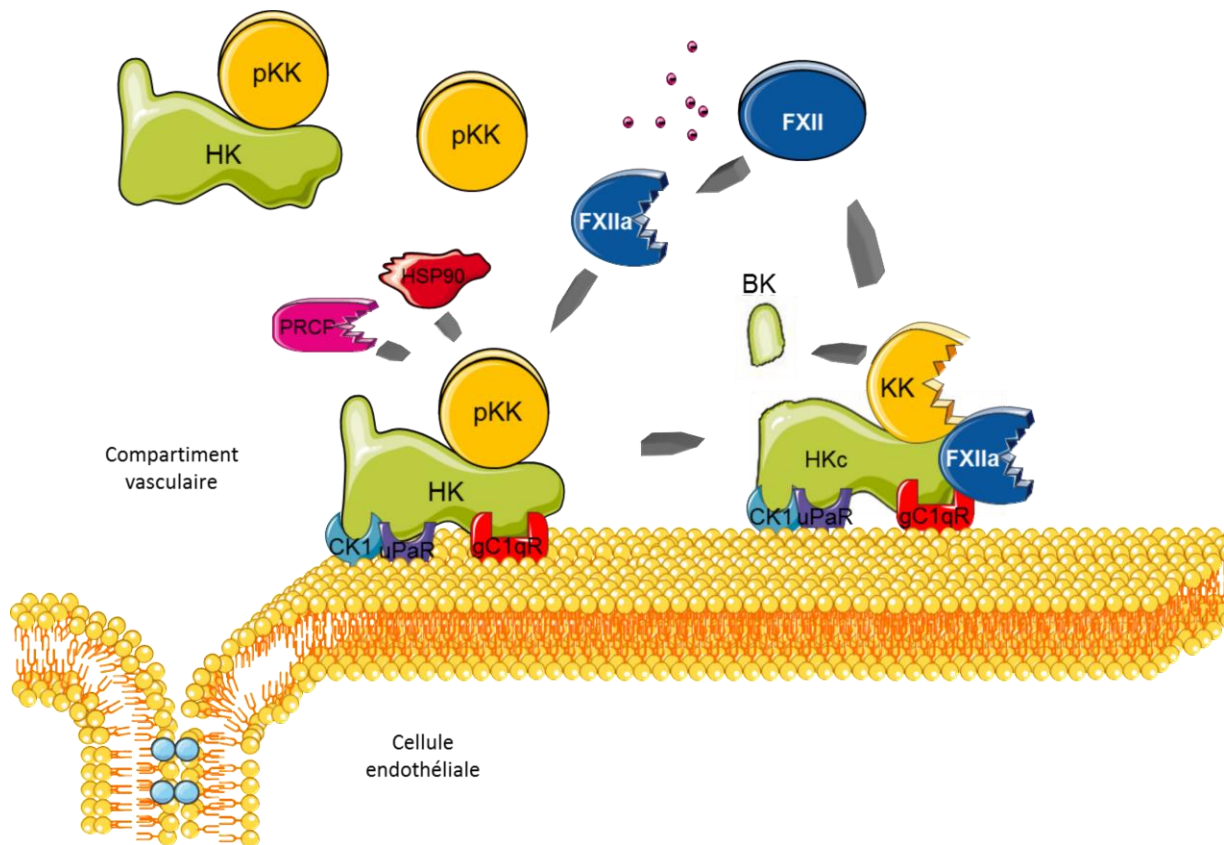


Figure 6 : Mécanisme de libération de la bradykinine (BK).

HK : kininogène de haut poids moléculaire ; pKK : prékallitréine ; KK : kallitréine ; FXII : Facteur XII; FXIIa : FXII protéase ; - : charge négative ; PRCP : prolylcarboxypeptidase ; HSP90 : protéine du choc thermique ; CK1 : cytokératine 1 ; gC1qR : récepteur de la tête globulaire de C1q; uPAR : Récepteur de l'activateur du plasminogène de type urokinase. Les proenzymes FXII et pKK circulent dans le plasma. HK et pKK forment des complexes qui peuvent se fixer à la surface des cellules endothéliales. Au contact de charges négatives, FXII s'active en FXIIa, qui va activer pKK en KK qui va elle-même cliver HK pour libérer BK. HSP90 et PRCP sont également capables d'activer pKK. Une boucle d'amplification se forme lorsque KK active FXII.

1.2.1 Le facteur XII ou facteur Hageman

Le facteur XII (FXII, EC 3.4.21.38) est un zymogène de type β -globuline de 80 à 90 kDa, synthétisé par le foie et circulant dans le plasma à la concentration de 30 à 35 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (0.30 à 0.45 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). FXII est codé par le gène *F12* situé sur le chromosome 5. A l'heure actuelle aucune structure cristallographique de FXII n'est disponible. FXII protéase (FXIIa) se compose d'une chaîne lourde (353 aa) et d'une chaîne légère (243 aa). Le site catalytique de type protéase à Sérine est composé d'une triade catalytique (His⁴¹², Asp⁴⁶¹ et Ser⁵⁶³) portée par la chaîne légère (Figure 7) [5].

L'activation du FXII en FXIIa procède au contact de surfaces chargées négativement, à l'origine de la dénomination « phase contact ». Les domaines de type fibronectine (Fn) I, Fn II, la région riche en Proline et les résidus chargés positivement du domaine N-terminal contribuent à la fixation de FXII aux charges négatives (Figure 7). L'activation de FXII peut se décomposer en 2 étapes. La première correspond au clivage entre les résidus Arg³⁵³ et Val³⁵⁴ et forme FXIIa ou α -FXIIa dont les deux chaînes (lourdes et légères) sont reliées par un pont disulfure (Figure 7). La seconde étape correspond aux clivages entre les résidus Arg³³⁴ et Asn³³⁵ et entre les résidus Arg³⁴³ et Leu³⁴⁴ libérant une partie de la chaîne légère et formant β -FXIIa (30 kDa, Figure 7) [11]. α -FXIIa possède la capacité d'activer pKK en KK, aboutissant à la libération des kinines, le complexe C1, premier composant de la voie classique du complément et le facteur XI (FXI) initiateur de la voie intrinsèque de la coagulation. β -FXIIa conserve la capacité d'activer pKK et le complexe C1. L'absence de la chaîne lourde et la diminution des propriétés de fixation aux charges négatives font perdre à β -FXIIa la capacité d'activer FXI [11]. L'absence de phénotype hémorragique chez les patients déficitaire pour FXII montre que FXII n'est pas indispensable à l'activation de la voie intrinsèque [12] toutefois FXII semble participer à la stabilisation du thrombus [13] (Cf. page 30 §1.3).

L'activation du proenzyme FXII s'opère selon 2 mécanismes. Le premier mécanisme dépend de l'auto-activation lente du FXII au contact de surfaces chargées négativement. Ces surfaces peuvent être d'origine exogène comme le verre, le dextran, des biomatériaux (membranes de dialyse) ou d'origine endogène tel que l'héparine [14], les polyphosphates [15], les cristaux d'acide urique [16], l'ARN extracellulaire [17], le collagène [18], le lipopolysaccharide (LPS) [19], les plaques amyloïdes [20]. Le second mécanisme dépend de l'activation du FXII par des protéases comme KK (formation d'une boucle d'amplification) et la plasmine [11].

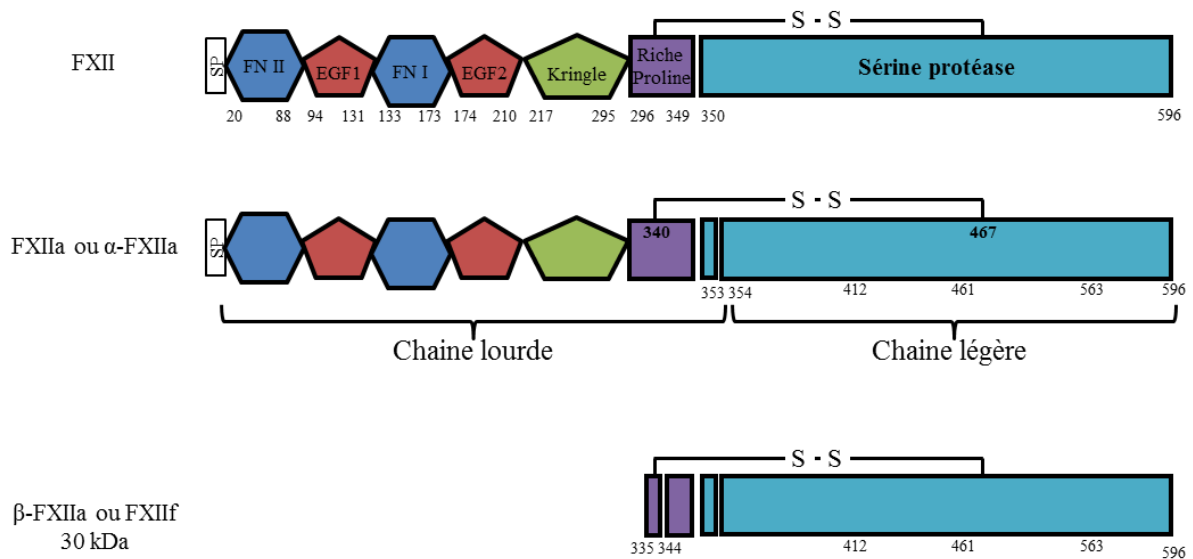


Figure 7 : Domaines structuraux du facteur XII (FXII) [11][21].

FN : domaine de type fibronectine II et I ; EGF : domaine de type facteur de croissance épidermique ; FXII : Facteur XII zymogène ; FXIIa ou α-FXIIa : Facteur XII enzyme.

FXII s'active au contact de charges négatives interagissant avec les domaines de type Fn I, Fn II, la région riche en Proline et les résidus chargés positivement du domaine N-terminal. L'activation de FXII en FXIIa ou α-FXIIa correspond au clivage entre les résidus Arg³⁵³ et Val³⁵⁴ dont les deux chaînes sont reliées par un pont disulfure entre la Cys³⁴⁰ et la Cys⁴⁶⁷. La chaîne légère de FXIIa porte le site catalytique de type protéase à Sérine (His⁴¹², Asp⁴⁶¹ et Ser⁵⁶³). Le seconde clivage entre les résidus Arg³³⁴ et Asn³³⁵ et entre les résidus Arg³⁴³ et Leu³⁴⁴ libère une partie de la chaîne légère et forme β-FXIIa ou FXIIIf.

L'activité de la FXIIa est contrôlée par des inhibiteurs de protéases, C1 Inhibiteur (C1Inh), contrôle majoritaire ; l' α 2-macroglobuline (α 2-M), l' α 2-antiplasmine (α 2-AP) et l'antithrombine III (ATIII) contrôles minoritaires.

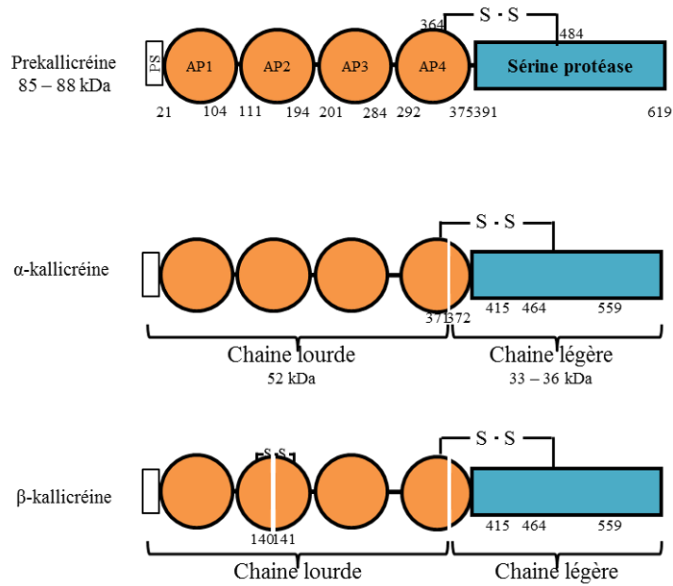
1.2.2 Les kallibréines

Les kallibréines sont des enzymes initialement identifiées pour leurs capacités à cliver le kininogène et libérer les kinines. Actuellement les kallibréines sont divisées en deux groupes, plasmatique et tissulaire.

1.2.2.1 Prékallibréine et kallibréine plasmatique

La pKK (EC 3.4.21.34) est une γ globuline présentant deux isoformes de 85 et 88 kDa, selon l'hétérogénéité de la glycosylation sur la chaîne légère. Elle est synthétisée et produite par le foie et présente dans le plasma à la concentration de 35 - 50 mg•L⁻¹ (0,41 – 0,56 μ mol•L⁻¹) [5]. pKK est codée par le gène *KLKB1* porté par le chromosome 4q35 et qui présente de nombreuses homologues (58 %) avec le gène codant pour le FXI, laissant supposer l'existence d'un gène ancestral commun. pKK circule dans le plasma sous forme zymogène dont environ 80-90 % forme un complexe non covalent avec HK [11]. KK est composée d'une chaîne lourde (371 aa) et d'une chaîne légère (248 aa) reliées par un pont disulfure. La chaîne lourde est structurée en 4 domaines répétés de 90-91 aa, dit domaines « Apple » (Figure 8), maintenus par 3 ponts disulfures. Ces 4 domaines Apple sont aussi retrouvés sur le FXI [5]. Les domaines d'interactions entre le domaine 6 de HK et pKK appartiennent aux domaines Apple 1, 2 et 4. Le site de reconnaissance pour le FXIIa se situe sur les domaines Apple 3 et 4 [5]. HK sert de récepteur à KK, sur la surface des cellules endothéliales par l'intermédiaire des récepteurs CK1, uPAR et gC1qR [6][11].

A



B

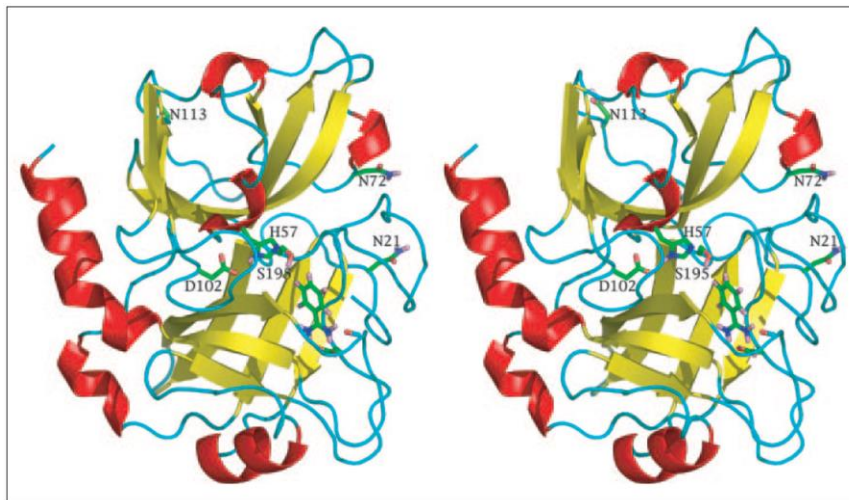


Figure 8 : Modèle structural de la prékallicréine et de la kallicréine plasmatique.

A : Structure de la prékallicréine, de kallicréine α et β : PS : peptide signal ; AP : domaine Apple. A partir de prékallicréine, le clivage entre les résidus Arg³⁷¹ et Ile³⁷² forme α -Kallicréine, dont la chaîne lourde et la chaîne légère sont reliées par un pont disulfure entre Cys³⁷¹ et Cys³⁷². La chaîne légère porte la triade catalytique (His⁴¹⁵, Asp⁴⁶⁴ et Ser⁵⁵⁹). α -Kallicréine subit un auto-clivage entre les résidus Lys¹⁴⁰ et Ala¹⁴¹ qui forme β -Kallicréine.

B : Structure secondaire de la chaîne légère de kallicréine : en jaune les feuilletts β ; en rouge les hélice α ; les trois résidus du site catalytique His⁵⁷, Asp¹⁰² et la Ser¹⁹⁵ ; les sites de glycosylation concernent les résidus Asn²¹, Asn⁷² et Asn¹¹³ [22].

L'activation de pKK en α -KK, par α -FXIIa et β -FXIIa, est la conséquence du clivage entre les résidus Arg³⁷¹ et Ile³⁷² (Figure 8) [5]. PRCP [9] ou les HSP90 [10] sont également capables d'activer pKK. La chaîne légère porte la triade catalytique de la protéase: His⁴¹⁵, Asp⁴⁶⁴ et Ser⁵⁵⁹. α -KK est capable de cliver HK pour libérer BK mais aussi d'activer FXII, pro-urokinase et plasminogène en FXIIa, urokinase et plasmine, respectivement. D'autres substrats de KK sont représentés par la pro-rénine, la protéine C3 du complément et le facteur H [23]. Par la suite α -KK, subit un clivage auto-lytique entre les résidus Lys¹⁴⁰ et Ala¹⁴¹ (Figure 8), pour former β -KK, qui possède une activité protéolytique diminuée [5].

L'activité de la KK est contrôlée par des inhibiteurs de protéases : C1Inh (contrôle majoritaire), α_2 -AP, ATIII et α_2 -M (contrôle minoritaire). L'association de KK à HK protège la KK du contrôle par C1Inh [5].

1.2.2.2 Prokallibréine et Kallibréine tissulaire

Les prokallibréine et kallibréine tissulaires, constituent un groupe de protéases à Sérine codées par une quinzaine de gènes (*hKLK1* à *hKLK15*). Le gène *hKLK1*, situé sur le chromosome 19q13, code pour hK1 (EC 3.4.21.35) qui est considérée comme la véritable kallibréine tissulaire capable de cliver LK pour libérer KD. Les autres membres de ce groupe d'enzymes sont appelées kallibréines à cause de leur homologie de séquence avec hK1 [24]. A l'inverse de la structure de KK composé de 4 domaines Apple répétés, les kallibréines tissulaires ne se composent que d'un seul domaine protéase. hK1 est une glycoprotéine de 46 kDa, synthétisée au niveau des reins, des glandes salivaires, du pancréas, de l'endomètre et de l'hypophyse. Elle est sécrétée sous la forme d'un zymogène, appelé prokallibréine. La prokallibréine est activée sous l'action d'enzymes possédant elles-mêmes une fonction kallibréine (trypsine, thermolysine) [24] et contrôlée par la kallistatine principalement [25] et mineurairement par l' α_1 -antitrypsine (α_1 -AT) [26].

1.2.3 Plasminogène et Plasmine

Le plasminogène (791 aa, 90 kDa) est la forme zymogène de la plasmine (EC 3.4.21.7), synthétisée par le foie et sécrétée dans le plasma à la concentration de 100 à 200 mg•L⁻¹ (1,1 à 2,2 µmol•L⁻¹). Le gène *PLG*, codant pour le plasminogène est situé sur le chromosome 6q26-27 [27].

Suite à l'activation du plasminogène par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), l'activateur de type urokinase (uPA), FXIIa, FXIa, KK et la trypsine, la liaison entre les résidus Arg⁵⁶¹ et Val⁵⁶² est rompue pour produire la plasmine [28]. Par la suite, sous l'influence de l'auto-activation, le clivage entre les résidus Lys⁷⁷ et Lys⁷⁸ libère les 77 premiers résidus de la chaîne lourde (Figure 9). L'activité protéase est portée par la triade His⁶⁰³, Asp⁶⁴⁶, Ser⁷⁴¹ située sur la chaîne légère de la plasmine [29]. Une grande variété de substrats est convertie par la plasmine, dont KK, FXII, caséine, un protéoglycane, collagène de type IV, mais les substrats principaux sont le fibrinogène et la fibrine que la plasmine dégrade dans le cadre de la fibrinolyse. L'activité de plasmine est sous le contrôle principal de l' α_2 -antiplasmine (α_2 -AP) et l' α_2 -M [28].

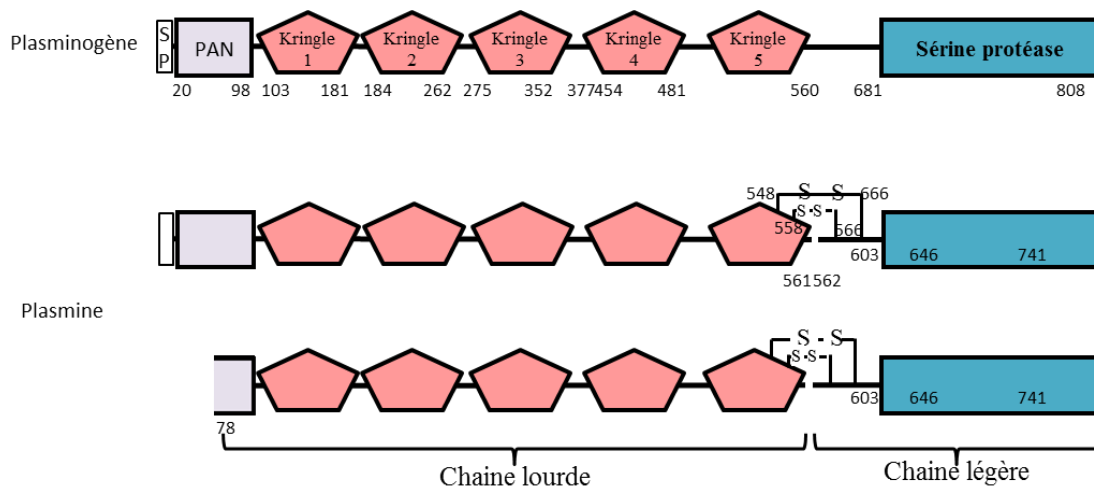


Figure 9 : Domaines structuraux du plasminogène et de la plasmine [29].

L'activation du plasminogène par la rupture de la liaison entre les résidus Arg⁵⁶¹ et Val⁵⁶² forme la plasmine composée d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère reliées par deux ponts disulfures entre les Cys⁵⁵⁸ et Cys⁵⁶⁶ et entre Cys⁵⁶¹ et Cys⁵⁶². Le clivage entre les résidus Lys⁷⁷ et Lys⁷⁸ libère une partie de la chaîne lourde. L'activité protéase est portée par la triade His⁶⁰³, Asp⁶⁴⁶, Ser⁷⁴¹ située sur la chaîne légère.

1.2.4 Prolylcarboxypeptidase

La prolylcarboxypeptidase (PRCP, EC 3.4.16.2) est une Sérine protéase de 58 kDa retrouvée de façon ubiquitaire dans le plasma et les tissus. PRCP est l'une des enzymes majeures du système rénine-angiotensine car elle est capable de convertir l'angiotensine-II (ang-II) en angiotensine_[1-7] et l'angiotensine-III en angiotensine_[2-7]. PRCP est elle-même capable d'activer pKK en KK [9].

1.3 Les déficits portant sur la phase contact

Le déficit d'un des facteurs de la phase contact, déficit de HK ou trait Fitzgerald (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM 228960), déficit de pKK ou trait Fletcher (OMIM 612423), déficit de FXII ou trait Hageman (OMIM 234000), se traduit par une augmentation du temps de coagulation, *in vitro*, mais n'est pas associé à un phénotype hémorragique *in vivo* [30]. Les individus présentant un de ces déficits restent, pour la plupart,

asymptomatiques jusqu'à ce qu'un examen biologique de routine montre un temps de céphaline activée (TCA) allongé. En général, le déficit en FXII augmente le TCA de 200 secondes, le déficit HK l'augmente d'environ 100 secondes et le déficit en pKK de 15 secondes. L'absence de phénotype hémorragique dans ces situations confirme l'existence de redondance et le rôle mineur de HK, pKK et FXII dans la coagulation.

1.4 Le contrôle de la phase contact et des kallicréines tissulaires

Les enzymes formant BK et KD sont sécrétées sous formes de proenzymes, dont les activations et les activités sont contrôlées. FXII, pKK, FXIIa et KK sont sous le contrôle principal de C1Inh [31]. L' α_2 -AP contrôle principalement KK [32] mais aussi légèrement FXII [33]. L'ATIII et l' α_2 -M sont des contrôles minoritaires pour FXIIa [33][34] et pour KK [35] (Tableau I).

Sur le plan tissulaire, hK1 est contrôlée principalement par la kallistatine [25] et minoritairement par l' α_1 -antitrypsine (α_1 -AT) [26].

	Inhibition relative du Facteur XIIa	Inhibition relative de la Kallicréine
C1 Inhibiteur	91,3 %	52 %
α_2 -antiplasmine	3,0 %	8 %
antithrombine III	1,5 %	1,1 %
α_2 -macroglobuline	4,3 %	35 %

Tableau I: Activités relatives de contrôle de la phase contacte par différents inhibiteurs [34][35].

C1Inh, α_2 -AP, ATIII, kallistatine et α_1 -AT sont des protéines appartenant à la superfamille des inhibiteurs de protéases à Sérine (Serpine). Les Serpines agissent de manière stœchiométrique (1 : 1) avec la protéase-cible, tel un substrat suicide pour piéger la protéase. Ces protéines contiennent dans la partie, C-terminale, un domaine serpine associé à une boucle réactive dont la séquence mime la spécificité de substrat des protéases cibles. La reconnaissance du site par la protéase conduit au clivage d'une liaison peptidique P1 P1' sur la serpine par la protéase, ce qui engage une attaque nucléophile du résidu Ser du site catalytique vis-à-vis du résidu Arg en P1 libéré ; les deux protéines sont alors liées par une liaison covalente de type ester. A cette liaison covalente s'associe un changement de conformation de la boucle réactive de la serpine qui s'insère dans le plancher A (feuillet β A, coloration bleue Figure 10, A), enfermant ainsi la protéase dans un complexe serpine-protéase. La protéase est alors inactivée dans une liaison covalente avec son inhibiteur (Figure 10, A) [36]. Cette réaction peut être imagée sous le principe de la tapette à souris (Figure 10, B).

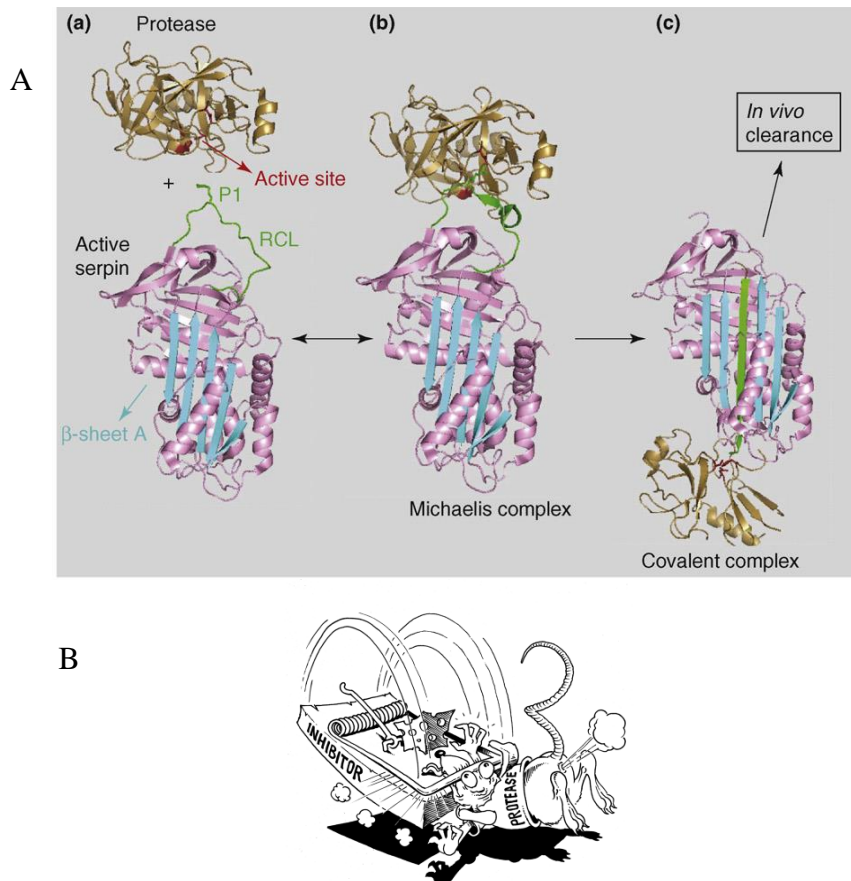


Figure 10 : Mécanisme de l'inhibition par un inhibiteur des protéases à Sérine [36].

A : La reconnaissance de la protéase cible (coloration dorée) par la boucle réactive (RCL, coloration verte) conduit au clivage de la liaison peptidique entre P1 et P1' sur RCL par la protéase. Les deux protéines forment alors un complexe. La formation de ce complexe s'associe à un changement de conformation de RCL qui s'insère dans les feuillets β A (coloration bleue), enfermant ainsi la protéase dans un complexe covalent serpine-protéase.

B : Illustration du mécanisme d'inhibition (dessin de Jan H Nuijens, Leiden NL)

1.4.1 Le contrôle des protéases plasmatiques

1.4.1.1 C1 Inhibiteur

C1Inh est une serpine de 105 kDa, circulant dans le plasma à la concentration de $240 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ce qui définit $1 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) ; elle est codée par le gène *SERPING1* porté par le chromosome 11. Le domaine serpine et la boucle réactive de C1Inh correspondent aux critères communs des serpines, mais le domaine N-terminal est fortement glycosylé (45% en

poids), propriété non retrouvée chez les autres serpinés, ce qui confère à C1Inh des propriétés spécifiques à ces polysaccharides dans ses fonctions de ligand des sélectines (Figure 11) [37].

C1Inh est produit par les hépatocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules de la microglie. Sous l'influence de cytokines comme le facteur α de nécrose tumorale (TNF- α), l'interleukine (IL) -6 ou l'interféron (IFN) - γ , la biosynthèse de C1Inh est augmentée. C'est ainsi que sa concentration peut être multipliée par 2,5 lors de la phase aiguë de l'inflammation [37].

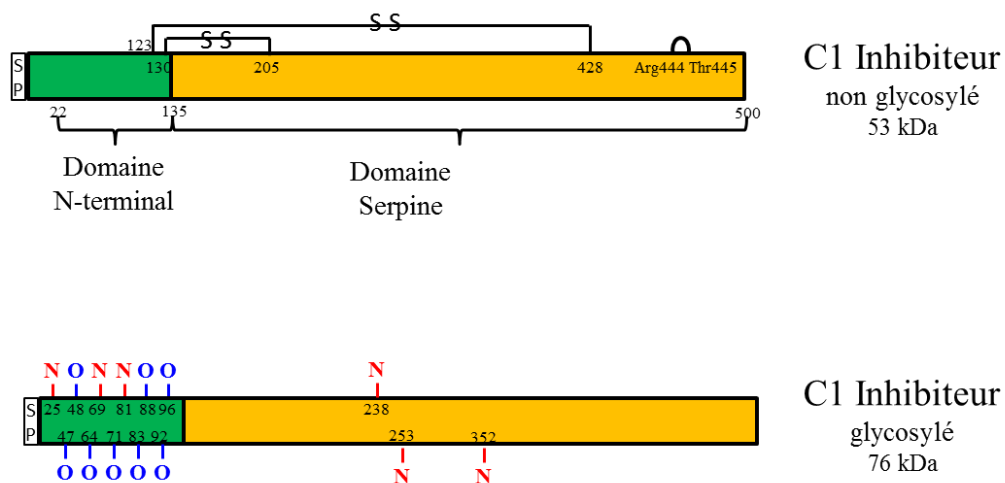


Figure 11 : Modèle de C1 Inhibiteur.

N- : indique une glycosylation N-liée, **O-** : indique une glycosylation O-liée. Le domaine N-terminal de la protéine C1 Inhibiteur porte 11 sucres dont 3 sont N-liés sur les résidus Asn²⁵, Asn⁶⁹ et Asn⁸¹ et 8 sont O-liés sur les résidus Thr⁴⁷, Thr⁴⁸, Ser⁶⁴, Thr⁷¹, Thr⁸³, Thr⁸⁸, Thr⁹² et Thr⁹⁶. Le domaine C-Terminal porte 3 glycosylation N-liées sur Asn²³⁸, Asn²⁵³, Asn³⁵² et la boucle réactive entre les résidus Arg⁴⁴⁴ et Thr⁴⁴⁵.

C1Inh a été initialement identifié comme contrôleur des protéases C1s, C1r du complément, d'où cette serpine tient son nom. C1Inh est largement impliqué dans le contrôle de la kininogenèse, car il contrôle les activités de KK et FXIIa. Il contrôle également les protéases associées à la lectine fixant le mannose (MASP-1 et -2), le FXIa et la thrombine de la coagulation, la plasmine et le tPA de la fibrinolyse (et de la kininogenèse) [37]. La principale fonction de C1Inh est donc le contrôle des protéases à Sérine, mais cette protéine

semble avoir des fonctions additionnelles indépendantes de son activité vis-à-vis des protéases. Par ses motifs Le^x ligand des sélectines, C1Inh développe un rôle protecteur de l'inflammation dans les situations de sepsis ou d'ischémie-reperfusion [38]. Les hypothèses de ce mécanisme évoquent une modification du profil cytokinique et/ou une modification de l'interaction des leucocytes à la surface des cellules endothéliales lorsque C1Inh est lui-même fixé aux surfaces cellulaires [39].

Le déficit pour C1Inh conduit à la production incontrôlée des kinines par l'absence de contrôle des protéases de la kininofomation (KK, FXIIa) et à la pathologie de l'angioedème héréditaire par déficit en C1Inh (AOH-C1Inh, Cf. page 57 §5.2.1) [40]. Il existe des redondances pour l'inhibition des autres protéases (C1s, C1r, FXIa, thrombine, plasmine, tPA) qui permettent de compenser le défaut de C1Inh vis-à-vis de ses cibles.

1.4.1.2 α_2 -macroglobuline

L' α_2 -M est un large homotétramère de la superfamille des α macroglobulines. Sa fonction principale est le contrôle de plusieurs protéases sans grande spécificité de cible. L' α_2 -M est en effet capable d'inhiber des enzymes de type carboxypeptidase, protéase à Sérine ou métallo-protéase. L' α_2 -M possède une région « bait » qui contient des sites spécifiques de clivage pour les différentes protéases. Lorsqu'une protéase clive la région « bait », il se produit un changement de conformation qui piège la protéase et découvre une liaison thioester qui va être hydrolysée. L'hydrolyse de cette liaison permet la création d'une liaison covalente entre la protéase et l' α_2 -M. Le complexe α_2 -M/protéase formé, est ensuite endocyté et rapidement éliminé de la circulation [41]. L' α_2 -M joue un rôle majeur dans la régulation de l'hémostase et de l'inflammation car elle contrôle la thrombine, le facteur Xa, le tPA, l'élastase et la KK [35][42]. L'action sur FXIIa est modeste [34].

1.4.1.3 Les autres inhibiteurs des protéases plasmatiques

L' α_2 -AP fait partie de la superfamille des serpins, c'est une glycoprotéine de 67 kDa synthétisée par le foie et circulant dans le plasma à la concentration de $70 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [27]. La cible principale de l' α_2 -AP est la plasmine, mais elle inhibe également la chymotrypsine, la trypsine, KK [32] et FXIIa [33]. Le déficit congénital en α_2 -AP, codée par le gène *SERPINF2*, se traduit par des saignements à répétition, ce qui confirme le rôle majeur de l' α_2 -AP dans le contrôle de la fibrinolyse [27].

L'ATIII fait, elle aussi, partie de la famille des serpins. Cette glycoprotéine de 58 kDa codée par le gène *SERPINC1* est principalement impliquée dans le contrôle de la coagulation, à travers ses effets inhibiteurs sur les facteurs IXa, Xa et XIa et minoritairement impliquée dans le contrôle de la kininofomation *via* ses effets sur KK [35] et FXIIa [33]. Le déficit en ATIII est associé à des thrombophilies.

1.4.2 Le contrôle des protéases tissulaires

L' α_1 -antitrypsine (α_1 -AT) est le premier inhibiteur identifié de hK1. Ces deux protéines sont capables de former un complexe mais cette interaction est lente à s'établir ce qui suggère au final un rôle mineur de l' α_1 -AT dans le contrôle de l'activité de hK1 [25][26].

La kallistatine est une serpine de 58 kDa qui forme un complexe équimolaire stable avec hK1 (92 kDa). Lors de la formation du complexe, hK1 clive un petit fragment C-terminal de kallistatine ce qui a pour conséquence d'inhiber son activité protéase. L'interaction entre la kallistatine et hK1 est environ 1000 fois plus rapide à s'établir que celle entre hK1 et l' α_1 -AT [25].

2. Le catabolisme des kinines

Les kinines BK, KD et leurs métabolites actifs possèdent des demi-vies courtes (27 s, 19 s, 643 s et 32 s respectivement pour BK [43], KD [44], *desArg*⁹-BK [43] et *desArg*¹⁰-KD [45]). La dégradation rapide des kinines constitue un moyen supplémentaire de contrôler leurs actions et permet d'expliquer leurs activités autocrine ou paracrine.

Les principales enzymes intervenant dans le catabolisme des kinines sont des métalloprotéases à zinc. Ces enzymes sont appelées aussi peptidases car elles sont douées d'une faible spécificité de substrat ; c'est ainsi que leur activité varie (1) selon le substrat peptidique, (2) selon l'espèce considérée, (3) selon le milieu biologique exploré. Les données décrites ci-dessous concernent le plasma humain.

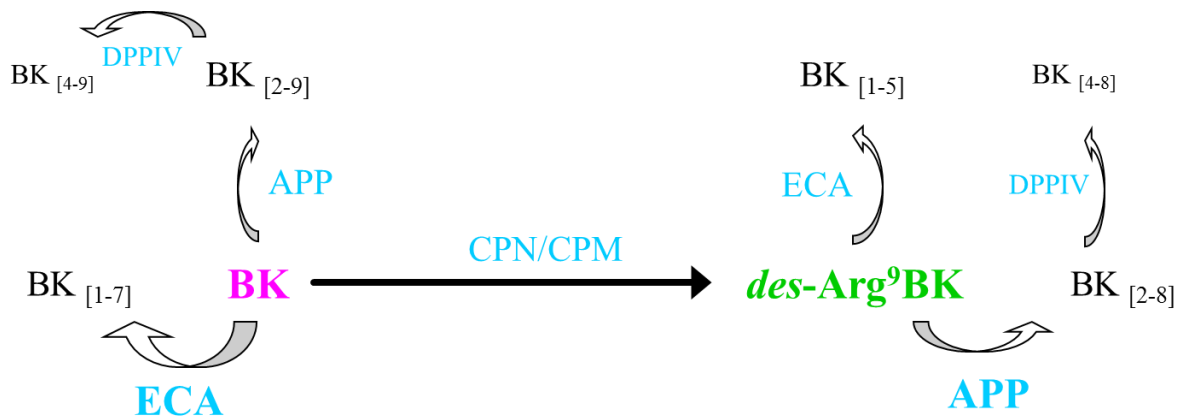


Figure 12 : Catabolisme de la bradykinine (BK) et de *desArg*⁹-BK.

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine-I ; CPN/CPM : Carboxypeptidase N/M ; APP : Aminopeptidase P ; DPPIV : Dipeptidyl peptidase IV.

BK est dégradée en métabolites inactifs principalement par l'ECA et secondairement par l'APP. BK peut également être transformée (réaction quantitativement mineure) en un métabolite actif *desArg*⁹-BK par CPN/M. *desArg*⁹-BK est dégradé en métabolites inactifs principalement par l'APP et secondairement par l'ECA. DPPIV assure un rôle secondaire par la prise en charge des métabolites issus de la dégradation par l'APP.

Les premières investigations du catabolisme des kinines identifièrent deux voies. La voie kininase I, soluble ou plasmatique, transforme l'agoniste de récepteur B2 (RB2) en agoniste du récepteur B1 (RB1). Elle est représentée par les carboxypeptidase N/M (CPN/M). La seconde voie, la voie kininase II, membranaire qui dégrade BK, est représentée par l'Enzyme de conversion de l'angiotensine-I (ECA, Figure 12 et Figure 13).

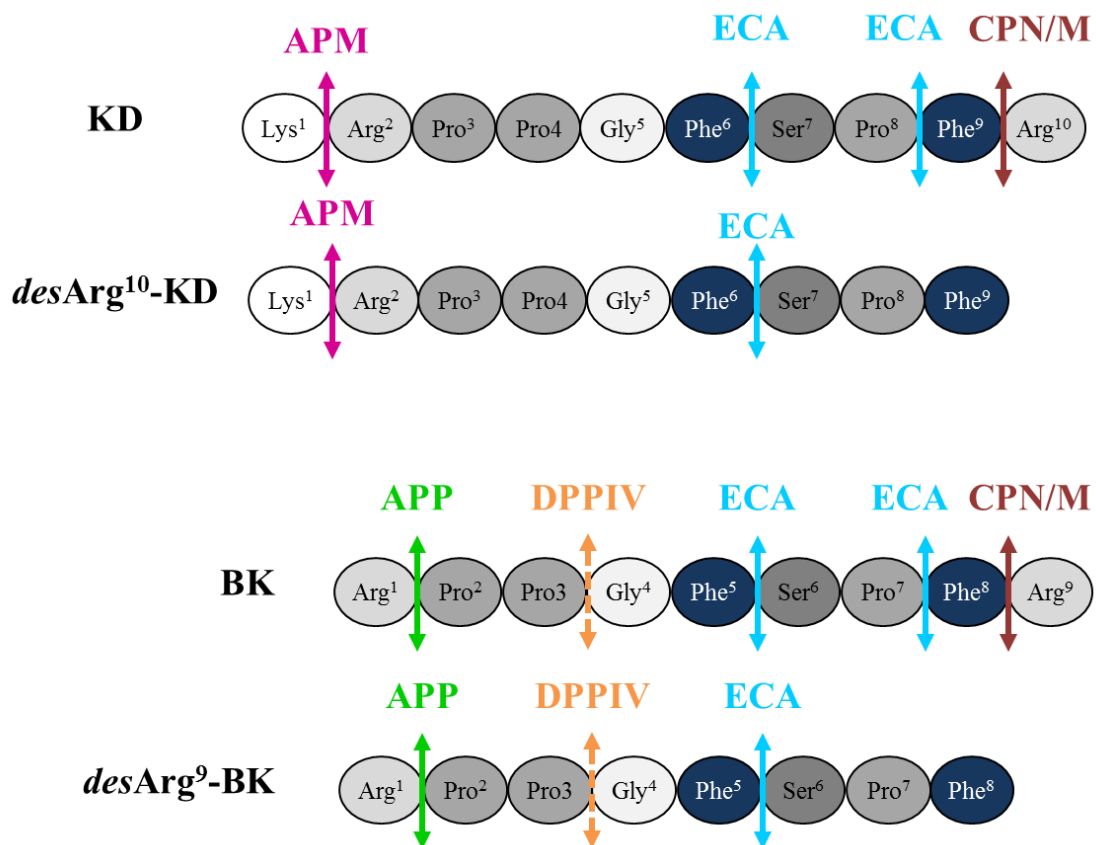


Figure 13 : Sites d'intervention des enzymes du catabolisme des kinines.

APM : Aminopeptidase M ; APP : Aminopeptidase P ; BK : Bradykinine ; CPN/M : Carboxypeptidase N/M ; *desArg⁹-BK* : *desArg⁹-bradykinine* ; *desArg¹⁰-KD* : *desArg¹⁰-Kallidine* ; DPPIV : Dipeptidyl Peptidase IV ; ECA : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine-I ; KD : Kallidine. Les flèches pleines indiquent une action directe sur le peptide, les flèches en pointillé indiquent une action indirecte, sur les métabolites secondaires.

2.1 Enzyme de Conversion de l'Angiotensine-

I

L'enzyme de conversion de l'angiotensine-I (ECA, EC 3.4.15.1) ou kininase II est une ecto-enzyme transmembranaire possédant deux isoformes, résultant de l'existence de 2 promoteurs différents. L'une des isoformes est exprimée au niveau des cellules germinales masculines (100 kDa) et l'autre somatique (170 kDa) est exprimée à la surface des cellules endothéliales, épithéliales et immunitaires (macrophages et cellules dendritiques). A partir de l'isoforme somatique membranaire, une forme soluble plasmatique peut être libérée sous l'action d'une enzyme de type sécrétase et le clivage de la partie C-terminale.

L'ECA représente l'enzyme majoritaire pour la dégradation de BK, transformée en BK_[1-7]. Elle est une enzyme secondaire pour le catabolisme de *desArg*⁹-BK, qu'elle transforme en un métabolite inactif, BK_[1-5] (Figure 12). L'ECA dégrade également KD et *desArg*¹⁰-KD en KD_[1-6] (Figure 13) [46]. Elle convertit aussi l'Angiotensine-I (Ang-I) inactive en Ang-II vasoconstrictrice (Figure 14), mais la constante de Michaelis (K_m) est en faveur de BK ($K_m = 0,18 \mu\text{M}$ pour BK et $K_m = 16 \mu\text{M}$ pour l'Ang-I) [47]. C'est en particulier pour cibler la transformation de l'Ang-I en Ang-II que des inhibiteurs puissants de l'ECA (IEC) sont utilisés comme médicaments antihypertenseur.

L'ECA est codée par le gène *ACE* situé sur le chromosome 17 (17q23), de nombreux polymorphismes sont décrits pouvant expliquer l'importante variabilité interindividuelle des niveaux de l'ECA plasmatique. En particulier, l'insertion (allèle « I ») /délétion (allèle « D ») de 287 paires de bases au niveau de l'intron 16 du gène (rs1799752) est impliquée dans le niveau de l'activité ECA plasmatique. Le génotype D/D conduisant à une forte activité alors que les porteurs du génotype I/I possèdent une activité enzymatique faible [48].

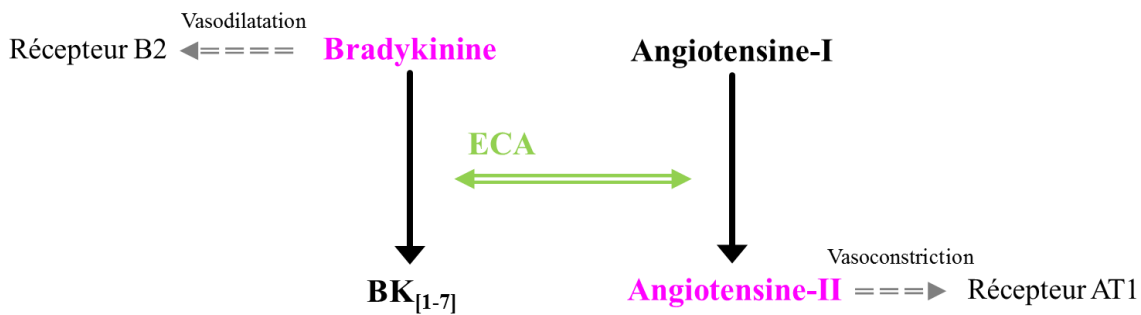


Figure 14 : Implication de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine-I (ECA) dans le système kallibréine-kinine et le système rénine-angiotensine.

L'ECA dégrade bradykinine (active) en BK_[1-7] (inactif) et convertit l'Angiotensine-I (inactive) en Ang-II (active). Les constantes Michaelis (K_m) de ces réactions sont en faveur de la prise en charge de bradykinine.

2.2 Aminopeptidase P

L'aminopeptidase P (APP, EC 3.4.11.9) est exprimée sous deux formes. La première est membranaire, ancrée par un motif glycosylphosphatidylinositol (GPI) à la surface externe des cellules endothéliales, épithéliales et des cellules mononuclées sanguines. Elle est codée par le gène *XPNPEP2* situé sur le chromosome X. Elle peut être clivée au niveau du motif GPI par une phospholipase (PPL) pour être libérée dans le plasma. La seconde forme est cytoplasmique et codée par le gène *XPNPEP1* situé sur le chromosome 10 [49].

L'APP libère à partir d'un peptide un à trois résidus liés à une Proline du côté N terminal [49] (Figure 13). Elle représente la principale enzyme responsable du catabolisme de *desArg*⁹-BK (environ 65 %) et la seconde en importance pour celui de BK, qu'elle transforme en métabolites inactifs, respectivement BK_[2-8] et BK_[2-9] (Figure 12) [50] ; alors qu'elle ne possède aucune action directe sur KD et *desArg*¹⁰-KD [51]. Cette enzyme devient prépondérante pour le catabolisme de *desArg*⁹-BK lorsque l'ECA est inhibée (traitement antihypertenseur IEC par exemple). Des polymorphismes du gène *XPNPEP2* sont associés à

une faible activité de l'APP [52] et représentent un facteur de risque pour l'accumulation des kinines et la survenue d'angioedèmes iatrogènes.

2.3 Carboxypeptidase M et N

Les carboxypeptidases M (CPM, EC 3.4.17.12) et N (CPN, EC 3.4.17.3) possèdent 41 % d'homologie de structure. CPN ou kininase I est un tétramère plasmatique composé de 2 fois 2 sous-unités, l'une régulatrice et l'autre catalytique, synthétisées par le foie et codée par le gène *CPNI* porté par le chromosome 10. Alors que CPM est une enzyme membranaire, ancrée à la surface des cellules souches hématopoïétiques, des monocytes/macrophages, des cellules épithéliales et endothéliales, à l'aide d'un motif GPI. CPM est codée par le gène *CPM* situé sur le chromosome 12.

CPN/M clivent le résidu C-terminal (-Arg ou -Lys) de BK ou KD transformant les peptides agonistes de RB2 (BK et KD) en peptides agonistes de RB1 (*desArg*⁹-BK et *desArg*¹⁰-KD, Figure 12 et Figure 13). CPN/M participent également à la dégradation des anaphylatoxines (C3a, C4a et C5a) en peptides *desArg*.

CPN/M constituent la voie kininase-I, voie mineure pour le catabolisme de BK d'un point de vue quantitatif lorsque les autres enzymes du catabolisme sont pleinement fonctionnelles mais qui devient importante lorsque les autres enzymes font défaut ou sont inhibées par un médicament, IEC par exemple [43].

2.4 Dipeptidyl-Peptidase IV

Dipeptidyl-Peptidase IV (DPPIV, EC 3.4.14.5) est une glycoprotéine de surface, identifiée également comme CD26, codée par le gène *DPP4* situé sur le chromosome 2. Elle est impliquée de façon secondaire dans le catabolisme des kinines dans la dégradation des métabolites inactifs, BK_[2-8] et BK_[2-9] (Figure 12 et Figure 13) [53][54].

Elle est également en charge du catabolisme des incrétines. C'est dans ce cadre que des inhibiteurs ont été développés, représentant une nouvelle classe d'antidiabétiques oraux, appelés gliptine [55].

2.5 Endopeptidase Neutre ou Néprilysine

La néprilysine (NEP, EC 3.4.24.11) est une ecto-enzyme transmembranaire qui inactive BK et KD de la même façon que l'ECA mais dont l'effet au niveau plasmatique est négligeable en comparaison de l'efficacité de l'ECA. A l'inverse au niveau rénal, où son expression est forte, son rôle devient prépondérant. Le gène *MME* codant pour NEP est situé sur le chromosome 3. Un SNP identifié sur le gène *MME* est associé à un risque de développer un AO iatrogène sous IEC [56].

3. Les récepteurs des kinines

Les kinines exercent leurs effets *via* deux récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G, les récepteurs B1 et B2 (RB1 et RB2, Figure 15). Les gènes *BDKBR1* et *BDKBR2*, codant respectivement pour RB1 et RB2, sont portés en tandem par le chromosome 14 et possèdent une forte homologie (> 40 %, Figure 15, Tableau II).

Les récepteurs B1 et B2 sont exprimés à la surface des mêmes cellules, incluant les cellules endothéliales et épithéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les neurones, les cellules tumorales et les cellules mononuclées sanguines [57].

	Récepteur B1	Récepteur B2
Gène	<i>BDKBR1</i>	<i>BDKBR2</i>
Chromosome/locus	14q32.2	14q32.2
Expression	Inductible	Constitutive
Désensibilisation	Aucune ou faible	Rapide et forte
Agonistes naturels	<i>desArg</i> ⁹ -BK <i>desArg</i> ¹⁰ -KD	BK KD

Tableau II : Propriétés des récepteurs B1 et B2.

3.1 Le récepteur B2

RB2 est exprimé constitutivement à la surface de nombreuses cellules, où il est capable de former des oligomères. Lorsque les récepteurs s'associent entre eux, la fixation d'une molécule d'agoniste sur l'une des sous-unités diminue l'affinité des autres sous-unités pour cet agoniste selon le principe de la coopération (ou de l'allostérie) négative [58].

La protéine G de RB2 peut être couplée à différentes sous-unités alpha (α_q , α_i , α_s , $\alpha_{12/13}$) selon les cellules, ce qui conduit à des mécanismes de signalisation différents. La fixation de l'agoniste sur RB2 entraîne principalement l'activation de la PPLC et la mobilisation du

calcium (Ca) permettant l'activation de la protéine kinase C et de la PPLA₂. Les conséquences en sont la production de médiateurs vasodilatateurs comme l'oxyde nitrique (NO), les prostaglandines (PG) et les prostacyclines, la libération de médiateurs tel que tPA au niveau endothélial ou le glutamate dans les neurones, l'activation de facteurs de croissance (facteur de croissance épidermique, EGF), la translocation de facteurs de transcription (NF- κ B), l'expression de molécules d'adhésion (paxilline), la réorganisation de la membrane cytoplasmique et des filaments d'actine (Figure 16). En résumé l'activation de RB2 participe à la vasodilatation, à la synthèse de cytokines ainsi qu'à la prolifération, l'adhésion et la migration cellulaire.

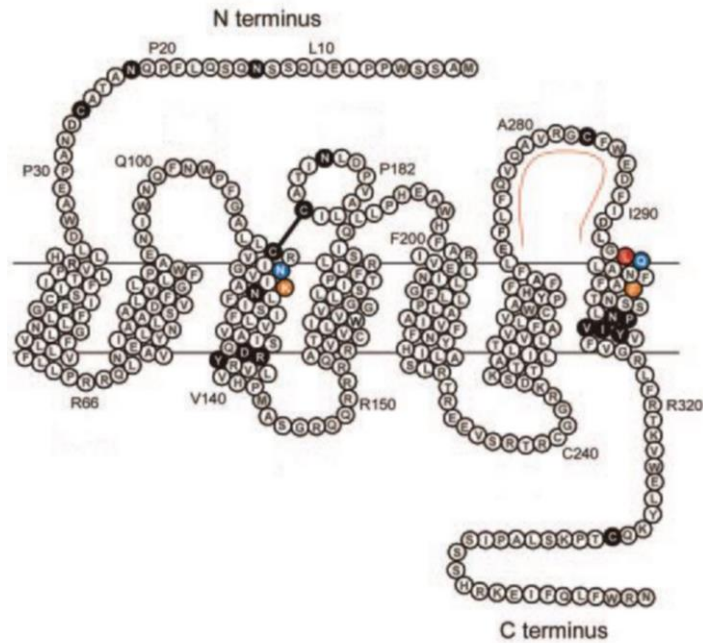
Une fois activé, RB2 est rapidement désensibilisé par la phosphorylation de résidus Ser et Thr portée sur le domaine C-terminal [58]. L'internalisation du récepteur fait intervenir le recrutement de la β -arrestine, la mobilisation de la protéine dynamine et la polymérisation des clathrines [59].

3.1 Le récepteur B1

Contrairement à RB2, l'expression de RB1 à la surface cellulaire n'est pas constitutive mais induite dans des situations pro-inflammatoires telles que l'ischémie, les infections bactériennes, le diabète, la consommation de tabac, en lien avec la production de cytokines comme IL-1 β , TNF- α , IFN γ et l'activation du facteur de transcription NF- κ B [57]. RB1 est également capable de former des oligomères dont la formation semble être nécessaire à la migration de la protéine depuis le réticulum endoplasmique vers la membrane cytoplasmique.

La protéine G de RB1 est couplée aux sous unités α_q , α_i . L'activation de RB1 conduit comme celle de RB2 à la mobilisation du Ca, la synthèse de NO (*via* la NO synthétase inducible), de PG et de prostacycline et à l'activation de la prolifération cellulaire (Figure 16).

Human B₁ Receptor



Human B₂ Receptor

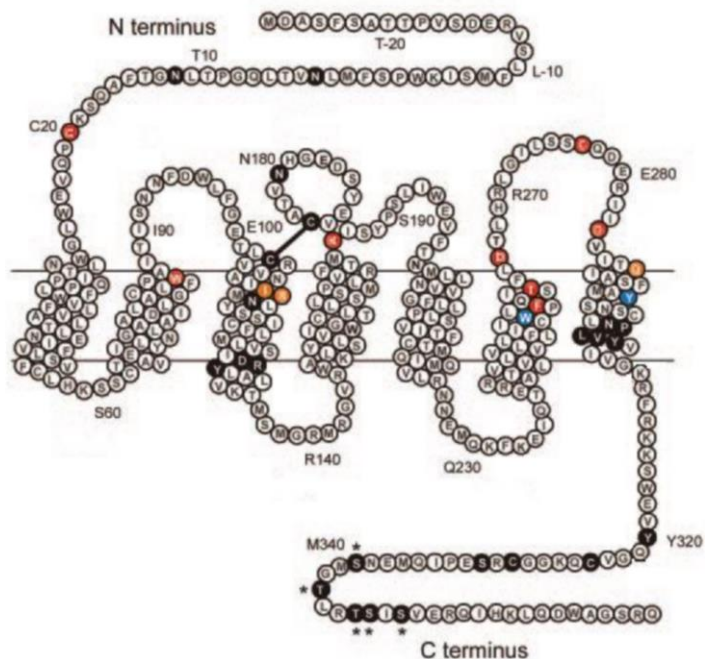


Figure 15 : Séquence peptidique des récepteurs B₁ et B₂ humains.

Sont signalées en rouge les zones impliquées dans la reconnaissance des agonistes, en bleu celles pour les antagonistes et en orange celles impliquées dans la reconnaissance des agonistes et des antagonistes. Les étoiles indiquent les acides aminés susceptibles d'être phosphorylés et impliqués dans la désensibilisation du récepteur B₂ [57].

Malgré leur grande homologie, RB1 et RB2 possèdent des propriétés de phosphorylation différentes. Pour conséquence RB1 ne subit pas de désensibilisation lors de la fixation des agonistes. La demi-vie prolongée des agonistes de RB1, l'absence de désensibilisation du récepteur et la stimulation de la NO synthétase inductible confèrent au RB1 un effet vasodilatateur supérieur à celui de RB2.

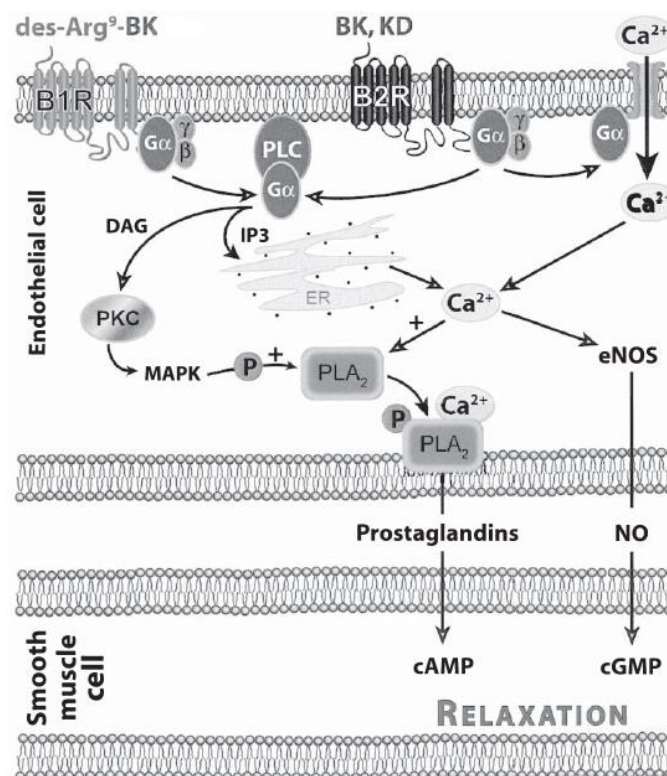


Figure 16 : Voies de signalisations et transduction des signaux associés à l'activation des récepteurs B1 (B1R) et B2 (B2R) [60].

Les voies de signalisation après l'activation des récepteurs B1 et B2 utilisent des voies de transduction du signal identiques, celles des protéines G_α, avec l'activation de la phospholipase C (PPLC), la synthèse inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG), la mobilisation du calcium (Ca²⁺), l'activation de la protéine kinase C (PKC) et de la phospholipase A₂ (PLA₂) et production des médiateurs relaxant les cellules musculaires lisses des vaisseaux conduisant à la vasodilatation : oxyde nitrique (NO) et prostaglandines.

4. Les agonistes et antagonistes des récepteurs

B1 et B2

Les différents profils pharmacologiques des récepteurs B1 et B2 pour leurs agonistes et antagonistes ont permis de définir de façon pharmacologique l'existence de deux récepteurs distincts [61].

4.1 Les agonistes des récepteurs B1 et B2

4.1.1 Les agonistes du récepteur B2

BK et KD, qui présentent un résidu -Arg à l'extrémité C-terminale, sont les agonistes naturels de RB2, récepteur pour lequel ils possèdent de fortes affinités (Tableau III) [62].

Des agonistes peptidiques synthétiques de RB2 ont été développés, comme [Hyp³, Thi⁵, Cha⁸]-BK [63] et [Hyp³, Thi⁵, 4-Me-Tyr⁸ Ψ(CH₂-NH)Arg⁹]-BK. Ces molécules possèdent une affinité *in vitro* équivalente ou supérieure à BK. Leurs demi-vies prolongées leur confèrent un certain potentiel thérapeutique [64].

4.1.2 Les agonistes du récepteur B1

Le clivage par CPN/M des résidus -Arg C-terminaux de KD et BK (Figure 13) diminue considérablement l'affinité des produits, *desArg*¹⁰-KD et *desArg*⁹-BK, pour RB2 et augmente fortement leurs affinités pour RB1 (Tableau III) [65].

Quelques agonistes synthétiques de RB1 ont été développés tel que Sar-[D-Phe⁸]*desArg*⁹-BK [57], mais leurs utilisations thérapeutiques semblent être extrêmement limitées à cause de leurs puissants effets pro-inflammatoires.

	Constantes d'affinités (K_i) des kinines pour les récepteurs B1 et B2 (nM)	
	Récepteur B1 [65]	Récepteur B2 [62]
BK	> 10 000	0,54
KD	2,54	0,63
<i>desArg⁹-BK</i>	1 930	8 100
<i>desArg¹⁰-KD</i>	0,12	> 30 000
HOE-140 ou Icatibant	437	0,41

Tableau III : Affinités des kinines et de l'icatibant pour les récepteurs B1 et B2.

Les valeurs des constantes d'affinité sont déterminées par la méthode de compétition ($[^3\text{H}]$ Lys-*desArg⁹-BK* 0,1 à 5 nM pour le récepteur B1 et $[^3\text{H}]$ BK 100 pM pour le récepteur B2).

4.2 Les antagonistes des récepteurs B1 et B2

Le développement des antagonistes des récepteurs B1 et B2 débute dans les années 1970 [61], leur découverte a été un élément déterminant pour comprendre l'implication respective des kinines BK et *desArg⁹-BK* dans la physiopathologie de différentes maladies.

4.2.1 Les antagonistes du récepteur B2

4.2.1.1 Première génération

Les premiers antagonistes de RB2 ont été obtenus par modification de la séquence de BK. La substitution du résidu Pro⁷ par un résidu D-Phe modifie l'orientation des résidus Phe⁸-Arg⁹ C-terminaux et permet d'obtenir [D-Phe⁷]BK un agoniste partiel de RB2 [66]. L'ajout d'un résidu D-Arg en N-terminal et le remplacement du résidu Pro³ par Hyp augmente l'effet antagoniste du peptide vis-à-vis du ligand naturel. Le remplacement des résidus aromatiques Phe⁵ et Phe⁸ par un résidu non naturel (Thiénylalanine, Thi), aux propriétés aromatiques supérieures, apporte une résistance vis-à-vis des enzymes du catabolisme. Néanmoins ces

peptides manquent de sélectivité car CPN/M les convertissent en métabolites *desArg* interagissant avec RB1.

4.2.1.2 Deuxième génération

La sélectivité et l'affinité pour RB2 ont été améliorées par l'insertion de résidus aux propriétés hydrophobes supérieures, D-Tic en position 7 et Oic en position 8. Ce dernier confère également une résistance à l'action de CPN/M.

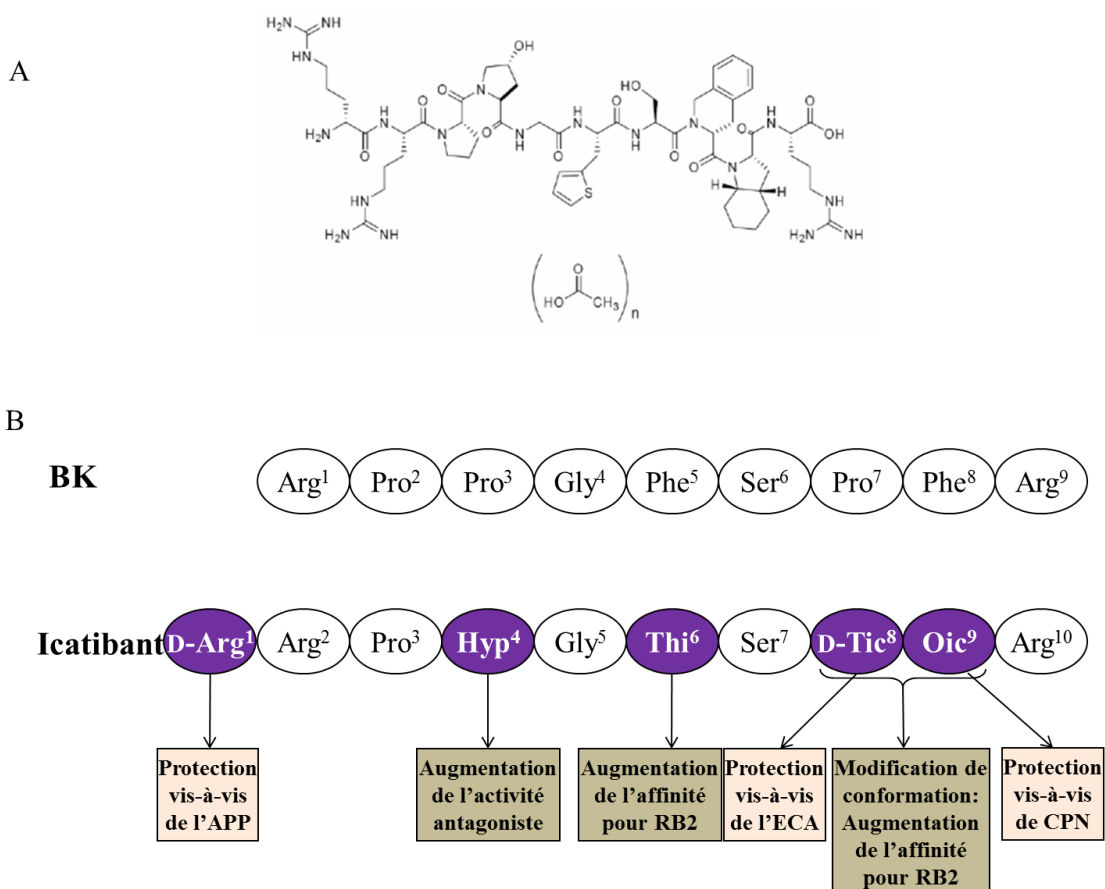


Figure 17 : Molécule HOE-140, Icatibant, Firazyr®.

A : Structure de la molécule.

B : Comparaison entre la séquence de l'icatibant et celle de bradykinine (BK).

Le résidu Arg en position N terminale est nécessaire au maintien de l'affinité pour RB2 mais confère une susceptibilité à la dégradation par l'APP. Il a donc été modifié par l'isomère

D-Arg apportant la résistance à l'APP et par conséquent l'augmentation de la demi-vie tout en conservant l'affinité pour RB2. L'évolution des antagonistes de seconde génération a abouti au développement du peptide initialement nommé HOE-140 par la société Hoechst® puis commercialisé sous la dénomination commune internationale d'Icatibant et de nom commercial Firazyr® par la société Shire® (Figure 17). Ce peptide présente une sélectivité et une haute affinité pour RB2 (Tableau III).

4.2.1.3 Antagonistes non peptidiques

Afin de surmonter les difficultés liées (1) à l'administration des peptides susceptibles aux métabolismes naturels et (2) à leurs faibles biodisponibilités, des antagonistes non peptidiques ont été développés. Des études structurales par résonance magnétique (RMN) et de dynamique moléculaire ont pu déterminer que les antagonistes de RB2 devaient comporter deux charges positives séparées par une région hydrophobe rigide mesurant 10 Å. Ces études ont abouti au développement de la molécule WIN 64338 [67] (Figure 18), sélective de RB2 relativement à RB1 mais non spécifique des récepteurs aux kinines car elle se fixe également sur les récepteurs muscariniques.

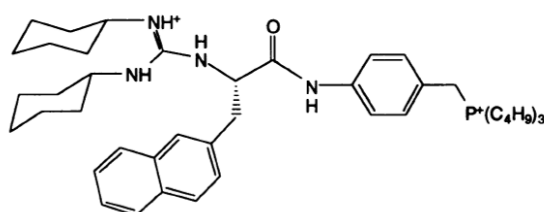


Figure 18 : Structure de la molécule WIN 64338.

A partir du pharmacophore représenté Figure 19 [68], les modifications aboutirent aux molécules FR 167344 et FR 173657 dont l'efficacité par voie orale a été démontrée chez l'animal [69]. Bien que la séquence peptidique de RB2 présente une forte homologie entre les

espèces, plusieurs antagonistes comme WIN 64338 et FR 173657 présentent des affinités 10 fois plus faibles pour les récepteurs humains que pour les récepteurs animaux [70]. C'est pourquoi d'autres molécules ont été dérivées à partir de la structure quinoléine de FR 173657, notamment la molécule LF 16.0335 [71] et l'anatibant [72].

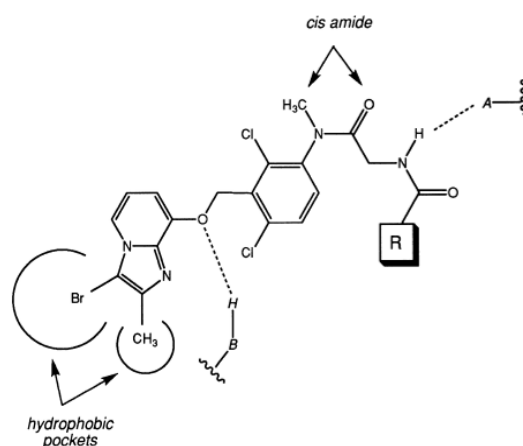


Figure 19 : Modèle de pharmacophore pour les antagonistes du récepteur B2 [68].

Et enfin d'autres molécules antagonistes non peptidiques ont été développées à partir d'un motif cyclique le 1,4-pipérazine (Figure 20) conduisant à la molécule Bradyzide [73].

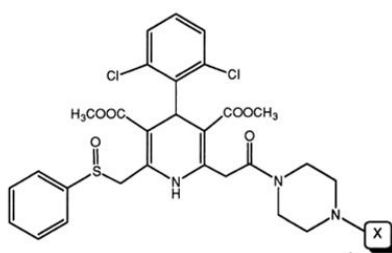


Figure 20 : Antagoniste non peptidique de RB2 ayant un motif 1,4-pipérazine : Bradyzide

4.2.1 Les antagonistes du récepteur B1

4.2.1.1 Première génération

Les premiers antagonistes sélectifs de RB1, [Leu⁸]*desArg*⁹-BK et Lys-[Leu⁸]*desArg*⁹-BK développés par Regoli en 1977, substituent le résidu Phe⁸ par un aa aliphatique [61]. De même la substitution par un résidu possédant un cycle saturé produit une activité antagoniste [74][75]. Toutefois ces analogues peptidiques présentent une activité agoniste partielle non négligeable, chez les rongeurs notamment, ce qui mena au développement de molécules de seconde génération.

4.2.1.2 Deuxième génération

Le développement de la seconde génération d'antagonistes de RB1, repose sur les avancées acquises dans le développement des antagonistes de RB2. Le retrait de l'Arg en position C-terminale de l'antagoniste de RB2, HOE140, conduit à la molécule *desArg*¹⁰-HOE140 antagoniste de RB1. De même pour l'antagoniste non sélectif de RB1 et RB2, B9430, le retrait de l'Arg en C-terminal produit un antagoniste sélectif de RB1, B9858 [76].

4.2.1.3 Antagonistes non peptidiques

En 2004, la société Sanofi rapporte le premier antagoniste non peptidique de RB1, SSR240612 (Figure 21).

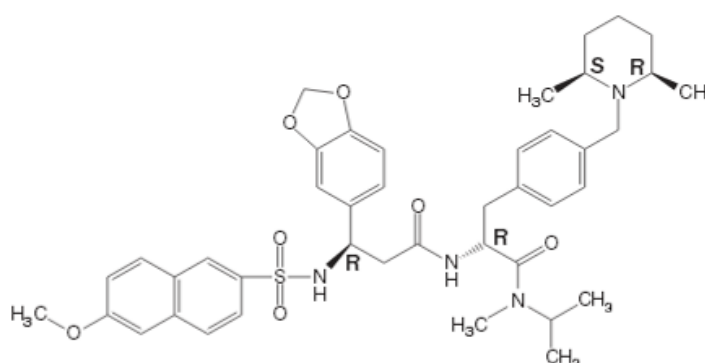


Figure 21 : Structure de la molécule SSR240612

Puis d'autres molécules ont été décrites dont LF 22-05842 et NPV-5AA164. Cette dernière molécule a démontré sa sélective pour le RB1 humain et son activité chez la souris lorsqu'elle est administrée par voie orale.

MK 0686 (Figure 22) a été étudié chez l'homme dans trois essais cliniques (NCT00296569, NCT00533403 et NCT00282763) pour le traitement de la douleur (sans qu'à l'heure d'aujourd'hui les résultats ne soient publiés).

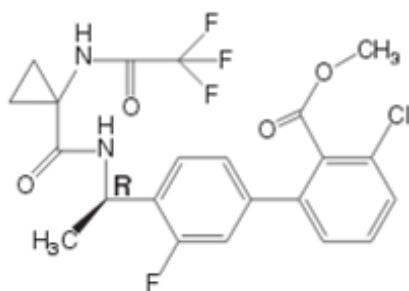


Figure 22 : Structure de la molécule MK-0686.

5. Les effets physiopathologiques des kinines

Les kinines sont impliquées dans les phénomènes de vasodilatation, de perméabilité vasculaire et de douleur, misent en jeu dans de nombreuses situations physiopathologiques. Leurs récepteurs sont exprimés à la surface d'un grand nombre de cellules (cellule endothéliale, neurone, cellule musculaire lisse [57]), les effets des kinines peuvent donc être ubiquitaires.

5.1 Les kinines médiateurs de l'inflammation et de l'immunité

Les kinines sont des acteurs majeurs du processus inflammatoire. L'injection de BK conduit aux 4 signes cardinaux de l'inflammation. La rougeur et la chaleur conséquences de la vasodilatation (Figure 23). L'œdème suite à l'extravasation du plasma du compartiment vasculaire vers le compartiment tissulaire [77]. Et la douleur par deux mécanismes distincts, l'un de compression lié à l'œdème, l'autre par action directe sur les fibres nerveuses en synergie avec la sub P [78] (Figure 24). Ces données sont illustrées par l'augmentation des concentrations de BK et KD au cours de pathologies inflammatoires telles que l'arthrite rhumatoïde [79] ou l'ostéo-arthrite [80].

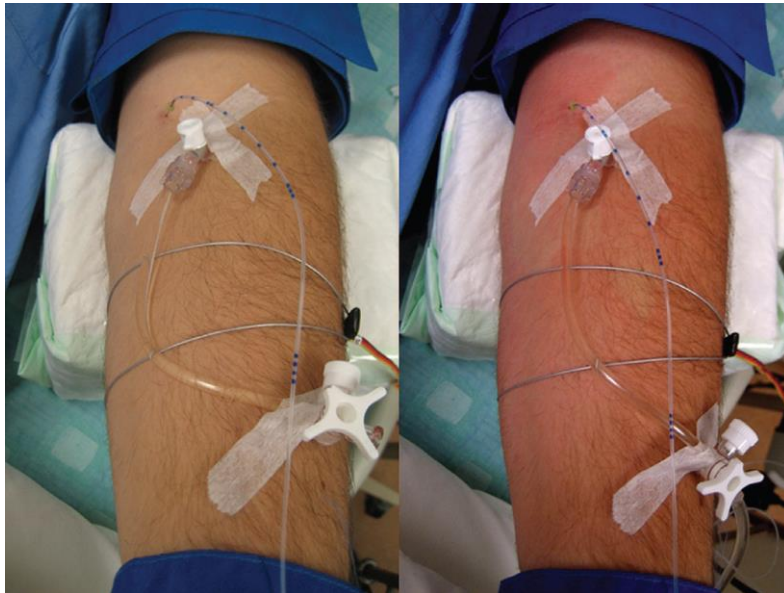


Figure 23 : Effet de l'administration intra-artérielle de bradykinine.

A gauche avant-bras avant l'administration. A droite, après l'infusion de bradykinine, on observe des zones d'œdèmes et d'érythème sur l'avant-bras du volontaire (image à droite)[81].

Les cellules de l'immunité innée comme les mastocytes et les basophiles, lors de leur dégranulation, libèrent des polysaccharides sulfatés comme l'héparine [82] ou des protéases telle que la tryptase, capables du clivage de HK et de la production des kinines [83]. Et réciproquement les analogues de BK sont capables d'activer les mastocytes et d'induire leur dégranulation, ce qui peut constituer une boucle d'amplification locale pour la production des kinines [84].

Les kinines participent également au recrutement des leucocytes [85], à leurs activations [86] et à la synthèse des cytokines et des médiateurs lipidiques [87]. Par conséquent les kinines sont des médiateurs importants de l'immunité innée mais possèdent aussi un rôle dans la mise en place et le maintien de l'immunité adaptative.

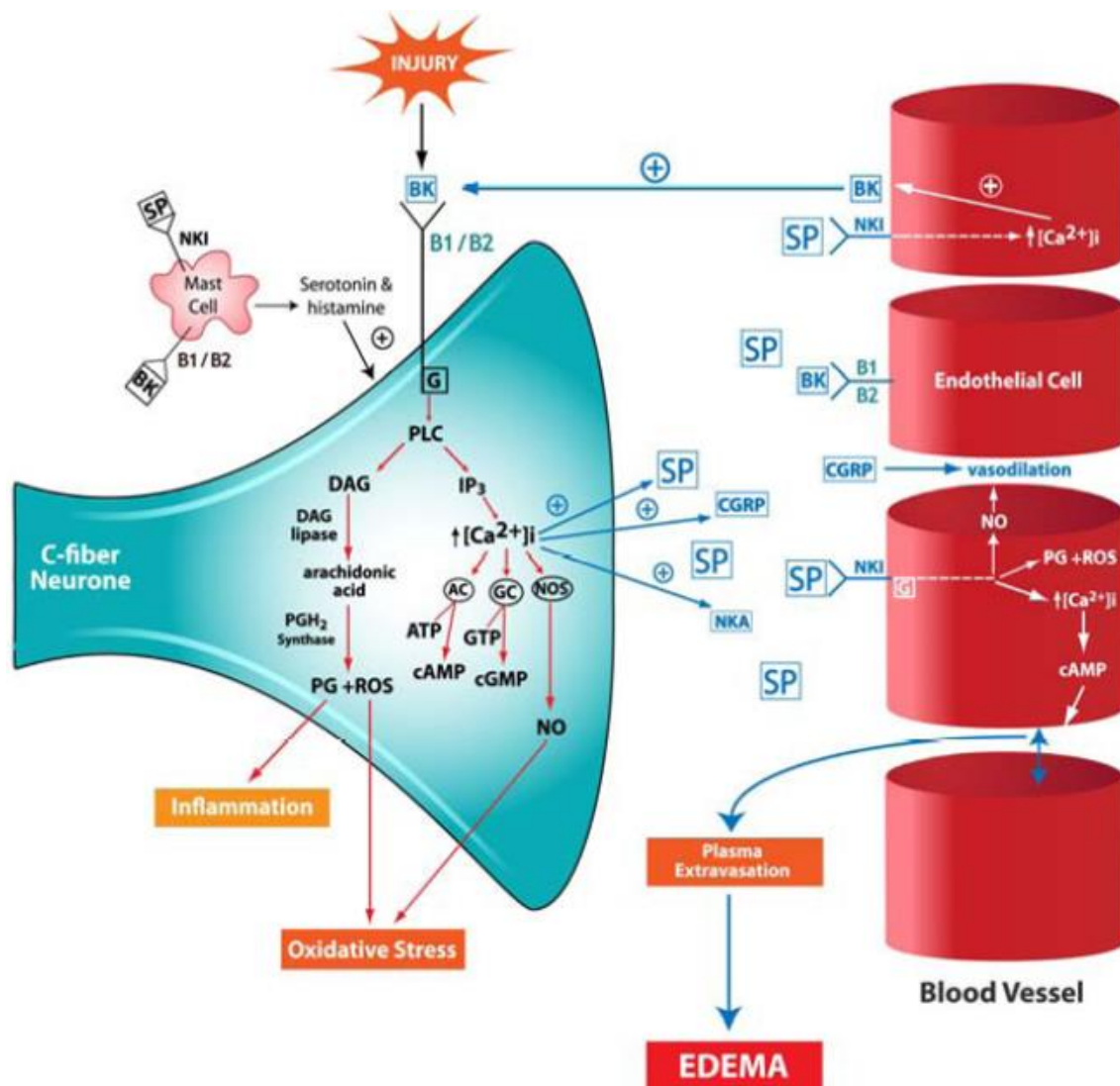


Figure 24 : Représentation de l'effet des kinines sur le système nerveux central (SNC) [88].

BK : bradykinine; SP : substance P; NKA : neurokinine A; NK1 : récepteur de tachykinine-1; B1 : récepteur B1; B2 : récepteur B2; G : protéine G; PLC : phospholipase C; DAG : diacylglycérol; IP₃ : 1,2,5-triphosphate; [Ca²⁺]_i : calcium intracellulaire; PLA₂ : phospholipase A₂; PG : prostaglandine; ROS : espèce réactive de l'oxygène; ATP : adénosine triphosphate; cAMP : adénosine monophosphate cyclique; cGMP : guanosine monophosphate cyclique; AC : adenylate cyclase; GC : guanylate cyclase; NO : oxyde nitrique, NOS : NO synthétase.

Au niveau du SNC les kinines peuvent exercer leurs effets *via* les récepteurs B1 et B2, pour participer à l'inflammation, la formation de l'œdème et le stress oxydatif en synergie avec la substance P.

5.2 L'angioedème à kinine

L'angioedème (AO) à kinine est caractérisé par l'accumulation des kinines sur l'endothélium vasculaire, conduisant à la formation d'œdèmes sous-cutanés ou sous-muqueux [89]. Ces AO sont classiquement décrits comme blancs, non prurigineux et sans urticaire (par opposition aux AO histaminiques qui sont accompagnés d'urticaire et de prurit). Ils surviennent sous la forme de crises spontanées et récurrentes qui durent 24 à 48h avec une régression spontanée sans séquelle. Ils affectent préférentiellement les organes où la microvasculature est riche tels que la face, la sphère ORL (oto-rhino-laryngologie) et les extrémités, où ils sont déformants et disgracieux ; les tissus sous-muqueux du système digestif, où ils entraînent des douleurs violentes pouvant conduire à des chirurgies exploratrices (laparotomies blanches) ; et le larynx, où le risque d'asphyxie peut mettre en jeu le pronostic vital du patient.

5.2.1 Classification des angioedèmes à kinine

Il existe différentes étiologies conduisant à l'accumulation des kinines. On distingue parmi les différentes formes d'AO, les formes héréditaires (AOH), les étiologies acquises (AOA) et les AO iatrogènes. On différencie également les AO par leur association (AOH-C1Inh) ou non (AOH-nC1Inh) à un déficit pour C1Inh (Tableau IV et Annexe 1) [90].

				Gène	
AO avec déficit pour C1Inh (AOH-C1Inh)		Héréditaire [40]	Type I (OMIM 106100)	Défaut quantitatif	<i>SERPING1</i> nombreuses mutations décrites [91]
			Type II (OMIM 606860)	Défaut qualitatif	
			Type I/II	Défaut quantitatif et qualitatif	
		Acquis [92]	Maladie lympho-proliférative	Consommation de C1Inh	aucun
Anticorps anti-C1Inh					
AO avec fonction normale de C1Inh (AOH-nC1Inh OMIM 610618)	Surproduction des kinines	Héréditaire	Mutation sur le gène <i>F12</i> (OMIM 610619)	Gain de fonction du FXII [93]	983C>A ou G [93][94] 971_1018+24del72 [95] 892_909dup [96]
			Non identifiées ou conjonction de plusieurs paramètres	Non identifié	
	Iatrogène	Susceptibilité de la kininoformation à être induite par les œstrogènes	Non identifié		
	Défaut du catabolisme des kinines	Héréditaire	Déficit pour l'Amino peptidase P		<i>XPNPEP2</i> [97]
			Déficit pour Carboxypeptidase N (OMIM 212070)		<i>CPN1</i> [98]
			Déficit pour l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine-I		<i>ACE</i>
		Iatrogène	Médicaments IEC (OMIM 106180) [99], sartan [100] et gliptine [101]		<i>XPNPEP2</i> (OMIM 300909) [102]

Tableau IV : Classification étiologique des angioedèmes (AO).

C1 Inhibiteur (C1Inh) ; Inhibiteur de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine-I (IEC), FXII (facteur XII).

5.2.2 Exploration biologique des angioedèmes à kinine

L'implication des kinines dans un phénomène œdémateux peut être suspectée dès lors que les symptômes persistent plus de 12h et qu'ils répondent mal aux thérapeutiques antihistaminiques et corticoïdes appliquées à forte dose. La présence d'urticaire et/ou de prurit ne doit pas faire éliminer cette hypothèse car ces symptômes peuvent résulter d'une activation concomitante de la phase contact et des mastocytes. L'investigation d'un AO à kinine est engagée après la recherche de facteurs déclencheurs iatrogènes : œstrogène, IEC, gliptine, sartan (Cf. page 62 §5.2.3). L'exploration biologique des AO à kinine repose sur (1) l'examen de C1Inh, (2) la capacité de production des kinines par le plasma et (3) les activités du catabolisme.

L'examen de C1Inh consiste en un dosage antigénique et fonctionnel pour caractériser les situations d'AO avec déficit pour C1Inh et qualifier les AOH des types I ou II. L'étude génétique du gène *SERPING1* complète cet examen (<http://hae.enzim.hu/index.php>) [91]. Chez une personne de plus de 50 ans, dont l'apparition des crises est récente et sans histoire familiale, une situation acquise (AOA) doit être envisagée. Son diagnostic repose sur la recherche d'anticorps anti-C1Inh, dont la présence caractérise l'AOA de type II. L'absence d'anticorps mais la diminution de C1q révèle l'hyper-activation de la voie classique, AOA de type I, secondaire à une prolifération, une dysglobulinémie ou une maladie auto-immune. L'apparition des symptômes d'AOA type I précède parfois le diagnostic lymphoprolifératif. L'Immunoblot anti-C1Inh confirme et complète l'analyse fonctionnelle par l'illustration des espèces moléculaires (formes clivées, complexe de la serpine avec les protéases C1s et/ou KK). Un déficit fonctionnel de C1Inh transitoire peut s'observer sous l'effet d'un inducteur (e.g. œstrogènes); le contrôle de la fonction de C1Inh en absence de l'inducteur (2 à 3 mois après l'arrêt du traitement) objective la normalisation de l'activité de C1Inh et exclut une anomalie constitutionnelle du gène *SERPING1*.

L'exploration des situations d'AO-nC1Inh normale repose sur l'examen de la capacité de production des kinines par le plasma (kininoformation) et sur la mesure des activités du catabolisme des kinines.

La capacité de production des kinines par le plasma peut s'évaluer à l'aide d'un substrat *p*-nitroanilide (activité amidase); le test se décompose en deux mesures enzymatiques, la première mesure l'activité spontanée du plasma et la seconde évalue la réserve des proenzymes disponibles. L'activité spontanée du plasma n'est pas stable, elle est augmentée en période de crise et/ou sous l'effet d'inducteurs [89] (œstrogènes exogènes, contexte infectieux, stress). Le contexte de recueil de l'échantillon est donc critique. A partir d'un prélèvement réalisé en situation de crise et/ou en présence de l'inducteur, les anomalies de la kininoformation sont repérées. Toute perturbation fait l'objet d'un contrôle après le sevrage de l'inducteur. La prise concomitante d'acide tranexamique réduit l'amplification *in vivo* des activités enzymatiques. La capacité d'activation des proenzymes évalue l'abondance des proenzymes, leur diminution ou consommation s'associe à une situation chronique d'activation de la phase contact et aux périodes aiguës de la maladie. L'immunoblot anti-HK permet de mettre en évidence les formes clivées de HK qui corrèlent avec la quantité des kinines produites. Cette mesure, effectuée à partir d'un échantillon recueilli en période active, identifie la responsabilité des kinines dans la symptomatologie (*Cf.* page 99) [103]. Elle peut être objectivée dans la limite de 3 jours suivant une crise (demi-reconstitution de HK 50 à 60 heures). L'identification de la mutation faux-sens c.983C>A sur le gène *F12* (AOH-FXII) complète l'exploration des situations de forte kininoformation. Cependant cette mutation est présente dans environ 15 % des cas seulement.

L'examen du catabolisme des kinines, dépiste les situations d'AO associées à une accumulation des kinines, pouvant être iatrogènes (IEC, sartan, gliptine) ou héréditaire. L'activité de ces enzymes sert également de marqueur de sévérité pour les formes d'AO

associée à une surproduction des kinines [104][105]. L'ECA est la principale enzyme du catabolisme de BK et la seconde pour *desArg*⁹-BK (Figure 12), son activité est donc primordiale pour la dégradation de ces deux peptides. Cette enzyme est inhibée par les IEC médicaments déclencheurs de l'AO. Dans les situations où l'activité de l'ECA est faible les autres enzymes du catabolisme, APP principalement, sont capables de compenser le déficit. Mais dans une situation où les autres enzymes ne sont pas capables de prendre le relais, les kinines s'accumulent sur l'endothélium et peuvent conduire à la formation de l'œdème. Une faiblesse de l'activité APP est fréquemment associée à la présence du polymorphisme c.-2399A sur le gène *XPNPEP2* [52] (porté par le chromosome X), ce polymorphisme a été identifié comme facteur de susceptibilité pour les AO iatrogène associé aux IEC [97]. L'APP est la seconde enzyme mise en jeu dans le catabolisme de BK et la première pour *desArg*⁹-BK, sa faiblesse d'activité est donc décisionnelle dans les situations où la cible de *desArg*⁹-BK, RB1, est exprimée (*e.g.* contexte inflammatoire, situation infectieuse, tabagisme). CPN est une enzyme quantitativement mineure pour le catabolisme des kinines. Le déficit isolé (<50%) est associé à des crises d'AO. Le déficit partiel contribue à la sévérité des crises associées à une autre forme d'AO [105]. CPN est également impliquée dans le catabolisme des anaphylatoxines C3a et C5a, dont l'accumulation participe à l'activation des mastocytes. La baisse d'activité CPN peut être mise en cause dans des situations mixtes, où les symptômes relèvent à la fois de l'activation endothéliale et de la dégranulation mastocytaires. DPPIV, la quatrième enzyme du catabolisme, est impliquée dans le catabolisme secondaire des kinines, par son implication dans le catabolisme des métabolites. Elle est inhibée par les gliptines, des médicaments antidiabétiques; dont la prise augmente le risque d'AO iatrogène chez les sujets porteur d'un déficit pour une autre kininase ou déjà traités par un IEC.

Dans un contexte d'AO familial ou lorsqu'une anomalie moléculaire est identifiée, les explorations biologique et génétique doivent être étendues aux membres de la famille, symptomatiques ou non, pour identifier les sujets à risque (apparition tardive des symptômes,

risque d'AO iatrogènes, transmission de l'anomalie). En l'absence d'une histoire familiale, le diagnostic d'AO ne doit pas être écarté (30% de mutations *de novo* sur le gène *SERPING1*, pénétrance faible, de 0,17 à 1,0, de la mutation sur le gène *F12*).

5.2.3 Rôle des facteurs déclencheurs

Le rôle le plus évident est celui des inhibiteurs des kininases, IEC (inhibiteur de l'ECA) et gliptines (inhibiteur de DPPIV), qui rompent l'équilibre entre production et dégradation des kinines.

Les sartans sont des médicaments antagonistes des récepteurs de l'ang-II (ARA-II) qui bloquent l'effet de l'ang-II sur le récepteur à l'angiotensine de type 1 (AT1, Figure 14). Les effets antihypertenseurs des sartans sont comparables aux effets des IEC avec un meilleur profil de tolérance. En effet, les sartans n'inhibant pas l'ECA, les effets liés à l'accumulation de BK sont moindres, ils persistent toutefois avec une incidence réduite. Car malgré l'absence d'effet sur l'ECA, les concentrations circulantes de BK sont retrouvées augmentées chez les patients traités par sartan [106] et des effets aderses de type AO, sont associés à la prise de ces médicaments [107] sans que le mécanisme soit clairement identifié. Certains auteurs rapportent une dimérisation de RB2 et AT1 sous l'influence des sartans [108][109], d'autres évoquent une augmentation de la production des kinines [110][111].

Le rôle des œstrogènes chez les patientes atteintes d'AO est bien documenté [112][113][114] mais mal compris. Une augmentation des concentrations plasmatiques de FXII, pKK et BK est observée chez les femmes prenant une contraception oestrogénique orale [115], expliquée par une augmentation de la transcription de FXII sous l'influence des œstrogènes par l'intermédiaire d'un site de fixation aux récepteurs œstrogéniques situé sur le promoteur du gène *F12*.

Les soins dentaires sont des facteurs déclencheurs fréquents des crises, il est supposé que les multiples lésions des micro-vaisseaux de la sphère ORL participent à l'activation de la phase contact.

Les mécanismes par lesquels d'autres facteurs déclencheurs comme l'anxiété, le stress, l'asthénie ou les traumatismes déclenchent des crises d'AO sont mal connus [116]. Des hypothèses sont émises sur une diminution de l'efficacité des contrôles de la kininoformation et/ou sur l'implication de l'expression de RB1. La recherche de ces facteurs déclencheurs a donc un rôle dans la prévention des crises et un but diagnostic.

5.2.4 Traitement des angioedèmes à kinine

La prise en charge médicamenteuses des AO reposent sur trois schémas thérapeutiques : (1) la prophylaxie à long terme ; (2) la prophylaxie à court terme et (3) le traitement des crises.

5.2.4.1 La prophylaxie à long terme

La prophylaxie à long terme reposait auparavant sur l'administration d'androgènes atténués, comme le danazol, augmentant à la fois l'expression et la fonction de C1Inh [117] et l'activité de l'APP [104]. Néanmoins la prise de ces médicaments est associée à la survenue d'effets indésirables (prise de poids, virilisation, migraine, myalgie, dépression et acné) parfois sévères (carcinogénèse hépatique) [118]. Actuellement le traitement prophylactique à long terme des AO repose sur l'utilisation (en dehors de l'autorisation de mise sur le marché appelée AMM), des traitements anti-fibrinolytiques (tel que l'acide tranexamique, Exacyl®). Ces médicaments se fixent au plasminogène et contrarient l'action amplificatrice de la plasmine sur la kininoformation [119]. La mise en place de ces prophylaxies à long terme est justifiée par la survenue fréquente des crises modérées à sévères (> à 2 /mois).

L'application prophylactique des concentrés de C1Inh est limitée du fait de la difficulté de l'abord intraveineux [120]. D'autres molécules plus spécifiques de la phase contact sont en cours de développement pour le traitement prophylactique de l'AO, comme l'anticorps anti-KK à longue durée d'action, DX-2930 [121] ou l'oligonucléotides anti sens ISIS-PKK_{RX} [122].

D'autres options thérapeutiques sont disponibles, notamment dans le cadre des AO induits par les œstrogènes, où le changement pour une contraception macro-progestative (Lutéran[®], Lutényl[®]) améliore souvent la symptomatologie [123].

5.2.4.1 La prophylaxie à court terme

La prophylaxie à court terme est indiquée avant une procédure chirurgicale ou dentaire chez les patients souffrant d'AO. Elle repose sur l'utilisation d'androgènes atténués, d'anti-fibrinolytique ou de concentré de C1Inh [118].

5.2.4.2 Le traitement des crises

Le traitement des crises distingue les crises modérées et les crises sévères, ces dernières étant représentées par les crises abdominales douloureuses et les crises pouvant mettre en jeu le pronostic vital (c'est-à-dire celle affectant la région proche du larynx ou définie par toute localisation entre les épaules et le nez). Le prix des thérapeutiques justifiant l'existence de cette distinction [118].

Le traitement des crises modérées reposent sur la prise d'acide tranexamique à la posologie de 1g toutes les 6 heures.

Pour le traitement des crises sévères, auparavant seul le concentré de C1Inh dérivé du plasma, Béринert[®], était disponible. Depuis 2011, une autre spécialité issue du plasma a été commercialisée, Cinryze[®], et l'offre a été complétée par une molécule recombinante, Ruconest[®]. Depuis 2007, une autre approche est disponible avec un peptide antagonise de BK sur le RB2 Firazyr[®], Icatibant [124][124], son administration sous cutanée facilite l'auto-

administration et la prise en charge rapide du patient. L'ecallantide, Kalbitor[®], un inhibiteur de KK, est une molécule disponible aux Etats-Unis pour le traitement des crises d'AO [125]. L'administration de plasma frais congelé n'est pas recommandée, même si elle est utilisée dans les pays ne disposant d'aucun des médicaments cités ci-dessus. Le plasma frais congelé apporte C1Inh mais également FXII, pKK et HK, c'est pourquoi il existe un risque d'aggravation de la crise lorsqu'il est administré [118].

5.2.5 Diagnostics différentiels

Le principal diagnostic différentiel de l'AO à kinine est l'AO à histamine secondaire à la dégranulation des mastocytes induite ou non par les immunoglobulines (Ig) de type E. Dans les AO histaminique à IgE, la dégranulation des mastocytes survient lors du contact avec un allergène, l'identification de ce dernier est donc primordial. Au contraire des AO à kinine, les AO histaminiques sont fréquemment associés à la présence d'urticaire et/ou de prurit et répondent favorablement à l'application des médicaments antihistaminiques.

5.3 Les autres implications

physiopathologiques des kinines

Les kinines sont impliquées dans la physiologie de nombreux organes et la physiopathologie de différentes maladies.

L'endothélium vasculaire représente un lieu de production et un site d'action privilégié des kinines plasmatiques BK et *desArg⁹*-BK. A ce niveau, les kinines sont impliquées dans les phénomènes de maintien de la tension artérielle [126] et participent aux effets antihypertenseur des médicaments ciblant le système rénine-angiotensine [127].

Le système kallicroïne-kinine possède plusieurs points de jonction avec le système de l'hémostase, notamment avec l'activation des plaquettes [128], l'activation de la voie intrinsèque de la coagulation [12] et la fibrinolyse [28][60] (Cf. page 24 §1.2.1) (Figure 25).

Le système kallibréine-kinine joue également un rôle dans les phénomènes d'ischémie-reperfusion. Cet effet peut être protecteur [129] ou néfaste [130][131] selon les conditions expérimentales (le type d'agoniste et la dose utilisée, les délais entre la lésion et l'application de l'agoniste, l'organe cible, la sensibilisation préalable [132]).

Les kinines participent à l'angiogenèse, en induisant la synthèse de facteur de croissance (FGF- β et VEGF) des vaisseaux sanguins [133][134].

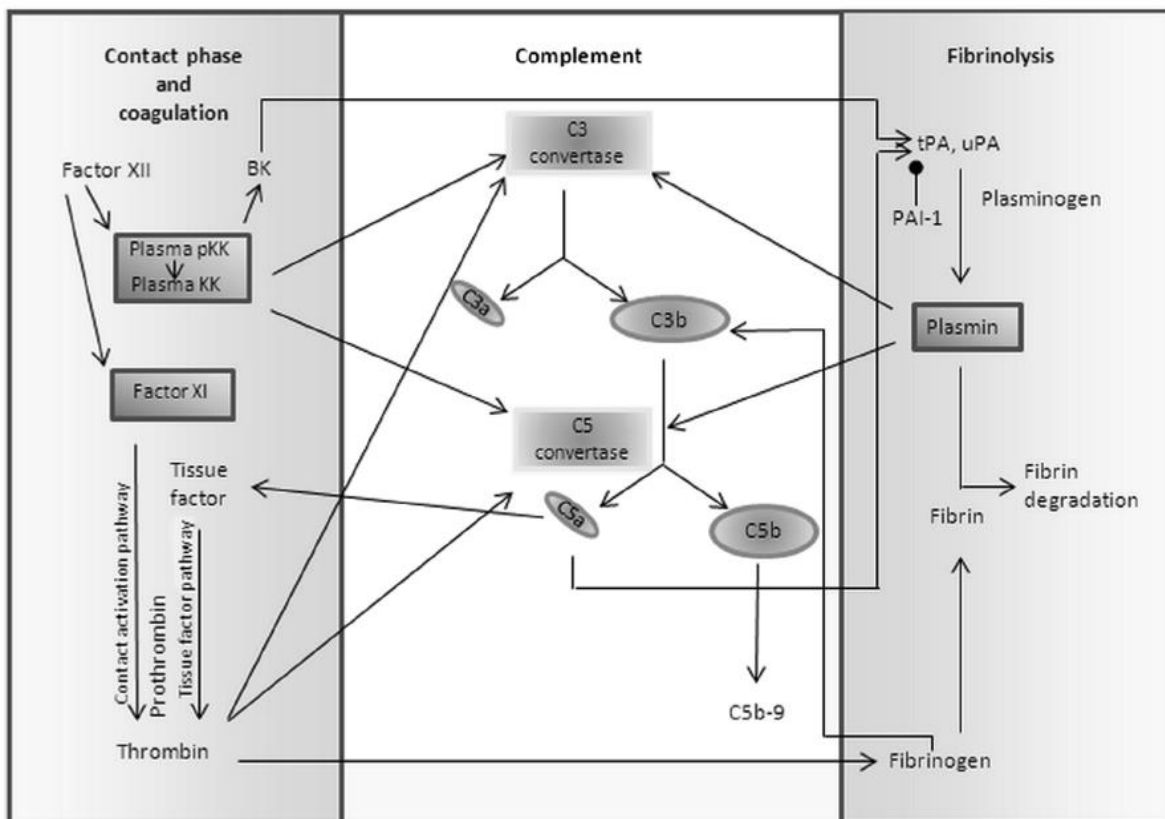


Figure 25 : Interconnexions entre le système kallibréine-kinine, la coagulation, le complément et la fibrinolyse [135].

L'activation de la phase contact possède de nombreux points communs avec l'activation des systèmes du complément et de la fibrinolyse. Notamment sous l'action de la kallibréine, de la thrombine et de la plasmine, les C3 et C5 convertases sont capables d'être activées.

BK induit la contraction des fibres musculaires lisses, cet effet pouvant s'exercer sur différents organes et se traduisant entre autre par la motilité intestinale, la bronchoconstriction, la contraction utérine.

Au niveau pulmonaire, les kinines participent aux phénomènes d'inflammation des voies aériennes en particulier au cours de l'asthme [136] ou de la rencontre avec un antigène (Ag) [137].

Le rein est un organe cible pour le système kallibréine-kinine. De façon indirecte, les reins sont des organes sensibles au diabète et à l'hypertension [138], pathologies au cours desquelles les kinines peuvent être impliquées. De façon directe les kinines sont impliquées dans le contrôle de l'excrétion rénale de l'eau et des électrolytes, effet contribuant au contrôle du volume plasmatique et au maintien de la pression artérielle [139], d'autre part plusieurs polymorphismes des gènes liés au système kallibréine-kinine (*ACE* [140], *BDKBR2* [141]) ont été identifiés comme facteurs de risques pour des pathologies rénales.

La plupart des cellules cancéreuses sont capables (1) de produire des protéases à Sérine pouvant libérer BK et KD [142] et (2) d'exprimer à leur surface RB1 et RB2 [143]. Par conséquent les tumeurs peuvent être autonomes vis-à-vis du système kallibréine-kinine, ce qui leur permet d'augmenter l'afflux sanguin assurant les apports en oxygène et nutriments nécessaires à leur survie et participant à la formation des métastases (activation des métalloprotéases et des molécules d'adhésion intercellulaire, Figure 26) [134][144].

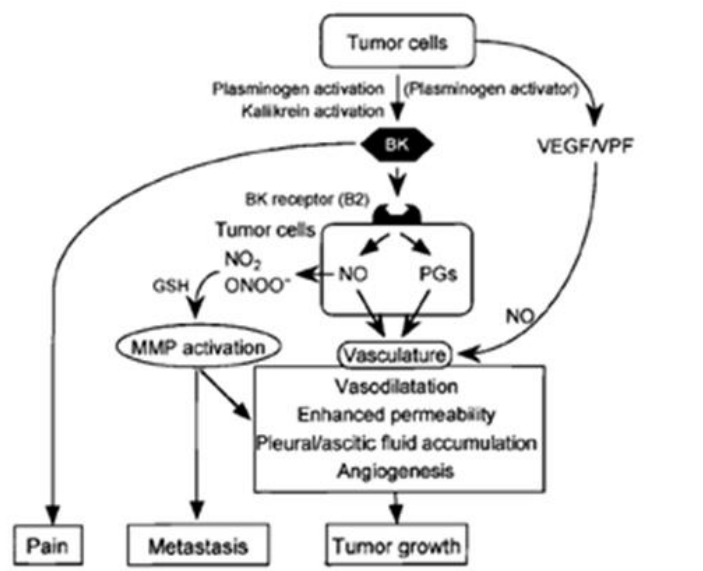


Figure 26 : Schéma de l'implication de la bradykinine (BK) dans les tumeurs [143].

Au niveau des tumeurs Bradykinine est impliquée dans la signalisation du message douloureux, le processus de métastase, l'angiogenèse et la croissance de la tumeur.

Les kinines sont impliquées dans le processus métabolique, potentialisant l'effet de l'insuline et augmentant l'assimilation du glucose par les cellules [145]. Les kinines sont également engagées dans la régulation du métabolisme des lipides avec un rôle dans les phénomènes pro-inflammatoire et les désordres métaboliques associés à l'obésité [146][147].

Les constituants du système kallibréine-kinine, plasmatique et tissulaire, sont présents au niveau du système nerveux central (SNC, Figure 24). L'administration de BK au niveau du SNC entraîne une excitation initiale puis une sédation [148] et une désynchronisation de l'électroencéphalogramme [149]. Au niveau du SNC, les kinines sont impliquées dans l'émergence et la signalisation du message douloureux par une action directe sur les fibres nerveuses [150] mais également indirecte par la sensibilisation des neurones à l'action d'autres stimuli [151]. Les lésions cérébrales conduisent à l'activation de la phase contact et à l'induction de l'expression de RB1, participant à la rupture de la barrière hémato-encéphalique, à la formation d'un œdème et à la libération de neuromédiateurs comme le glutamate [88].

Les plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer sont capables, *in vitro*, d'activer les proenzymes de la kininofomation et de conduire au clivage de HK [152]. *Ex vivo* l'activité de KK est retrouvée augmentée dans le cortex des patients atteints par la maladie [153].

Par conséquent les kinines possèdent de nombreux effets physiopathologiques et ubiquitaires.

6. Les autres médiateurs vasodilatateurs et vasoperméants

Les effets physiopathologiques vasodilatateurs et vasoperméants des kinines sont similaires aux effets que provoquent l'histamine et les leucotriènes (LT). La similarité des effets entre ces médiateurs rend le diagnostic différentiel de l'angioedème à kinine délicat en physiopathologie humaine.

6.1 L'histamine

L'histamine est une amine vasoactive de courte demi-vie libérée lors de l'activation des mastocytes.

6.1.1 Les mastocytes

Les mastocytes sont de grandes cellules granuleuses et tissulaires (Figure 27) dont les précurseurs hématopoïétiques sont encore mal connus. Ces cellules de l'immunité innée sont largement impliquées dans la protection des muqueuses, la défense contre les parasites helminthes et la réponse allergique.



Figure 27 : Mastocyte : coloration par le bleu de toluidine [154].

Le mastocyte est une grande cellule granuleuse.

Les mastocytes portent des récepteurs spécifiques pour les IgE (FcεRI) et les IgG (FcγRIII). Les récepteurs FcγRIII fixent essentiellement des IgG ayant engagées la liaison avec l'Ag, la reconnaissance de l'Ag induisant un changement de conformation au niveau de la partie constante de l'anticorps. Au contraire le récepteur FcεRI, lie avec une forte affinité les IgE monomériques n'ayant pas encore reconnu d'Ag.

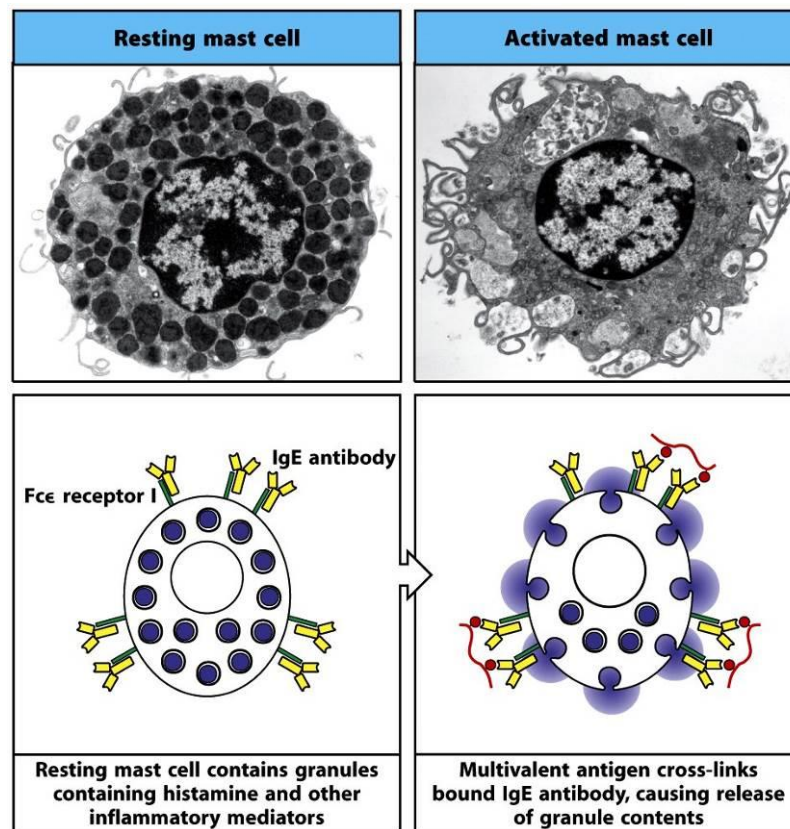


Figure 28 : Schéma d'activation d'une cellule mastocytaire par le pontage d'immunoglobulines de type E fixées à leur récepteur FcεRI [154].

Le pontage de deux IgE fixées par leurs récepteurs (FcεRI) entraîne la dégranulation et l'activation du mastocyte.

La liaison d'un Ag à une IgG spécifique produit des complexes Ag-IgG, ce qui permet à ces derniers de se fixer sur le récepteur FcγRIII, ce qui conduit à l'activation cellulaire. A l'inverse, les IgE monomériques se fixent aux récepteurs FcεRI du mastocyte. La liaison d'un

allergène multivalent aux IgE réticule les récepteurs FcεRI, ce qui conduit à l'activation de la cellule. Le mastocyte peut également être activé par les petits fragments C3a et C5a du complément, appelés anaphylatoxines *via* leurs récepteurs, C3aR et C5aR (CD88), respectivement. L'activation du mastocyte se traduit par une première étape d'exocytose des granules cytoplasmiques, libération rapide (quelques secondes) de médiateurs préformés (Figure 28) tels que l'histamine et des enzymes tryptase, chymase et protéases à Sérine mastocytaires, suivie par une seconde étape de synthèse et de libération de médiateurs néoformés comme PGD₂, le facteur activateur des plaquettes (PAF), les leucotriènes B₄ et C₄, les cytokines IL-13, IL-4 et TNF-α. La libération de ces médiateurs initie la réaction inflammatoire locale amplifiée par le recrutement de leucocytes.

6.1.2 Les effets physiopathologiques de l'histamine

L'histamine est libérée par les cellules immunitaires (mastocytes et basophiles), par les cellules entérochromaffines de l'estomac et par les neurones histaminergiques. Cette amine vasoactive est ligand de 4 récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G : H₁, H₂, H₃ et H₄. Les récepteurs H₁, en périphérie, sont impliqués dans les phénomènes allergiques, vasodilatation et contraction des muscles lisses ; au niveau central il joue un rôle dans le maintien de l'éveil. Les récepteurs H₂ sont impliqués dans la régulation de la sécrétion acide au niveau de l'estomac et dans la vasodilatation. Les récepteurs H₁ et H₂ participent également à la mise en place de la réponse immunitaire *via* l'activation des monocytes/macrophages et des lymphocytes T. Les récepteurs H₃, situé au niveau présynaptique contrôlent la libération neuronale d'histamine et d'autres neuromédiateurs. Alors que les récepteurs H₄ sont exprimés à la surface des cellules de l'immunité (cellules dendritiques, éosinophiles, mastocytes et lymphocytes T CD4⁺) et sont impliqués dans la réponse inflammatoire induite par l'histamine (chimiotactisme, expression des molécules d'adhésions, synthèse des chimiokines et cytokines).

6.1.3 Le suivi biologique de l'activation des mastocytes

Les mastocytes étant des cellules tissulaires, leur exploration directe est donc inaccessible à partir d'un échantillon sanguin. Le basophile présente une forte homologie fonctionnelle avec le mastocyte et constitue un outil d'exploration biologique indirecte des mastocytes [155].

En raison de la très courte demi-vie de l'histamine l'application de son dosage plasmatique est réduite. On préfère le dosage de la tryptase qui est une protéase quasi-spécifique de l'activation du mastocyte et dont la demi-vie est plus longue (≈ 2 h). On utilise le dosage différentiel entre une situation de crise (30 min à 2 h après l'apparition des symptômes) et une situation hors crise (> 24 h après l'apparition des symptômes). L'observation d'une différence de plus de $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ signe l'activation des mastocytes [155].

6.2 Les leucotriènes

Les LT sont des médiateurs lipidiques produits principalement par les leucocytes lors de leur activation. Ces métabolites de l'acide arachidonique sont formés sous l'action de la 5-lipoxygénase (5-Lox). La 5-Lox catalyse la formation de LTA_4 , instable qui est rapidement converti selon deux voies métaboliques. La première voie métabolique produit, sous l'action de la LTA_4 hydrolase, le LTB_4 par addition d'une molécule d'eau. La seconde voie, produit les « leucotriènes cystéinés » et met en jeu l'enzyme LTC_4 synthase et l'insertion d'un glutathion pour former LTC_4 . L'élimination du glutathion à partir de LTC_4 forme LTD_4 puis la perte d'un résidu Gly conduit au métabolite final LTE_4 (Figure 29).

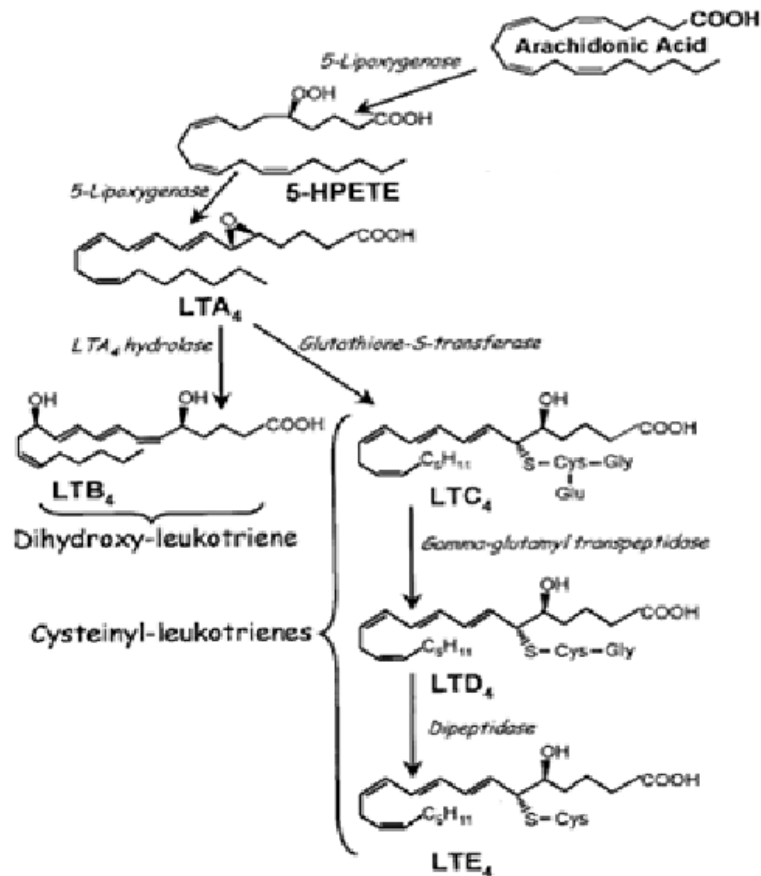


Figure 29 : Métabolisme des leucotriènes [156].

A partir de l'acide arachidonique, l'enzyme 5-lipoxygénase catalyse la formation de LTA₄. Puis l'enzyme LTA₄ hydrolase forme le LTB₄. A partir de LTA₄, l'enzyme LTC₄ synthase, forme LTC₄ ensuite transformé en LTD₄ puis en LTE₄.

Les effets des leucotriènes sont médiés par des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G ; les récepteurs BLT1 de haute affinité et BLT2 récepteur de faible affinité pour LTB₄ et les récepteurs CysLT1 pour LTD₄ > LTC₄ = LTE₄ et CysLT2 pour LTC₄ = LTD₄ > LTE₄ (Tableau V). Récemment un troisième récepteur pour les leucotriènes cystéinés a été mis en évidence, sans que son rôle ne soit encore défini.

Les leucotriènes jouent un rôle dans le chimiotactisme, la dégranulation des polynucléaires neutrophiles, l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales, la

contraction et la perméabilité vasculaire ainsi que la prolifération des cellules musculaire lisse et épithéliale (Tableau V).

Leucotriènes	Récepteur	Localisation	Effets
LTB ₄	BLT ₁	Polynucléaires neutrophile et éosinophile	Chimiotactisme Dégranulation des polynucléaires neutrophiles
	BLT ₂	ubiquitaire	Favorise l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales
LTC ₄	CysLT ₁ CysLT ₂	Leucocytes Cellules spléniques Cellules musculaires lisse Cellules endothéliale	Contraction vasculaire Augmentation de la perméabilité vasculaire Prolifération cellulaires (cellule musculaire lisse et épithéliale)
LTD ₄	CysLT ₁ CysLT ₂		Contraction vasculaire Augmentation de la perméabilité vasculaire Prolifération cellulaires (cellule musculaire lisse et épithéliale)
LTE ₄	CysLT ₁		Contraction vasculaire Chimiotactismes Prolifération cellulaires (cellule musculaire lisse et épithéliale)

Tableau V : Effets des leucotriènes.

Un antagoniste du récepteur Cys-LT₁ (Montelukast, Singulair®), dispose d'une AMM et est indiqué dans le traitement de l'asthme. D'autres inhibiteurs ou antagonistes des leucotriènes sont en cours de développement, notamment vis-à-vis du récepteur BLT₁ et de la LTA₄ hydrolase.

Objectif

L'AO à kinine est une maladie complexe car intégrée dans une interconnexion de systèmes eux-mêmes complexes : phase contact, système rénine-angiotensine, coagulation, fibrinolyse et système du complément. Cette pathologie est complexe également par son diagnostic difficile parce que le phénotype clinique est variable avec l'âge d'apparition des crises, les facteurs déclencheurs, la fréquence de survenue des attaques, leur localisation et leur sévérité. S'ajoute à cela un diagnostic différentiel délicat entre l'AO à kinine et l'AO à histamine et un impact socioéconomique lourd de cette pathologie sur la qualité de vie des patients et de leurs familles [157][158]. Meilleure est la connaissance de la pathologie et plus il semble évident que l'AO à kinine est une pathologie multifactorielle et que c'est l'accumulation d'anomalies qui conduit à la maladie [159]. Cette pluralité de conditions accentue la difficulté du diagnostic mais également celle de la prise en charge thérapeutique car à chaque groupe de patient, la thérapeutique doit être adaptée.

L'objectif de ce travail vise à décrypter l'interconnexion complexe du système des kinines pour mieux appréhender le diagnostic biologique de la pathologie d'AO afin d'améliorer la prise en charge en passant par une meilleure définition des cohortes de patients.

Ce travail se décompose en trois parties. La première vise à promouvoir la connaissance du système kallibréine-kinine à l'aide de deux revues de la littérature, l'une sur l'activation de la phase contact pour appliquer ces connaissances à l'AO, la seconde sur le RB2, la cible de BK, et son antagoniste l'icatibant. La seconde partie vise à montrer le caractère multifactoriel de la maladie et à identifier les facteurs décisionnels pour le phénotype. Et enfin la troisième partie a pour but de développer des outils de diagnostic pour l'AO à kinine.

Partie 1 : Application des connaissances du système kallicréine-kinine à

l'angioedème :

Première forme décrite d'AOH et la mieux connue, l'AOH avec déficit pour C1Inh (AOH-C1Inh), se développe avec une kininof ormation exacerbée par le déficit de C1Inh et le défaut de contrôle des enzymes de la phase contact. Cette première définition de la maladie a orienté l'AOH vers une maladie du complément. Cependant les données récentes indiquent que BK est le médiateur principal de l'AOH issu de l'activation de la phase contact. Il a fallu réorienter la vision de la pathologie d'une maladie du complément vers des étiologies affectant la phase contact et la composante mastocytaire. Mieux connaître la phase contact nous permettra donc de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie, d'appréhender les traitements, d'anticiper les facteurs déclencheurs des crises et d'orienter la recherche vers les paramètres décisionnels pour la production des kinines. Cette approche a déjà conduit au développement de nouveaux médicaments.

Ces deux revues font le point sur la connaissance concernant l'activation de la phase contact chez les sujets ayant une fonction normale de C1Inh, d'une part, et d'autre part, sur le nouveau traitement de l'AO, l'icatibant.

Contact system activation in patients with HAE and normal C1 Inhibitor function

Delphine Charignon*, Arije Ghannam*, Federica Defendi*, Françoise Csopaki, Bertrand Favier, Mohamed Habib, Sven Cichon, Christian Drouet

Immunology and Allergy Clinics of North America **2013**;33: 513-533

*: premier auteur partagé.

L'AO est la conséquence de l'accumulation des kinines sur l'endothélium vasculaire. Il existe deux étiologies distinctes de cette pathologie ; la première est associée à une absence de contrôle des enzymes de la kininofomation, conséquence d'un déficit pour C1Inh ; la seconde est définie par une fonction normale de C1Inh. Cette seconde forme AOH-nC1Inh, décrite pour le première fois en 1986 [160], est associée dans 10 à 20 % des cas à une mutation sur le gène *F12* mais dans la majorité des situations aucune anomalie génétique n'est identifiée. Ce qui suggère que l'AO-nC1Inh est en fait un groupe hétérogène formé par différentes étiologies [161].

Cette revue fait le point sur le système kallicroïne-kinine, ses composants, ses mécanismes d'activation et de contrôle en appliquant ces données aux situations d'AO-nC1Inh. Les facteurs déclencheurs de la phase contact et les mécanismes par lesquels les proenzymes sont activés sont encore mal connus, mais l'importance de ces phénomènes activateurs doit être mise en parallèle avec l'évolution par poussée de la maladie. Identifier les facteurs déclencheurs des crises et donc de la phase contact permettra de mettre en place une prévention appropriée au patient. Comprendre ces mécanismes et les étapes de l'activation pourrait permettre également d'accéder à l'identification de nouveaux marqueurs pour le diagnostic, le suivi et/ou le traitement des AO.

Ghannam A, Defendi F, Charignon D et al. Contact system activation in patients with HAE and normal C1 Inhibitor function. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2013, 33, p.513–533.

Icatibant, the bradykinin B2 receptor antagonist with target to the interconnected kinin systems

Delphine Charignon, Peter Späth, Ludovic Martin, Christian Drouet

Expert Opinion on Pharmacotherapy 2012; 13: 2233-47.

A ce jour, l'icatibant est le seul antagoniste des récepteurs B1 et/ou B2 à disposer d'une AMM pour la pratique clinique humaine. Ce puissant antagoniste sélectif de RB2 a été développé sous le nom de HOE140 et commercialisé sous la dénomination de Firazyr®. L'AMM actuelle de l'icatibant restreint son utilisation aux crises d'AO modérées à sévères chez les adultes déficitaires pour C1Inh. Pourtant d'autres utilisations sont envisagées dans le cadre des AO d'une part (AOA [162], AOH-nC1Inh [163], AO iatrogènes [164], prophylaxie [165]), mais aussi dans d'autres indications (chirurgie avec pontage cardiopulmonaire [166], ischémie reperfusion [167], ostéo-arthrite [168], rhinite allergique [169], asthme chronique [170]). De plus les antagonistes de RB2, incluant l'icatibant, représentent une possible option thérapeutique pour de nombreuses pathologies incluant la douleur [171], la maladie d'Alzheimer [172], les septicémies [173], les traumatismes crâniens [88], la goutte [174] et la pancréatite [175] (Figure 30).

Le document fait un point sur les données acquises au cours de son développement thérapeutique et sur l'expérience acquise au cours de son utilisation en pratique médicale du traitement des AO.

Plusieurs points ont porté l'attention, sur la dose, ses propriétés agoniste partiel et ses effets indésirables à type de réaction locale au point d'injection et de récurrence ou d'aggravation des crises d'AO dans les 48 h suivant l'application du médicament. Des données manquantes ont également été relevées, concernant l'effet de l'icatibant sur le

déplacement de BK fixé au récepteur et le devenir de ces molécules. De même il ne faut pas oublier que les kinines exercent des effets bénéfiques à long terme, illustrées par les effets protecteurs des traitements par IEC. Il faut donc distinguer les applications aiguës (par exemple le traitement d'une crise) d'une utilisation chronique (*e.g.* traitement d'une douleur neuropathique).

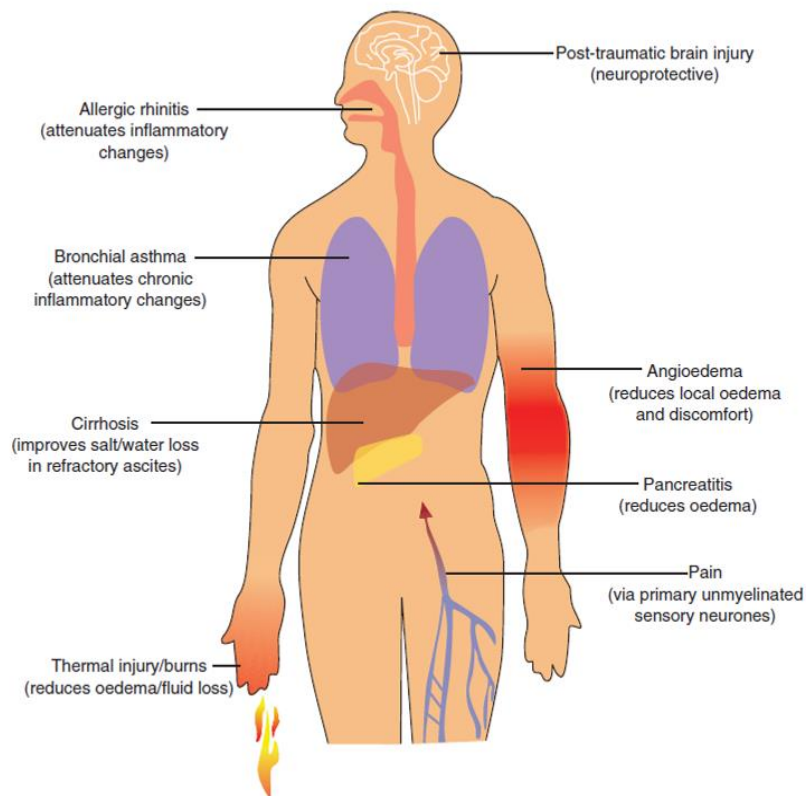


Figure 30 : Applications potentielles des antagonistes des récepteurs des kinines [81]

Charignon D, Späth P, Martin L et al. Icatibant, the bradykinin B2 receptor antagonist with target to the interconnected kinin systems. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2012, 13, p.2233–2247

Partie 2: Démonstration d'une maladie multifactorielle

L'AOH est considéré actuellement comme associé aux mutations sur les gènes de causalité *SERPING1* et *F12*. Cependant en appui sur la variabilité des phénotypes cliniques, la pathologie est décrite depuis peu comme une maladie multifactorielle [96][159] sans que les facteurs décisionnels associés aux mutations des gènes *SERPING1* et *F12* ne soient identifiés. En effet les porteurs d'une même mutation peuvent être asymptomatique ou développer une pathologie sévère, sans que les paramètres décisionnels pour l'apparition des symptômes ne soient encore identifiés. Cette variabilité confère une difficulté pour le diagnostic, à partir d'une mutation génétique, de savoir prédire l'apparition des symptômes chez un sujet.

Nous avons cherché, dans les deux études suivantes, à comprendre et à identifier quels paramètres pourraient expliquer les variations des phénotypes cliniques. Le premier article se concentre, sur une population restreinte, les familles porteuses de la mutation sur le gène *F12*, ce qui permet d'étudier une population homogène. Le second, illustre le caractère multifactoriel de l'AOH, par le premier rapport d'une famille porteuses de deux anomalies génétiques, l'une sur le gène *F12* et l'autre sur le gène *SERPING1*.

Hereditary angioedema with *F12* mutation: factors modifying clinical phenotype

Delphine Charignon, Arije Ghannam, Federica Defendi, Denise Ponard, Nicole Monnier, Margarita López Trascasa, David Launay, Teresa Caballero, Kamel Djenouhat, Olivier Fain, Sven Cichon, Ludovic Martin, Christian Drouet

Allergy 2014; doi: 10.1111/all.12515

Le document décrit des données biologiques homogènes dans les conditions d'une forme particulière, les AO associés aux mutations du gène *F12* (AOH-FXII, OMIM 610618). En 2006, étaient identifiées les mutations c.983C>A (p.Thr³²⁸Lys) et c.983C>G (p.Thr³²⁸Arg) sur le gène *F12* associées aux AOH-nC1Inh [93][94] qui confèrent au FXII un gain d'activation [93]. L'importance de l'intégrité du gène *F12* pour la pathologie de l'AOH-nC1Inh a été soulignée par la description d'autres anomalies, la délétion c.971_1018+24del72 [95] et la duplication c.892_909dup, associées également à des AOH-nC1Inh [96]. Ces mutations autosomales et dominantes affectent au plus 10 à 20 % des patients souffrant d'AOH-nC1Inh. La pénétrance de la pathologie est extrêmement variable d'une famille à l'autre (0,17 à 1), avec l'existence de nombreux porteurs asymptomatiques. Le phénotype clinique d'un individu à l'autre (et même au sein d'une même famille) est lui aussi, extrêmement variable alors que ces individus portent la même mutation. L'hypothèse est émise par plusieurs équipes d'une maladie multifactorielle [96][159], où la mutation sur le gène *F12* serait causale mais dont le phénotype clinique pourrait être modifié par d'autres éléments (facteur de sévérité et/ou facteur de protection). Pour préciser cette question, nous avons émis l'hypothèse que l'équilibre du métabolisme des kinines entre le contrôle de la kininoformation par C1Inh (antigénémies de C1Inh et de C4 et fonction de C1Inh), la production des kinines (activité amidase spontanée du plasma et réserve des proenzymes) et les activités des enzymes du catabolisme des kinines (APP, CPN, ECA) pourraient influencer

l'accumulation des kinines sur l'endothélium et par conséquent la sévérité des crises d'AO. L'étude a porté sur 40 familles porteuses de la mutation c.983A>C sur le gène *F12* (n=176, dont 118 porteurs de la mutation et 58 apparentés non porteurs et comparés à 200 donneurs sains) avec la mesure des paramètres biologiques du métabolisme des kinines. Chez les patients, nous avons quantifié la sévérité du phénotype clinique selon l'âge d'apparition des symptômes, leur fréquence et leur localisation [176]. Nous avons ensuite cherché parmi les paramètres du métabolisme des kinines lesquels pouvaient influencer la sévérité du phénotype clinique. A cette fin nous avons construit un modèle de régression logistique incluant les différents paramètres biologiques mesurés pour tenter d'expliquer la sévérité du phénotype. Le modèle de régression a retenu comme paramètres décisionnels les activités amidase spontanée, ECA et CPN. La capacité de production et de dégradation des kinines influence donc la sévérité du phénotype clinique.

Charignon D, Ghannam A, Defendi F, Ponard D, Monnier N, Lopez-Trascasa M, et al. Hereditary angioedema with *F12* mutation: factors modifying clinical phenotype. *Allergy* 2014; doi: 10.1111/all.12515.

First hereditary angioedema with mutations on both the *SERPING1* and *F12* genes

Delphine Charignon, Arije Ghannam, Federica Defendi, Denise Ponard, Nicole Monnier,
Christian De Gennes, Christian Drouet

En révision (Journal of Allergy and Clinical Immunology)

Une première démonstration a été apportée que l'AOH est une maladie multifactorielle. Une nouvelle démonstration est décrite avec le cas d'une famille qui porte les deux mutations causales pour l'angioedème héréditaire, sur le gène *F12* et sur le gène *SERPING1*. Cette situation très rare est associée à un facteur de risque pour une maladie sévère, la faible activité CPN. L'accumulation de ces anomalies se traduit effectivement chez le cas index par une pathologie sévère (score de sévérité 11/12) et à l'apparition précoce des symptômes chez sa fille et un score de sévérité (9/12) qui pourra se consolider après la puberté.

D'autre part la coexistence, dans cette famille, de deux anomalies distinctes et causales pour l'AO l'une portée sur le chromosome 5 et l'autre portée sur le chromosome 11, pose la question de la prévalence de ces anomalies. La prévalence des anomalies sur le gène *SERPING1* a été évaluée à 1 : 50 000 [177][178] alors que celle sur le gène *F12* n'a pas encore pu être estimée. La coexistence de ces deux anomalies suggère que la prévalence de la mutation sur le gène *F12* n'est probablement pas aussi faible qu'estimée.

First hereditary angioedema with mutations on both the *SERPING1* and *F12* genes

Delphine Charignon, PharmD, ^{a, b} Arije Ghannam, PhD, ^{a, b} Federica Defendi, PhD, ^{a, b} Denise Ponard, PharmD, ^a Nicole Monnier, PhD, ^a Christian De Gennes, MD, ^c and Christian Drouet, PhD ^{a, b}

^a Centre de Référence des Angioedèmes, Grenoble, F-38043

^b Université Joseph Fourier, GREPI/AGIM CNRS FRE 3405, Grenoble, F-38043

^c Service de Médecine Interne 2, Hôpital La Pitié-Salpêtrière, AP-HP, Paris, F-75013

Correspondance: Christian Drouet

Email: christian.drouet@ujf-grenoble.fr

Tel: +33 (0)476 767 201

Centre de Référence des Angioedèmes, CHU Grenoble & EFS Rhône-Alpes, BP35, F-38701 La Tronche

Declaration of sources of funding:

This work was supported by the National Rare Disease Plan (French Ministry of Health, 2011-2015), the ERA-Net E-RARE-1 research program (AG, CD) within the European FP6 (Genetics, Pathophysiology, and Therapy of Hereditary Angioedema Type III) and the Programme Hospitalier de Recherche Clinique from the French Ministry of Health.

Conflict of interest:

The authors declare no competing financial interests.

Capsule summary

This report describes the first family to present with hereditary 26 angioedema, carrying mutations on both the *SERPING1* and *F12* causative genes. This redundancy creates a severe phenotype and suggests a not-rare prevalence of affected genes.

To the Editor

Hereditary angioedema (HAE) is an autosomal dominant disease characterized by recurrent swellings of the cutaneous and mucosal tissues. Associated complications include potentially life-threatening swellings, involving the tongue, pharynx, and larynx. The most common forms of HAE are caused by mutations in the *SERPING1* gene (MIM #106100) (1). These lead to a functional deficiency of C1 Inhibitor (C1Inh), resulting in failed control of the contact system, *i.e.* bradykinin formation, with a subsequent increase in vascular permeability causing angioedema (2). Recently, another HAE type has been described as HAE with normal C1Inh (3), involving 10-20% of patients carrying a c.983C>A mutation of the *F12* gene. It has been suggested that this mutation increases Factor XII (FXII) activity, which in turn may trigger excess bradykinin formation, eventually leading to edema (4). In this study, we sought to investigate the severe clinical phenotype of a woman (III.1) who regularly suffered from laryngeal angioedema. The first symptoms manifested at 7 years old, were triggered by cold and stress and worsened at puberty and during the first trimester of pregnancy. The patient exhibited up to 90 angioedema attacks per year, involving the extremities, larynx, and intestines, each lasting approximately two days. The disease was ameliorated under treatment with danatrol, tranexamic acid, and C1Inh concentrate. This clinical presentation was characteristic of a severe angioedema phenotype, with a severity score of 11 (5). The patient displayed reduced C1Inh level and function, measured at $103 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (normal range $210\text{--}355 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and $9.6 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($17.2\text{--}27.4 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), respectively. Her C4 antigenic level was decreased to $136 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($157\text{--}257 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Anti-C1Inh immunoblot (7.5% SDS-PAGE, non-reducing conditions) revealed that circulating C1Inh was partially proteolyzed, the native form being able to associate with C1s protease (Fig. 1). This C1Inh status was characteristic of Type I C1Inh deficiency. Further investigation was then undertaken, with an assessment of kinin metabolism, revealing high spontaneous amidase activity ($39.2 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$; $1.4\text{--}7.2 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$) and decreased proenzyme activation ($1,639 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1}$; $1,870\text{--}$

2,985 nmol•min⁻¹•mL⁻¹), with subsequent failed control of contact phase (6) and gain-of-function of the FXIII^{Lys}³²⁸ (4). The high proteolytic activity illustrated by the amidase activity is associated with the 95-kDa cleaved C1Inh species (Fig. 1). In addition, we observed a decreased carboxypeptidase N (CPN) activity (27.7 nmol•min⁻¹•mL⁻¹; 34.3–56.5 nmol•min⁻¹•mL⁻¹), in line with the severe phenotype score associated with a low CPN activity (7). While the aminopeptidase P and angiotensin-I converting enzyme activities were elevated (3.67 nmol•min⁻¹•mL⁻¹; 0.24–2.32 nmol•min⁻¹•mL⁻¹; 102 nmol•min⁻¹•mL⁻¹; 42–86 nmol•min⁻¹•mL⁻¹, respectively), they nevertheless failed to provide any protection from angioedema attacks. After obtaining informed consent, we investigated causative genes *via* complete sequencing of *SERPING1* gene, direct sequencing of the *F12* gene (4). The patient was found to be a carrier of mutations on both genes, presenting with the c.51+3 A>C new allele on the *SERPING1* gene and the c.983C>A common allele on the *F12* gene (4) (Fig. 1). A point mutation had already been described in the same location (c.51+3A>G) of the *SERPING1* gene (8) and was associated with a donor splice defect (9). This patient combined causative mutations, which accounted for the frequent angioedema attacks, with an additional risk factor for a severe phenotype.

Other family members were also presented with angioedema, with her two brothers (III.2 and III.4), her sister (III.3), her father (II.1) and her paternal grandfather (I.1). Her two young children, a 7-year-old girl (IV.1) and 4-year-old boy (IV.2), were also tested for biological parameters and the familial genetic defects (Table 1). The daughter exhibited biological abnormalities characteristic of HAE with C1Inh deficiency and decreased CPN activity, being found to carry both familial mutations (Table 1). This patient developed first symptoms 2 years later at 9 years old. In contrast, the young boy was not carrier of the familial mutations, yet presented with high amidase activity and low CPN activity, suggesting that several factors in favor of kinin accumulation could be shared in this family.

The angioedema disease results from the accumulation of susceptibility factors, targeting the control of contact phase, kinin-forming enzyme activities, or kinin catabolism (7). The conjunction of both affected genes in this HAE condition suggests a not-rare prevalence of mutations causative for the disease and represents a significant burden that HAE exerts on society.

Delphine Charignon, PharmD ^{a, b}

Arije Ghannam, PhD ^{a, b}

Federica Defendi, PhD ^{a, b}

Denise Ponard, PharmD ^a

Nicole Monnier, PhD ^a

Christian De Gennes, MD ^c

Christian Drouet, PhD ^{a, b}

^a Centre de Référence des Angioedèmes, F-38043 Grenoble

^b Université Joseph Fourier, GREPI/AGIM CNRS FRE 3405, F-38043 Grenoble

^c Service de médecine interne 2, Hôpital La Pitié-Salpêtrière, AP-HP, F-75013 Paris

Acknowledgments

The authors are indebted to Françoise Csopaki, Marion Allegret-Cadet and Joëlle Lerat for skillful work.

References

1. Kalmár L, Hegedüs T, Farkas H, Nagy M, Tordai A. HAEdb: a novel interactive, locus specific mutation database for the C1 inhibitor gene. *Hum Mutat* 2005;251:1-5.
2. Kaplan AP. Enzymatic pathways in the pathogenesis of hereditary angioedema: The role of C1 inhibitor therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:918-25.
3. Zuraw BL, Bork K, Binkley KE, Banerji A, Christiansen SC, Castaldo A, et al. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor function: consensus of an international expert panel. *Allergy Asthma Proc* 2012;33 Suppl 1:S145-56.
4. Cichon S, Martin L, Hennies HC, Müller F, Van Driessche K, Karpushova A, et al. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *Am J Hum Genet* 2006;79:1098-104.
5. Freiburger T, Grombiříková H, Ravčuková B, Jarkovský J, Kuklínek P, Kryštůfková O, et al. No evidence for linkage between the hereditary angioedema clinical phenotype and the *BDKR1*, *BDKR2*, *ACE* or *MBL2* gene. *Scand J Immunol* 2011;74:100-6.
6. Defendi F, Charignon D, Ghannam A, Baroso R, Csopaki F, Allegret-Cadet M, et al. Enzymatic assays for the diagnosis of bradykinin-dependent angioedema. *PLoS One* 2013;8:e70140.
7. Charignon D, Ghannam A, Defendi F, Ponard D, Monnier N, Lopez-Trascasa M, et al. Hereditary angioedema with *F12* mutation: factors modifying clinical phenotype. *Allergy* 2014; doi: 10.1111/all.12515.
8. Roche O, Blanch A, Duponchel C, Fontán G, Tosi M, López-Trascasa M. Hereditary angioedema: the mutation spectrum of *SERPING1/C1NH* in a large Spanish cohort. *Hum Mutat* 2005;26:135-44.
9. Duponchel C, Djenouhat K, F 127 rémeaux-Bacchi V, Monnier N, Drouet C, Tosi M. Functional analysis of splicing mutations and of an exon 2 polymorphic variant of *SERPING1/C1NH*. *Hum Mutat* 2006;27:295-6.

Key words

Hereditary angioedema, *SERPING1*, mutation, *F12*, C1 inhibitor deficiency, carboxypeptidase N, kinins

Abbreviations

C1Inh: C1 Inhibitor; HAE: hereditary angioedema; CPN: carboxypeptidase N

Table

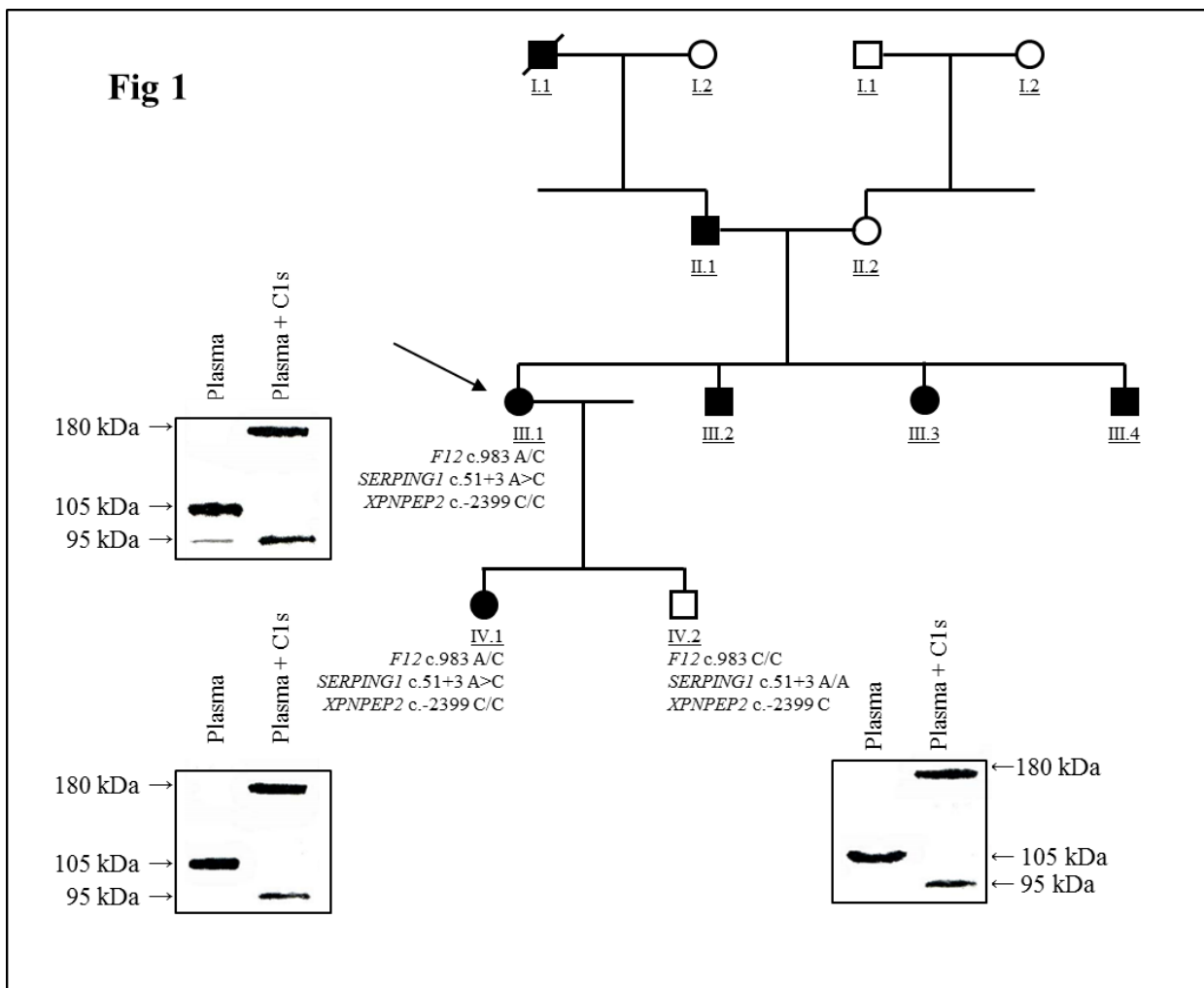
Id	Age	Gender	Age of onset	Severity score	Symptoms	Prophylactic treatment	C1Inh anti-genic level	C1Inh function	C4 anti-genic level	Spont. amidase activity	Pro-enzyme activation	APP	CPN	ACE	<i>SERPING1</i>	<i>F12</i>	<i>XPNPEP2</i>
	years		years				mg•L ⁻¹	U•mL ⁻¹	mg•L ⁻¹	nmol•min•mL ⁻¹	nmol•min•mL ⁻¹	nmol•min•mL ⁻¹	nmol•min•mL ⁻¹	UI	c.51+3	c.983	c.-2399
							210-255	17.2-27.4	100-380	1.4-7.2	1,870-2,985	0.24-2.32	34.3-56.5	42-86			
III.1	36	F	7	Severe	Sub-cutaneous, abdominal, laryngeal	danatrol tranexamic acid	103	9.6	136	39.2	1,639	3.67	27.7	102	C/A	A/C	C/C
IV.1	7	F	9	Moderate	Sub-cutaneous, face	None	178	14.9	116	42.1	1,699	0.86	30.1	143	C/A	A/C	C/C
IV.2	4	M	-	Asymptomatic	-	None	444	31.8	179	23.4	1,715	0.90	26.3	110	A/A	C/C	C

Table 1 : Biological parameters of family members.

Id, patient number as in Fig.1, Severity score is established according Freiburger et al scaling [176], C1Inh: C1Inhibitor, Spont. amidase activity

Figure:

Figure 1: Depiction of the family tree. Circles denote women, squares denote men. Black symbols indicate that the individual is affected with HAE; arrow indicates the family index case. We tested DNA for the presence of the disease-causing mutations on *SERPING1* and *F12* genes, and of the SNP -2399C>A on the *XPNPEP2* gene. The anti-C1 Inhibitor immunoblot of the plasma illustrates the C1 Inhibitor molecular species.



Partie 3: Développement d'outils diagnostics de l'angioedème à kinine

Jusqu'en 2007 n'était disponible pour le diagnostic de l'AO à kinine que l'examen de C1Inh et de son gène (*SERPING1*), modifiés dans les AO avec déficit pour C1Inh (Annexe 1). Depuis la définition des AO-nC1Inh, la mise en place de nouveaux tests diagnostiques est nécessaire. Les kinines, élément central de la réaction d'AO, présentent une demi-vie trop courte (< 30s) pour que leur mesure soit accessible à partir d'échantillon sanguin en routine. C'est pourquoi le laboratoire d'exploration de l'AO du CHU de Grenoble développe depuis 2007 des analyses biologiques innovantes pour le diagnostic de l'AO à kinine incluant les AO avec ou sans déficit pour C1Inh. Ces analyses suivent à la fois des marqueurs de la production des kinines mais également les activités des enzymes du catabolisme des kinines.

Enzymatic assays for the diagnosis of bradykinin-dependent angioedema

Federica Defendi, Delphine Charignon, Arije Ghannam, Rémi Baroso, Françoise Csopaki, Marion Allegret-Cadet, Denise Ponard, Bertrand Favier, Sven Cichon, Brigitte Nicolie, Olivier Fain, Ludovic Martin, Christian Drouet

PloS One 2013;8:e70140.

En 2013, les données accumulées ont permis de valider la méthode de l'analyse biologique dite de kininofomation spontanée (ou activité amidase spontanée du plasma ou kininogénase) et de la réserve des proenzymes (ou activabilité des proenzymes). Le travail décrit les activités du métabolisme des kinines sur une large cohorte de patients se présentant avec un AO (250 avec AOH-C1Inh, 20 avec AOA, 268 avec AOH-nC1Inh, 60 avec AOH-FXII, 61 avec AO histaminique et 23 avec une maladie inflammatoire chronique). Il montre que l'activité amidase spontanée est augmentée avec une bonne spécificité et une bonne sensibilité en situation de crise chez les sujets souffrant d'AO, que cette augmentation est contrôlée par la prise d'acide tranexamique ou en dehors d'une situation de crise comparée aux donneurs sains (n=303). L'augmentation de l'activité amidase spontanée chez certains sujets développant des angioedèmes histaminiques doit considérer la difficulté du diagnostic différentiel avec l'expression de l'activation de la composante mastocytaire. Elle suggère l'existence de formes mixtes présentant une co-activation de la phase contact et des mastocytes. Ces données sont supportées par celles de la littérature. Des analogues de BK sont capables d'induire la dégranulation des mastocytes [84] et les médiateurs libérés par le mastocyte (tryptase et héparine) sont capables de cliver HK [82][83]. La diminution de l'activabilité des proenzymes chez les AOH-C1Inh démontre la forte activation du système et la grande consommation des proenzymes associées à ces formes d'AO. De même la consommation des proenzymes dans une condition inflammatoire révèle l'activation du système immunitaire.

Defendi F, Charignon D, Ghannam A, Baroso R, Csopaki F, Allegret-Cadet M, et al. Enzymatic assays for the diagnosis of bradykinin-dependent angioedema. *PLoS One* 2013;8:e70140

High molecular weight kininogen cleavage by kallikrein: kinetics, mathematical model, and applications for biological diagnostics of angioedema

Rémi Baroso, Bertrand Favier, Delphine Charignon, Françoise Csopaki, Dominique J. Bicout,
Jacques Demongeot, Christian Drouet

En préparation

Le clivage de HK pour libérer BK est l'élément clé de la production des kinines et par conséquent de la crise d'AO. Les kinines ayant une demi-vie extrêmement courte, il est impossible de mesurer leurs concentrations à partir d'échantillons sanguins. C'est pourquoi nous avons choisi, comme indicateur de la libération des kinines, le suivi de la coupure de HK par immunoblot anti-HK. Avant de développer ce nouvel outil diagnostique et de déterminer les caractéristiques analytiques de cette nouvelle méthode, les caractéristiques de la réaction enzymatique de KK vis-à-vis de HK ont été étudiées. Déterminer les constantes de la réaction nous a permis de développer un modèle mathématique à partir duquel pourra être estimée la quantité de BK libérée une fois établie la mesure des différentes espèces de HK natif et clivé. Etudier les effets de la température sur la réaction, définira les conditions analytique et pré-analytique de ce nouveau test, en tenant compte des conditions fonctionnelles des Serpines, dont C1Inh.

En pratique, l'immunoblot anti-HK sur gel d'électrophorèse (8% de polyacrylamide) révèle les formes native de HK (non clivée, N-HK) à 120 kDa, la chaîne légère (LC-HK) à 56 kDa et la chaîne légère clivée (cLC-HK) à 45 kDa. La distribution de ces espèces moléculaires dans le plasma suggère l'importance de la mise en jeu de la phase contact dans l'événement pathologique.

**High molecular weight kininogen cleavage by kallikrein: kinetics, mathematical model,
and applications for biological diagnostics of angioedema**

Rémi Baroso¹, Bertrand Favier¹, Delphine Charignon^{1,2}, Françoise Csopaki², Dominique J. Bicot³, Jacques Demongeot¹, and Christian Drouet^{1,2}

¹Univ. Grenoble Alpes, AGIM CNRS-UJF FRE 3405, Grenoble, France

²Centre de Référence des Angioedèmes, CREAK, Grenoble, France

³Univ. Grenoble Alpes, TIMC-IMAG UMR UJF-CNRS UMR 5525, Grenoble, France

Corresponding author

Bertrand Favier, Univ. Grenoble Alpes, AGIM CNRS-UJF FRE 3405, Etablissement Français du Sang, 29 avenue du Maquis du Grésivaudan, BP35, F-38701 La Tronche

Tel: +33 (0)4 76 76 62 20

Fax: +33 (0)4 76 76 62 51

Email: Bertrand.Favier@ujf-grenoble.fr

Extra table

What is known on this topic?

- Bradykinin production resulting from high molecular weight kininogen (HK) cleavage by kallikrein (KK) is primarily controlled by C1 inhibitor (C1Inh) at 37°C, but not at a lower temperature.
- Bradykinin-associated angioedema is a condition typically associated with C1Inh deficiency, in which serpin function can be measured in plasma.
- Diagnostics of angioedema with normal C1Inh are difficult due to the absence of a pertinent assay.

What this paper adds?

- The kinetics of HK cleavage by KK is almost as efficient at 0°C as at 37°C.
- HK cleavage is slow at all temperatures and mathematical simulation has indicated that efficient contact phase control is achievable with C1Inh at the blood stream level
- We conducted a diagnostic test in order to investigate HK in plasma, with an 88-100% specificity of angioedema with normal C1Inh.

Abstract

Bradykinin-associated angioedema (AO) is a rare condition characterized by recurrent attacks of edema. In order to identify a biological marker of bradykinin production, we investigated high molecular weight kininogen (HK) cleavage characteristics. The kinetics of HK cleavage by kallikrein (KK) were measured at 0°C ($K_M=6.72 \times 10^{-7}M$, $k_{cat}=1.33 \times 10^{-1}s^{-1}$) and 37°C ($K_M=1.09 \times 10^{-6}M$, $k_{cat}=6.37 \times 10^{-1}s^{-1}$). In a reconstituted contact phase with purified components that included HK, prekallikrein (PKK), and activated FXII, PKK was fully activated prior to complete HK cleavage. This delay was modelled by creating a mathematical representation, which accounted that the majority of plasma HK was associated with PKK, and that the inhibition of this association severely impaired HK cleavage by KK. According to this model, local activation of KK resulted in minor HK cleavage in the bloodstream. Bradykinin, the mediator of angioedema, displays too short a plasma half-life to be considered a disease marker. The model thus validates the pertinence of HK investigation in peripheral plasma and demonstrates HK cleavage analysis to be a successful biological marker of AO. The HK cleavage assay was confirmed as effective after assaying HK molecular species in 56 AO samples (25 men; 31 women) with normal C1 Inhibitor, normal kinin catabolism, and without prophylactic treatment, compared to 49 healthy blood donor plasma samples (25 men; 24 women). Median values of native HK concentration were 99mg/L and 71mg/L for control men and women, respectively, and 39mg/L and 17mg/L for AO men and women, respectively. The percentage of HK cleavage (%C) was established, producing median values of 9% and 18% for control men and women, respectively, and 32% and 68% for AO men and women, respectively. The thresholds were set at <85mg/L native HK with >34 %C for men, and <65mg/L HK with >40 %C for women, with a specificity of 100% and 88% for men and women, respectively. HK cleavage should provide physicians

with supportive arguments for significant kinin production in suspected AO cases, as well as benefitting patient follow-up in clinical trials.

Keywords

High molecular weight kininogen, angioedema, kallikrein, enzymatic kinetics

Introduction

Angioedema (AO) has been defined as local subcutaneous edema or sub-mucosal edema of digestive or respiratory tracts (1). While it can be associated with a hereditary defect in functional C1Inh (OMIM 106100) for which the estimated prevalence is 1/50,000 (2), AO can also occur with normal C1Inh function (AO-nC1Inh), such as in FXII mutation carriers (3) (OMIM 610618), or under the iatrogenic conditions of angiotensin-converting enzyme inhibitors with subsequently enhanced kinin half-life. AO can prove life-threatening if the upper airways are affected, though symptom intensity and frequency vary widely, even within the same family (1). AO has been defined as non-pruritic, non-pitting (1), and resistant to antihistamine drugs. While bradykinin (BK) and *desArg*⁹-BK are recognized as the main mediators, the precise disease pathogenesis and diagnosis remain a matter of debate. (4).

BK is released from high molecular weight kininogen (HK) upon kallikrein (KK) cleavage (5). KK circulates in plasma in its zymogen form prekallikrein (PKK), which can be activated by heat shock protein 90 (6), prolylcarboxypeptidase (PRCP) (7), or activated coagulation Factor XII (FXIIa). FXII zymogen can be activated by negative charges, such as glass or dextran sulphate (DS) *ex vivo* (8), or alternatively by platelet polyphosphate (9), heparin sulphate (10), or KK in a positive feedback loop (11). Contact system activation is controlled by C1 Inhibitor (C1Inh), which blocks FXIIa and KK activities in a serpin-protease association (12).

The plasmatic concentration of kinins is not pertinent to AO diagnostics due to the short half-life of BK and *desArg*⁹-BK (13). In order to provide supporting evidence for kinin production, routine tests were developed investigating the kinin forming ability of human plasma, namely its amidase activity (14), as well as kinin catabolism. This prompted us to investigate another biological marker: the change of HK from native, full-length status (N-HK) to cleaved molecule (C-HK).

HK is a 120kDa α -globulin protein composed of six domains, the fourth being the BK peptide (15). On BK release, HK is cleaved by KK into a heavy (64kDa, HC) and light (56kDa, LC) chains. Scott et al. (16) demonstrated that LC HK is further cleaved into a light chain (46kDa, cLC). In their investigations of BK release at 25°C, Tayeh et al. reported that the KM value of KK was 1.38×10^{-6} M, and the kcat value was 0.63 s⁻¹. These parameters were only slightly modified by using DS, yet found to be dependent on a prior association between KK and HK (17). The N-terminus of PKK (or the corresponding heavy chain of KK) can associate with LC-HK (or the corresponding C-terminus of N-HK) with a KD of 12-17nM, resulting in 62% to 83% of plasmatic HK being associated with PKK (18) (19).

In our study, we have demonstrated that plasma KK efficiently cleaves HK at both 37°C and 0°C. The delay between KK activation and N-HK cleavage can be simulated by a mathematical model if it comprises the required prior association between the two proteins. We performed a semi-quantitative HK assay in order to evaluate N-HK concentration and HK cleavage in plasma samples from AO-nC1Inh patients. This assay could be used as a non-controversial AO diagnostic tool, with high sensitivity and specificity.

Material and methods

Reagents

Purified native (single chain) HK (N-HK) was purchased from Enzyme Research (Swansea, United Kingdom) (data from Fig. 1-2) or Calbiochem (Darmstadt, Germany). HK purity was claimed to be >99% by the manufacturer. For all data where HK was used as standard, we confirmed a batch purity >90% by silver staining of a poly-acrylamide gel in reducing conditions and we estimated the concentration by means of micro bicinchoninic acid assay (microBCA, Interchim, Montluçon, France). KK was purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). PKK, FXIIa, and plasmine were obtained from Enzyme Research (Swansea, United Kingdom). Peroxydase-conjugated anti-HK light chain polyclonal antibodies and goat anti-PKK antibodies were also purchased from Enzyme Research. A monoclonal anti-PKK antibody (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) was used alternatively with similar results. Peroxydase-conjugated anti-mouse antibodies were obtained from GE Healthcare (Chalfont St. Giles, United Kingdom), while peroxydase-conjugated anti-goat antibodies and other chemicals were acquired from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France).

Patient plasma

All procedures were performed according to the principles of the Helsinki declaration and in adherence with French ethical policies, ensuring suitable execution of the study. This comprised anonymous biological sample collection (Ministry of Health identification DC-2008-634) and informed consent to participate in the investigation with associated biological assays. Blood donors (healthy controls) answered a questionnaire. The AO patient plasma samples were taken from the “*Centre de Référence des Angioedèmes*” in France, selected according to the following criteria: established angioedema symptoms, normal kinin catabolism enzyme activity, and no prophylactic treatment like tranexamic acid or danazol.

AO-nC1Inh patient samples were further selected for normal C1Inh function levels. The Institutional Review Board of Grenoble (South-East committee V) stated that sample collection and its processing agreed with these ethical requirements (decision April 1st, 2009). The study procedures were also in compliance with the “*Informatique & Libertés*” act under ID 909453. All data was analyzed anonymously.

HK standard and plasma sample preparation

Native HK (N-HK) was mixed with loading buffer containing SDS (2% wt/vol) and β -mercaptoethanol (2.5% vol/vol), then boiled and stored frozen. One aliquot was thawed each day to be diluted further in loading buffer prior to loading on gels.

Human plasma samples were drawn in glass citrated tubes and shipped at room temperature (20-25°C) within 2 days. After a 10 min and 2,000×g centrifugation, the platelet-free plasma samples were collected, immediately aliquoted, and frozen at -80°C. They were diluted five times in loading buffer, then boiled and frozen at -20°C. As opposed to the purified protein samples, we noticed that the plasma samples in loading buffer could be thawed several times. We loaded 5 μ l corresponding to 1 μ l of plasma onto the gels.

***In vitro* assays**

All reactions with purified proteins were performed in polypropylene tubes coated for 1 to 18 hours (H) with 1% BSA, then washed with the PBS-Zn reaction buffer (155.17mM NaCl, 1.54mM KH₂PO₄, 2.71mM Na₂HPO₄, pH 7.2, and 50 μ M ZnCl₂). For PKK activation and HK cleavage assay, FXIIa (0.313pmol), PKK (1.74pmol), and HK (1.74pmol) were incubated for 0 to 30 min at 0°C or 37°C. The reported amounts represent a typical 10 μ l volume corresponding to one sample to be loaded on a gel. For the kinetic KK parameters at both 0°C and 37°C, three experiments were performed. We independently tested five different HK concentrations (range: 57 to 570nM) in a tube, then analyzed them on a gel loaded with five cascade dilution of a sample prior to adding the enzyme. Three samples were taken at 0,

1, and 2 min after adding KK (17.5 or 35nM). All reactions or samples were blocked in loading buffer, then boiled and stored frozen as independent aliquots. Spontaneous amidase activity assay and DS activation were both carried out as previously described (14).

Gel electrophoresis and HK quantification

Poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using 8% poly-acrylamide gels prior to transfer onto nitrocellulose membrane (Hybond, GE HealthCare, Chalfont St. Giles, UK), followed by incubation with a horseradish peroxidase-conjugated polyclonal antibody against HK light chain, then with enhanced chemiluminescence (ECL Amersham, Arlington Heights, IL, USA). The three following bands were revealed: native (N-HK), light chain (LC-HK), and cleaved light chain (cLC-HK) HK. Densitometry quantification was conducted by means of a ChemiDoc™ XRS+ System camera and Image Lab™ software (Biorad, Hercules, USA), and a linear regression was plotted in order to calculate N-HK plasma levels. The percentage of HK cleavage (%C) was defined as the ratio of LC-HK+cLC-HK to the sum of the three bands.

Statistics

Unless otherwise stated, all results were expressed as mean±standard deviation. The values in square brackets represent quartiles [quartile 1-median-quartile 3]. The results displayed in Figure 4 were compared by means of the non-parametric Wilcoxon sign rank test, using the R software package (20).

To determine K_M and k_{cat} , initial velocity of reaction and substrate concentration were plotted using Lineweaver-Burk and Hanes-Woolf linear regressions (21) (22). Our obtained K_M and k_{cat} values were used as a starting point for non-linear regression (Excel® software, Microsoft, Redmond, WA, USA), with iterations performed until at least four digits of both values were stable. One K_M and k_{cat} value was considered validated if both starting points of

iteration produced the same result. Final K_M and k_{cat} values were expressed as the mean of three experiments.

Cut-off values were determined in order to maximize the sum of sensitivity and specificity by using receiver operating characteristic (ROC) curves (23) (24) *via* Excel[®] software. Box plots were drawn with Origin[®] 8.5.1 software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA), applying whiskers extending up or down to the most proximal value between the following: maximum/minimum value or 1.5 of upper/lower interquartile range, respectively.

Mathematical models

Model M1 presents R1 and R2 reactions (Tab. 1), with the following initial conditions: as above for *in vitro*, and $[FXIIa]=3.75 \cdot 10^{-7}M$, $[PKK]=4.07 \cdot 10^{-7}M$, and $[N-HK]=6.78 \cdot 10^{-7}M$ for plasmatic simulations.

Model M2 applied similar initial concentrations, including R1 and substituting R2 with R3 to R7 (Tab. 1), according to the observations made by Tayeh *et al.*(17), stating that N-HK cleavage by KK is impaired if the association between the two molecules is blocked. We theorized that cleavage could only occur once the N-HK light chain domain associated with the KK heavy chain. To calculate the initial concentration of all four possible associations between peptide chains, we estimated the four K_D values of R3, R5, R6, and R7 at 16nM (19) and solved the corresponding second order equations. We posited that the association between N-HK and KK represented the true Michaelian enzyme-substrate complex and thus deduced the k_{on} and k_{off} values for R2 from $K_M=(k_{off} + k_{cat})/ k_{on}$ and $K_D=k_{off} / k_{on}$. R5, R6, and R7 were assumed to hold the same k_{on} and k_{off} values as R2.

In order to evaluate C1Inh effect on KK-mediated HK cleavage, R8 was added to the R3-R7 reactions in model M3, with $[PKK]=9/10$ of $4.07 \cdot 10^{-7}M$, $[KK]=4.07 \cdot 10^{-8}M$, $[N-HK]$ unchanged, and $[C1Inh]=2.18 \cdot 10^{-6}M$.

Differential equations were programmed on R (ref) and Excel[®] softwares, producing similar results. With the Excel[®] software, 3000 steps of a short time interval were calculated, 10,000 in R, with step length adjusted in order to achieve reactions. A complete reaction was defined as 90% substrate hydrolysis.

Results

***In vitro* prekallikrein activation by Factor XIIa is faster than kininogen cleavage by kalikrein at 0°C and 37°C**

Laboratory tests of kinin forming enzymes are conducted on ice with the aim of avoiding serpin control (8). We investigated HK cleavage *in vitro* at both 0°C and 37°C, using purified PKK, HK, and FXIIa to reconstitute a simplified activated contact phase. We then submitted the samples to SDS-PAGE (reducing condition) and anti-KK and anti-HK immunoblot. PKK activation was achieved within 1-5 min, irrespective of the temperature applied (Fig. 1A-B). Three HK species were distinguished as previously described (15): native form (N-HK), separated light chain (LC-HK), and cleaved light chain (cLC-HK) HK, its derivative (Fig. 1C-D).

PKK was fully activated at an earlier time point (5 min at 0°C; 1 min at 37°C) than full HK cleavage (30 min at 0°C, 10 min at 37°C) in the *in vitro* contact phase reconstitution (Fig. 1), while they were activated simultaneously (5 min at 37°C) in plasma upon DS activation (Fig. S1). This finding does not correlate with a proteolytic process where one KK enzyme cleaves more than one HK molecule, with subsequent full HK cleavage prior to total PKK proenzyme activation.

The kininogen cleavage rate *in vitro* cannot be explained by Michaelian kinetics

In this setting, proteases are known to exhibit a low k_{cat} (25), and we therefore wished to determine whether Michaelian kinetics alone could account for PKK being fully activated prior to total HK cleavage. To calculate the K_M and k_{cat} values of KK, purified KK and HK were incubated at 0°C and 37°C, with the HK cleavage kinetics followed by a semi-quantitative assay of the HK species, as described in the Method section (Fig. S2). At 0°C, KK was found to be 5-times slower ($k_{cat}=0.133\text{ s}^{-1}$) than at 37°C ($k_{cat}=0.637\text{ s}^{-1}$), while the K_M value at 0°C (0.67 μM) was comparable to that produced at 37°C (1.09 μM ; Tab. 2). These

constants were taken as a basis for mathematical models. In model M1, R1 and R2 reactions were translated into differential equations and then simulated using Matlab[®] or Excel[®] software, as described in Table 1. The time required to achieve 90% PKK activation and 90% HK cleavage have been displayed in Table S1. *In vitro*, HK cleavage was achieved prior to PKK activation. This M1 model was built using solely Michaelian kinetics and failed to mimic the delay between the two processes.

We were thus prompted to build model M2, which accounted for the association of the majority of plasma HK with PKK (18), as well as for the inhibition of this association that severely impairs HK cleavage by KK (17). Model M2 included R1 and R3 to R7 reactions (Table 1), with the possible sequestration of KK and N-HK into equilibrium R5 and R6 reactions, respectively. For the purposes of simplification, two assumptions were made: (i) the four dissociation constants of the combined reactions between KK heavy chain (from KK or PKK) and HK light chain (from N-HK or CL-HK) fall within the same range, estimated as $K_D=16\text{nM}$ (19); (ii) the association between KK and N-HK is assumed to be the enzyme-substrate complex, thus giving us an estimation of k_{on} and k_{off} values of R3 reaction, and consequently of R5, R6, and R7 reactions. The model M2 simulations reported that PKK activation occurs prior to HK cleavage (Fig. 2A-B). The densitometry analyses of the electrophoretic bands from Figure 1 have been reported in Figures 2C-D. Both experimental data sets and simulation curves are consistent.

We then proceeded to analyze the simulations by applying the ratio of NH-HK cleavage time to PKK activation time. The simulations of HK concentrations in the range of $1-3\times 10^{-7}\text{M}$ produced N-HK time:PKK time ratio values of 3.5-4.6 (Table S1). This confirmed that the experimental Figure 1 observations were not dependent on partial initial cleavage of HK. Given that the kinetic constants of FXIIa at 0°C were unknown, simulations at this temperature were made with a k_{cat} value 5-times lower than that at 37°C (Table S1). The time required for PKK activation was 11 min (longer than the 5 min observed in experiments; Fig.

2 C), and the N-HK:PKK time ratio was over 1. By means of interpolation, we concluded that, regardless of the actual k_{cat} value of FXIIa at 0°C, model M2 was consistent with the delay between *in vitro* PKK activation and HK cleavage.

In order to apply this model to the human plasma setting, two simplifications were used: (i) full and instantaneous FXII activation; (ii) lack of C1Inh control. Model M2 predicted a faster occurrence of both PKK activation and HK cleavage than that observed *in vitro*, in addition to a delay between these processes (Fig. 2E). The application of DS to the plasma for *ex vivo* contact phase activation at 0°C (8) or 37°C resulted in simultaneous PKK and HK cleavages (Fig. S1). The 10 to 20 min delay observed for full PKK activation underlined the risk of oversimplification with model M2 when used for plasma activation, given that the effect of DS on FXII activation is not instantaneous.

We were interested in determining whether local activation of the contact phase would lead to massive and near-complete HK cleavage, or if it could be prevented by C1Inh control. Model M3 was based on the following assumptions: ongoing FXIIa activation of PKK is neglected, as is partial local initial HK cleavage (see above). We therefore hypothesized an immediate and perfect dilution of an activated KK fraction in the total blood flow volume. Model M3 demonstrated that a significant 10% hypothetical activation of PKK led to a minor 3% increase in HK cleavage (Fig. 2F).

In conclusion, a locally produced and reasonable amount of KK is not believed to result in an immediate and complete plasmatic HK cleavage, and the M3 model has demonstrated that the kinetic constraints of C1Inh are efficient enough to control contact phase in blood flow. It is therefore pertinent to look for traces of contact phase activation by analyzing remaining zymogen PKK (14) or HK molecular species in the peripheral plasma, which is primarily sampled at a large distance from the affected tissue.

Human plasma kininogen concentration differs between men and women

Native HK plasma concentration was evaluated by means of the semi-quantitative assay, as described above, and standard dilutions of purified HK protein using solely the measurement of N-HK (Fig. 3). Samples from healthy blood donors (25 men and 24 women) were analyzed. N-HK concentrations were measured at 101 ± 24 [91-99-118]mg/L for men and 72 ± 30 [50-71-85]mg/L for women (mean \pm standard deviation [quartile 1-median-quartile 3]) (Fig. 4A-B and Tab. 3). These concentrations were higher than the 70-90mg/ml range found in previously reported data (26), though did prove more similar to an older study that reported a range of 69-116mg/ml (27). Differences in N-HH concentration between the genders were found to be highly significant ($p < 0.001$, non parametric Wilcoxon test).

Kininogen cleavage can be used for angioedema diagnostics in patients with normal C1Inh function

In order to evaluate HK cleavage, the 56- and 45-kDa bands corresponding to LC-HK and cLC-HK were quantified and displayed as %C, which represented the ratio of (LC-HK + cLC-HK) to (N-HK + LC-HK + cLC-HK) (Fig.3). The %C was 13 ± 9 [5-9-13]% for men and 21 ± 14 [10-18-29]% for women (Fig. 4A-B and Tab. 3). Our analysis of three healthy donors revealed that neither a 2-day delay between blood sampling and plasma extraction at room temperature nor five plasma freeze-thaw cycles modified the distribution of HK molecular species (data not shown).

We then proceeded to analyze a selection of confirmed AO-nC1Inh cases spread across both genders. N-HK concentration was reported at 45 ± 24 [30-39-55]mg/L for men and 25 ± 29 [0-17-41]mg/L for women. The %C was 33 ± 19 [16-32-48]% for men and 63 ± 29 [45-68-90]% for women (Fig. 4A-B and Tab. 3).

The correlation between N-HK concentration and %C was negative, with a low coefficient (Fig. 4C-D). This suggests that overall HK concentration (N- + LC- + cLC-HK) was not constant during the HK cleavage process, and that light chains were potentially

subjected to further degradation in plasma. We thus decided to base our description of the HK molecular species in patient plasma on both N-HK and %C values. The ROC analysis (23) (24) was performed in order to determine the thresholds of both parameters corresponding to maximum specificity plus sensitivity (Fig. S3A-D). The second best threshold was chosen where necessary in order to obtain a comparable threshold, specificity, and sensitivity between genders. While N-HK concentration was found to be a sensitive parameter (96% for men, 90% for women), %C was very specific to AO-nC1Inh (100% for men and 88% for women) (Tab. 3). Both parameters were plotted against the amidase activity of the samples (14) as indicators of active HK cleaving enzymes (Fig. S3E-H). The correlation was incomplete, leading to our conclusion that amidase activity provides information that is non-redundant with HK concentration and cleavage.

Application in AO

In this study, we have performed HK evaluation in two other exemplary situations (Fig. 5). HK cleavage was analyzed in nine samples from patients with C1Inh deficiency, four of which are displayed in Figure 5A. N-HK was not detectable in three out of four samples, with very low amounts reported in the fourth. HK cleavage was almost complete in these patient samples, with high amidase activity. Our HK cleavage analysis in this pathological condition was in line with data from Cicardi *et al.* (28), and congruent with amidase activity testing (14).

Estrogen intake has been retained as a precipitating factor of AO, as demonstrated in a series of 18 women presenting with AO attacks while under estroprogestative oral contraception, then going into remission after stopping contraception (29). As an illustrative example, five samples from these previously investigated female patients while taking contraceptive pills have been displayed in Figure 5. The findings revealed that HK concentrations were restored after pill withdrawal in all these patients, as demonstrated by the

emergence of N-HK (from 0 to 65-114ng/ μ l). The %C decreased from 76-85 to 37-54%, though remained within the range found in AO conditions, demonstrating that these patients did not recover a level similar to blood donors with regard to contact phase. In this example, HK cleavage analysis provided pertinent information on the patients' kinin status, which was not directly achievable through amidase activity measurement. As a result, we can attest that measuring the extent of HK cleavage represents a new tool for AO diagnostics and patient follow-up.

Discussion

The kinetic parameters of HK cleavage by KK have previously been investigated only at 25°C (17). In order to more appropriately mimic physiological conditions, our experiments were performed at 37°C and included 50µM ZnCl₂, due to its relevance in contact phase activation, such as PKK activation by PRCP at the endothelial cell surface (7). The K_M and k_{cat} values were found to be similar to those reported by Tayeh *et al.*, at 25°C, suggesting that human KK activity displays some level of temperature tolerance. The activation of contact phase by DS at 0°C is a commonly used method (8) (14). This prompted us to perform experiments on ice, demonstrating effective KK kinetics using HK as substrate (only five times slower than at 37°C). This extended temperature tolerance is unusual for human enzymes. As a practical consequence, maintaining blood or plasma at 0-4°C is not an efficient means for preventing the contact phase activation. This type of cooling method even has a worsening effect on the process, given that contact phase control by the major inhibitors, serpins (30), is inefficient at 0-4°C (8). This feature supports the recommendation for blood sample shipments to be maintained at room temperature prior to contact phase analysis (14).

In vitro observations revealing KK activation to be complete before HK cleavage prompted us to seek a theoretical explanation. Model M1 only considered two sequential Michaelian enzymatic reactions (R1 and R2) and failed to replicate the delay between KK activation and HK cleavage. Model M2 provided simulation curves consistent with experimental data, with a model design based on HK cleavage only within KK-HK complexes, enabling the sequestration of both KK in R5 reaction and N-HK in R6 reaction (Tab. 1). R7 reaction was included solely for symmetry reasons and its contribution was marginal. Model M2 could, however, prove partially consistent with current knowledge of KK, with k_{on} and k_{off} values being calculated under the hypothesis that the association between HK light chain and KK heavy chain represents the Michaelian enzyme-substrate

intermediate. Moreover, the inhibition of this contact, caused by an excess of PKK or synthetic peptide, did not completely inhibit HK cleavage while lowering its V_{\max} by no more than 60% (17). A possible interpretation is that KK also cleaves the HK molecule associated with another ligand. We opted not to consider this alternative cleavage, given that (i) its mechanism was not fully described (17) and (ii) a model modified according to this factor might be indiscriminable from M2 by the precision of densitometry analyses in immunoblotting signals. In addition, with regards to alternative mechanisms of HK cleavage, we did not detect the previously reported non-enzymatic cleavage of HK by PKK (31), with our assays performed using a 300-fold higher protein concentration, a Zn-containing buffer, and other preparations of purified proteins. Even so, model M2 is yet relevant to the experimental data in its capacity to provide evidence of the KK-HK association representing a critical intermediate in the HK cleavage process.

In order to better understand contact phase activation, model M2 could be improved in terms of four primary criteria. The first one is to explain the discrepancy between the simulation described in Figure 2E and plasma activation by DS (Fig. 1S). This could be achieved by including the positive feedback loop between KK and FXIIa, as this reciprocal activation is 2,000 times faster than autoactivation (11). Furthermore, DS has a great impact on this reciprocal activation (32), yet a lesser one on HK cleavage by KK (17), and the kinetics of PKK activation by FXIIa at 0°C are not yet known. To evaluate the latter, simulations of model M2 with a 5 times slower k_{cat} (Tab. 2S) resulted in KK activation within 11 min, whereas the experimental time was 5 min (Fig. 1). The actual k_{cat} value of FXIIa at 0°C would therefore fall between the values observed at 37°C and 5 times less. This suggests that FXIIa would be more cold insensitive than KK. Secondly, plasma kinetic studies should definitely consider the control of all contact phase proteases by C1Inh. Model M3 focused on C1Inh inhibition of KK in order to simulate the interactions between KK, C1Inh, and HK. The 10% activation of PKK into KK corresponded to the maximum amidase activity observed

in routine AO diagnostics (14). Model M3 predicted KK inactivation within 2 min in the context of normal C1Inh control. The constitutive amidase activity of patient plasma must be accounted for by using an improved model that includes the progressive loss of functional C1Inh, along with the ongoing contact phase activation in capillaries (14). Thirdly, models M2 and M3 were developed using the law of mass action, more relevant to *in vitro* testing and some pathological conditions of contact phase activation, such as the amniotic embolism described by Adam *et al.* (33). In most scenarios, this activation takes place at the capillary endothelium under the following conditions: (i) the endothelium surface:plasma volume ratio is high; (ii) FXII, PKK, and HK display binding sites on endothelial cells (30); (iii) endothelial membrane-bound enzymes such as PRCP or the endothelial release of HSP90 can also activate PKK with a K_D value that is in the nanomolar range (6)(7). These conditions should be considered for developing a model of the initial contact phase activation. For a fourth improvement, models M2 and M3 could be no more synchronized, with another trigger than an initial and evenly distributed concentration of FXIIa (model M2) or KK (model M3). As already described ((16) and Fig. 1), HK cleavage results in more cLC-HK than LC-HK. Of the nearly 200 plasma samples investigated, only two displayed a cLC-HK:LC-HK ratio above 1 (data not shown). Faced with these rare observations, we can suggest two complementary explanations: (i) plasmatic degradation of cLC-HK; (ii) PKK activation and HK cleavage potentially being a continuous process as blood flows through capillaries. Considering these four possible improvements, a conclusion can be drawn that M2 and M3 models are relevant to HK cleavage after initial activation of contact phase. In this context, a small proportion of PPK activation was found not to be sufficient to completely cleave HK, with HK cleavage occurring after a near-equimolar activation of PPK into KK.

It is established that BK and its metabolite *desArg*⁹-BK displayed a very short half-life in plasma (27 ± 10 sec for BK) (13). In contrast, HK exhibited a very long regeneration time (33), and its cleavage was found to be considerably shorter (Fig. 2E-F). HK cleavage can

therefore be considered the best indicator of BK release and thus the most relevant evidence of AO pathology. Differences in HK concentrations between men and women were not reported by Adam *et al.* (27). The following explanations can be proposed for this: (i) Adam *et al.* radio-immunoassays measured all HK species, and we quantified only N-HK species; (ii) the two reference populations (female donors in 1980 and in 2000) could potentially differ not in terms of age distribution (49 ± 8.6 vs. 45.8 ± 12.9 years, respectively) but rather in oral contraception methods. This latter point was suggested by the relevance of estrogen intake for AO pathological susceptibility ((29) and Fig. 5).

Our study's assay was appropriate for investigating patient plasma HK, which holds clinical phenotypes that are uncommon or difficult to differentiate from other pathologies, such as AO-nC1Inh. In this type of complementary assay, specificity should be favored over sensitivity (34). We fixed the thresholds of HK cleavage and HK concentration referring to established cases of AO-nC1Inh. Using ROC curves to maximize both specificity and sensitivity, we found thresholds with highly demonstrative 100% and 88% specificity values for men and women, respectively (Table 3).

The quantification of HK cleavage products upon immunoblot provided us with a direct indication of BK production, constituting a great advantage to the problematical kinin assay, given the short half-life of BK and *desArg*⁹-BK (13). Our mathematical model demonstrated that HK cleavage followed PKK activation. HK cleavage also indicated, therefore, that either a comparable amount of PKK has been activated, or that some hypotheses of our model, such as with normal C1Inh function, should be reconsidered for this patient.

The application of this testing complements the amidase activity assay (14) and reinforces its usefulness and potential for application in AO diagnostics. More importantly, measuring HK cleavage should aid the physician in producing clear evidence of significant kinin production in suspected AO cases.

Acknowledgements

We would like to thank the physicians of the French National Centre for Angioedema for their helpful participation in this collaborative study, including Ludovic Martin and Brigitte Nicolie (Angers); Olivier Fain Bondy and Brigitte Coppéré (Lyon); Stéphane Gayet and Bruno Graffin (Marseille); Isabelle Pruvost and David Launay (Lille); Hervé Maillard (Le Mans); Denise Anne Moneret-Vautrin and Etienne Beaudouin (Epinal); Yann Ollivier (Caen); Hervé Watier (Tours); Nadia Raison-Peyron and Aurélie Du Thanh (Montpellier); and Fabien Pelletier (Besançon). The authors are indebted to Marion Allegret-Cadet (Grenoble), and Hélène Humeau (Angers), for their skillful work. This work was supported by a research program conducted within European framework 7 (acronym HAEIII; coordinator: S. Cichon), a national granting for transfusion related acute lung injury (TRALI; from *Etablissement Français du Sang*) and by national program for rare disease research (French Ministry of Health, 2011-2015).

Bibliography

1. Zuraw BL. Hereditary Angioedema. *N Engl J Med* 2008; 359: 1027–36.
2. Cugno M, Zanichelli A, Foieni F, et al. C1-inhibitor deficiency and angioedema: molecular mechanisms and clinical progress. *Trends in Molecular Medicine* 2009; 15: 69–78.
3. Zuraw BL, Bork K, Binkley KE, et al. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor function: consensus of an international expert panel. *Allergy Asthma Proc* 2012; 33 Suppl 1: S145–156.
4. Giard C, Nicolie B, Drouet M, et al. Angio-oedema induced by oestrogen contraceptives is mediated by bradykinin and is frequently associated with urticaria. *Dermatology (Basel)* 2012; 225: 62–9.
5. Kaplan AP, Greaves MW. Angioedema. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 373–88.
6. Joseph K, Tholanikunnel BG, Kaplan AP. Heat shock protein 90 catalyzes activation of the prekallikrein-kininogen complex in the absence of factor XII. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 896–900.
7. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH. Identification and Characterization of Prolylcarboxypeptidase as an Endothelial Cell Prekallikrein Activator. *J Biol Chem* 2002; 277: 17962–9.
8. Kluft C. Determination of prekallikrein in human plasma: optimal conditions for activating prekallikrein. *J Lab Clin Med* 1978; 91: 83–95.
9. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 2009; 139: 1143–56.
10. Oschatz C, Maas C, Lecher B, et al. Mast Cells Increase Vascular Permeability by Heparin-Initiated Bradykinin Formation In Vivo. *Immunity* 2011; 34: 258–68.
11. Tankersley DL, Finlayson JS. Kinetics of activation and autoactivation of human factor XII. *Biochemistry* 1984; 23: 273–9.
12. Davis AE 3rd, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost* 2010; 104: 886–93.
13. Charignon D, Späth P, Martin L, et al. Icatibant, the bradykinin B2 receptor antagonist with target to the interconnected kinin systems. *Expert Opin Pharmacother* 2012; 13: 2233–47.
14. Defendi F, Charignon D, Ghannam A, et al. Enzymatic assays for the diagnosis of bradykinin-dependent angioedema. *PLoS ONE* 2013; 8: e70140.

15. Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 1997; 90: 3819–43.
16. Scott CF, Silver LD, Schapira M, et al. Cleavage of Human High Molecular Weight Kininogen Markedly Enhances Its Coagulant Activity Evidence That This Molecule Exists as a Procofactor. *The Journal of clinical investigation* 1984; 73: 954–62.
17. Tayeh MA, Olson ST, Shore JD. Surface-induced alterations in the kinetic pathway for cleavage of human high molecular weight kininogen by plasma kallikrein. *The Journal of biological chemistry* 1994; 269: 16318–25.
18. Scott CF, Colman RW. Function and immunochemistry of prekallikrein-high molecular weight kininogen complex in plasma. *J Clin Invest* 1980; 65: 413–21.
19. Bock PE, Shore JD, Tans G, et al. Protein-protein interactions in contact activation of blood coagulation. Binding of high molecular weight kininogen and the 5-(iodoacetamido) fluorescein-labeled kininogen light chain to prekallikrein, kallikrein, and the separated kallikrein heavy and light chains. *J Biol Chem* 1985; 260: 12434–43.
20. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014. Available from: <http://www.R-project.org/>
21. Atkins GL, Nimmo IA. A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation. *Biochem J* 1975; 149: 775.
22. Cornish-Bowden A, Eisenthal R. Statistical considerations in the estimation of enzyme kinetic parameters by the direct linear plot and other methods. *Biochem J* 1974; 139: 721.
23. McNeil BJ, Hanley JA. Statistical approaches to the analysis of receiver operating characteristic (ROC) curves. *Med Decis Making* 1984; 4: 137–50.
24. Morin V, Morin J, Mercier M, et al. Les courbes ROC en biologie médicale. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 1998; 13: 279–86.
25. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*, 5th edition. Section 8.4: The Michaelis-Menten Model Accounts for the Kinetic Properties of Many Enzymes. New York: Freeman W. H.; 2002.
26. Kaplan AP, Ghebrehiwet B. The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol* 2010; 47: 2361–2169.
27. Adam A, Albert A, Calay G, et al. Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values. *Clin Chem* 1985; 31: 423–6.

28. Suffritti C, Zanichelli A, Maggioni L, et al. High-molecular-weight kininogen cleavage correlates with disease states in the bradykinin mediated angioedema due to hereditary c1-inhibitor deficiency. *Clin Exp Allergy* 2014; DOI: 10.1111/cea.12293.
29. Giard C, Nicolie B, Drouet M, et al. Angio-oedema induced by oestrogen contraceptives is mediated by bradykinin and is frequently associated with urticaria. *Dermatology* 2012; 225: 62–9.
30. Schmaier AH, McCrae KR. The plasma kallikrein–kinin system: its evolution from contact activation. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2323–9.
31. Joseph K, Tholanikunnel BG, Kaplan AP. Factor XII–independent cleavage of high-molecular-weight kininogen by prekallikrein and inhibition by C1 inhibitor. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 124: 143–9.
32. Tankersley DL, Alving BM, Finlayson JS. Activation of factor XII by dextran sulfate: the basis for an assay of factor XII. *Blood* 1983; 62: 448–56.
33. Robillard J, Gauvin F, Molinaro G, et al. The syndrome of amniotic fluid embolism: A potential contribution of bradykinin. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193: 1508–12.
34. Hui SL, Walter SD. Estimating the error rates of diagnostic tests. *Biometrics* 1980; 36: 167–71.
35. Wuillemin WA, Eldering E, Citarella F, et al. Modulation of Contact System Proteases by Glycosaminoglycans: selective enhancement of the inhibition of factor XIa. *J Biol Chem* 1996; 271: 12913–8.

Tables

Table 1: enzymatic reactions and mathematical expression

The first model (M1) was developed under the assumption that HK cleavage is independent of bound KK. It included R1, the enzymatic transformation of zymogen PKK into active KK by FXIIa, and R2, the enzymatic cleavage of N-HK into a light chain, a heavy chain, and BK (the latter two are not mentioned in the table).

The second model (M2) was designed on the premise that HK is cleaved only by bound KK. It included R1 and substituted R2 by R3 to R7 Reactions. According to Tayeh *et al.*(17), N-HK cleavage by KK is impaired when association between both molecules is inhibited. We assumed that cleavage could only occur after an association was established between the N-HK light chain domain and KK heavy chain (named the KK#N-HK complex).

R8 was substituted by R1 in a third model (M3) in order to quantify C1Inh inhibition of KK-mediated HK cleavage.

C-HK refers to cleaved HK light chains (both LC-HK and cLC-HK), X° means unbound X protein, while X#Y means bound X and Y proteins. Other abbreviations are as defined in the main body of the text. ^(a): from (11), considered independent of temperature; ^(b): from (19) and the Material and Method section. ^(c): from (35). M1, M2, and M3 columns recapitulate reactions included in the corresponding mode.

Reaction	Chemical or enzymatic reaction	Mathematical expression of the kinetics	Constants	M1	M2	M3
R1	$\text{FXIIa} + \text{PKK} \leftrightarrow \text{FXIIa}\#\text{PKK} \rightarrow \text{FXIIa} + \text{KK}$	$\frac{d[\text{KK}]/dt = k_{\text{cat}1} [\text{FXIIa}] [\text{PKK}]/}{([\text{PKK}] + K_{M1})}$	$k_{\text{cat}1} = 1.03\text{s}^{-1}$ $K_{M1} = 1.8 \times 10^{-6}\text{M}^{(a)}$	X	X	
R2	$\text{KK} + \text{N-HK} \leftrightarrow \text{KK}\#\text{N-HK} \rightarrow \text{KK} + \text{C-HK}$	$\frac{d[\text{C-HK}]/dt = k_{\text{eff}2} [\text{KK}] [\text{N-HK}]}$	$k_{\text{eff}2} = k_{\text{cat}} / K_M,$ k_{cat} and K_M : cf Tab. 2	X		
R3	$\text{KK}^\circ + \text{N-HK}^\circ \leftrightarrow \text{KK}\#\text{N-HK}$	$\frac{d[\text{KK}\#\text{N-HK}]/dt = k_{\text{on}} [\text{KK}^\circ] [\text{N-HK}^\circ]}{-k_{\text{off}} [\text{KK}\#\text{N-HK}]}$	$k_{\text{on}} = k_{\text{cat}} / (K_M - K_D)$ $k_{\text{off}} = k_{\text{cat}} K_D / (K_M - K_D)$ $K_D = 16\text{nM}^{(b)}$		X	X
R4	$\text{KK}\#\text{N-HK} \rightarrow \text{KK}\#\text{C-HK}$	$\frac{d[\text{KK}\#\text{C-HK}]/dt = k_{\text{cat}} [\text{KK}\#\text{N-HK}]}$	k_{cat} and K_M : cf Tab. 2		X	X
R5	$\text{KK}^\circ + \text{C-HK}^\circ \leftrightarrow \text{KK}\#\text{C-HK}$	$\frac{d[\text{KK}\#\text{C-HK}]/dt = k_{\text{on}} [\text{KK}^\circ] [\text{C-HK}^\circ]}{-k_{\text{off}} [\text{KK}\#\text{C-HK}]}$	as for R3		X	X
R6	$\text{PKK}^\circ + \text{N-HK}^\circ \leftrightarrow \text{PKK}\#\text{N-HK}$	$\frac{d[\text{PKK}\#\text{N-HK}]/dt = k_{\text{on}} [\text{PKK}^\circ] [\text{N-HK}^\circ]}{-k_{\text{off}} [\text{PKK}\#\text{N-HK}]}$	as for R3		X	X
R7	$\text{PKK}^\circ + \text{C-HK}^\circ \leftrightarrow \text{PKK}\#\text{C-HK}$	$\frac{d[\text{PKK}\#\text{C-HK}]/dt = k_{\text{on}} [\text{PKK}^\circ] [\text{N-HK}^\circ]}{-k_{\text{off}} [\text{PKK}\#\text{C-HK}]}$	as for R3		X	X
R8	$\text{KK} + \text{C1Inh} \rightarrow \text{KK}\#\text{C1Inh}$	$\frac{d[\text{KK}\#\text{C1Inh}]/dt = k_{\text{inh}} [\text{KK}] [\text{C1Inh}]}$	$k_{\text{inh}} = 2.55 \times 10^4\text{M}^{-1}\text{s}^{-1(c)}$			X

Table 2: Kinetic constants for HK cleavage by KK

Results are expressed as the mean \pm standard error to the mean of three independent assays. ^(a)
from Tayeh *et al.*(17)

Temperature (°C)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (M)
0	$1.33 \pm 0.20 \times 10^{-1}$	$6.72 \pm 0.87 \times 10^{-7}$
25 ^(a)	$6.3 \pm 0.2 \times 10^{-1}$	$1.38 \pm 0.12 \times 10^{-6}$
37	$6.37 \pm 1.39 \times 10^{-1}$	$1.09 \pm 0.11 \times 10^{-6}$

Table 3: N-HK plasma concentration and cleavage of HK in blood donor and AO-nC1Inh patient plasma

Plasmatic values from blood donors and angioedema (AO-nC1Inh) patients were reported as mean±standard deviation, square brackets hold [first- median-third quartile], n is the number of plasma included in the study. The thresholds were chosen to provide ^(a) maximum sensitivity (SE) + specificity (SP), or ^(b) second best maximum with values comparable to the other gender

	Blood donors	AO patients	Threshold sensitivity; specificity
Men, N-HK (ng/μL)	101 ± 24 [91-99-118] n=25	45 ± 24 [30-39-55] n=25	<85 ^(a) SE 96%; SP 76%
Men, %C of HK (%)	13 ± 9 [5-9-13] n=25	33 ± 19 [16-32-48] n=25	>34 ^(b) SE 44%; SP 100%
Women, N-HK (ng/μL)	72 ± 30 [50-71-85] n=24	25 ± 29 [0-17-41] n=31	<65 ^(b) SE 90%; SP 54%
Women, %C of HK (%)	21 ± 15 [10-18-29] n=24	63 ± 29 [45-68-90] n=31	>40 ^(a) SE 80%; SP 88%

Table S1: If HK is cleaved only by bound KK, N-HK would be totally cleaved only after complete PKK activation

This table presents the mathematical estimation of the time required to cleave 90% of PKK and N-HK, using the two mathematical models described in Table 1. The first model (M1) was designed under the assumption that HK cleavage is independent of bound KK. It failed to reproduce the delay shown in Figure 1. The results obtained with plasmatic concentrations were also not compliant with the DS activation displayed in Figure S1.

The second model (M2) took the assumption that HK is cleaved only by bound KK, with a prior association between KK and N-HK. This model reproduced the delay between PKK activation and N-HK cleavage, which was found to be relatively independent of initial N-HK concentration, with an N-HK:KK ratio between 1 and 2 providing the minimum delay. At 0°C, this delay was still simulated if we used a 5 times slower kinetic for FXIIa than that used at 37°C. Simulations with M2 and plasmatic concentration failed to reproduce assays on DS-activated plasma, especially pertaining to KK activation. This model did not account for DS modifying FXIIa kinetics, DS assay not commencing with fully activated FXIIa, and the positive feedback loop of KK-mediated activation of FXIIa. Nevertheless, this simulation confirmed that N-HK complete cleavage never occurred prior to complete KK activation, regardless of which concentration was used.

The *in vitro* concentrations are those we used with recombinant protein assays, while the plasmatic ones are for a purely theoretical activation with all FXII in the form of FXIIa. In our assay with DS-activated plasma (Fig. S1), the latter was diluted twice. Temperature was taken into account only in terms of the kinetic constants of k_{cat} and K_M of KK (Tab. 2). ^(a): k_{cat} value for FXIIa-mediated activation of PKK at 0°C was estimated at 5 times less its value at 37°C. Other changes in the simulations have been indicated.

Model	Concentrations	Temperature	Conditions (if different from Materials and Methods)	Time (in s) for 90% PKK activation	Time (in s) for 90% N-HK cleavage	Delay ratio (N-HK time :PKK time)		
M1 (R1, R2)	<i>in vitro</i>	0°C		134	126	0.94		
		37°C		134	63	0.47		
HK cleavage independent of bound HK#KK	plasma	0°C		12	45	3.85		
			1/2 dilution for DS activation	22	78	3.49		
		37°C		12	17	1.46		
			1/2 dilution for DS activation	22	31	1.39		
		M2 (R1, R3, R4, R5, R6, R7)	<i>in vitro</i>	0°C	lower [N-HK]: 10 ⁻⁷ M	134	610	4.57
						134	481	3.60
0°C	higher [N-HK]: 2×10 ⁻⁷ M			134	468	3.51		
	higher [N-HK]: 3×10 ⁻⁷ M			134	630	4.72		
37°C	lower k _{cat} for FXIIa ^(a)			669	832	1.24		
	lower [N-HK]: 10 ⁻⁷ M			134	255	1.91		
HK cleavage only within bound HK#KK	plasma	37°C		134	228	1.71		
			higher [N-HK]: 2×10 ⁻⁷ M	134	228	1.70		
		0°C	higher [N-HK]: 3×10 ⁻⁷ M	134	279	2.08		
				12	405	35.19		
		0°C	1/2 dilution for DS activation	22	492	22.21		
			1/2 dilution for DS activation, lower k _{cat} for FXIIa ^(a)	112	565	5.03		
37°C		12	143	12.26				
	1/2 dilution for DS activation	22	177	7.92				

Figures and legends

Figure 1: PKK activation is faster than N-HK cleavage *in vitro*, at 0°C and 37°C

We incubated 0.3pmol of FXIIa and 1.2pmol of PKK and N-HK at 0°C (**A,B**) or 37°C (**C,D**) for the indicated times in minutes (from 0 to 30 min). The reactions were interrupted by SDS and the samples were boiled then subjected to SDS-PAGE. Immunorevelation with an anti-PKK antibody revealed PKK activation by FXIIa to be fast and complete within 5 min at 0°C (**A**) and 1 min at 37°C (**C**). An anti-HK light chain antibody revealed complete cleavage within 30 min at 0°C (**B**) and 10 min at 37°C (**D**). NC: no contact between FXIIa and PKK; PKK: prekallikrein; KK: kallikrein; N-HK: native chain of high molecular weight kininogen (HK); LC-HK: light chain of HK; cLC-HK: cleaved light chain of HK

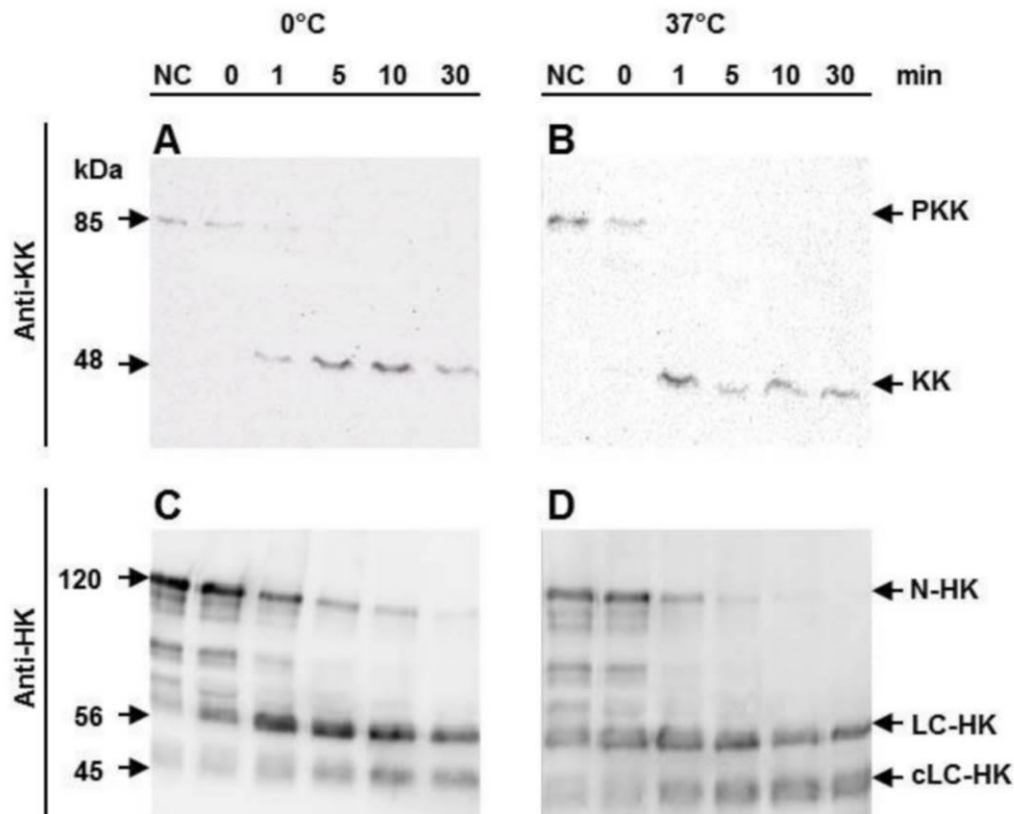


Figure 2: KK activation is faster than N-HK cleavage

AB: Mathematical simulation of FXIIa, PKK and HK incubation at 0°C (**A**) and 37°C (**B**) assuming that HK is cleaved only by bound KK, and that the KK and N-HK association represents the real enzyme-substrate Michaelian complex (Model M2). This model reproduced the delay between PKK activation and N-HK cleavage, as well as displaying comparable values to the semi-quantitative assay. **CD:** Quantification of Figure 1 demonstrating all PKK to be activated before all N-HK is cleaved, at both 0°C (**C**) and 37°C (**D**). **E:** Extrapolation of the model to a hypothetical complete FXIIa activation in plasma, also predicting that KK is activated prior to complete N-HK cleavage. **F:** Mathematical simulation of a significant KK activation controlled by C1Inh. If 10% of all PKK were activated into active KK by a local angioedema, less than 3% of the remaining N-HK would be cleaved before all KK was inactivated by C1Inh. The reciprocal action of KK and FXIIa was not calculated, and the influence of the 0-10% HK concomitantly activated with KK was neglected

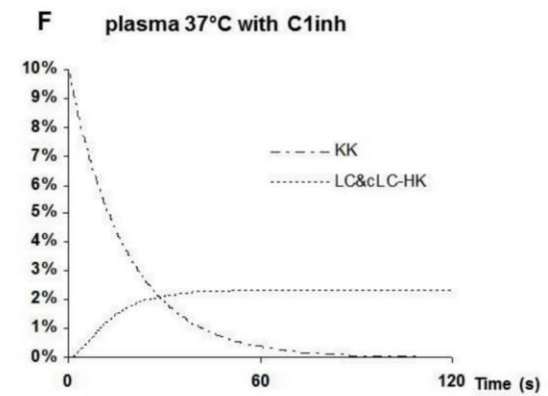
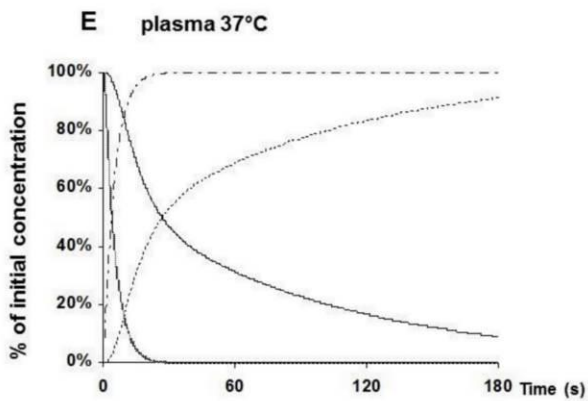
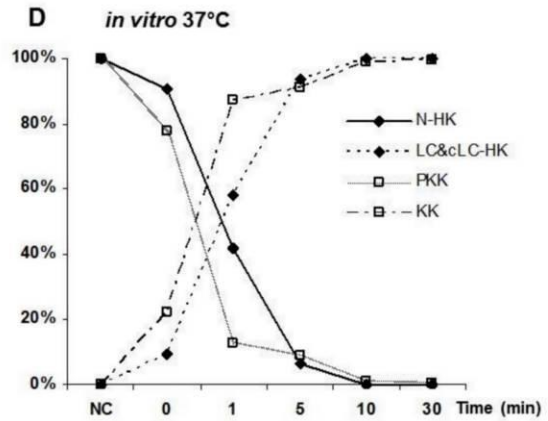
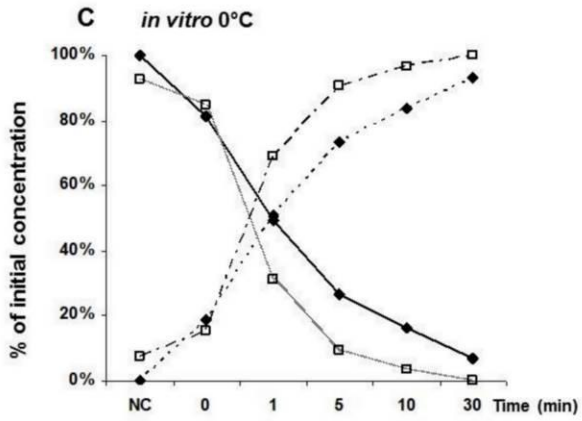
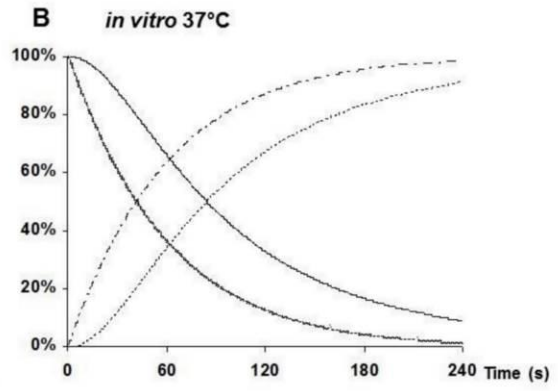
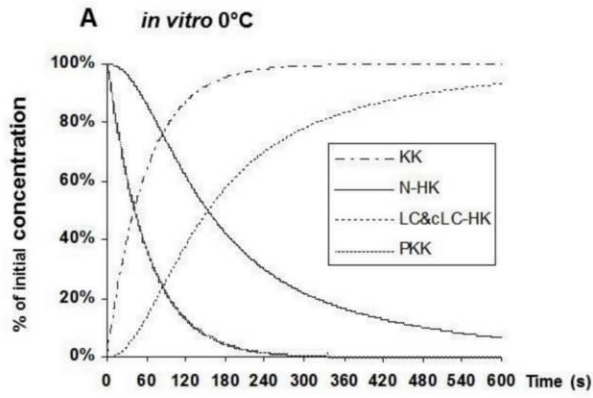
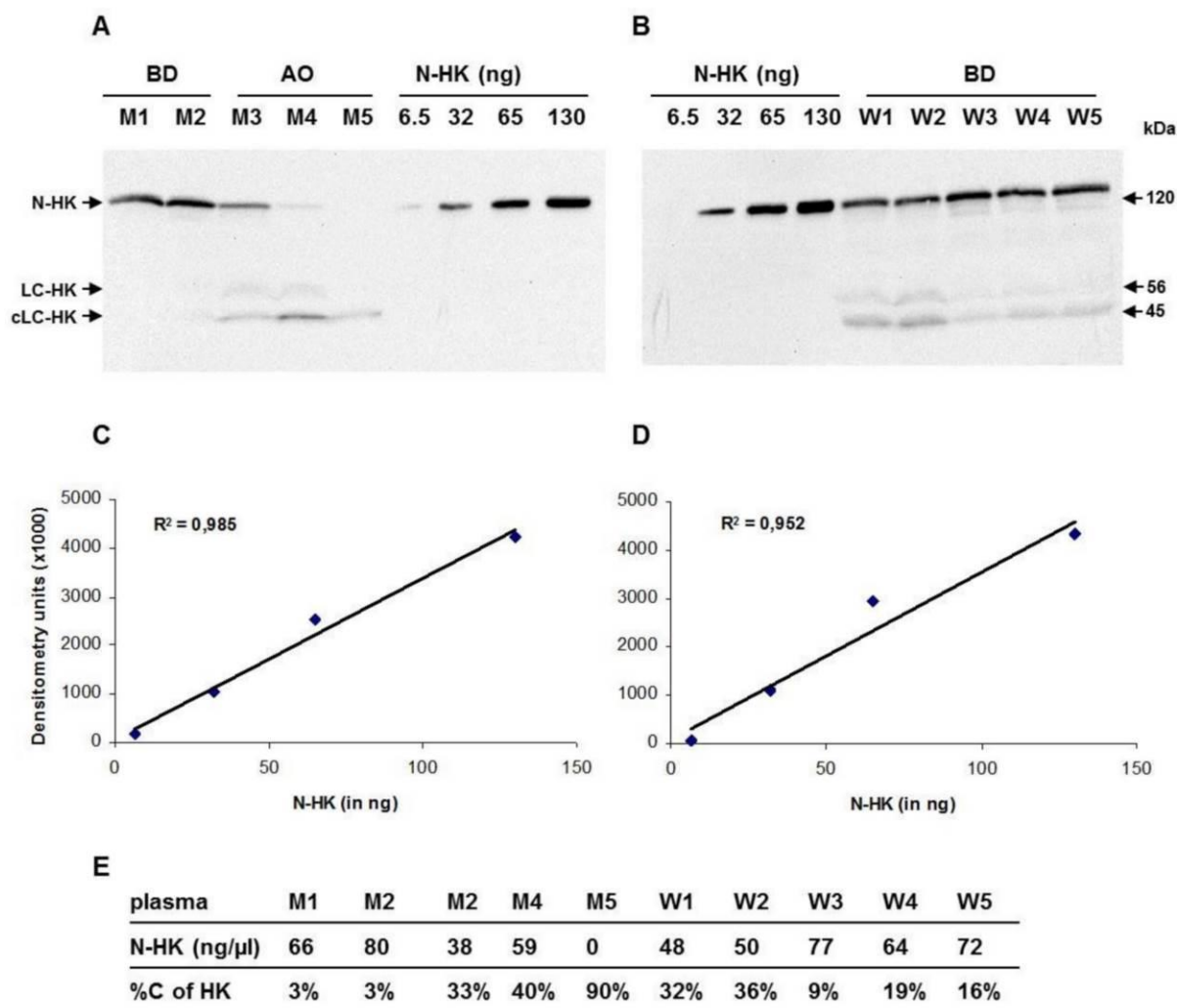


Figure 3: quantification of HK molecular species in human plasma

Human purified HK and 1µl of plasma from blood donors (BD) and AO-nC1Inh patients (AO) were subjected to SDS-PAGE, and detected using a peroxidase-conjugated anti-light chain HK polyclonal antibody. The signal was quantified and %C defined as $(LC\text{-}HK + cLC\text{-}HK) / (N\text{-}HK + LC\text{-}HK + cLC\text{-}HK)$



AB: sample gel analysis of control and AO plasma. **CD**: titration curve of N-HK in the gel displayed in AB, respectively. **EF**: N-HK plasmatic concentration and %C

Figure 4: HK molecular species in healthy blood donors and AO-nC1Inh patients

A: distribution of N-HK concentration in male and female blood donor (BD, n=25 for men, n=24 for women) and angioedema patient (AO; n=25 for men, n=31 for women) plasma. **B:** same as **A** in terms of the percentage of cleavage (%C) of HK. **CD:** N-HK and %C of HK were poorly correlated in both men (**C**) and women (**D**). Vertical and horizontal bars represent the thresholds indicated in Table 3; r: coefficient of correlation; ♦: BD, blood donor plasma; □: AO, plasma from AO-nC1Inh patients; *: p <0.05, **: p <0.01, ***: p <0.001 (Wilcoxon sign rank test)

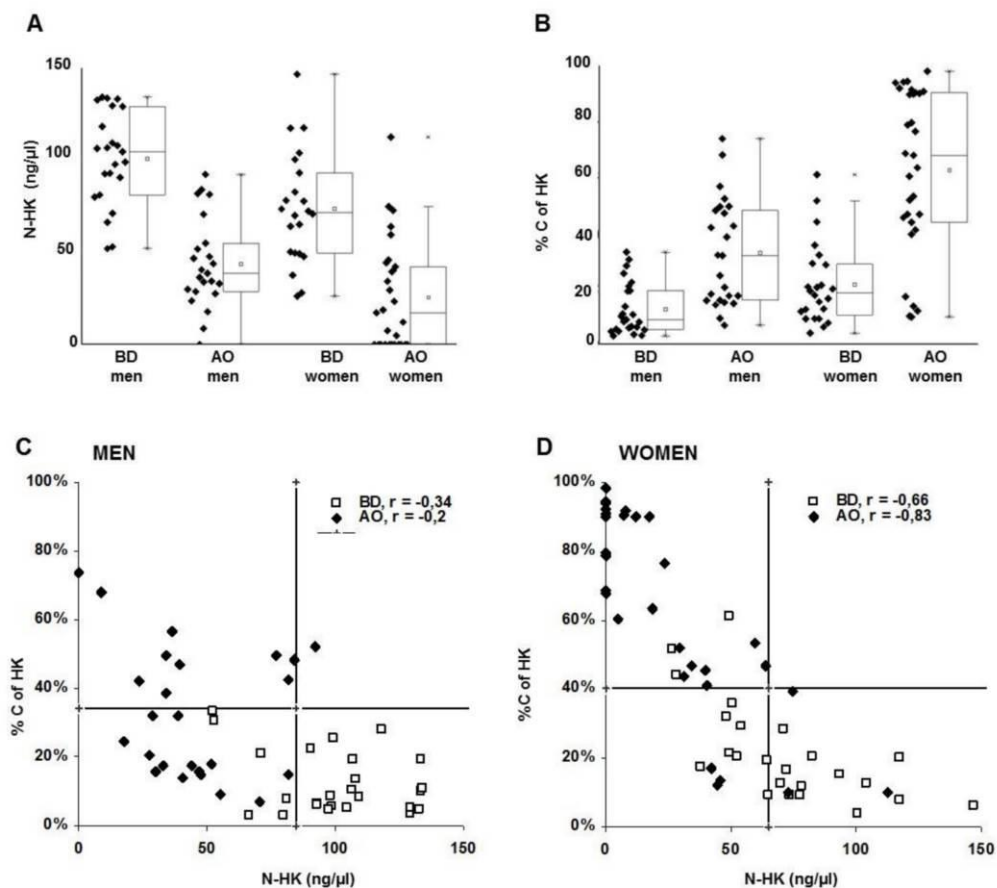


Figure 5: HK cleavage analysis in AO patients

A: HK was also cleaved in four AO patients (AO1 to 4) with deficiency in C1Inh levels. One μl of each citrated plasma was subjected to PAGE and immunoblot using polyclonal antibody against HK light chain, together with normal blood donor (BD1) plasma and known amounts of purified HK (from 6.5 to 130ng per lane). N-HK is the main HK molecular species in blood donor plasma, and was not detectable in three out of four AO patients. The cLC-HK was the main HK molecular species detected in AO plasma, and was present in very low quantities. **B:** densitometric analysis of A and corresponding plasma amidase activity. For these patients, HK cleavage analysis provided no additional information, yet instead confirmed the interest of using amidase activity as a routine test. **C:** titration curve of gel displayed in A. Densitometric quantifications of N-HK bands were plotted against the quantity of HK loaded on gel. **D:** plasma samples from five female (number 1-5) patients presenting with AO attacks under estrogen therapy (E) and exhibiting remission 2 months after stopping (S) estrogen therapy were subjected to immunoblot using polyclonal antibody against HK light chain. HK was totally cleaved while under estrogen therapy, and was partially restored 2 months after stopping therapy. **E:** quantification of A together with spontaneous amidase activity (14). While these patients did not display any more AO attacks after stopping estrogen therapy, the plasmatic parameters were improved though not fully restored to normal values. Normal values are underlined, N-HK concentration $<6.5\text{ng}/\mu\text{l}$ (lowest point of titration curves) was considered as 0. The two titration curves of the two gels displayed in D are not shown

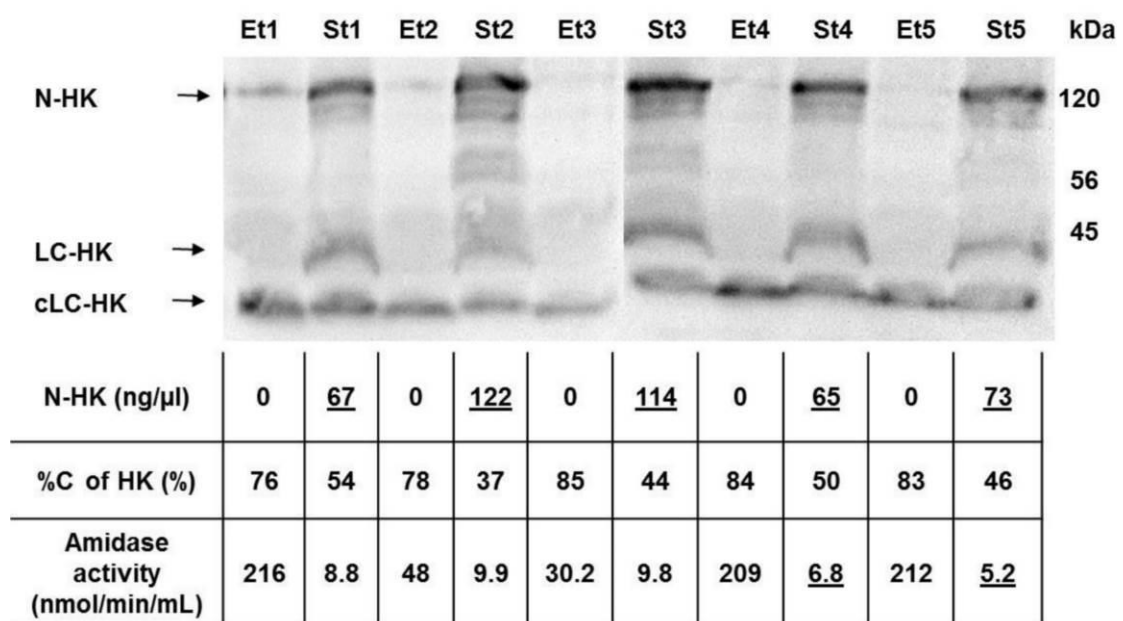


Figure S1: Dextran sulfate plasma activation differs from *in vitro* PKK activation by FXIIa

Normal human plasma was diluted in the same buffer volume (without DS in **A, C**) or the same dextran sulfate volume (DS) (with DS in **B, D**) at 0°C (**A, B**) or 37°C (**C, D**). Samples taken prior to dilution (NC) or after 1 to 30 min were subjected to SDS-PAGE. Without DS, high molecular weight kininogen (HK), prekallikrein (PKK), and C1 Inhibitor (C1Inh) were stable. DS incubation led to a simultaneous PKK activation into kallikrein (KK), as well as native HK (N-HK) cleavage into light (CL-HK and cLC-HK) chain, heavy chain, and bradykinin, in contrast with *in vitro* PKK activation by FXIIa. Protease-conjugated C1Inh (Prot-C1Inh) only appeared after 37°C incubation, but not at 0°C

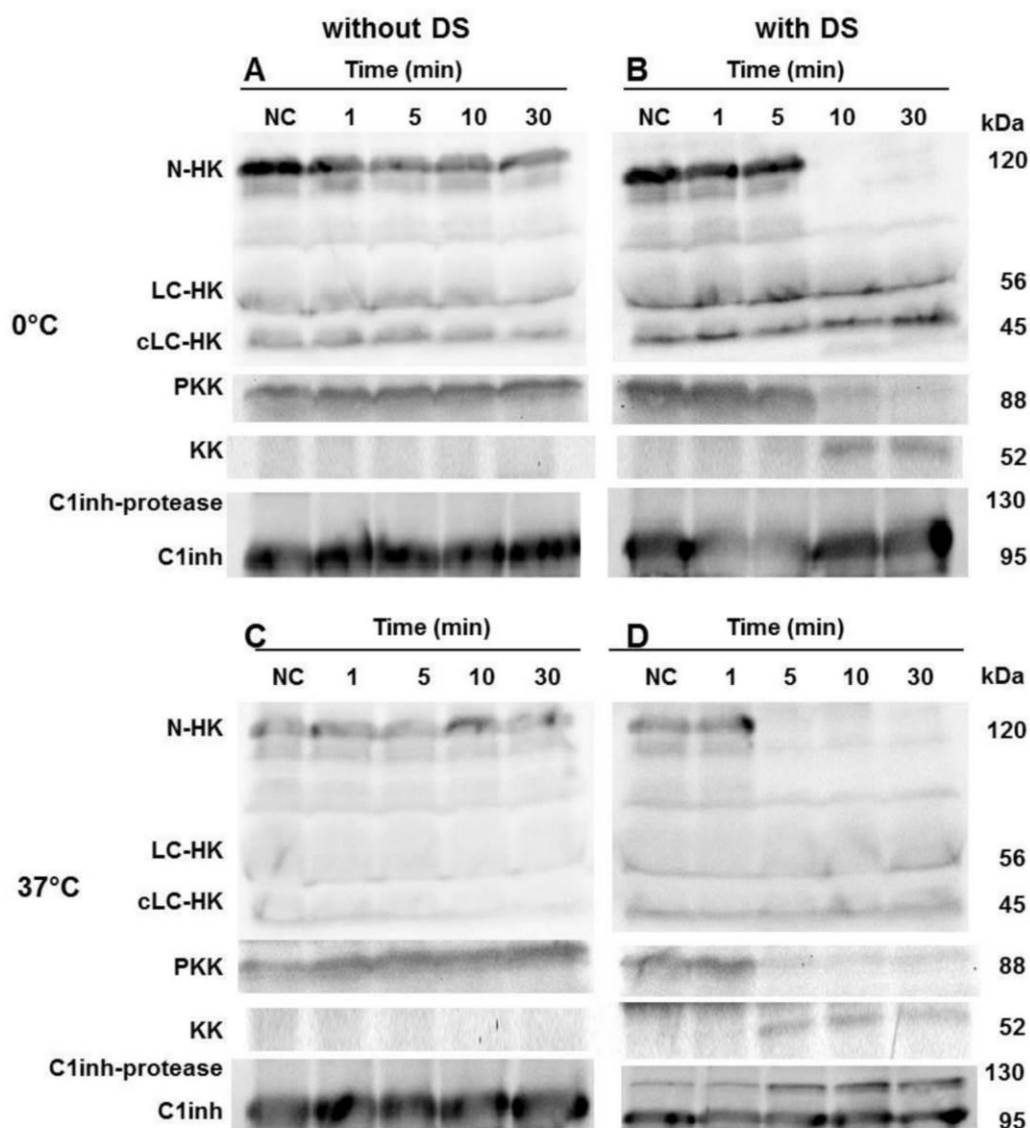


Figure S2: Kinetic constant determination of plasma kallikrein against its natural substrate

A, B: 570nM of high molecular weight kininogen (HK) was mixed with either 35nM (A) kallikrein (KK) at 0°C (A) or 17.5nM KK at 37°C (B), the reaction was stopped immediately after mixing (T0) or after a 1 or 2 min period (T1 and T2). Samples corresponding to 200-250ng (depending on initial conditions) were loaded into SDS-PAGE. Control samples were taken before mixing, with C representing the equivalent amount of analyzed samples and 2C, C/2, C/4, and C/8 their fractions. **C, D:** titration curves of N-HK respectively loaded in A and B gels following immunorevelation with a peroxidase-conjugated anti-HK light chain polyclonal antibody. **E, F:** five experiments were conducted under the same conditions outlined above, except with a different substrate concentration, with initial reaction velocity plotted against HK concentration. This figure presents the non-linear regression curves calculated by iterations produced by means of Excel[®] software in order to determine k_{cat} and K_M . These experiments were repeated twice (n=3) in order to produce the data presented in Table 2.

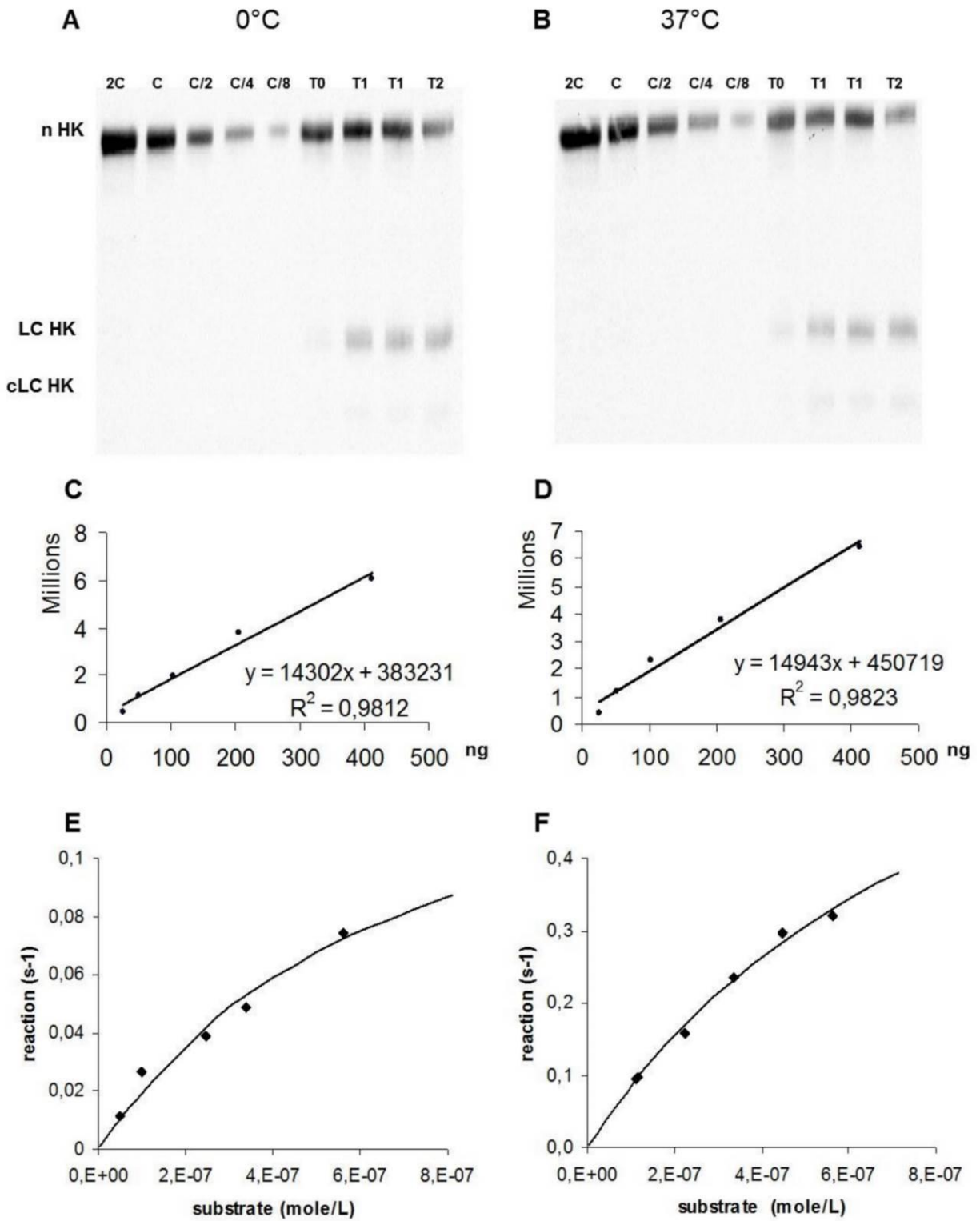
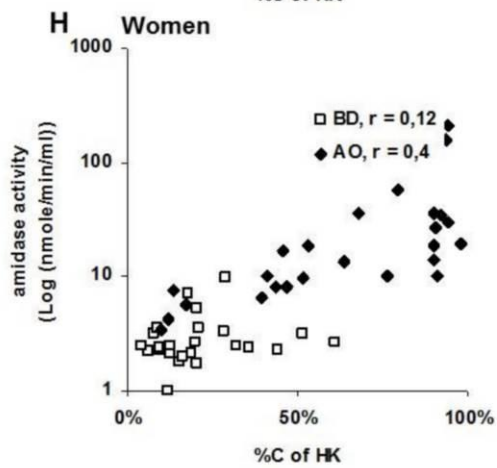
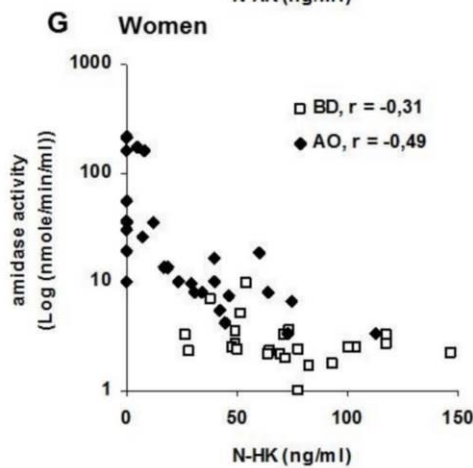
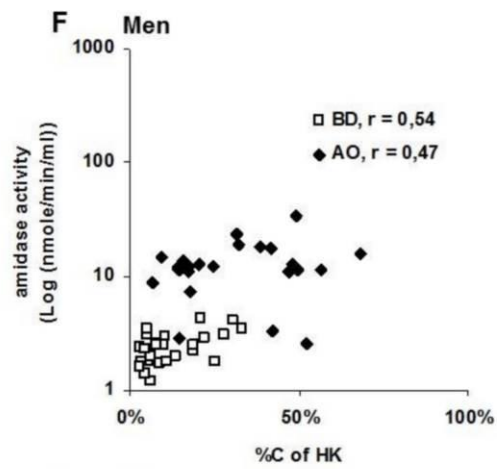
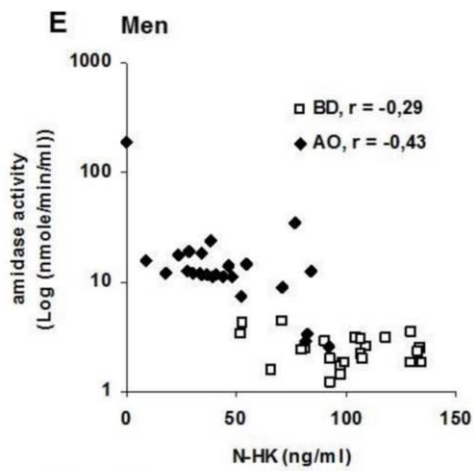
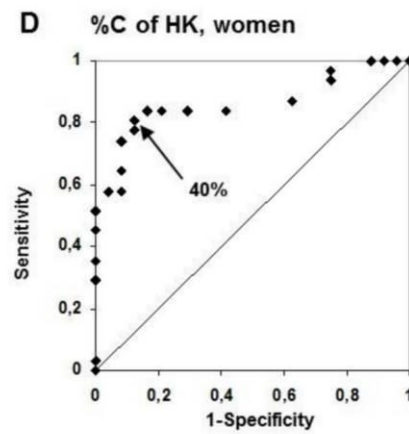
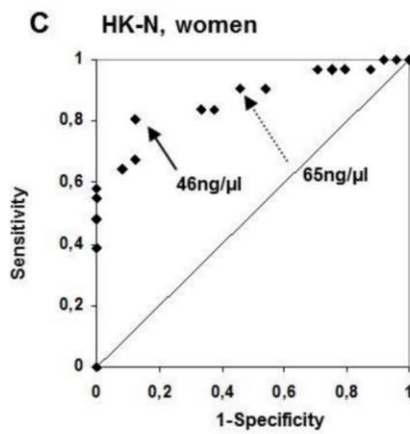
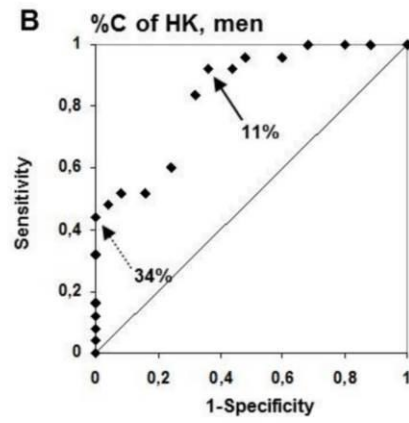
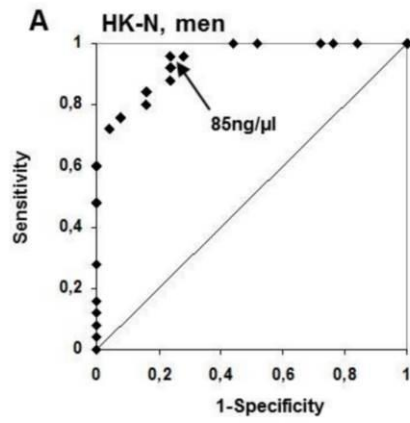


Figure S3: Plasmatic N-HK concentration and %C threshold determination and correlation to amidase activity

A, B, C, D: Threshold determination using ROC curve analysis. Thresholds were fixed for all possible values of the corresponding parameters (N-HK concentration in **A** and **C**, %C of HK in **B** and **D**), with the corresponding specificity and sensitivity independently plotted for men (**A, B**) and women (**C, D**). The threshold maximizing specificity + specificity was represented by the dot furthest removed from the diagonal, as pinpointed by the arrow. The dotted arrow indicates the second best choice, retained in order to ensure comparable values of threshold, sensitivity, and specificity for both genders

E, F, G, H: N-HK and %C of HK in plasma poorly correlated to amidase activity. All three parameters potentially are applicable for investigating contact phase activation in plasma. ♦: BD, blood donor plasma; □: AO, plasma from AO-nC1Inh patients.



Discussion générale

La première définition de l'AOH a associé cette pathologie au déficit pour C1Inh, orientant la pathologie pendant de nombreuses années vers une anomalie du complément. Bien que le rôle de KK ait été identifié en 1980 [179] et que l'AOH avec fonction normale de C1Inh ait été décrit en 1986 [160], la pathologie reste dans la sphère du complément. Pour illustration, l'article du groupe Hongrois, datant de 2013, qui présente le rôle de l'activation de la voie des lectines et de la voie classique du complément dans l'AOH-C1Inh [180]. Ce n'est qu'en 2006 avec l'identification de la première mutation causale pour l'AOH-nC1Inh sur le gène *F12* avec la définition du gain-de-fonction [93] que la maladie se réoriente vers une anomalie de la phase contact. Cette nouvelle approche de l'AOH demande un effort pédagogique pour convertir le monde médical. C'est pourquoi nous avons rédigé deux revues l'une sur l'activation de la phase contact chez les sujets ayant un AOH-nC1Inh et l'autre sur l'icatibant, un nouveau médicament spécifique de l'AO à kinine.

La perméabilité endothéliale excessive à l'origine des AO est la conséquence de l'accumulation des kinines (BK et *desArg*⁹-BK) sur l'endothélium vasculaire [181][182]. La production des kinines est issue de l'activation de la phase contact, classiquement décrite par l'action de FXIIa sur pKK, le clivage de HK par KK, événement sous le contrôle de C1Inh. Mais les facteurs déclencheurs de la phase contact sont mal compris. C'est pourquoi cette revue de la littérature reprend le phénomène d'activation de la phase contact, en particulier chez les sujets présentant un AOH-nC1Inh. Il est important de considérer que les enzymes impliquées dans la production des kinines circulent dans le plasma sous formes de proenzymes (inactives) et que la transformation de la forme proenzyme à la forme enzyme (active) est un événement déterminant pour la production des kinines. Cette revue fait le point sur les constituants du système kallikréine-kinine, la biosynthèse des constituants, les structures moléculaires, les récepteurs, les activateurs et les contrôles. Ce qui conduit à

développer la question des relations entre les zymogènes, les facteurs déclencheurs des crises et l'évolution sous forme de poussées de la maladie.

Le postulat de l'AOH comme maladie multifactorielle est émis en appui sur la variabilité de la pénétrance observée au sein des familles affectées par l'AOH. Avec l'observation de paramètres aggravants (*e.g.* susceptibilité d'activation de la phase contact, défaut des systèmes de contrôle) mais aussi protecteurs (*e.g.* activité du catabolisme des kinines), la conjugaison de ces phénotypes biologiques confère à chaque individu la capacité de résister à, ou de développer la maladie. Cette hypothèse s'appuie sur la démonstration de Råberg au sujet de la résistance ou la tolérance d'un hôte à une infection parasitaire (Figure 31) [183].



Figure 31 : Schéma montrant les réactions possibles de deux génotypes (ligne et pointillé) pour la sévérité d'une pathologie [135].

A : Les deux génotypes expriment la même tolérance (pente de la droite) mais des résistances différentes (le génotype pointillé est moins résistant). B : Les deux génotypes expriment la même résistance mais ont une tolérance différente (le phénotype trait plein est moins tolérant). C : Les deux génotypes sont différents pour leur tolérance et leur résistance (le phénotype trait pointillé est moins résistant mais plus tolérant). Ces différences de phénotype clinique pour une même espèce animale sont le reflet de phénomènes multifactoriels, tels qu'ils sont rencontrés dans l'AO. Adapté de Råberg *et al.* [183].

La seconde revue décrit les caractéristiques, du nouveau médicament Icatibant, Firazyr[®], dans le système interconnecté des kinines. Il s'agit d'un antagoniste de RB2, disponible depuis 2007 pour le traitement des crises d'AOH-C1Inh. Sont rappelés les résultats

des différents essais précliniques et cliniques concernant l'icatibant, mettant en évidence différentes propriétés ou questions concernant ce médicament.

En premier lieu, est exposée la difficulté des essais précliniques pour l'étude du système kallibréine-kinine sur des modèles animaux. Par exemple, la restriction de certains modèles comme celui de l'aorte de lapin qui n'exprime que le RB1 ou alors le modèle murin qui possède un contrôle de l'activation de la kininoformation trois fois plus efficace que les contrôles humains et est donc peu sensible à l'activation de la kininoformation. Pour ce qui relève du système kallibréine-kinine, on comprend la difficulté de transposer à l'humain les données acquises chez l'animal.

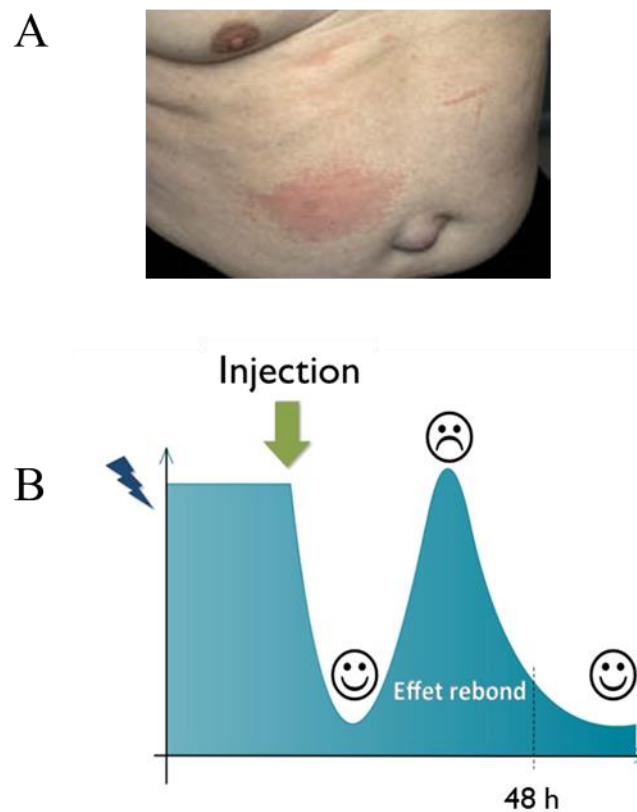


Figure 32 : Effets indésirables associés à l'application de l'icatibant.

A : réaction locale au site d'injection (œdème, prurit, douleur ou érythème). B : Effet rebond : aggravation ou une récurrence de la crise d'AO dans les 48 h suivant l'administration du médicament.

En second lieu, l'accent est mis sur les effets indésirables associés à la prise de ce médicament et leurs mécanismes. Le plus fréquent des effets indésirables est un effet local (œdème, prurit, douleur ou érythème, Figure 32, A) au niveau du site d'injection qui serait associé à un effet agoniste sur les mastocytes cutanés de l'icatibant quand il est appliqué à forte dose [84]. La forte concentration d'icatibant présente au niveau du site d'injection induirait la dégranulation des mastocytes et la libération d'histamine responsable de la réaction cutanée [184]. Le second effet est une aggravation ou une récurrence de la crise d'AO dans les 48h suivant la première administration (appelé « effet rebond », Figure 32, B), affectant 11 à 25 % des crises traitées par l'icatibant [185][186][187]. Cet effet pourrait être le résultat (1) d'un effet agoniste partiel de la molécule ou (2) de la conversion de BK déplacée de RB2 en *desArg*⁹-BK pouvant alors interagir avec RB1. Cependant, les données concernant l'effet de l'icatibant sur le déplacement de BK et le devenir de BK déplacée sont manquantes. De même l'interaction de l'icatibant avec KD n'apparaît pas dans la littérature.

Troisièmement, la question est posée de la posologie de l'icatibant et de la comparer à la quantité de BK libérée lors d'une crise. Le clivage complet de HK chez un individu libérerait 1 µmol de BK, alors que l'application d'une seule dose d'icatibant distribue 23 µmol de médicament, représentant un large excédent pour l'icatibant. Nous avons déjà évoqué l'hypothèse d'une activité agoniste partielle de la molécule. La forte dose d'icatibant appliquée pourrait être en faveur de l'implication de cette propriété agoniste partielle dans la survenue des effets indésirables notamment l'effet rebond. Et nous posons la question de l'impact d'une diminution de la posologie sur (1) l'efficacité du médicament et (2) la survenue des effets indésirables.

L'utilisation des antagonistes de RB2, dont icatibant, est envisagée dans le cadre des traitements des douleurs neuropathiques [171], de la maladie d'Alzheimer [172], des septicémies [173], des traumatismes crâniens [88], de la goutte [174], de la pancréatite [175], de l'ischémie [167], de l'asthme [170] et des rhinites [169] (Figure 30). Mais avant d'élargir

de l'AOH ces applications, des réponses aux questions développées en amont doivent être apportées. De même la pathologie de l'AOH ne doit se comprendre par la seule accumulation de BK sur l'endothélium vasculaire. Les responsabilités des récepteurs B1 et B2, des enzymes de la kininofomation et leurs contrôles ainsi que les enzymes du catabolisme et les autres kinines actives ne doivent pas être sous-estimés.

Que ce soit pour des essais thérapeutiques ou la mise en place de marqueurs diagnostics, la réussite des essais sur des cohortes de patients affectées par l'AOH repose sur une définition précise et homogène des groupes soumis à l'étude. A la recherche de facteurs explicatifs de la variabilité de la pénétrance et de la sévérité des phénotypes de l'AOH-nC1Inh, nous avons choisi d'étudier les familles dont au moins un membre est porteur de la mutation c.983A>C du gène *F12*. Cette étude (contrairement à d'autres [176]) identifie des facteurs de sévérité car elle s'appuie sur une définition restrictive de la population avec l'avantage d'inclure un nombre important de sujets (40 familles soit n=176, dont 118 sont porteurs de la mutation et 58 individus apparentés non porteurs). La participation à l'étude de 200 donneurs sains permet de s'affranchir de l'influence des facteurs de susceptibilités familiaux partagés entre les porteurs de la mutation et les sujets apparentés.

Les résultats obtenus au cours de cette étude sont en accord avec des travaux antérieurs du laboratoire qui montrent que la sévérité des crises dépend de l'équilibre entre production, contrôle de la production et catabolisme des kinines. Néanmoins ces deux études se différencient au niveau des facteurs modificateurs identifiés [104]. Cette différence peut être expliquée par le fait que les populations étudiées sont affectées par des mutations sur des gènes différents. En effet, la première étude en 2008, concerne une population AOH-C1Inh et identifie l'activité APP comme facteur modificateur du phénotype clinique [104]. La présente étude porte sur des sujets se présentant avec un AOH-FXII et identifie les activités amidase spontanée, ECA et CPN comme facteurs modificateurs du phénotype. Ces résultats, bien que différents, soutiennent deux hypothèses similaires : (1) la capacité de dégradation des kinines

est un facteur primordial pour l'accumulation des kinines et la sévérité des crises ; (2) l'AOH est une maladie multifactorielle illustrée par la variabilité de pénétrance et la variabilité du phénotype clinique observée au sein d'une même famille. La présence de la maladie est déterminée par le portage de la mutation mais l'expression du phénotype est modulée par des facteurs protecteurs ou aggravants.

La spécificité d'action des enzymes APP, CPN et ECA sur le catabolisme des kinines BK et *desArg*⁹-BK doit être discutée. Les enzymes ECA et CPN sont principalement impliquées dans le catabolisme de BK, alors que l'APP est principalement impliquée dans le catabolisme de *desArg*⁹-BK (Figure 12). On peut alors émettre l'hypothèse que dans les deux formes d'AOH considérées, avec déficit pour C1Inh ou avec mutation sur le gène *F12*, BK et *desArg*⁹-BK et leurs récepteurs respectifs RB2 et RB1, ne présentent pas la même importance pour la pathologie. BK et RB2 semblent essentiels pour l'AOH-FXII alors que *desArg*⁹-BK et RB1 semblent majoritairement impliqués dans l'AOH-C1Inh. Ces considérations pourraient présenter des impacts importants concernant les facteurs déclencheurs des crises et les prises en charge thérapeutiques. Par exemple, ces données suggèrent que l'application de l'icatibant antagoniste de RB2 serait justifiée pour le traitement des crises d'AO chez les sujets affectés par un AOH-FXII, alors que pour l'instant l'AMM ne concerne pas cette population. De même l'induction du RB1 pourrait être un phénomène déclencheur des crises chez les sujets AOH-C1Inh.

La description de la première famille porteuse de deux mutations causales pour l'AOH, l'une sur le gène *F12* et l'autre sur *SERPING1*, présente la pathologie associée avec un facteur de risque pour une maladie sévère, la faible activité CPN. Ceci illustre encore le caractère multifactoriel de l'AO. La forte sévérité des phénotypes cliniques observés au sein de cette famille (apparition des crises avant l'âge de 12 ans associée à une fréquence élevée des attaques) est en cohérence avec l'accumulation des facteurs déterminants pour l'AO. De

plus la coexistence, chez un même sujet de ces deux anomalies, suggère que la prévalence de la mutation sur le gène *F12* n'est pas aussi rare que ce qui avait été postulé.

L'absence de paramètres biologiques communément utilisés pour le diagnostic de l'AOH-nC1Inh rend délicat le diagnostic de cette maladie. En l'absence de mutation sur les gènes *F12* et *SERPING1*, il est nécessaire de mettre des marqueurs biologiques au service des praticiens pour établir le diagnostic d'AO-nC1Inh.

Depuis 2007 et l'ouverture du laboratoire d'exploration de l'AO, la mesure de l'activité amidase spontanée du plasma et l'activité des proenzymes sont des tests disponibles pour le suivi de l'AOH-nC1Inh avec l'appréciation de la capacité à produire des kinines.

L'analyse des données accumulées montrent que l'activité amidase spontanée du plasma est constamment augmentée chez les sujets ayant un déficit pour C1Inh (AOh-C1Inh ou AAE) due au défaut de contrôle de la phase contact associé à ce déficit. Ces situations de forte activité amidase spontanée sont associées à une consommation des proenzymes révélant l'activation profonde et durable du système. L'augmentation de l'activité amidase est cependant transitoire, observable lors de la période de crise, chez les sujets avec un AOH-nC1Inh. Ce qui suggère que FXII ou d'autres protéases de la phase contact sont transitoirement activées en excès, soit par une susceptibilité à l'activation, soit par échappement aux contrôles. L'augmentation de l'activité amidase étant moins vigoureuse dans ces situations, elle ne s'associe pas à la diminution des proenzymes.

L'intérêt d'utiliser l'activité amidase du plasma comme révélateur de l'activité de kininofomation est démontrée par l'association des fortes activités amidases au clivage de HK mesurée par immunoblot anti-HK et donc à la libération de BK.

Les bonnes performances analytiques (sensibilité, spécificité) de ce test ainsi que l'association des données enzymatiques aux données de l'immunoblot démontrent l'intérêt de la mesure de l'activité amidase spontanée et de la réserve des proenzymes en situation de crise

lorsque le diagnostic d'AOH-nC1Inh est évoqué. Néanmoins, les contraintes pré-analytiques de ce test sont fortes (délais d'acheminement, température de transport, dilution de l'anticoagulant), et doivent être impérativement respectées car l'auto-activation des enzymes est un paramètre confondant sensible. Parmi les paramètres confondant, la prise de certains médicaments, pilule œstroprogestative et acide tranexamique, a été étudiée pour son impact sur l'activité amidase. Les œstrogènes sont des facteurs inducteurs reconnus pour l'AOH, néanmoins les mécanismes au travers desquels certaines femmes développent des AO en réponse aux fortes concentrations oestrogéniques sont mal compris mais en cohérence avec l'observation d'une augmentation de l'activité amidase spontanée du plasma sous l'influence des œstrogènes chez les femmes qui ont développé un AO. De façon importante cette augmentation n'est pas observée chez des sujets sains prenant une contraception œstroprogestative. L'activité amidase spontanée se normalise après quelques mois de sevrage du médicament. Ceci évoque une susceptibilité de certains sujets pour l'effet inducteur des œstrogènes sur la kininoformation. Par conséquent lorsque les œstrogènes sont suspectés pour être un élément favorisant la survenue des crises d'AO, il est utile de mesurer l'activité amidase spontanée en présence de l'inducteur puis de contrôler la normalisation de cette activité après 2 à 3 mois de sevrage. D'autre part l'acide tranexamique est utilisé pour le traitement des AO et ses propriétés inhibitrices de la kininoformation, aussi l'impact de cette thérapeutique sur l'activité amidase spontanée du plasma a été évalué. En effet l'acide tranexamique masque *in vitro* l'augmentation de l'activité amidase, le recueil des échantillons pour la mesure de l'activité amidase spontanée doit donc être effectué avant la prise de cette thérapeutique.

L'objectif de cette étude était aussi de faire la distinction entre l'AOH et d'autres conditions de diagnostic différentiel délicat de l'AO à kinine : AO allergique médié par les IgE (n=64), AO histaminique idiopathique (n=62) et maladie inflammatoire chronique (n=23). Les patients atteints d'AO allergique médié par les IgE développent une activité

amidase spontanée et des proenzymes normales. Les patients affectés par un AO histaminique idiopathique développaient une activité amidase spontanée moyenne augmentée, néanmoins seuls 20% des patients de ce groupe présentent une activité amidase spontanée supérieure aux valeurs de références. Ces données évoquent une population non homogène au sein de ce groupe de patient dont une partie pourrait développer des AO avec participation à la fois des médiateurs mastocytaires (histamine, tryptase) mais aussi des kinines. En effet, il existe plusieurs points communs entre la phase contact et l'activation mastocytaire notamment CPN impliquée dans le catabolisme des kinines et des anaphylatoxines, ou KK capable d'activer les convertases du complément, ce qui suggèrent que cette hypothèse pourrait être valide. Et enfin les sujets ayant une maladie inflammatoire chronique ne montraient pas de modification de l'activité amidase spontanée, mais une diminution des proenzymes. Cette consommation des proenzymes peut être associée à l'activation chronique de l'endothélium dans le contexte inflammatoire.

L'activité amidase, sous réserve de respecter les contraintes pré-analytiques, est un bon outil d'aide au diagnostic des AO. Néanmoins dans certaines situations, l'hypothèse de l'implication des kinines est forte (caractéristiques des symptômes, réponses aux traitements) et malgré le recueil de l'échantillon en situation de crise l'activité amidase reste normale parce que l'échantillon est recueilli pendant la phase de résolution de la crise ou après la prise d'acide tranexamique par exemple. Il faut alors poursuivre l'investigation de l'échantillon et l'une des approches proposée est l'examen des espèces moléculaires de HK par immunoblot anti-HK. Le clivage de HK libérant BK est l'élément déterminant le diagnostic de la crise d'AO et le suivi de la coupure de HK par immunoblot est un indicateur de la libération des kinines.

L'analyse des paramètres cinétique de la réaction de clivage de HK par KK n'avait été effectué qu'à 25°C [188]. Cette analyse a été reconduite à 37°C pour plus de vraisemblance avec la physiopathologie humaine de l'AO et à 0°C pour la correspondance avec les

expérimentations *in vitro*. Entre 25 et 37°C les paramètres cinétiques sont similaires, alors qu'à 0°C la réaction est cinq fois plus lente qu'à 37°C. Ces données démontrent la grande tolérance des activités des enzymes pour la température et justifie que les échantillons plasmatiques pour l'examen du métabolisme des kinines soient transportées entre 20 et 25°C. Entre 0 et 4°C les serpinés, qui contrôlent les activités des enzymes, perdent de leurs efficacités [189] alors que nous montrons que la réaction est capable d'être mise en jeu. Pour conserver intacts les paramètres examinés sur les échantillons plasmatiques, il est nécessaire d'éviter les variations de température et de maintenir un thermostat qui garantit l'activité des mécanismes de contrôles pendant le transport.

Contrairement à la courte demi-vie des kinines, le temps de régénération hépatique de HK est long (50 à 60 heures). L'évaluation de la quantité de HK clivé est donc un bon indicateur de la libération des kinines. Les quantités de HK natif (non clivé) dans le plasma diffèrent entre les sujets masculins et féminins, il faut donc différencier ces deux groupes pour établir des valeurs normales et des caractéristiques de performances de la méthode. Cet essai, long à mettre en œuvre, est considéré comme un examen de seconde intention lorsque l'activité amidase n'est pas suffisamment informative. Ce qui nous a conduits à favoriser la spécificité du test plus que la sensibilité. D'après l'analyse de la courbe ROC (de l'anglais "Receiver Operating Characteristic) les concentrations seuils pour HK natif (85 ng• μ L⁻¹ et 65 ng• μ L⁻¹, respectivement pour les hommes et pour les femmes) et HK clivé déterminées (34 % et 40 % respectivement pour les hommes et pour les femmes), apportent une spécificité de 100% pour les sujets masculins (25 patients et 24 donneurs sains) et de 88% pour les sujets féminins (31 patientes et 24 volontaires).

La quantification de HK clivé donne une indication directe sur la production de BK et peut aider le praticien pour mettre clairement en évidence l'implication des kinines dans un phénomène pathologique.

Conclusion

L'AO à kinine représente un prototype d'une pathologie complexe et multifactorielle dont la prise en charge pourrait être améliorée grâce à une meilleure connaissance des systèmes mis en jeu. De nombreuses questions restent en suspens, *e.g.* l'impact de la prise de l'antagoniste du RB2. Une amélioration de la prise en charge passera également par un développement des outils de diagnostic qui accéderont à une meilleure définition des groupes de patients pour ensuite définir des groupes homogènes.

Notre laboratoire développe des outils de diagnostic pour évaluer le métabolisme des kinines au niveau de son contrôle, de leur production et de leur catabolisme. L'équilibre qui résulte de ces activités détermine la capacité d'un individu à accumuler les kinines et par conséquent à développer des angioedèmes (Figure 33). La confrontation de ces différentes activités définit le phénotype biologique des individus. Nos travaux ont conduit à proposer le profil de la kininoformation chez les sujets atteints d'AO à kinine et d'identifier, dans le phénotype biologique du métabolisme des kinines, des facteurs de sévérité différents selon l'étiologie de l'AOH développé. En appui sur les résultats, la détermination du phénotype biologique des patients assurera une définition fine des groupes de patients homogène, pour augmenter la puissance des essais thérapeutiques et des études sur cohortes.

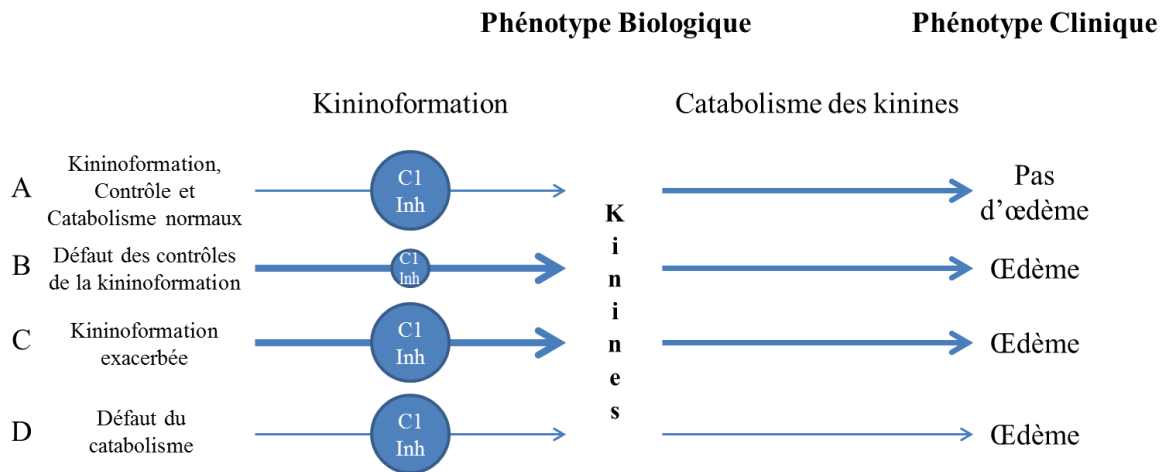


Figure 33 : Les différents phénotypes biologiques du métabolisme des kinines associés à l'angioedème à kinine. Modifié d'après Björkqvist *et al* [182]

A : L'activité de kininoformation, du catabolisme des kinines et le contrôle par C1 Inhibiteur (C1Inh) sont normaux, aucun œdème ne se forme. B : Le contrôle par C1Inh fait défaut, l'activité de kininoformation n'est pas suffisamment contrôlée malgré l'activité du catabolisme des kinines efficace, les kinines s'accumulent et l'œdème peut survenir. C : La kininoformation est exacerbée indépendamment du contrôle par C1Inh malgré l'efficacité du catabolisme des kinines, celles-ci s'accumulent et l'œdème peut survenir. D : Les activités du catabolisme des kinines sont en défaut malgré une activité de kininoformation normale et un contrôle par C1Inh efficace, les kinines s'accumulent sur l'endothélium et l'œdème peut survenir.

Perspectives

Ce travail a apporté les premières données de la définition des phénotypes biologiques associés à l'AO qui doivent être approfondies notamment au niveau (1) de l'implication respectives des récepteurs B1 et B2 dans la survenue des crises, (2) dans la modélisation de la relation entre les activités protéases et la consommation de HK, (3) sur les effets du médicament icatibant et son effet agoniste partiel supposé et (4) de la dépendance entre l'activation de la phase contact et celle des mastocytes.

La définition des phénotypes biologiques des patients atteints angioedèmes nous a conduits à examiner des patients souffrant d'AO d'allure atypique. Le phénotype biologique, de certains de ces patient, pourrait correspondre à un angioedème à kinine (*e.g.* forte activité amidase spontanée relevée, *Cf.* page 65 §5.2.5 et page 97 partie 3) [89][114]. Au vu des nombreux points communs, entre l'activation de la phase contact et l'activation des mastocytes (Figure 25), nous émettons l'hypothèse que l'activation de l'une de ces deux voies entretient ou amplifie l'activation de l'autre voie. Ces mécanismes pourraient conduire à des phénotypes cliniques mixtes d'angioedème avec urticaire [114], qui répondraient partiellement aux thérapeutiques des angioedèmes histaminiques (antihistaminiques à forte dose) et partiellement aux traitements des angioedèmes bradykinique (acide tranexamique par exemple), l'association de ces deux thérapeutiques serait, elle, efficace.

Pour répondre à l'ensemble de ces questions, nous avons développé différents outils d'études *in vitro* de la perméabilité endothéliale, de l'activation de la phase contact et des mastocytes.

Le premier modèle évalue la perméabilité endothéliale et repose sur le système Transwell® ou chambre de Boyden qui représente deux chambres de cultures séparées par une membrane poreuse (Figure 34). Ce dispositif est habituellement appliqué à l'étude des

phénomènes d'interactions cellulaires (co-culture), de mobilité cellulaire et de chimiotactisme. Dans notre application, la membrane poreuse séparant les deux chambres sert de support pour la culture des cellules endothéliales qui vont former à sa surface une monocouche de cellules imperméable modélisant la paroi de l'endothélium vasculaire [190].

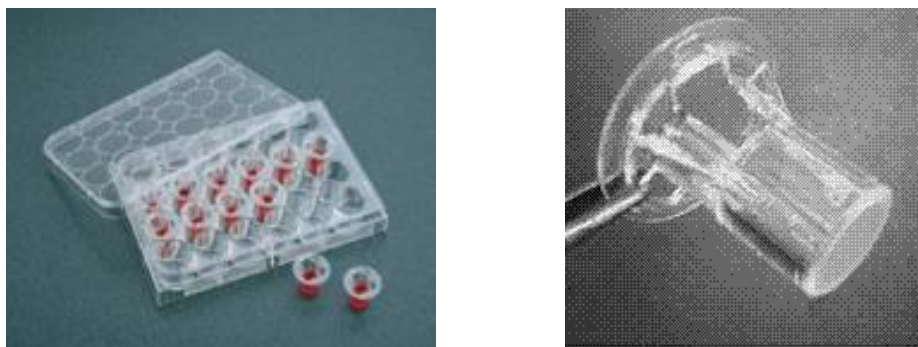


Figure 34 : Système Transwell®.

Nous appliquons les différents stimuli à la culture en monocouche de cellules endothéliales confluentes (lignée EA.hy926 ou cellules primaires HUVECs), à l'état de repos ou à l'état sensibilisé par une cytokine pro-inflammatoire ($\text{TNF}\alpha$, $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$). Ensuite nous suivons la perméabilité de l'endothélium par le transfert d'un fluorochrome d'un compartiment à l'autre. Dans ce modèle, nous avons par exemple confirmé l'activité agoniste partielle et sélective pour RB2 de l'icatibant (Figure 35), observée par ailleurs [191].

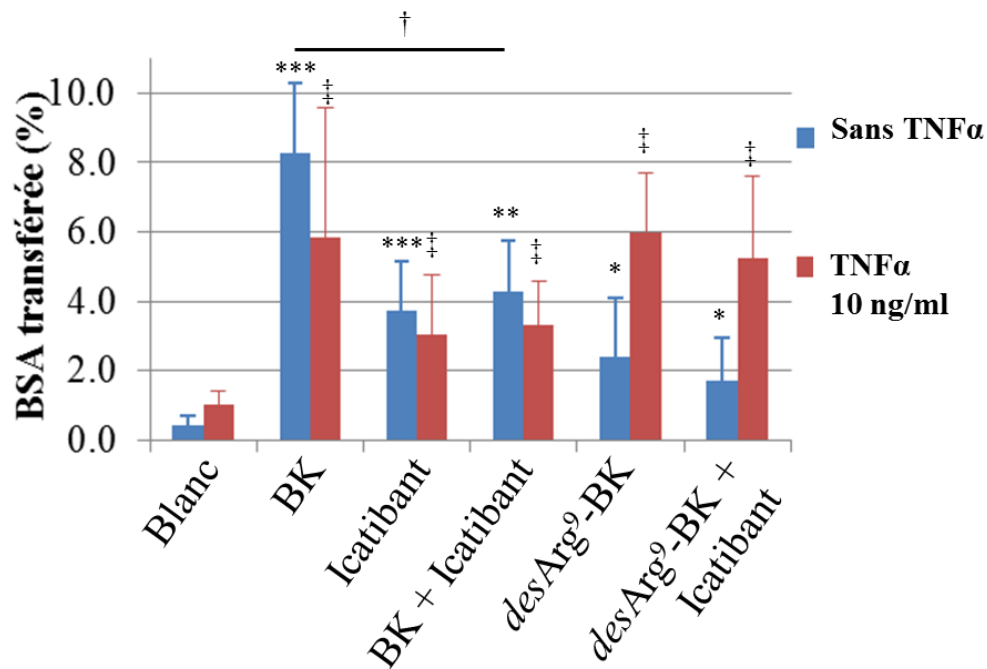


Figure 35 : Perméabilité de l'endothélium : mesure du transfert du traceur par le système Transwell®.

Mesure de l'impact de bradykinine (BK, agoniste du récepteur B2), de *desArg*⁹-BK (agoniste du récepteur B1) et de l'icatibant (antagoniste du récepteur B2) sur la perméabilité d'une monocouche confluente de cellules endothéliales (EA.hy926). La perméabilité est évaluée par le pourcentage du traceur (BSA-FITC) transféré au travers de la monocouche endothéliale. n_≥3. Test de Mann-Whitney. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001 : perméabilité comparée entre le blanc et celle induite par le peptide sans activation de l'endothélium par TNF- α ; ‡ p < 0,05 : perméabilité comparée entre le blanc et celle induite par le peptide avec sensibilisation de l'endothélium par TNF- α ; † p < 0,05 : perméabilité comparée entre le peptide seul et l'association peptide + icatibant.

Le second modèle étudie également la perméabilité endothéliale, mais repose sur la mise en évidence du clivage de VE-Cadhérine, une protéine des jonctions cellulaires adhérentes spécifique des cellules endothéliales. La VE-cadhérine est sensible au clivage enzymatique, le relargage de la forme clivée (90 kDa) reflète les modifications de l'endothélium associée à la perméabilité [192]. Pour illustration, dans ce modèle, nous

observons un clivage de VE-Cadhérine en réponse à BK en partie inhibée par l'ajout d'icatibant et on confirme à nouveau, l'activité agoniste partielle de l'icatibant (Figure 36).

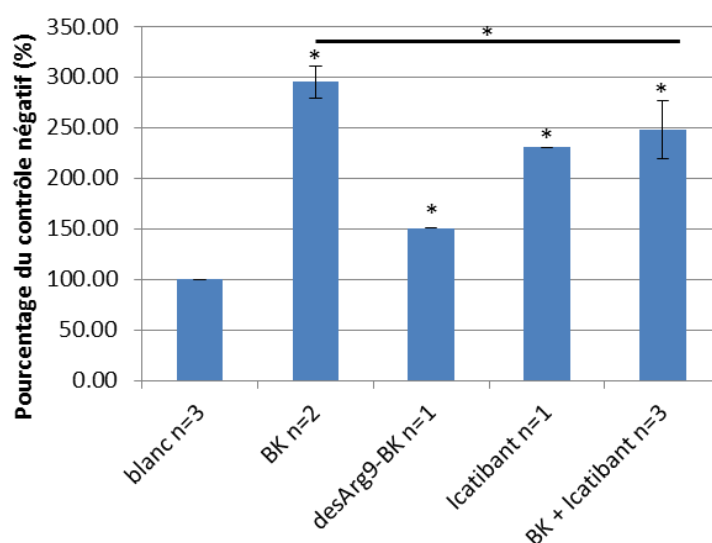


Figure 36 : Perméabilité endothéliale suivie par le clivage et la libération de VE-Cadhérine sous l'influence des kinines et de l'icatibant.

Les cellules EA.hy926 confluentes, à l'état basal, sont incubées 6h avec les différents peptides à la concentration finale de 1.10^{-5} M. Les surnageants sont ensuite chargés sur un gel de polyacrylamide (8 %) en présence de laurylsulfate de sodium et en conditions dénaturantes. Après le transfert sur membrane de nitrocellulose, la VE-Cadhérine est mise en évidence (anticorps primaire de souris, BV9, Abcam® 1/500^{ème} et anticorps secondaire anti-souris conjugué avec HRP NA913V, GE Healthcare life sciences® 1/5000^{ème}, caméra Biorad ChemiDoc XRS+). Sur l'image, la quantification de la densité des pixels de chacune des bandes (logiciel Image Lab Software) est rapportée à celle du contrôle et est exprimé en %. $n \geq 3$. Mann Whitney : * $p < 0,05$.

Le troisième modèle vise à comprendre l'activation de la phase contact et repose sur sa reconstitution à l'aide de protéines purifiées (FXII, pKK et HK, Cf page 96). L'activation de la phase contact, en réponse à différents activateurs, est suivie à l'aide du substrat *p*-nitroanilide ou par l'examen du clivage de HK par immunoblot (Figure 37). Cette investigation est appropriée à l'évaluation du contrôle par C1Inh ou par d'autres conditions expérimentales reproduisant les conditions de la pathologie.

Le quatrième modèle développé étudie l'activation mastocytaire par l'intermédiaire du dosage de PGD₂ produit par les cellules de la lignée LUVA [193]. Les produits d'activation des mastocytes peuvent ensuite être appliqués sur les trois modèles décrits précédemment pour déterminer l'impact des produits d'activation du mastocyte sur l'activation de la phase contact (Figure 37) et la perméabilité endothéliale. Et inversement les produits d'activation de la phase contact peuvent être appliqués sur les mastocytes pour mesurer leurs effets activateurs sur ces cellules.

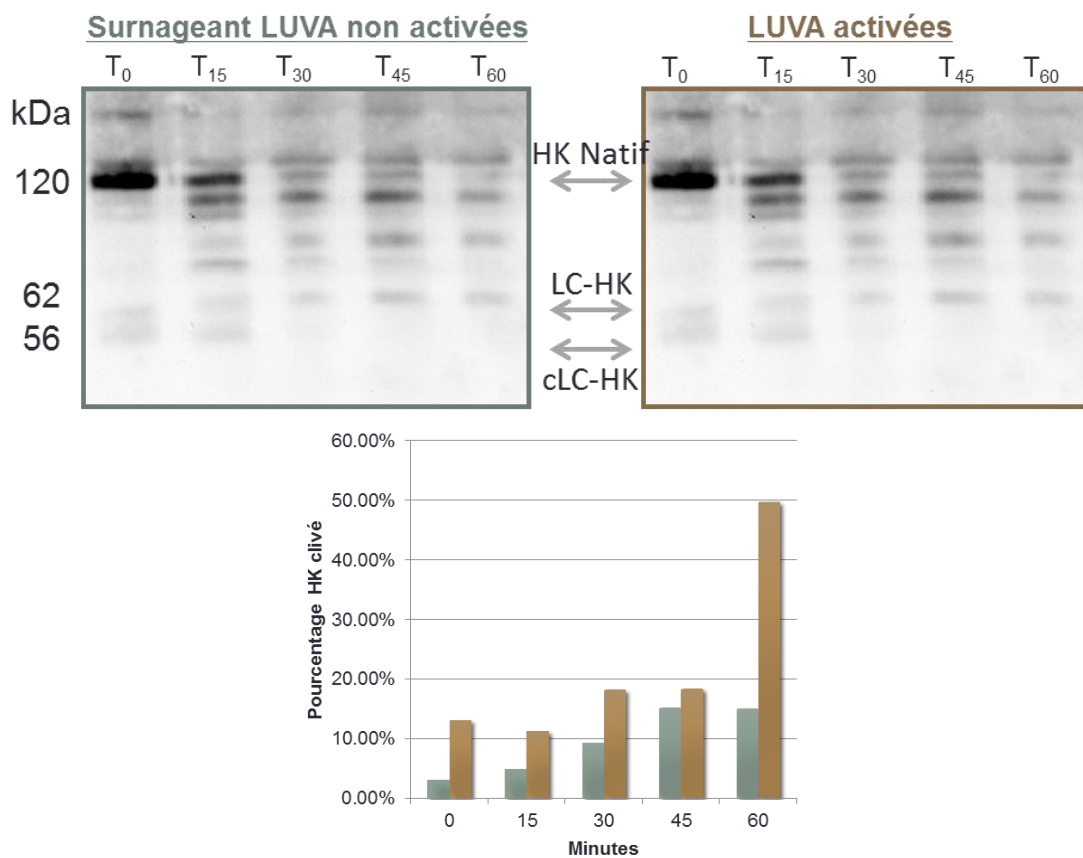


Figure 37 : Augmentation de l'activation de la phase contact par le surnageant des mastocytes activés.

Les cellules LUVA sont activées par 1 μ M de Calcium ionophore (6 h, 37°C, 5 % CO₂). Avant collecte des surnageants. L'activation des mastocytes est confirmée par le dosage de PGD₂ (EIA Kit, Cayman®). Les surnageants activés ou non sont mis en contact avec le mélange de protéine purifiée : FXIIa, pKK et HK (37°C). Des échantillons sont prélevés à partir de ce mélange (0, 15, 30, 45 et 60 minutes) et examinés par immunoblot (en condition dénaturante, gel d'acrylamide 8%, anticorps anti-HK couplé à la peroxydase Enzyme Research®).

Ces différents outils sont en cours de développement ; ils nous assureront la poursuite des investigations sur la définition des phénotypes biologiques des patients souffrant d'angioedème à kinine. En appui sur les données déjà développées par les équipes de F. Bossi dans l'AO-C1Inh [190], de JW. Steinke dans l'urticaire chronique idiopathique [194] et T. Renné dans l'anaphylaxie [195], ces différents modèles nous permettront également d'avancer sur la connaissance des effets biopathologiques des plasmas issus des différents groupes bien définis et sélectionnés parmi les patients atteints d'AO.

Bibliographie

1. Abelous J, Bardier E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *Comptes rendus des séances de la société de biologie*. 1909, 66, p.511–520.
2. Frey EK, Kraut H. Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. *Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*. 1928, 133, p.1–56.
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. *The American Journal of Physiology*. 1949, 156, p.261–273.
4. Proud D, Baumgarten CR, Naclerio RM et al. Kinin metabolism in human nasal secretions during experimentally induced allergic rhinitis. *Journal of Immunology*. 1987, 138, p.428–434.
5. Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood*. 1997, 90, p.3819–3843.
6. Pixley RA, Espinola RG, Ghebrehiwet B et al. Interaction of high-molecular-weight kininogen with endothelial cell binding proteins suPAR, gC1qR and cytokeratin 1 determined by surface plasmon resonance (BiaCore). *Thrombosis and Haemostasis*. 2011, 105, p.1053–1059.
7. Mori K, Nagasawa S. Studies on human high molecular weight (HMW) kininogen. II. Structural change of HMW kininogen by the action of human plasma kallikrein. *Journal of Biochemistry*. 1981, 89, p.1465–1473.
8. Kaufmann J, Haasemann M, Modrow S et al. Structural dissection of the multidomain kininogens. Fine mapping of the target epitopes of antibodies interfering with their functional properties. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993, 268, p.9079–9091.
9. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH. Identification and characterization of prolylcarboxypeptidase as an endothelial cell prekallikrein activator. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, 277, p.17962–17969.
10. Joseph K, Tholanikunnel BG, Kaplan AP. Heat shock protein 90 catalyzes activation of the prekallikrein-kininogen complex in the absence of factor XII. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, 99, p.896–900.
11. Kaplan AP, Ghebrehiwet B. The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Molecular Immunology*. 2010, 47, p.2161–2169.
12. Renné T, Schmaier AH, Nickel KF et al. In vivo roles of factor XII. *Blood*. 2012, 120, p.4296–4303.
13. Woodruff RS, Sullenger B, Becker RC. The many faces of the contact pathway and their role in thrombosis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*. 2011, 32, p.9–20.

14. Johnes J, Blume C, Benz PM et al. Platelets promote coagulation factor XII-mediated proteolytic cascade systems in plasma. *Biological chemistry*. 2006, 387, p.173–178.
15. Puy C, Tucker EI, Wong ZC et al. Factor XII promotes blood coagulation independent of factor XI in the presence of long-chain polyphosphates. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2013, 11, p.1341–1352.
16. Ginsberg MH, Jaques B, Cochrane CG et al. Urate crystal-dependent cleavage of Hageman factor in human plasma and synovial fluid. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1980, 95, p.497–506.
17. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F et al. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, 104, p.6388–6393.
18. Wilner GD, Nossel HL, LeRoy EC. Activation of Hageman factor by collagen. *The Journal of Clinical Investigation*. 1968, 47, p.2608–2615.
19. Morrison DC, Cochrane CG. Direct evidence for Hageman factor (factor XII) activation by bacterial lipopolysaccharides (endotoxins). *The Journal of Experimental Medicine*. 1974, 140, p.797–811.
20. Shibayama Y, Joseph K, Nakazawa Y et al. Zinc-dependent activation of the plasma kinin-forming cascade by aggregated beta amyloid protein. *Clinical Immunology (Orlando, Fla)*. 1999, 90, p.89–99.
21. Stavrou E, Schmaier AH. Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thrombosis Research*. 2010, 125, p.210–215.
22. Tang J, Yu CL, Williams SR et al. Expression, crystallization, and three-dimensional structure of the catalytic domain of human plasma kallikrein. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005, 280, p.41077–41089.
23. Björkqvist J, Jämsä A, Renné T. Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme. *Thrombosis and Haemostasis*. 2013, 110, p.399–407.
24. Mahabeer R, Bhoola KD. Kallikrein and kinin receptor genes. *Pharmacology & Therapeutics*. 2000, 88, p.77–89.
25. Zhou GX, Chao L, Chao J. Kallistatin: a novel human tissue kallikrein inhibitor. Purification, characterization, and reactive center sequence. *Journal of Biological Chemistry*. 1992, 267, p.25873–25880.
26. Geiger R, Stuckstedte U, Clausnitzer B et al. Progressive inhibition of human glandular (urinary) kallikrein by human serum and identification of the progressive antikallikrein as alpha 1-antitrypsin (alpha 1-protease inhibitor). *Hoppe Seyler's Zeitschrift Physiologische Chemie*. 1981, 362, p.317–325.
27. Schaller J, Gerber SS. The plasmin–antiplasmin system: structural and functional aspects. *Cellular and molecular life sciences*. 2011, 68, p.785–801.

28. Law RHP, Abu-Ssaydeh D, Whisstock JC. New insights into the structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Current Opinion in Structural Biology*. 2013, 23, p.836–841.
29. Castellino FJ. Plasmin. In: *Plasmin*. London: Neil D. Rawlings & Guy S. Salesen 2013: 2958–2968.
30. Saito H. Studies on Fletcher trait and Fitzgerald trait. A rare chance to disclose body's defense reactions against injury. *Thrombosis and Haemostasis*. 2010, 104, p.867–874.
31. Davis AE 3rd, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thrombosis and Haemostasis*. 2010, 104, p.886–893.
32. Saito H, Goldsmith GH, Moroi M et al. Inhibitory spectrum of alpha 2-plasmin inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1979, 76, p.2013–2017.
33. Pixley RA, Schapira M, Colman RW. The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*. 1985, 260, p.1723–1729.
34. Reddigari S, Silverberg M, Kaplan AP. Bradykinin formation in allergic diseases. In: *Bradykinin formation in allergic diseases*. Stephen G Farmer 1997: 265–285.
35. Van der Graaf F, Koedam JA, Bouma BN. Inactivation of kallikrein in human plasma. *Journal of Clinical Investigation*. 1983, 71, p.149–158.
36. Cugno M, Zanichelli A, Foieni F et al. C1-inhibitor deficiency and angioedema: molecular mechanisms and clinical progress. *Trends in Molecular Medicine*. 2009, 15, p.69–78.
37. Zeerleder S. C1-inhibitor: more than a serine protease inhibitor. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2011, 37, p.362–374.
38. Singer M, Jones AM. Bench-to-bedside review: the role of C1-esterase inhibitor in sepsis and other critical illnesses. *Critical care (London, England)*. 2011, 15, p.203.
39. Davis AE. Biological effects of C1 inhibitor. *Drug News & Perspectives*. 2004, 17, p.439–446.
40. López-Lera A, Garrido S, Roche O et al. SERPING1 mutations in 59 families with hereditary angioedema. *Molecular Immunology*. 2011, 49, p.18–27.
41. Rehman AA, Ahsan H, Khan FH. Alpha-2-macroglobulin: A physiological guardian. *Journal of Cellular Physiology*. 2013, 228, p.1665–1675.
42. Harpel PC. Human plasma alpha 2-macroglobulin. *The Journal of Experimental Medicine*. 1970, 132, p.329–352.
43. Cyr M, Lepage Y, Blais C et al. Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2001, 281, p.H275–H283.

44. Mc Carthy DA, Potter DE, Nicolaidis E. An in vivo estimation of the potencies and half-lives of synthetic bradykinin and kallidin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1965, 148, p.117–122.
45. Audet R, Rioux F, Drapeau G et al. Cardiovascular effects of Sar-[d-Phe⁸]des-Arg⁹-Bradykinin, a metabolically protected agonist of B1 receptor for kinins, in the anesthetized rabbit pretreated with a sublethal dose of bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1997, 280, p.6–15.
46. Blais C Jr, Marceau F, Rouleau JL et al. The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides*. 2000, 21, p.1903–1940.
47. Blaes N, Girolami J-P. Targeting the ‘Janus face’ of the B2-bradykinin receptor. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2013, 17, p.1145–1166.
48. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F et al. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *The Journal of Clinical Investigation*. 1990, 86, p.1343–1346.
49. Molinaro G, Carmona AK, Juliano MA et al. Human recombinant membrane-bound aminopeptidase P: production of a soluble form and characterization using novel, internally quenched fluorescent substrates. *The Biochemical journal*. 2005, 385, p.389–397.
50. Nowak W, Goldschmidt ED, Falcioni AG et al. Functional evidence of des-Arg¹⁰-kallidin enzymatic inactivating pathway in isolated human umbilical vein. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 2007, 375, p.221–229.
51. Ward PE, Chow A, Drapeau G. Metabolism of bradykinin agonists and antagonists by plasma aminopeptidase P. *Biochemical Pharmacology*. 1991, 42, p.721–727.
52. Cilia La Corte AL, Carter AM, Rice GI et al. A functional XPNPEP2 promoter haplotype leads to reduced plasma aminopeptidase P and increased risk of ACE inhibitor-induced angioedema. *Human Mutation*. 2011, 32, p.1326–1331.
53. Ryan JW, Berryer P, Chung AY et al. Characterization of rat pulmonary vascular aminopeptidase P in vivo: role in the inactivation of bradykinin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1994, 269, p.941–947.
54. Lefebvre J, Murphey LJ, Hartert TV et al. Dipeptidyl Peptidase IV Activity in patients with ACE-inhibitor-associated angioedema. *Hypertension*. 2002, 39, p.460–464.
55. Wiedeman PE. DPPiV Inhibition: Promising Therapy for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Progress in Medicinal Chemistry*. 2007, 45, p.63–109.
56. Pare G, Kubo M, Byrd JB et al. Genetic variants associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Pharmacogenetics and genomics*. 2013, 23, p.470–478.
57. Leeb-Lundberg LMF, Marceau F, Müller-Esterl W et al. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacological Reviews*. 2005, 57, p.27–77.

58. Pizard A, Blaukat A, Müller-Esterl W et al. Bradykinin-induced internalization of the human B2 receptor requires phosphorylation of three serine and two threonine residues at its carboxyl tail. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999, 274, p.12738–12747.
59. Bachvarov DR, Houle S, Bachvarova M et al. Bradykinin B2 receptor endocytosis, recycling, and down-regulation assessed using green fluorescent protein conjugates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001, 297, p.19–26.
60. Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G et al. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2005, 99, p.6–38.
61. Regoli D, Barabé J, Park WK. Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1977, 55, p.855–867.
62. Hess JF, Borkowski JA, Macneil T et al. Differential pharmacology of cloned human and mouse B2 bradykinin receptors. *Molecular Pharmacology*. 1994, 45, p.1–8.
63. Bélanger S, Bovenzi V, Côté J et al. Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin B2 receptor. *Peptides*. 2009, 30, p.777–787.
64. Savard M, Labonté J, Dubuc C et al. Further pharmacological evaluation of a novel synthetic peptide bradykinin B2 receptor agonist. *Biological chemistry*. 2013, 394, p.353–360.
65. Bastian S, Loillier B, Paquet JL et al. Stable expression of human kinin B1 receptor in 293 cells: pharmacological and functional characterization. *British Journal of Pharmacology*. 1997, 122, p.393–399.
66. Rhaleb N, Telemaque S, Rouissi N et al. Structure-activity studies of bradykinin and related peptides. B2- receptor antagonists. *Hypertension*. 1991, 17, p.107–115.
67. Sawutz DG, Salvino JM, Dolle RE et al. The nonpeptide WIN 64338 is a bradykinin B2 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994, 91, p.4693–4697.
68. Altamura M, Meini S, Quartara L et al. Nonpeptide antagonists for kinin receptors. *Regulatory Peptides*. 1999, 80, p.13–26.
69. Griesbacher T, Legat FJ. Effects of the non-peptide B2 receptor antagonist FR173657 in models of visceral and cutaneous inflammation. *Inflammation Research*. 2000, 49, p.535–540.
70. Marceau F, Levesque L, Drapeau G et al. Effects of peptide and nonpeptide antagonists of bradykinin B2 receptors on the vasoconstrictor action of bradykinin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1994, 269, p.1136–1143.
71. Pruneau D, Luccarini JM, Fouchet C et al. LF 16.0335, a novel potent and selective nonpeptide antagonist of the human bradykinin B2 receptor. *British Journal of Pharmacology*. 1998, 125, p.365–372.
72. Pruneau D, Paquet JL, Luccarini JM et al. Pharmacological profile of LF 16-0687, a new potent non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist. *Immunopharmacology*. 1999, 43, p.187–194.

73. Marceau F, Fortin J-P, Morissette G et al. A non-peptide antagonist unusually selective for the human form of the bradykinin B2 receptor. *International Immunopharmacology*. 2003, 3, p.1529–1536.
74. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 Receptors for Kinins. *Pharmacological Reviews*. 1998, 50, p.357–386.
75. Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A et al. Bradykinin receptors and their antagonists. *European Journal of Pharmacology*. 1998, 348, p.1–10.
76. Whalley ET, Figueroa CD, Gera L et al. Discovery and therapeutic potential of kinin receptor antagonists. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2012, 7, p.1129–1148.
77. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacological Reviews*. 1992, 44, p.1–80.
78. Couture R, Harrisson M, Vianna RM et al. Kinin receptors in pain and inflammation. *European Journal of Pharmacology*. 2001, 429, p.161–176.
79. Cassim B, Mody G, Bhoola KD. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. *Pharmacology & Therapeutics*. 2002, 94, p.1–34.
80. Meini S, Maggi CA. Knee osteoarthritis: a role for bradykinin? *Inflammation Research*. 2008, 57, p.351–361.
81. Cruden NLM, Newby DE. Therapeutic potential of icatibant (HOE-140, JE-049). *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2008, 9, p.2383–2390.
82. Oschatz C, Maas C, Lecher B et al. Mast cells increase vascular permeability by heparin-initiated bradykinin formation in vivo. *Immunity*. 2011, 34, p.258–268.
83. Kozik A, Moore RB, Potempa J et al. A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites. Diverse effects of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikreins on native and oxidized kininogens. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998, 273, p.33224–33229.
84. Cohan VL, MacGlashan DW Jr, Warner JA et al. Mechanisms of mediator release from human skin mast cells upon stimulation by the bradykinin analog, [DArg0-Hyp3-DPhe7]bradykinin. *Biochemical Pharmacology*. 1991, 41, p.293–300.
85. Gulliver R, Baltic S, Misso NL et al. Lys-des[Arg9]-bradykinin alters migration and production of interleukin-12 in monocyte-derived dendritic cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2011, 45, p.542–549.
86. Böckmann S, Paegelow I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 2000, 68, p.587–592.
87. Sato E, Koyama S, Nomura H et al. Bradykinin stimulates alveolar macrophages to release neutrophil, monocyte, and eosinophil chemotactic activity. *Journal of Immunology*. 1996, 157, p.3122–3129.

88. Thornton E, Ziebell JM, Leonard AV et al. Kinin receptor antagonists as potential neuroprotective agents in central nervous system injury. *Molecules*. 2010, 15, p.6598–6618.
89. Defendi F, Charignon D, Ghannam A et al. Enzymatic assays for the diagnosis of bradykinin-dependent angioedema. *PloS One*. 2013, 8, p.e70140.
90. Defendi F, Charignon D, Csopaki F et al. Actualités biologiques sur les angioedèmes à kinines. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2012, 2012, p.39–52.
91. Kalmár L, Hegedüs T, Farkas H et al. HAEdb: a novel interactive, locus-specific mutation database for the C1 inhibitor gene. *Human Mutation*. 2005, 25, p.1–5.
92. Bouillet-Claveyrolas L, Ponard D, Drouet C et al. Clinical and biological distinctions between type I and type II acquired angioedema. *The American Journal of Medicine*. 2003, 115, p.420–421.
93. Cichon S, Martin L, Hennies HC et al. Increased activity of coagulation factor XII (Hageman factor) causes hereditary angioedema type III. *American Journal of Human Genetics*. 2006, 79, p.1098–1104.
94. Dewald G, Bork K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006, 343, p.1286–1289.
95. Bork K, Wulff K, Meinke P et al. A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. *Clinical Immunology (Orlando, Fla)*. 2011, 141, p.31–35.
96. Kiss N, Barabás E, Várnai K et al. Novel duplication in the F12 gene in a patient with recurrent angioedema. *Clinical Immunology (Orlando, Fla)*. 2013, 149, p.142–145.
97. Duan QL, Nikpoor B, Dube M-P et al. A variant in XPNPEP2 is associated with angioedema induced by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. *American Journal of Human Genetics*. 2005, 77, p.617–626.
98. Cao H, Hegele RA. DNA polymorphism and mutations in CPN1, including the genomic basis of carboxypeptidase N deficiency. *Journal of Human Genetics*. 2003, 48, p.20–22.
99. Roberts JR, Lee JJ, Marthers DA. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor angioedema: the silent epidemic. *The American journal of cardiology*. 2012, 109, p.774–775.
100. Toh S RM. Comparative risk for angioedema associated with the use of drugs that target the renin-angiotensin-aldosterone system. *Archives of Internal Medicine*. 2012, 172, p.1582–1589.
101. Brown NJ, Byiers S, Carr D et al. Dipeptidyl peptidase-IV inhibitor use associated with increased risk of ACE inhibitor-associated angioedema. *Hypertension*. 2009, 54, p.516–523.
102. Adam A, Cugno M, Molinaro G et al. Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors. *Lancet*. 2002, 359, p.2088–2089.

103. Baroso R, Favier B, Charignon D et al. High molecular weight kininogen cleavage by kallikrein: kinetics, mathematical model, and applications for biological diagnostics of angioedema. *In preparation*.
104. Drouet C, Désormeaux A, Robillard J et al. Metallopeptidase activities in hereditary angioedema: Effect of androgen prophylaxis on plasma aminopeptidase P. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008, 121, p.429–433.
105. Charignon D, Ghannam A, Defendi F et al. Hereditary angioedema with F12 mutation: factors modifying clinical phenotype. *Allergy*. 2014, p.doi: 10.1111/all.12515.
106. Campbell DJ. Losartan Increases Bradykinin Levels in Hypertensive Humans. *Circulation*. 2005, 111, p.315–320.
107. Shino M, Takahashi K, Murata T et al. Angiotensin II receptor blocker-induced angioedema in the oral floor and epiglottis. *American Journal of Otolaryngology*. 2011, 32, p.624–626.
108. Bonde MM, Olsen KB, Erikstrup N et al. The angiotensin II type 1 receptor antagonist Losartan binds and activates bradykinin B2 receptor signaling. *Regulatory Peptides*. 2011, 167, p.21–25.
109. Quitterer U, AbdAlla S. Vasopressor meets vasodepressor: The AT1-B2 receptor heterodimer. *Biochemical Pharmacology*. 2014, 88, p.284–290.
110. Zhu L, Carretero OA, Xu J et al. Angiotensin II type 2 receptor-stimulated activation of plasma prekallikrein and bradykinin release: role of SHP-1. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2012, 302, p.H2553–H2559.
111. Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H et al. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *Journal of Clinical Investigation*. 1999, 104, p.925–935.
112. Binkley KE, Davis A 3rd. Clinical, biochemical, and genetic characterization of a novel estrogen-dependent inherited form of angioedema. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000, 106, p.546–550.
113. Binkley KE, Davis AE 3rd. Estrogen-dependent inherited angioedema. *Transfusion and apheresis science: official journal of the World Apheresis Association: official journal of the European Society for Haemapheresis*. 2003, 29, p.215–219.
114. Giard C, Nicolie B, Drouet M et al. Angio-oedema induced by oestrogen contraceptives is mediated by bradykinin and is frequently associated with urticaria. *Dermatology (Basel, Switzerland)*. 2012, 225, p.62–69.
115. Campbell SJ, Mackie IJ, Robinson GE et al. Contact factor mediated fibrinolysis is increased by the combined oral contraceptive pill. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 1993, 100, p.79–84.
116. Zotter Z, Csuka D, Szabó E et al. The influence of trigger factors on hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2014, 9, p.44.

117. Pappalardo E, Zingale LC, Cicardi M. Increased expression of C1-inhibitor mRNA in patients with hereditary angioedema treated with Danazol. *Immunology Letters*. 2003, 86, p.271–276.
118. Caballero T, Baeza ML, Cabañas R et al. Consensus statement on the diagnosis, management, and treatment of angioedema mediated by bradykinin. Part II. Treatment, follow-up, and special situations. *Journal of investigational allergology & clinical immunology*. 2011, 21, p.422–441; quiz 442–443.
119. Ritchie BC. Protease inhibitors in the treatment of hereditary angioedema. *Transfusion and Apheresis Science*. 2003, 29, p.259–267.
120. Levi M, Choi G, Picavet C et al. Self-administration of C1-inhibitor concentrate in patients with hereditary or acquired angioedema caused by C1-inhibitor deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2006, 117, p.904–908.
121. Chyung Y, Vince B, Iarrobino R et al. A phase 1 study investigating DX-2930 in healthy subjects. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2014, 113, p.460–466.e2.
122. Bhattacharjee G, Revenko AS, Crosby JR et al. Inhibition of vascular permeability by antisense-mediated inhibition of plasma kallikrein and coagulation factor 12. *Nucleic Acid Therapeutics*. 2013, 23, p.175–187.
123. Saule C, Boccon-Gibod I, Fain O et al. Benefits of progestin contraception in non-allergic angioedema. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2013, 43, p.475–482.
124. Charignon D, Späth P, Martin L et al. Icatibant, the bradykinin B2 receptor antagonist with target to the interconnected kinin systems. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2012, 13, p.2233–2247.
125. Stolz LE, Sheffer AL. Prospective, double-blind, placebo-controlled trials of ecallantide for acute attacks of hereditary angioedema. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2012, 8, p.25–32.
126. Fox RH, Goldsmith R, Kidd DJ et al. Bradykinin as a vasodilator in man. *The Journal of Physiology*. 1961, 157, p.589–602.
127. Regoli D, Plante GE, Gobeil F Jr. Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacology & therapeutics*. 2012, 135, p.94–111.
128. Caen J, Wu Q. Hageman factor, platelets and polyphosphates: early history and recent connection. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2010, 8, p.1670–1674.
129. Manolis AJ, Marketou ME, Gavras I et al. Cardioprotective properties of bradykinin: role of the B(2) receptor. *Hypertension research*. 2010, 33, p.772–777.
130. Lagneux C, Bader M, Pesquero JB et al. Detrimental implication of B1 receptors in myocardial ischemia: evidence from pharmacological blockade and gene knockout mice. *International Immunopharmacology*. 2002, 2, p.815–822.

131. Hellal F, Pruneau D, Palmier B et al. Detrimental role of bradykinin B2 receptor in a murine model of diffuse brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2003, 20, p.841–851.
132. Austinat M, Braeuninger S, Pesquero JB et al. Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema. *Stroke*. 2009, 40, p.285–293.
133. Parenti A, Morbidelli L, Ledda F et al. The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB journal*. 2001, 15, p.1487–1489.
134. Yu H-S, Wang S-W, Chang A-C et al. Bradykinin promotes vascular endothelial growth factor expression and increases angiogenesis in human prostate cancer cells. *Biochemical Pharmacology*. 2014, 87, p.243–253.
135. Ghannam A, Defendi F, Charignon D et al. Contact system activation in patients with HAE and normal C1 Inhibitor function. *Immunology and allergy clinics of North America*. 2013, 33, p.513–533.
136. Proud D, Kaplan AP. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annual review of immunology*. 1988, 6, p.49–83.
137. Proud D, Togias A, Naclerio RM et al. Kinins are generated in vivo following nasal airway challenge of allergic individuals with allergen. *The Journal of clinical investigation*. 1983, 72, p.1678–1685.
138. Kakoki M, Smithies O. The kallikrein-kinin system in health and in diseases of the kidney. *Kidney international*. 2009, 75, p.1019–1030.
139. Zaika O, Mamenko M, O’Neil RG et al. Bradykinin acutely inhibits activity of the epithelial Na⁺ channel in mammalian aldosterone-sensitive distal nephron. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 2011, 300, p.F1105–F1115.
140. Marre M, Bernadet P, Gallois Y et al. Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic retinal and renal complications. *Diabetes*. 1994, 43, p.384–388.
141. Maltais I, Bachvarova M, Maheux P et al. Bradykinin B2 receptor gene polymorphism is associated with altered urinary albumin/creatinine values in diabetic patients. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2002, 80, p.323–327.
142. Maeda H. Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. *Proceedings of the Japan Academy, Series B Physical and biological sciences*. 2012, 88, p.53–71.
143. Wu J, Akaike T, Hayashida K et al. Identification of bradykinin receptors in clinical cancer specimens and murine tumor tissues. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2002, 98, p.29–35.
144. Kashuba E, Bailey J, Allsup D et al. The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*. 2013, 18, p.279–296.

145. Duka I, Shenouda S, Johns C et al. Role of the B2 Receptor of Bradykinin in Insulin Sensitivity. *Hypertension*. 2001, 38, p.1355–1360.
146. Catalioto R-M, Valenti C, Liverani L et al. Characterization of a novel proinflammatory effect mediated by BK and the kinin B₂ receptor in human preadipocytes. *Biochemical Pharmacology*. 2013, 86, p.508–520.
147. Fonseca RG, Sales VM, Ropelle E et al. Lack of kinin B1 receptor potentiates leptin action in the liver. *Journal of molecular medicine*. 2013, 91, p.851–860.
148. Okada Y, Tuchiya Y, Yagyu M et al. Synthesis of bradykinin fragments and their effect on pentobarbital sleeping time in mouse. *Neuropharmacology*. 1977, 16, p.381–383.
149. Kariya K, Yamauchi A. Effects of intraventricular injection of bradykinin on the EEG and the blood pressure in conscious rats. *Neuropharmacology*. 1981, 20, p.1221–1224.
150. Green PG, Luo J, Heller P et al. Modulation of bradykinin-induced plasma extravasation in the rat knee joint by sympathetic co-transmitters. *Neuroscience*. 1993, 52, p.451–458.
151. Walker K, Perkins M, Dray A. Kinins and kinin receptors in the nervous system. *Neurochemistry International*. 1995, 26, p.1–16.
152. Joseph K, Shibayama Y, Nakazawa Y et al. Interaction of factor XII and high molecular weight kininogen with cytokeratin 1 and gC1qR of vascular endothelial cells and with aggregated Abeta protein of Alzheimer's disease. *Immunopharmacology*. 1999, 43, p.203–210.
153. Ashby EL, Love S, Kehoe PG. Assessment of activation of the plasma kallikrein-kinin system in frontal and temporal cortex in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiology of aging*. 2012, 33, p.1345–1355.
154. Janeway CA, Murphy K, Travers P et al. *Immunobiologie*. 3ème édition. De Boeck
155. Association des enseignants d'immunologie (ASSIM), Société française d'immunologie (SFI). *Guide des analyses en immunologie Indications, critères de réalisation et limite*. Elsevier Masson
156. Brink C, Dahlén S-E, Drazen J et al. International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacological Reviews*. 2003, 55, p.195–227.
157. Wilson DA, Bork K, Shea EP et al. Economic costs associated with acute attacks and long-term management of hereditary angioedema. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2010, 104, p.314–320.
158. Aygören-Pürsün E, Bygum A, Beusterien K et al. Socioeconomic burden of hereditary angioedema: results from the hereditary angioedema burden of illness study in Europe. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2014, 9, p.99.
159. Gómez-Traseira C, López-Lera A, Drouet C et al. Hereditary angioedema caused by the p.Thr309Lys mutation in the F12 gene: A multifactorial disease. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013, 132, p.986–989.e5.

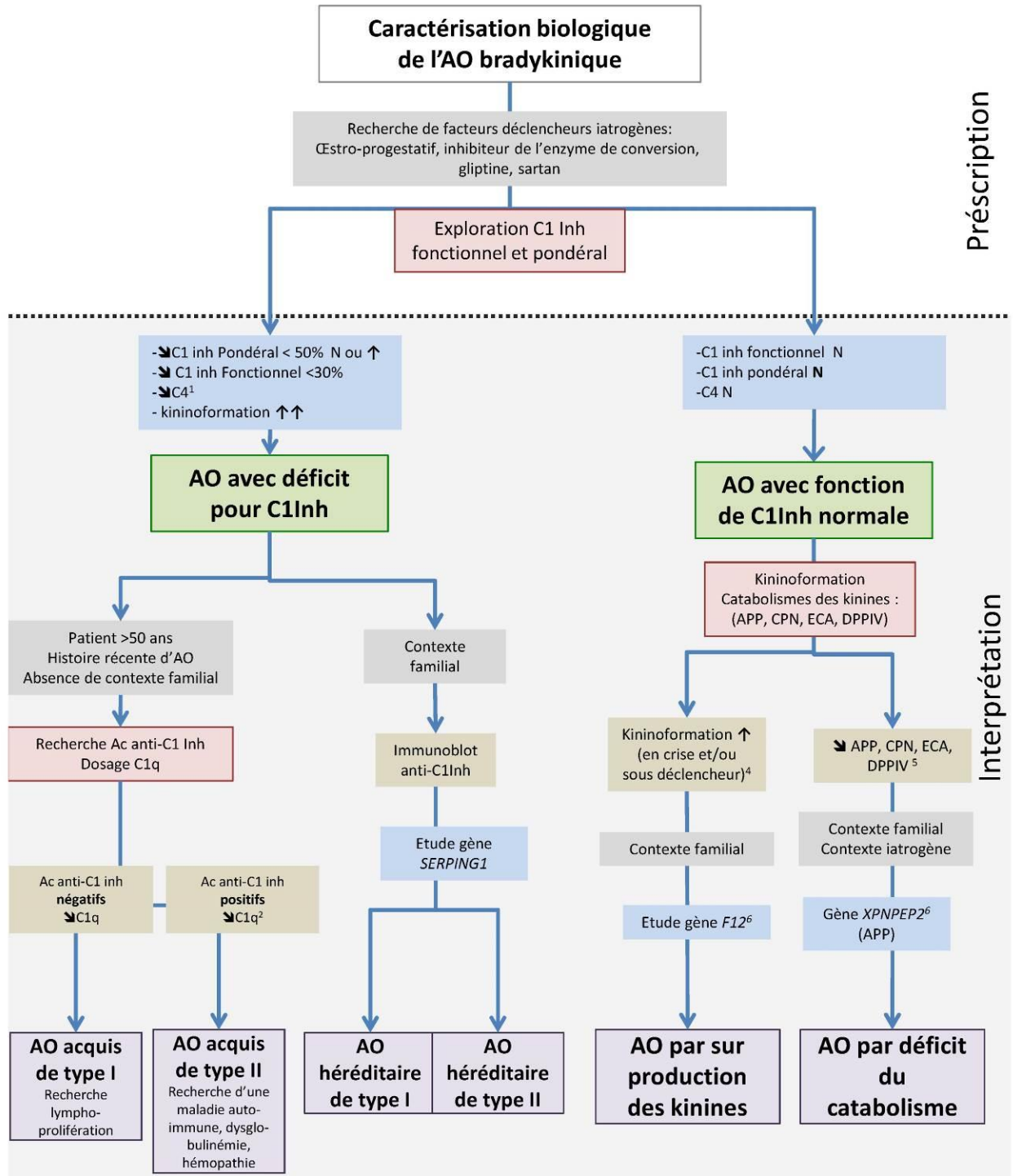
160. Warin RP, Cunliffe WJ, Greaves MW et al. Recurrent angioedema: familial and oestrogen-induced. *The British journal of dermatology*. 1986, 115, p.731–734.
161. Zuraw BL, Bork K, Binkley KE et al. Hereditary angioedema with normal C1 inhibitor function: consensus of an international expert panel. *Allergy and Asthma Proceedings: The Official Journal of Regional and State Allergy Societies*. 2012, 33 Suppl 1, p.S145–S156.
162. Charmillon A, Deibener J, Kaminsky P et al. Angioedema induced by angiotensin converting enzyme inhibitors, potentiated by m-TOR inhibitors: successful treatment with icatibant. *Intensive care medicine*. 2014, 40, p.893–894.
163. Bouillet L, Boccon-Gibod I, Ponard D et al. Bradykinin receptor 2 antagonist (icatibant) for hereditary angioedema type III attacks. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2009, 103, p.448.
164. Bas M, Greve J, Stelter K et al. Therapeutic efficacy of icatibant in angioedema induced by angiotensin-converting enzyme inhibitors: a case series. *Annals of Emergency Medicine*. 2010, 56, p.278–282.
165. Senaratne K, Cottrell A, Prentice R. Successful perioperative management of a patient with C1 esterase inhibitor deficiency with a novel bradykinin receptor B2 antagonist. *Anaesthesia and intensive care*. 2012, 40, p.523–526.
166. Balaguer JM, Yu C, Byrne JG et al. Contribution of endogenous bradykinin to fibrinolysis, inflammation, and blood product transfusion following cardiac surgery: a randomized clinical trial. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2013, 93, p.326–334.
167. Pedersen CM, Schmidt MR, Barnes G et al. Bradykinin does not mediate remote ischaemic preconditioning or ischaemia-reperfusion injury in vivo in man. *Heart (British Cardiac Society)*. 2011, 97, p.1857–1861.
168. De Falco L, Fioravanti A, Galeazzi M et al. Bradykinin and its role in osteoarthritis. *Reumatismo*. 2013, 65, p.97–104.
169. Turner P, Dear J, Scadding G et al. Role of kinins in seasonal allergic rhinitis: icatibant, a bradykinin B2 receptor antagonist, abolishes the hyperresponsiveness and nasal eosinophilia induced by antigen. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001, 107, p.105–113.
170. Akbary AM, Wirth KJ, Schölkens BA. Efficacy and tolerability of icatibant (Hoe 140) in patients with moderately severe chronic bronchial asthma. *Immunopharmacology*. 1996, 33, p.238–242.
171. Levy D, Zochodne DW. Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. *Pain*. 2000, 86, p.265–271.
172. Prediger RDS, Medeiros R, Pandolfo P et al. Genetic deletion or antagonism of kinin B(1) and B(2) receptors improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2008, 151, p.631–643.

173. Fein AM, Bernard GR, Criner GJ et al. Treatment of severe systemic inflammatory response syndrome and sepsis with a novel bradykinin antagonist, deltidant (CP-0127). Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CP-0127 SIRS and Sepsis Study Group. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 1997, 277, p.482–487.
174. Shaw OM, Harper JL. Bradykinin receptor 2 extends inflammatory cell recruitment in a model of acute gouty arthritis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011, 416, p.266–269.
175. Griesbacher T, Rainer I, Evans DM. Inhibition of kinin action and kinin generation compared to dexamethasone pretreatment with respect to vascular effects and pancreatic enzymes in experimental acute pancreatitis. *Immunopharmacology*. 1999, 43, p.219–224.
176. Freiburger T, Grombířiková H, Ravčuková B et al. No evidence for linkage between the hereditary angioedema clinical phenotype and the BDKR1, BDKR2, ACE or MBL2 gene. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2011, 74, p.100–106.
177. Bygum A. Hereditary angio-oedema in Denmark: a nationwide survey. *The British Journal of Dermatology*. 2009, 161, p.1153–1158.
178. Roche O, Blanch A, Caballero T et al. Hereditary angioedema due to C1 inhibitor deficiency: patient registry and approach to the prevalence in Spain. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*. 2005, 94, p.498–503.
179. Curd JG, Prograis LJ Jr, Cochrane CG. Detection of active kallikrein in induced blister fluids of hereditary angioedema patients. *The Journal of experimental medicine*. 1980, 152, p.742–747.
180. Csuka D, Munthe-Fog L, Skjoedt M-O et al. The role of ficolins and MASPs in hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Molecular immunology*. 2013, 54, p.271–277.
181. Bas M, Adams V, Suvorava T et al. Nonallergic angioedema: role of bradykinin. *Allergy*. 2007, 62, p.842–856.
182. Björkqvist J, Sala-Cunill A, Renné T. Hereditary angioedema: a bradykinin-mediated swelling disorder. *Thrombosis and Haemostasis*. 2013, 109, p.368–374.
183. Råberg L, Sim D, Read AF. Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science (New York, NY)*. 2007, 318, p.812–814.
184. Maurer M, Church MK. Inflammatory skin responses induced by icatibant injection are mast cell mediated and attenuated by H1-antihistamines. *Experimental Dermatology*. 2012, 21, p.154–155.
185. Bork K, Frank J, Grundt B et al. Treatment of acute edema attacks in hereditary angioedema with a bradykinin receptor-2 antagonist (icatibant). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007, 119, p.1497–1503.

186. Cicardi M, Banerji A, Bracho F et al. Icatibant, a new bradykinin-receptor antagonist, in hereditary angioedema. *The New England Journal of Medicine*. 2010, 363, p.532–541.
187. Lumry WR, Li HH, Levy RJ et al. Randomized placebo-controlled trial of the bradykinin B2 receptor antagonist icatibant for the treatment of acute attacks of hereditary angioedema: the FAST-3 trial. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2011, 107, p.529–537.
188. Tayeh MA, Olson ST, Shore JD. Surface-induced alterations in the kinetic pathway for cleavage of human high molecular weight kininogen by plasma kallikrein. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994, 269, p.16318–16325.
189. Schmaier AH, McCrae KR. The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2007, 5, p.2323–2329.
190. Bossi F, Fischetti F, Regoli D et al. Novel pathogenic mechanism and therapeutic approaches to angioedema associated with C1 inhibitor deficiency. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2009, 124, p.1303–1310.
191. 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,Qic8]bradykinin). *European Journal of Pharmacology*. 1992, 210, p.115–120.
192. Bouillet L, Mannic T, Arboleas M et al. Hereditary angioedema: Key role for kallikrein and bradykinin in vascular endothelial-cadherin cleavage and edema formation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2011, 128, p.232–234.
193. Laidlaw TM, Steinke JW, Tiñana AM et al. Characterization of a novel human mast cell line that responds to stem cell factor and expresses functional FcεRI. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2011, 127, p.815–822.e1–e5.
194. Posthumus J, Tiñana A, Mozena JD et al. Autoimmune mechanisms in chronic idiopathic urticaria. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2012, 130, p.814–816.e4.
195. Sala-Cunill A, Björkqvist J, Senter R et al. Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Published Online First: 17 September 2014.
doi:10.1016/j.jaci.2014.07.057

Annexe

Annexe 1 : Arbre décisionnel pour l'exploration biologique d'un angioedème à kinine



¹ Antigénémie C4 parfois normale
² Antigénémie C1q parfois normale
³ En période de crise et/ou sous déclencheur
⁴ Prévoir contrôle normalisation de l'activité hors période de crise
⁵ Prévoir contrôle normalisation de l'activité au sevrage du médicament
⁶ Investigation familiale sujets symptomatiques et asymptomatiques
 * La sévérité de la pathologie est le fait des activités du catabolisme

Références:
 M Cicardi et al., Allergy 2014
 F Defendi et al., Revue francophone des laboratoires 444 (2012)
 D Lang et al. Ann Allergy Asthma Immunol 109 (2012) 395-402
 C Drouet et al., J Allergy Clin Immunol 2008
 S Cichon et al., Am J Hum Genet 2006
 QL Lang et al., Am J Hum Genet 2005
 A Adam et al., Lancet 2002