

2m11.2808.6

Université de Montréal

**RÔLE DE LA BRADYKININE ET DE LA DES-ARG⁹-BRADYKININE DANS LES
RÉACTIONS D'HYPOTENSION SÉVÈRES LORS DE TRANSFUSIONS
SANGUINES: DÉVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE EXPÉRIMENTALE**

par

Mélanie Cyr

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences pharmaceutiques

Avril 2000

© Mélanie Cyr, 2000



1971. 288. 6

Université de Montréal

RÔLE DE LA BRADYKININE ET DE LA DES-ARG⁹-BRADYKININE DANS LES
RÉACTIONS D'HYPOTENSION SÉVÈRES LORS DE TRANSFUSIONS
SANGUINES: DÉVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE EXPÉRIMENTALE

QV
705
1158
2000
N. 012

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences pharmaceutiques

Avril 1971

© Mémoire Cyt. 3000



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**RÔLE DE LA BRADYKININE ET DE LA DES-ARG⁹-BRADYKININE DANS LES
RÉACTIONS D'HYPOTENSION SÉVÈRES LORS DE TRANSFUSIONS
SANGUINES: DÉVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE EXPÉRIMENTALE**

Présenté par:
Mélanie Cyr

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

| | | |
|----------------------------|---|--------------------------|
| <u>Nobuharu Yamaguchi</u> | : | président du jury |
| <u>Albert Adam</u> | : | directeur de recherche |
| <u>Jean-Lucien Rouleau</u> | : | codirecteur de recherche |
| <u>Daniel Lamontagne</u> | : | membre du jury |

Mémoire accepté le: 15^e avril 2000.

SOMMAIRE

Récemment, l'hypothèse d'une implication de la bradykinine (BK) dans les réactions d'hypotension sévères lors de la transfusion de plaquettes ou de globules rouges déplétées en leucocytes au moyen d'un filtre chargé négativement a été émise.

Afin d'élucider le rôle potentiel de la BK et/ou de son métabolite actif, la des-Arg⁹-BK, dans la physiopathologie de ces réactions sévères, nous avons au cours de ce travail de maîtrise, caractérisé le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK dans le sérum d'un nombre limité de patients (n = 4) ayant présenté ce type de réaction. Nous avons démontré que ces patients présentaient une anomalie non pas du métabolisme de la BK mais bien au niveau du métabolisme de la des-Arg⁹-BK. Ce même type de profil métabolique a été observé pour des patients ayant présenté un angiooedème aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (iECA) ou une réaction anaphylactoïde en hémodialyse. L'investigation préliminaire du métabolisme des kinines dans le sérum de ces patients, a permis de mettre en évidence une diminution de l'activité de l'aminopeptidase P. Cette baisse d'activité étant attribuable à une déficience enzymatique plutôt qu'à un inhibiteur circulant, ouvre de nouveaux champs d'investigations sur l'aspect génétique de cette déficience et sur la nature du polymorphisme de cette métallopeptidase.

Avant d'entreprendre des investigations génétique plus poussées, nous avons défini au cours de ce travail, le métabolisme des kinines au niveau du sérum et la cinétique d'activation du système de contact du plasma pour une population d'individus, hommes et femmes, en bonne santé (n = 117) afin de déterminer des valeurs de référence. Le métabolisme des kinines a été étudié en suivant la cinétique de la dégradation de la BK exogène et de la formation de la des-Arg⁹-BK par des méthodes de dosage immunologiques développées au laboratoire. Cette méthode avait précédemment été appliquée à un nombre restreint (n = 7) de sujets mâles en bonne santé. L'activité enzymatique des métallopeptidases (ECA, aminopeptidase P et kininase I) impliquées dans le métabolisme des kinines a également été déterminée. L'activation du système

de contact du plasma à l'aide de billes de verre, en présence d'un iECA, nous a permis de caractériser la cinétique de libération de la BK à partir du kininogène de haut poids moléculaire endogène et de la des-Arg⁹-BK formée à partir de la BK endogène. De plus, l'étude de la cinétique d'activation du système de contact a permis d'élaborer un modèle mathématique caractérisant les courbes cinétique de la BK et de la des-Arg⁹-BK.

Les valeurs de référence que nous avons déterminées serviront de base à d'autres études métaboliques chez des patients ayant présenté des effets secondaires aux iECA (toux, angiooedème, réaction anaphylactoïde et la réaction d'hypotension sévère).

Mots-clés: réactions d'hypotension, transfusions sanguines, bradykinine, des-Arg⁹-bradykinine, inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, métabolisme des kinines.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|------|
| SOMMAIRE..... | iii |
| LISTE DES TABLEAUX | x |
| LISTE DES FIGURES | xi |
| LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS..... | xiii |
| REMERCIEMENTS | xv |
| | |
| CHAPITRE 1. INTRODUCTION | 1 |
| 1. Le système kallicréines-kinines..... | 2 |
| 1.1 Les kininogènes | 3 |
| 1.2 Les kallicréines | 6 |
| 1.2.1 La kallicréine plasmatique..... | 7 |
| 1.2.2 La kallicréine tissulaire..... | 9 |
| 1.3 Les kinines..... | 11 |
| 1.4 Les récepteurs | 12 |
| 1.5 Les kininases..... | 13 |
| 1.5.1 L'enzyme de conversion de l'angiotensine | 14 |
| 1.5.2 L'endopeptidase neutre..... | 15 |
| 1.5.3 Les carboxypeptidases N et M | 15 |
| 1.5.4 L'aminopeptidase P | 16 |
| 1.5.5 Métabolisme de la bradykinine..... | 17 |
| 2. Le système de contact..... | 18 |
| 2.1 Activation du système de contact par une surface chargée négativement..... | 20 |
| 2.2 Activation du système de contact au niveau de la cellule Endothéliale | 25 |
| 3. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine..... | 29 |
| 3.1 Généralités | 29 |
| 3.2 Effets cardioprotecteurs des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine | 30 |

| | |
|--|----|
| 3.3 Effets secondaires aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine | 30 |
| 3.3.1 L'angioedème | 31 |
| 3.3.2 La réaction anaphylactoïde en hémodialyse | 32 |
| 4. Les réactions d'hypotension lors de transfusions sanguines | 33 |
| 4.1 Les réactions d'hypotension sévères | 34 |
| 4.2 Les kinines et les réactions d'hypotension sévères | 37 |
| 5. Le but du travail..... | 39 |

CHAPITRE 2. ANOMALY OF THE DES-ARG⁹-BRADYKININ METABOLISM ASSOCIATED WITH SEVERE HYPOTENSIVE REACTIONS DURING BLOOD TRANSFUSIONS: A PRELIMINARY STUDY

| | |
|---|----|
| 1. Abstract..... | 43 |
| 2. Introduction | 44 |
| 3. Materials and Methods | 45 |
| 3.1 Patients | 45 |
| 3.2 Metabolism of BK and des-Arg ⁹ -BK | 46 |
| 3.2.1 Incubation procedure | 46 |
| 3.2.2 Quantification of BK and des-Arg ⁹ -BK | 46 |
| 3.2.3 Kinetic parameters..... | 47 |
| 3.3 Serum ACE activity measurement | 47 |
| 3.4 Statistical analysis | 47 |
| 4. Results | 47 |
| 5. Discussion..... | 48 |
| 6. Acknowledgement..... | 49 |
| 7. References | 50 |

| | |
|--|----|
| CHAPITRE 3. BRADYKININ METABOLISM AND HYPOTENSIVE TRANSFUSION REACTIONS..... | 57 |
| 1. Introduction | 59 |
| 2. The kallikrein-kinin system and generation of bradykinin..... | 60 |
| 2.1 The kallikrein-kinin system | 60 |
| 2.1.1 Kallikreins | 60 |
| 2.1.2 Plasma kallikrein | 60 |
| 2.1.3 Tissue kallikrein | 61 |
| 2.1.4 Kininogens..... | 61 |
| 2.2 The contact system activation | 62 |
| 2.3 Bradykinin and receptors..... | 63 |
| 2.4 Bradykinin inactivation and kininases..... | 64 |
| 2.4.1 Angiotensin-converting enzyme..... | 65 |
| 2.4.2 Neutral endopeptidase | 66 |
| 2.4.3 Carboxypeptidases N and M | 67 |
| 2.4.4 Aminopeptidase P..... | 67 |
| 2.5 Plasma metabolism of bradykinin | 67 |
| 3. Kinins and ACE inhibitors | 68 |
| 3.1 Kinins and pharmacological properties of ACE inhibitors | 68 |
| 3.2 Kinins and acute side effects of ACE inhibitors | 70 |
| 3.2.1 Kinins as proinflammatory peptides..... | 70 |
| 3.2.2 Adverse effects of ACE inhibitors | 71 |
| 4. Kinins and hypotensive transfusion reactions | 72 |
| 4.1 Reaction to plasma protein fraction and albumin infusions | 72 |
| 4.2 Reactions during therapeutic apheresis | 73 |
| 4.3 Bradykinin and hypotensive transfusion reactions..... | 75 |
| 4.4 Uncertain role of kinins | 79 |
| 4.5 Prevention of bedside filtration and ACE inhibitor-related reactions..... | 81 |
| 5. Conclusions | 82 |
| 6. References | 83 |

| | |
|---|-----|
| CHAPITRE 4. THE BRADYKININ (BK) AND DES-ARG ⁹ -BK METABOLIC PATHWAYS AND THE KINETIC OF ACTIVATION OF HUMAN PLASMA | 107 |
| 1. Abstract..... | 109 |
| 2. Introduction | 110 |
| 3. Materials and methods..... | 112 |
| 3.1 Blood samples | 112 |
| 3.2 Drugs, peptides and reagents..... | 112 |
| 3.3 Metabolism of exogenous BK and des-Arg ⁹ -BK | 112 |
| 3.3.1 Incubation procedure | 112 |
| 3.3.2 Quantification of BK and des-Arg ⁹ -BK | 113 |
| 3.3.3 Kinetic parameters..... | 113 |
| 3.4 Serum metallopeptidase activity measurement | 114 |
| 3.4.1 Serum ACE activity..... | 114 |
| 3.4.2 Serum APP activity | 114 |
| 3.4.3 Serum kininase I activity | 114 |
| 3.5 Kinetic of release of endogenous BK and des-Arg ⁹ -BK during plasma activation..... | 115 |
| 3.5.1 Contact system activation..... | 115 |
| 3.5.2 Mathematical treatment | 115 |
| 3.6 Statistical analysis | 116 |
| 4. Results..... | 116 |
| 4.1 Metabolism of exogenous BK and des-Arg ⁹ -BK | 116 |
| 4.1.1 Half-life of BK and des-Arg ⁹ -BK..... | 116 |
| 4.1.2 Relative participation of ACE and kininase I in the metabolism of kinins | 117 |
| 4.1.3 Serum metallopeptidase activities | 117 |
| 4.1.4 Reference intervals | 118 |
| 4.1.5 Correlation between kinetic parameters and enzyme activities | 118 |
| 4.2 Metabolism of endogenous BK and des-Arg ⁹ -BK | 118 |

| | |
|---|-----|
| 4.3 Comparison between exogenous and endogenous metabolism of BK | 119 |
| 5. Discussion..... | 119 |
| 6. Acknowledgments | 123 |
| 7. References | 124 |
| | |
| CHAPITRE 5. DISCUSSION GÉNÉRALE..... | 136 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | 142 |

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2. ANOMALY OF THE DES-ARG⁹-BRADYKININ METABOLISM ASSOCIATED WITH SEVERE HYPOTENSIVE REACTIONS DURING BLOOD TRANSFUSIONS: A PRELIMINARY STUDY.

Table I. Clinical characteristics of the severe hypotensive transfusion reaction..... 53

Table II. ACE activity, half-life of bradykinin (BK) and des-Arg⁹-BK (in the absence of preincubation with an ACE inhibitor) in the sera of patients who presented severe hypotensive transfusion reactions 54

CHAPITRE 4. THE BRADYKININ (BK) AND DES-ARG⁹-BK METABOLIC PATHWAYS AND THE KINETIC OF ACTIVATION OF HUMAN PLASMA.

Table I. Half-life of bradykinin (BK) and des-Arg⁹-BK with or without enalaprilat and the relative participation of ACE and kininase I in the sera of 116 healthy individuals..... 129

Table II. Enzymatic activities in the serum of 116 healthy individuals 130

Table III. Distribution of the variables in a healthy population 131

Table IV. Correlations between enzymatic activities and the half-life of bradykinin (BK) and des-Arg⁹-BK in the serum of 116 healthy individuals (in the absence and the presence of enalaprilat) 132

Table V. Parameters characterising the gamma model fitted to endogenous measures 133

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1. INTRODUCTION.

| | |
|--|----|
| Figure 1. Representation schématique de la structure des kininogènes humains | 4 |
| Figure 2. Représentation schématique de la structure de la prékallicréine plasmatique humaine | 8 |
| Figure 3. Contribution relative des différentes kininases dans le métabolisme de la BK et de la des-Arg ⁹ -BK au niveau du sérum humain | 17 |
| Figure 4. Cascade d'activation du système de contact du plasma par une surface étrangère. | 19 |
| Figure 5. Représentation schématique de la structure du facteur XII humain de la coagulation..... | 22 |
| Figure 6. Représentation schématique de la structure du facteur XI humain de la coagulation..... | 24 |
| Figure 7. Mécanisme de formation de la BK au niveau de la cellule endothéliale dépendant du facteur XIIa..... | 26 |
| Figure 8. Mécanisme de formation de la BK au niveau de la cellule endothéliale indépendant du facteur XIIa..... | 28 |

CHAPITRE 2. ANOMALY OF THE DES-ARG⁹-BRADYKININ METABOLISM
ASSOCIATED WITH SEVERE HYPOTENSIVE REACTIONS
DURING BLOOD TRANSFUSIONS: A PRELIMINARY STUDY.

- Figure 1. Half-life of BK and des-Arg⁹-BK in the sera of normal healthy controls and of patients who presented SHR following incubation of the sera with an ACE inhibitor..... 56

CHAPITRE 3. BRADYKININ METABOLISM AND HYPOTENSIVE
TRANSFUSION REACTIONS.

- Figure 1. The contact activation cascade of plasma by foreign surface leading to BK generation..... 102
- Figure 2. Relative contribution of various kininases to the degradation of BK and des-Arg⁹-BK in human serum 104
- Figure 3. Typical kinetic profiles of formation and degradation of BK and des-Arg⁹-BK after activation of the contact system with glass beads in normal human plasma 106

CHAPITRE 4. THE BRADYKININ (BK) AND DES-ARG⁹-BK METABOLIC
PATHWAYS AND THE KINETIC OF ACTIVATION OF
HUMAN PLASMA.

- Figure 1. Typical kinetic profiles of formation and degradation of bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin for men and women after activation of the contact system, in the presence of enalaprilat, with glass beads in normal human plasma..... 135

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

| | |
|---------------|--|
| APP: | aminopeptidase P |
| ARNm: | acide ribonucléique messenger |
| AO: | angiooedème |
| BK: | bradykinine |
| CABG: | <i>coronary artery bypass graft</i> |
| CK1: | cytokératine-1 |
| CPM: | carboxypeptidase M |
| CPN: | carboxypeptidase N |
| ECA: | enzyme de conversion de l'angiotensine |
| EPN: | endopeptidase neutre |
| FXI: | facteur XI de la coagulation |
| FXIa: | facteur XI activé |
| FXII: | facteur XII de la coagulation |
| FXIIa: | facteur XII activé |
| FXIIIf: | fragment actif du facteur XII |
| GMP cyclique: | guanosine 3', 5'-monophosphate cyclique |
| iECA: | inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine |
| Kb: | kilobase |
| KD: | kallidine |
| kDa: | kilodaltons |
| KFPM: | kininogène de faible poids moléculaire |
| KHPM: | kininogène de haut poids moléculaire |
| KHPMa: | kininogène de haut poids moléculaire activé |
| KHPMi: | kininogène de haut poids moléculaire inactif |
| mmHg: | millimètre de mercure |
| RA: | réaction anaphylactoïde |
| RA+ : | patients ayant présenté une réaction anaphylactoïde |
| RA- : | patients dialysés n'ayant pas présenté une réaction anaphylactoïde |
| RHS: | réaction d'hypotension sévère |

t½: demi-vie

UPAR: *urokinase-type plasminogen activator receptor*

REMERCIEMENTS

Un travail d'une telle envergure n'aurait pu être possible sans la contribution de plusieurs personnes. J'aimerais donc remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à ce projet.

Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Albert Adam pour la formation qu'il m'a permis d'acquérir, pour ses précieux conseils, pour le temps qu'il a su m'accorder et surtout pour la confiance qu'il m'a témoignée.

J'aimerais également remercier mes collègues de laboratoire, plus particulièrement Charles Blais Jr. pour son aide, ses conseils et pour le temps qu'il m'a consacré, Patrick Leclair pour son écoute, ses conseils et pour m'avoir fait découvrir ce laboratoire et Nicole Gervais pour son aide et ses conseils.

Je remercie Eric pour avoir supporté mes nombreux stress pendant 1 an et demi, pour ses encouragements, pour son aide en informatique, mais surtout pour le bonheur qu'il a su m'apporter durant cette maîtrise.

Je tiens à remercier ma famille et mes amis pour m'avoir encouragée et soutenue tout au long de mes études. Je remercie également Aldéa et Robert pour m'avoir écoutée dans les moments de joie comme dans les moments difficiles et je tiens à les remercier d'être là pour moi.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1. LE SYSTÈME KALLICRÉINES-KININES

Une variété de facteurs incluant, les dommages tissulaires, les réactions allergiques, les infections virales, et autres événements inflammatoires sont susceptibles d'activer différentes réactions protéolytiques provoquant la libération de kinines. Les kinines sont des peptides vasoactifs libérés à partir de leurs précurseurs, les kininogènes, sous l'action de kininogénases (kallibréines) (Bhoola *et al.*, 1992). La bradykinine (BK), principale kinine relâchée, est un nonapeptide vasodilatateur très puissant caractérisé par une très courte demi-vie due à un métabolisme important par différentes kininases (Erdös & Skidgel, 1997). De ce fait, les kinines exercent leurs activités pharmacologiques de façon autocrine ou paracrine. Les kinines localement formées dans divers tissus sont détectables dans les sécrétions telles que l'urine, la salive, la sueur et dans les liquides interstitiel. Lorsqu'il y a inhibition de leur métabolisme on les retrouve également dans la circulation systémique.

Outre leur caractère vasoactif, les kinines peuvent aussi influencer un très grand nombre de processus biologiques: la pression sanguine, le tonus vasculaire, le flux sanguin, le transport intracellulaire d'électrolytes et de glucose, la prolifération cellulaire, le recrutement des leucocytes et d'une manière générale le développement et l'évolution de la réaction inflammatoire. Possédant un rôle très important au niveau de la réaction inflammatoire, les kinines sont responsables des signes cardinaux de l'inflammation.

Les actions des kinines sont dues à la stimulation de récepteurs spécifiques de même qu'à leur habileté à engendrer la libération de plusieurs médiateurs tels que le facteur activateur de plaquettes, les leucotriènes, les prostaglandines, la substance P, l'acétylcholine et la noradrénaline (Bhoola *et al.*, 1992).

1.1 LES KININOGÈNES

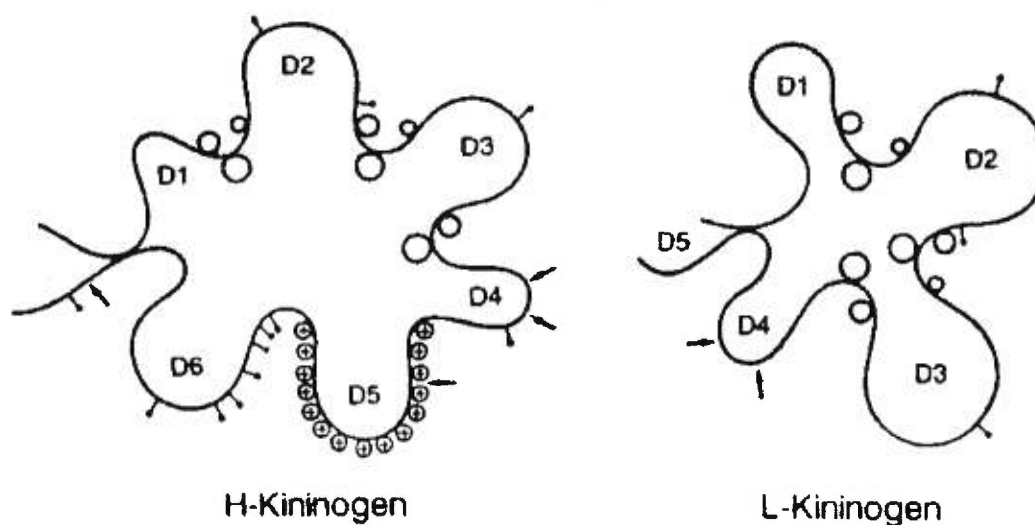
Le rôle des kininogènes comme précurseurs des kinines, a été suggéré en 1937 par Werle et coll.. Ayant initialement le rôle exclusif de précurseur des kinines, les kininogènes sont aujourd'hui connus comme des glycoprotéines douées de multiples fonctions.

Chez l'homme, il existe deux types de kininogènes que l'on distingue par leur poids moléculaire, leur structure, leur fonction de même que par leur susceptibilité au clivage par les kininogénases. Le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), est une α -globuline de 626 acides aminés et selon l'espèce animale, son poids moléculaire varie de 80 à 120 kDa. Le kininogène de faible poids moléculaire (KFPM), une β -globuline de 409 acides aminés, possède un poids moléculaire de 50 à 68 kDa (Margolius, 1996; Müller-Esterl *et al.*, 1986). Le KHPM et le KFPM sont, respectivement, identiques à l'" α_1 - et l'" α_2 -cysteine proteinase inhibitor".

Le foie constitue le principal lieu de synthèse des kininogènes. Suite à cette synthèse par les hépatocytes, il y a sécrétion et transport des kininogènes dans le plasma (KHPM 80 $\mu\text{g/ml}$, KFPM 160 $\mu\text{g/ml}$) (Adam *et al.*, 1985; Schmaier *et al.*, 1986). D'autres tissus (les reins, l'utérus, les glandes salivaires et sudoripares) (Figuroa *et al.*, 1992a) et certains type de cellules (cellules endothéliales, plaquettes, polynucléaires neutrophiles) constituent aussi une source de kininogènes (Bhoola *et al.*, 1992).

Les kininogènes sont des glycoprotéines monocaténares. Leur structure comporte une chaîne lourde amino-terminale liée à une chaîne légère carboxy-terminale par la partie kininoformatrice. Plusieurs domaines composent les kininogènes, chaque domaine comportant une activité spécifique (Figure 1). La structure moléculaire du KHPM est constituée de six domaines alors que celle du KFPM ne comporte que cinq domaines (Müller-Esterl *et al.*, 1986). La chaîne lourde constituée de trois domaines (D1, D2 et D3) est identique pour les deux kininogènes. La fonction du domaine D1 est inconnue, mais certaines études indiquent qu'au niveau de la partie amino-terminale de

A



B

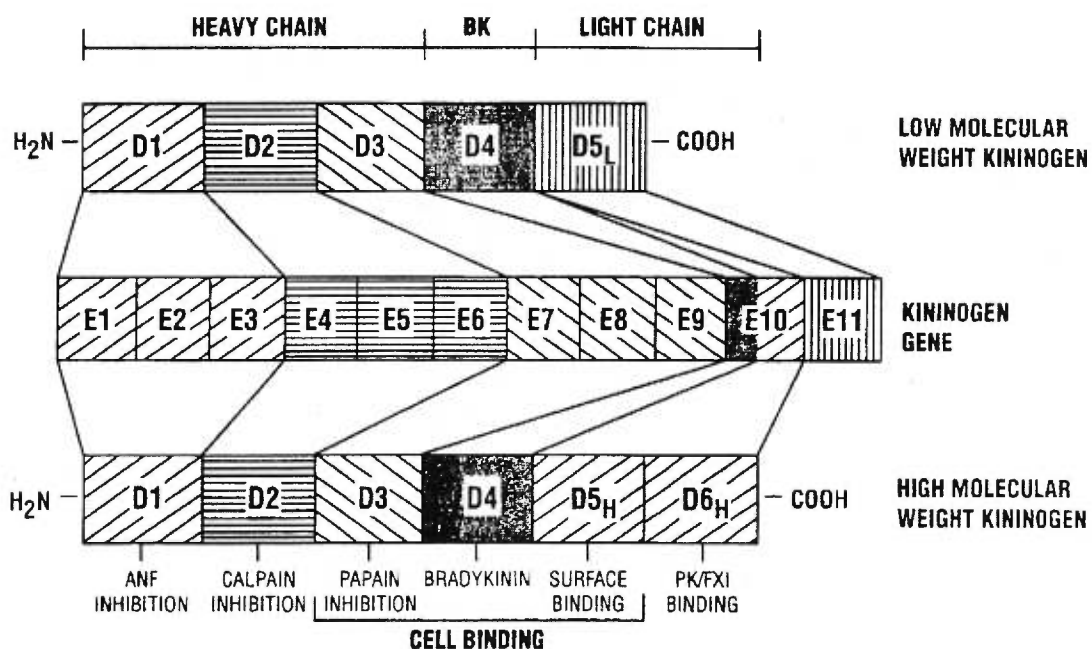


Figure 1. A) Représentation schématique de la structure des kininogènes humains. Le KHPM comporte six domaines (D1 à D6) et le KFPM est constitué de cinq domaines (D1 à D5). (Bhoola *et al.*, 1992).

B) Structure des domaines des kininogènes humains. (Colman & Schmaier, 1997).

ce domaine se situe un site de liaison pour le calcium (Higashiyama *et al.*, 1987). Les domaines D2 et D3 contiennent le pentapeptide Gln-Val-Val-Ala-Gly, une séquence hautement conservée à travers la superfamille des inhibiteurs des cystéines protéases des mammifères qui inclut aussi les cystatines et les stéfines. L'inhibition de l'activité enzymatique des calpaïnes s'effectue uniquement par le domaine D2, le domaine D3 inhibant les autres cystéines protéases (la papaïne, les cathepsines B, L et H). Ainsi, par leur chaîne lourde, les kininogènes possèdent une activité antiprotéasique. D'autre part, le domaine D3 comporte une autre fonction. Il facilite les interactions cellulaires par son site de liaison pour les polynucléaires neutrophiles, les cellules endothéliales et les plaquettes (Schmaier, 1997; Colman & Schmaier, 1997).

Les domaines D1, D2 et D3 sont suivis de la partie kininomatrice des kininogènes, le domaine D4 comportant la séquence de la BK. Ce domaine possède plusieurs fonctions associées à ce peptide, mais il dispose également de la capacité d'inhiber l' α -thrombine. De plus, un site de liaison cellulaire se situe à l'intérieur de ce domaine permettant de maintenir les kininogènes dans la conformation appropriée pour une liaison cellulaire optimale.

La chaîne légère du KFPM consiste en un seul domaine, le domaine D5 (D5_F). Sa fonction est à l'heure actuelle toujours inconnue. Quant à elle, la chaîne légère de KHPM est formée des domaines D5 (D5_H) et D6. Le domaine D5_H, riche en histidine, proline et lysine, fixe le KHPM aux surfaces chargées négativement. Un site de liaison cellulaire se situe également à l'intérieur de celui-ci. Une séquence de 31 acides aminés (565 à 595) située au niveau carboxy-terminal du domaine D6 constitue un site de liaison pour la prékallibréine plasmatique tandis que la région couvrant les résidus 556 à 613 permet la liaison avec le facteur XI de la coagulation (FXI). Une molécule de KHPM peut seulement interagir avec une molécule de prékallibréine ou une molécule de FXI à la fois, puisque leur site de liaison s'entrecoupent. L'activité procoagulante du KHPM, grâce à sa chaîne légère, dépend donc de la capacité de celui-ci à se fixer aux surfaces chargées négativement via son domaine D5_H mais également de sa capacité d'association avec la prékallibréine et le FXI (DeLa Cadena & Colman, 1991).

Un gène unique, le gène K, code pour les deux types de kininogènes (Figure 1). L'utilisation de différents sites de polyadénylation en combinaison avec un épissage alternatif, permet d'obtenir deux ARNm distincts. Ce gène est situé sur le chromosome 3 chez l'homme. Il renferme 27 Kb et comporte 11 exons. Le KHPM et le KFPM partagent la région codante des neuf premiers exons (codant pour la chaîne lourde), une portion de l'exon 10 contenant la séquence de la BK ainsi que les 12 premiers acides aminés distaux de la région carboxy-terminale de la partie kinino-formatrice. L'exon 11 code uniquement pour la chaîne légère (4 kDa) du KFPM. La chaîne légère du KHPM est quant à elle, codée spécifiquement par l'extrémité 3' de l'exon 10. Ainsi, il est possible de distinguer les kininogènes grâce à leur chaîne légère (Müller-Esterl *et al.*, 1986; Colman & Schmaier, 1997).

Le T-kininogène, une glycoprotéine de 68 kDa constitue le troisième type de kininogène identifié jusqu'à présent chez les mammifères mais s'avère unique au rat. Tout comme le KFPM, le T-kininogène comporte cinq domaines. Il possède la capacité d'inhiber les cathepsines mais il est incapable d'inhiber les calpaïnes.

1.2 LES KALLICRÉINES

La libération des kinines à partir de leurs précurseurs s'effectue par l'action enzymatique de kininogénases non spécifiques et spécifiques. Les kininogénases non spécifiques regroupent différentes enzymes libérées lors de la lyse cellulaire (la trypsine et la plasmine).

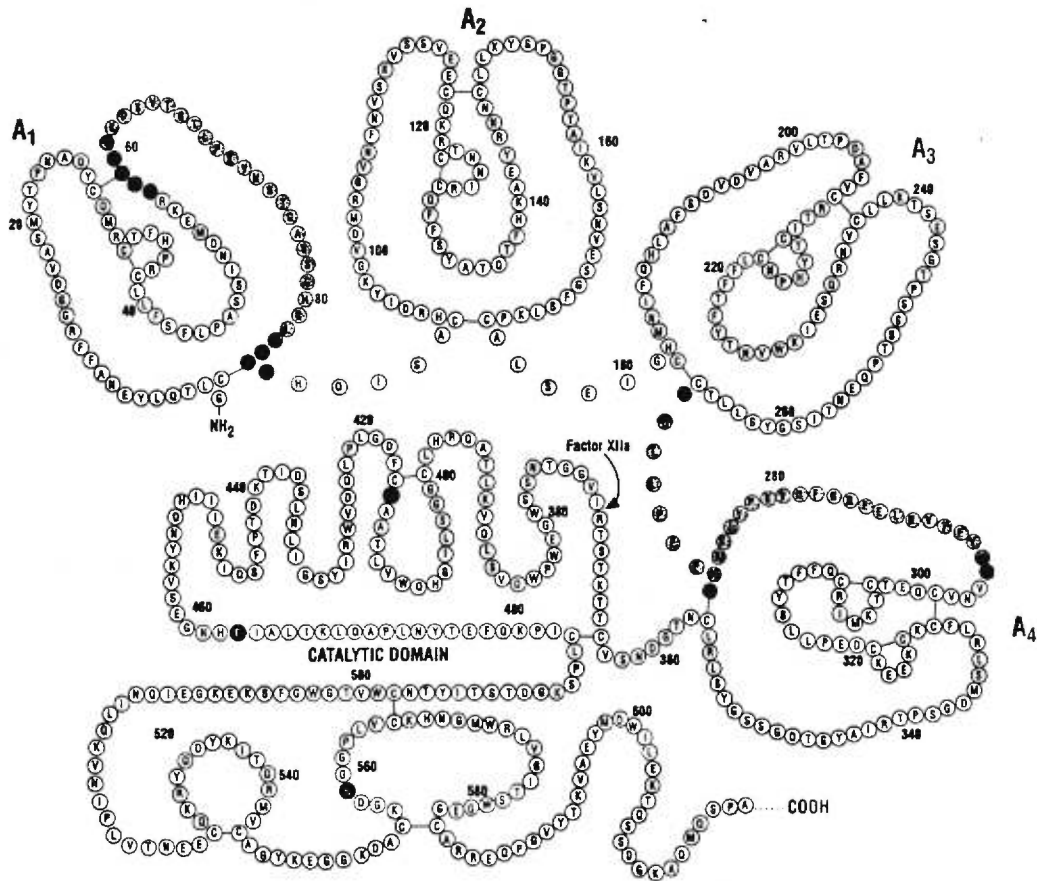
Les kallicroïnes plasmatique et tissulaire représentent en fait les kininogénases spécifiques. Les kallicroïnes, protéases à sérine, sont deux enzymes distinctes codées par différents gènes; elles diffèrent quant à leur poids moléculaire, leur composition en acides aminés, le type de kinines libérées, leur spécificité de substrat, leur mécanisme d'activation, mais surtout elles se distinguent par leur fonction (Bhoola *et al.*, 1992). La libération de kinines à partir des kininogènes s'avère le seul lien unissant les deux types de kallicroïnes.

1.2.1 LA KALLICRÉINE PLASMATIQUE

Les hépatocytes synthétisent et sécrètent la prékallibréine plasmatique, une molécule inactive (zymogène) circulant dans le plasma en étant complexée au KHPM (Mandle *et al.*, 1976) pour ensuite être clivée pour former la kallibréine plasmatique (EC 3.4.21.34). Codée par un gène unique situé sur le chromosome 4 (Beaubien *et al.*, 1991), la prékallibréine est une glycoprotéine formée d'une seule chaîne d'acides aminés (619) existant sous deux formes, l'une de 85 et l'autre de 88 kDa, les deux formes étant présentes dans le plasma humain (Figure 2) (Mandle & Kaplan, 1977). La variation de poids moléculaire dépend du degré de glycosylation de la prékallibréine.

L'activation de la prékallibréine par le facteur de Hageman activé (FXIIa) ou par un fragment de celui-ci (FXIIb), s'effectue suite au clivage du lien Arg³⁷¹-Ile³⁷² situé à l'intérieur d'un pont disulfure. Ce type de clivage permet la formation d'une seule enzyme, la kallibréine, comportant deux chaînes, mais demeurant liées par le pont disulfure (Figure 2). La kallibréine engendrée est composée d'une chaîne lourde de 56 kDa et d'une chaîne légère de 33 ou 36 kDa selon la forme de la prékallibréine impliquée (Kaplan *et al.*, 1998). Constituée de 371 acides aminés, la chaîne lourde de la molécule provient de la partie amino-terminale du zymogène. La séquence en acides aminés de cette chaîne lourde est très caractéristique. Elle est constituée de quatre structures répétées de 90 ou 91 résidus comportant des liaisons entre les résidus cystéine 1-6, 2-5 et 3-4 à l'intérieur de chacune de ces structures. Ces structures, communément appelées domaines "pommes" se retrouvent également chez le FXI expliquant l'homologie de 58 % entre celui-ci et la prékallibréine. Les domaines "pommes" 1 (F56-G86) et 4 (K266-G295) comportent les sites de liaison pour le KHPM. Dans le plasma, 80 à 90 % de la prékallibréine est complexée au KHPM via la chaîne lourde de la prékallibréine. Les régions permettant la liaison du facteur XII (FXII) sont situées au niveau des domaines 3 et 4 mais les sites spécifiques ne sont pas identifiés (Page & Colman, 1991).

A



B

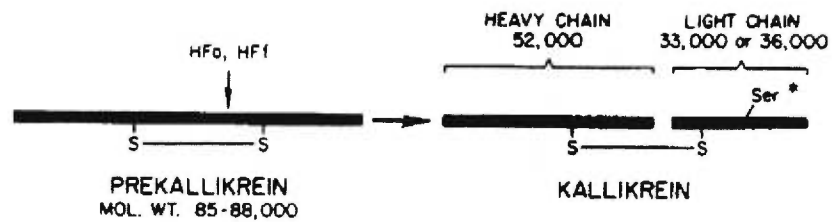


Figure 2. A) Représentation schématique de la structure de la prékallicréine plasmatique humaine. Les lettres A₁ à A₄ représentent les quatre domaines « pommes » de la chaîne lourde de la prékallicréine. (Colman & Schmaier, 1997).

B) Activation de la prékallicréine plasmatique en kallicréine par le facteur XIIa. (Kaplan & Silverberg, 1987).

La kallicréine plasmatique appartient à la famille des sérines protéases due à la présence d'un site catalytique formé par trois acides aminés caractéristiques (His-415, Asp-464 et Ser-559), à l'intérieur de sa chaîne légère (Van der Graaf *et al.*, 1982; Chung *et al.*, 1986; Kaplan *et al.*, 1998). Cette chaîne légère est homologue à plusieurs domaines catalytiques d'enzymes faisant partie de la cascade de la coagulation. L' α_2 -macroglobuline et le C1-estérase inhibiteur inhibent l'activité protéolytique de la kallicréine en interagissant avec la chaîne légère de celle-ci. Ces deux inhibiteurs majeurs (Meijers *et al.*, 1992) procure une inhibition équivalente mais le C1-estérase inhibiteur agit beaucoup plus rapidement dans le plasma (Schmaier *et al.*, 1984). L'antithrombine III ainsi que la protéine C inhibitrice inhibent aussi l'activité de la kallicréine, mais dans une moindre mesure.

Le FXII, le KHPM ainsi que la prourokinase constituent les substrats de la kallicréine plasmatique. De part ses substrats, la kallicréine plasmatique participe à l'activation de la cascade de la coagulation, à la fibrinolyse, à la régulation du tonus vasculaire et à l'inflammation.

1.2.2 LA KALLICRÉINE TISSULAIRE

Les kallicréines tissulaires ou glandulaires constituent un sous-groupe de protéases à sérine qui sont codées par une famille multigéniques chez diverses espèces animales (Murray *et al.*, 1990). Possédant une très grande homologie, ces gènes sont étroitement liés sur un chromosome spécifique et leur arrangement structural, hautement conservé, consiste en cinq exons et quatre introns. Les enzymes codées par ces différents gènes se distinguent selon leur spécificité de substrats, leur modèle d'expression tissulaire et plus particulièrement selon leur fonction, puisque certaines protéases vont relâcher des peptides vasoactifs autres que les kinines (Carretero *et al.*, 1993).

Le nombre de gènes dans la famille des kallicréines tissulaires varie d'une espèce à l'autre; la famille des rongeurs étant la plus grande (souris, 24 gènes; le rat 15-20 gènes et le hamster 3 gènes) (Clements, 1994). Chez l'homme, la famille des kallicréines

tissulaires regroupe seulement trois enzymes codées par le chromosome 19 (q13.2-q13.4). Le gène hK2 s'exprime exclusivement dans la prostate, mais la fonction de la protéine produite demeure inconnue. Le gène hK3 code pour l'antigène spécifique de la prostate (PSA). Bien qu'étant membre de la famille des kalllicréines tissulaires, ces enzymes possèdent une très faible (hK2) ou aucune (hK3) activité kininogénase (Carbini *et al.*, 1993; Clements, 1994).

La kalllicréine tissulaire communément appelée kalllicréine vraie (EC 3.4.21.35) est codée par le gène hK1 et elle possède la capacité de générer des kinines de façon très efficace (Carbini *et al.*, 1993; Clements, 1994). La kalllicréine vraie s'exprime dans les tissus tels que le pancréas et les glandes salivaires mais également au niveau de divers tissus impliqués dans la régulation des fonctions cardiovasculaires tels le rein, les artères et les veines, le cœur, le cerveau et les glandes surrénales (Carretero *et al.*, 1993). Cette glycoprotéine acide possède un poids moléculaire variant de 24 à 45 kDa suivant son degré de glycosylation et libère la kallidine (KD), Lys-bradykinine ou lysyl-BK, préférentiellement à partir du KFPM mais également à partir du KHPM (Margolius, 1996).

Étant membre de la famille des protéases à sérine, cette enzyme possède un site catalytique comportant la triade propre à cette famille, c'est-à-dire les résidus His⁴¹, Asp⁹⁶ et Ser¹⁸⁹. De plus, le site actif de cette protéase, se caractérise également par les acides aminés suivants : Tyr⁹³, Ser¹³⁵, His¹⁶⁴, Asp¹⁸³, Trp²⁰⁵ et Gly²⁰⁶, ceux-ci étant responsable de la spécificité de l'activité kininogénase (Carretero *et al.*, 1993).

La kalllicréine vraie est synthétisée sous forme de zymogène nommé prokalllicréine comportant un peptide signal de 17 acides aminés précédent une séquence d'activation de 7 acides aminés devant être clivée afin d'activer l'enzyme. Plusieurs protéases, incluant une thiol protéase humaine au niveau du rein, sont capables d'activer la prokalllicréine, mais la régulation de l'activation de la kalllicréine tissulaire *in situ* demeure toujours inconnue (Margolius, 1996).

1.3 LES KININES

La formation des kinines s'effectue suite à l'action protéolytique des kallibréines ou kininogénases sur les kininogènes. Selon le type de kininogène et la spécificité des kallibréines, quatre types de kinines peuvent être générées : la BK qui est un nonapeptide, la KD, un décapeptide, la Met-Lys-BK et la T-kinine (Ile-Ser-BK) que l'on retrouve uniquement chez le rat après induction d'une réaction inflammatoire. Les kinines partagent une séquence consensus de neuf acides aminés au niveau carboxy-terminal (Arg¹-Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹), mais différent quant à la taille et la structure de leur partie amino-terminale (Müller-Esterl *et al.*, 1986).

La kallibréine plasmatique relâche la BK à partir du KHPM par l'hydrolyse des liens Lys³⁶²-Arg³⁶³ et Arg³⁷¹-Ser³⁷². La KD est quant à elle libérée à partir des deux types de kininogènes suite à l'hydrolyse des liens Met³⁶¹-Lys³⁶² et Arg³⁷¹-Ser³⁷² par la kallibréine tissulaire. La KD peut être convertie en BK suite à l'hydrolyse du résidu lysine amino-terminal par une aminopeptidase plasmatique (Bhoola *et al.*, 1992). Toutefois, cette conversion est lente comparativement à l'inactivation par hydrolyse au niveau carboxy-terminal. De plus, cette conversion n'est pas nécessaire pour que la KD exerce son action pharmacologique puisqu'elle possède une activité comparable à la BK.

La Met-Lys-BK, produite lors de l'inflammation, semble être le résultat de l'action combinée de la kallibréine et de l'élastase des neutrophiles. En effet, la kallibréine clive le lien Arg-Ser du substrat pour former la partie carboxy-terminale libre de la kinine, alors que l'élastase scinde le lien Leu-Met pour libérer l'extrémité amino-terminale de la kinine et permettant d'engendrer la Met-Lys-BK (Stewart, 1993).

1.4 LES RÉCEPTEURS

En 1980, l'existence de deux types de récepteurs de kinines, désignés B₁ et B₂, a été proposée (Regoli & Barabé, 1980). C'est via ces deux types de récepteurs que les kinines exercent leur activité pharmacologique. La spécificité pharmacologique envers chaque récepteur réside dans la partie carboxy-terminale des kinines. Le récepteur B₁ de même que le récepteur B₂ ont été clonés (Hess *et al.*, 1992; Menke *et al.*, 1994) et les gènes codant pour ces récepteurs sont localisés sur le chromosome 14 (q32). Il s'agit de récepteurs à 7 passages transmembranaires couplés à une protéine G possédant, chez l'homme, 36% d'homologie au niveau de leur séquence en acides aminés. Au niveau endothélial, la stimulation de l'un ou l'autre de ces récepteurs mène à l'activation de la phospholipase C et A₂. L'activation de ces deux enzymes provoque d'une part la libération de prostaglandines, particulièrement la prostacycline et d'autre part la formation d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) qui a pour conséquence d'augmenter la concentration intracellulaire de calcium (Marceau *et al.*, 1998). Étant sensible au calcium, l'oxyde nitrique synthase endothéliale s'active et provoque la libération d'oxyde nitrique qui à son tour est responsable de la génération de GMP cyclique dans les cellules musculaires lisses sous-jacentes. Les médiateurs prostacycline et GMP cyclique sont responsables des propriétés anti-proliférative et hypotensive de la BK (Auch-Schwelk *et al.*, 1993; Mombouli & Vanhoutte, 1995).

Les récepteurs B₁ sont stimulés de façon sélective par la des-Arg¹⁰-KD et la des-Arg⁹-BK tandis que les récepteurs B₂, plus abondants, possèdent comme agonistes la BK et la KD. En plus de pouvoir les distinguer selon la nature de leurs agonistes, les récepteurs diffèrent quant à la régulation de leur expression. Les récepteurs B₂ (364 acides aminés) sont exprimés de façon constitutive dans une grande variété de tissus normaux alors que les récepteurs B₁ (353 acides aminés) sont généralement absents des tissus normaux et des animaux (avec quelques exceptions), mais ils sont rapidement induits par les cytokines pro-inflammatoires, particulièrement l'interleukine-1, et les protéines kinases activées par les mitogènes, suite à un dommage tissulaire ou à une

inflammation chronique (Marceau, 1995; Blais *et al.*, 1997; Marceau *et al.*, 1998). L'expression des récepteurs B₁ survient seulement en conditions pathologiques.

Les deux types de récepteurs des kinines diffèrent significativement au niveau de l'internalisation des complexes récepteur-ligand. La partie carboxy-terminale cytoplasmique du récepteur B₂ comporte des séquences spécifiques permettant l'internalisation d'un complexe récepteur-ligand de même que la séquestration du récepteur comparativement au récepteur B₁ qui est dépourvu de ces séquences (Faussner *et al.*, 1996).

Les récepteurs B₂ sont présents en densité élevée dans le rein, mais on les retrouve également dans le cœur, les poumons, le cerveau, l'utérus et les testicules (Margolius, 1996). Le développement de peptides antagonisant sélectivement l'action des kinines a permis de définir les récepteurs B₁ et B₂ comme deux entités distinctes. L'icatibant (HOE 140) et Lys-[Leu⁸]des-Arg⁹-BK sont des antagonistes sélectifs des récepteurs B₂ et B₁ respectivement. La sélectivité des antagonistes varie en fonction de la concentration utilisée.

1.5 LES KININASES

Suite à leur formation les kinines sont rapidement hydrolysées par l'action enzymatique de peptidases. Cette famille d'enzymes porte le nom de kininases bien qu'aucune ne soit spécifique aux kinines. En absence d'une nécrose tissulaire, au moins cinq métallopeptidases sont responsables de l'inactivation et du métabolisme de la BK. La kininase I, représentée par la carboxypeptidase M et N, clive le résidu Arg à l'extrémité carboxy-terminale de la BK et de la KD pour former respectivement la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD. Le terme kininase II fait référence à l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) ou peptidyldipeptidase qui libère le dipeptide Phe⁸-Arg⁹ de la BK ou de la KD, mais l'endopeptidase neutre 24.11 (EPN) ou enképhalinase libère également ce dipeptide (Erdös & Skidgel, 1997). L'aminopeptidase P (APP) hydrolyse le résidu Arg au niveau amino-terminal de la BK. Ces métallopeptidases partagent des caractéristiques communes. Il s'agit de métallopeptidases à zinc qui sont

liées à la membrane cellulaire et également présentes dans une forme soluble dans les liquides biologiques.

1.5.1 L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE

C'est au milieu des années 50 que l'ECA (EC 3.4.15.1) a été décrite pour la première fois (Skeggs *et al.*, 1956), mais c'est seulement dans les années 70 que l'ECA et la kininase II furent considérées identiques (Yang *et al.*, 1970a,b). L'ECA est une métallopeptidase qui libère un dipeptide au niveau carboxy-terminal de l'angiotensine I afin de produire un octapeptide vasopresseur très puissant, l'angiotensine II. De plus, elle inactive la BK par le retrait séquentiel de deux dipeptides à l'extrémité carboxy-terminale c'est-à-dire Phe⁸-Arg⁹ et Ser⁶-Pro⁷ menant ainsi à la BK_[1-5]. La BK et l'angiotensine I constituent les substrats majeurs de l'ECA mais elle peut également relâcher un dipeptide au niveau carboxy-terminal de plusieurs substrats dont les enképhalines, la neurotensine et la substance P. Bien que l'ECA soit fréquemment considérée comme une dipeptidyl-carboxypeptidase, elle possède la capacité de libérer un tripeptide au niveau carboxy-terminal de la des-Arg⁹-BK pour produire le peptide inactif, BK_[1-5] (Dorer *et al.*, 1974). L'ECA est une métallopeptidase constituée d'une seule chaîne d'acides aminés (1278) et comporte deux domaines homologues comprenant chacun un site catalytique et un site de liaison pour le zinc (Soubrier *et al.*, 1988; Bernstein *et al.*, 1989). Il existe deux isoformes de l'ECA: une forme somatique de 150-180 kDa que l'on trouve au niveau des cellules endothéliales, épithéliales et neuroépithéliales et un isoforme de plus petite taille (90-110 kDa) présent au niveau des cellules germinales (testicules). L'ECA existe sous forme transmembranaire au niveau des cellules endothéliales vasculaires, ayant une forte concentration au niveau de la surface des cellules endothéliales vasculaires du poumon. En plus de sa localisation endothéliale, l'ECA s'exprime au niveau des cellules épithéliales du petit intestin, des tubules rénaux, mais elle se retrouve également au niveau des cellules mononuclées (monocytes, lymphocytes-T, fibroblastes). Divers liquides du corps (sérum, liquide séminal, et liquide cébrospinal) renferme l'ECA mais sous forme soluble (Corvol & Williams, 1997).

1.5.2 L'ENDOPEPTIDASE NEUTRE

L'EPN (EC 3.4.24.11) est une ectoenzyme liée à la membrane cellulaire. Chez l'homme, elle est codée par le chromosome 3 (q21-27) (Barker *et al.*, 1989; Tran-Paterson *et al.*, 1989). L'EPN libère le dipeptide Phe⁸-Arg⁹ de la BK ou de la KD, mais elle clive également le lien Gly⁴-Phe⁵ pour produire la BK_[1-4] ou la Lys-BK_[1-4]. Ce dernier clivage, s'effectue aussi dans le cas de la des-Arg⁹-BK ou de la des-Arg¹⁰-KD. L'EPN est particulièrement présente en grande concentration au niveau de l'épithélium du néphron proximal et elle se situe sur la membrane de certains leucocytes (Connelly *et al.*, 1985), mais elle est pratiquement indétectable dans la circulation ou dans le plasma (Erdős, 1990). L'EPN participe également à l'hydrolyse d'autres peptides comme les enképhalines, la substance P et l'angiotensine I.

1.5.3 LES CARBOXYPEPTIDASES N ET M

La carboxypeptidase N (CPN) humaine plasmatique (EC 3.4.17.3) est une arginine carboxypeptidase synthétisée au niveau du foie et sécrétée dans la circulation sanguine. Il s'agit d'une glycoprotéine tétramérique (280 kDa) composée de deux sous-unités de haut poids moléculaire (83 kDa) fortement glycosylées et de deux sous-unités de faible poids moléculaire (55 et 48 kDa) non-glycosylées (Skidgel, 1988). Le site actif de la CPN, comportant un ion zinc, est situé au niveau des sous-unités de faible poids moléculaire. Les sous-unités de haut poids moléculaire étant inactives auraient pour rôle de prévenir la dégradation protéolytique des sous-unités actives et/ou d'empêcher leur élimination lors de la filtration glomérulaire (Bhoola *et al.*, 1992). La CPN libère le résidu Arg⁹ de la BK et de la KD mais elle possède également des substrats endogènes autres que les kinines tels que les anaphylatoxines, les Arg- ou Lys-enképhalines, les fibrinopeptides, etc (Skidgel, 1988). Ainsi, la CPN clive une grande variété de substrats contenant un résidu Arg ou Lys en position carboxy-terminale, libérant généralement plus rapidement le résidu Lys.

La carboxypeptidase M (CPM) humaine est une enzyme liée à la membrane d'où son appellation CPM. Cette métallopeptidase de 62 kDa est constituée d'une seule chaîne de 426 acides aminés et tout comme la CPN elle libère le résidu Arg⁹ de la BK et de la KD et possède également la capacité de cliver un résidu Arg ou Lys en position carboxy-terminale. Contrairement à la CPN, la CPM hydrolyse préférentiellement le résidu Arg. La CPM montre seulement 41% d'homologie avec la sous-unité active de la CPN humaine (Bhoola *et al.*, 1992). Il existe une grande variété de cellules et de tissus humains ou animaux où l'on retrouve la CPM, notamment au niveau du rein, des poumons, du placenta humain, des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire, des intestins, du cerveau et fibroblastes du poumons (Skidgel 1984, 1988; Nagae *et al.*, 1992, 1993). Bien qu'étant membranaire, la CPM est également présente sous forme soluble (urine) (Skidgel *et al.*, 1984).

1.5.4 L'AMINOPEPTIDASE P

L'APP (EC 3.4.11.9), une proline aminoacyl aminopeptidase, est une glycoprotéine que l'on retrouve dans une variété de tissus, les poumons et les reins contenant une très forte concentration de l'enzyme sous forme transmembranaire. L'enzyme sous forme soluble ou cytosolique est également présente dans le cerveau, les érythrocytes et les plaquettes (Hooper *et al.*, 1990; Simmons & Orawski, 1992; Orawski & Simmons, 1995). La forme cytosolique et la forme transmembranaire de l'APP proviennent de deux gènes distincts (Venema *et al.*, 1997; Czirják *et al.*, 1999). Les deux formes d'enzymes catalysent le retrait, au niveau amino-terminal, d'acides aminés non-substitués, adjacents à un résidu proline en avant-dernière position. Dans le cas de la BK, l'APP hydrolyse le résidu Arg¹ produisant la BK_[2-9] (Hooper *et al.*, 1990; Simmons & Orawski, 1992).

1.5.5 Métabolisme de la bradykinine

La nature et l'importance des différentes kininases impliquées dans le métabolisme de la BK varie en fonction de la nature du milieu biologique étudié et en fonction de l'approche expérimentale. Le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK au niveau sanguin est représenté à la figure 3. Deux enzymes sont principalement responsables de l'inactivation de la BK. L'ECA constitue la voie métabolique principale étant responsable à 75% du métabolisme de la BK dans la circulation (Décarie *et al.*, 1996; Erdős & Skidgel, 1997). Elle transforme la BK_[1-9] en BK_[1-7] et finalement en BK_[1-5]. La deuxième enzyme impliquée dans le métabolisme de la BK est l'APP et s'avère une voie de dégradation plutôt secondaire (approximativement 21%). Elle transforme la BK_[1-9] en BK_[2-9] qui sera ensuite transformée en BK_[2-8] par la peptidase dipeptidyle IV (Scharpé *et al.*, 1988; Blais *et al.*, 1999b). La BK peut être également transformée par la kininase I en son métabolite actif la des-Arg⁹-BK, mais cette voie est très mineure. Cette voie mineur devient importante cependant lorsque l'ECA est inhibée. La des-Arg⁹-BK pour sa part est métabolisée par deux enzymes, l'ECA et l'APP, mais dans ce cas-ci c'est l'APP qui constitue la voie métabolique majeure (Décarie *et al.*, 1996).

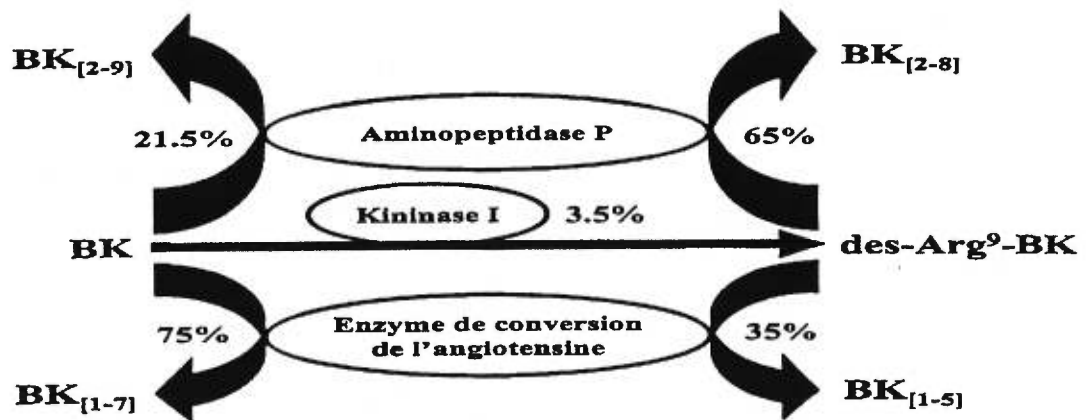


Figure 3. Contribution relative des différentes kininases dans le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK au niveau du sérum humain.

2. LE SYSTÈME DE CONTACT

L'exposition du sang à une surface chargée négativement (verre, kaolin, le dextran sulfate) provoque l'activation du système de contact de la coagulation sanguine. Les protéines plasmatiques impliquées dans cette réaction sont : la prékallicroïne, le FXII, le KHPM et le FXI. L'implication de plusieurs protéases dans l'activation du système de contact entraîne une interaction entre divers systèmes dont celui de la coagulation sanguine (voies extrinsèque et intrinsèque), des kallicroïnes-kinines, de la fibrinolyse, du système rénine-angiotensine, du complément et par le fait même permet d'engendrer de multiples réactions (Figure 4). De façon globale, suite à l'activation du FXII en FXIIa la prékallicroïne est clivée en kallicroïne plasmatique et celle-ci libère la BK à partir du KHPM. Le FXIIa possède également un deuxième substrat au niveau du plasma: le FXI de la coagulation. L'activation de ce facteur en FXIa par le FXIIa déclenche la voie intrinsèque de la coagulation sanguine (Kaplan *et al.*, 1998).

Le FXII est une β -globuline de 80 kDa constituée d'une seule chaîne d'acides aminés (596). Il circule dans le plasma sous forme de zymogène c'est-à-dire sous forme d'un précurseur ne possédant aucune activité enzymatique. La synthèse de ce facteur s'effectue au niveau du foie et sa concentration plasmatique est d'environ 30-35 $\mu\text{g/ml}$. La partie amino-terminale de cette protéine renferme de multiple domaines ayant une homologie de séquence avec la fibronectine, le plasminogène et les activateurs de plasminogène, alors que l'extrémité carboxy-terminale comporte la triade caractéristique des sérines protéases (Asp, His et Ser) lui conférant ainsi, suite à son activation, une activité homologue à ces protéases (Reddigari *et al.*, 1997; Kaplan *et al.*, 1998). Un seul gène de 12 Kb code pour le FXII (Colman & Schmaier 1997).

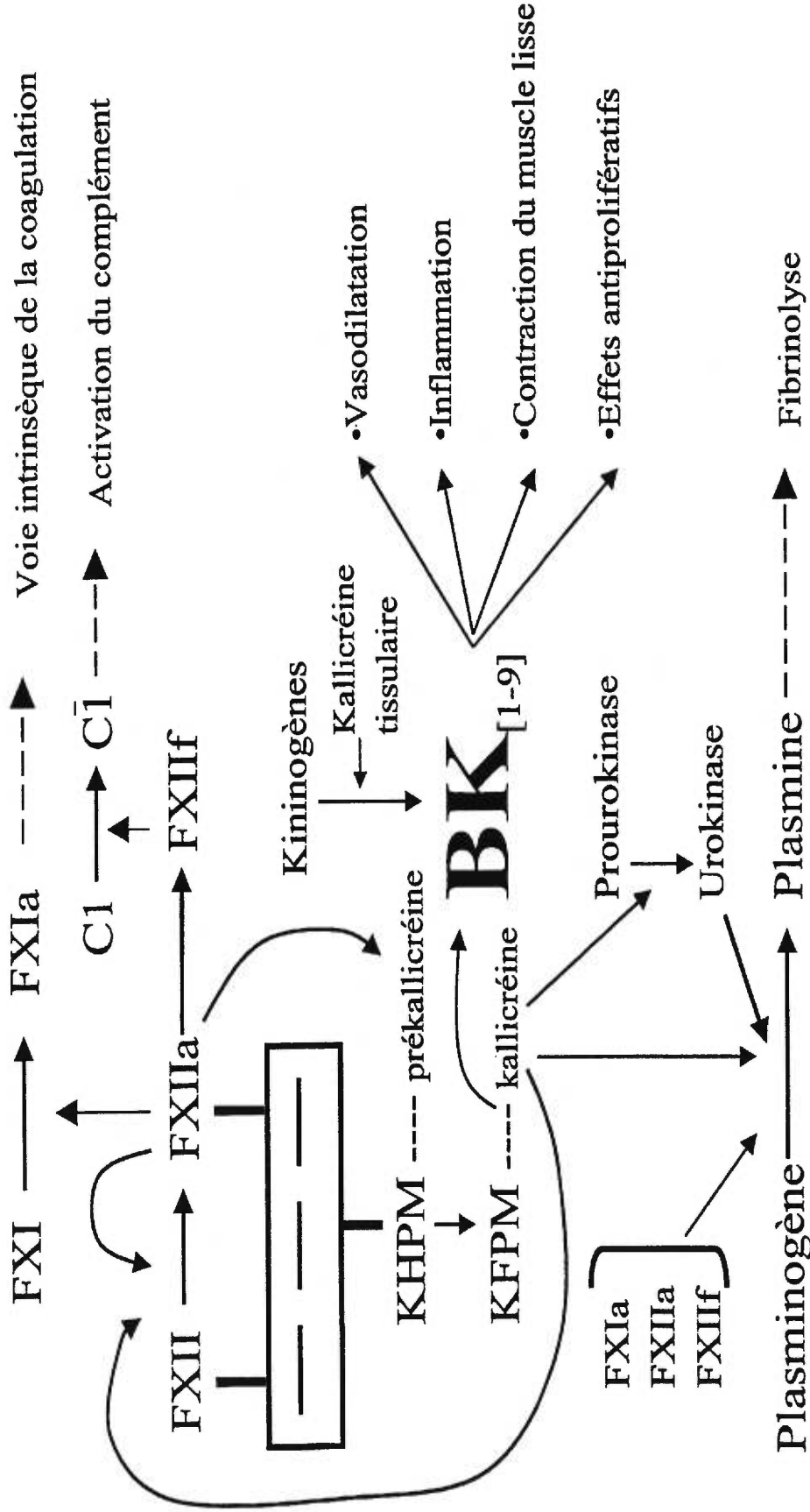


Figure 4. Cascade d'activation du système de contact du plasma par une surface étrangère.

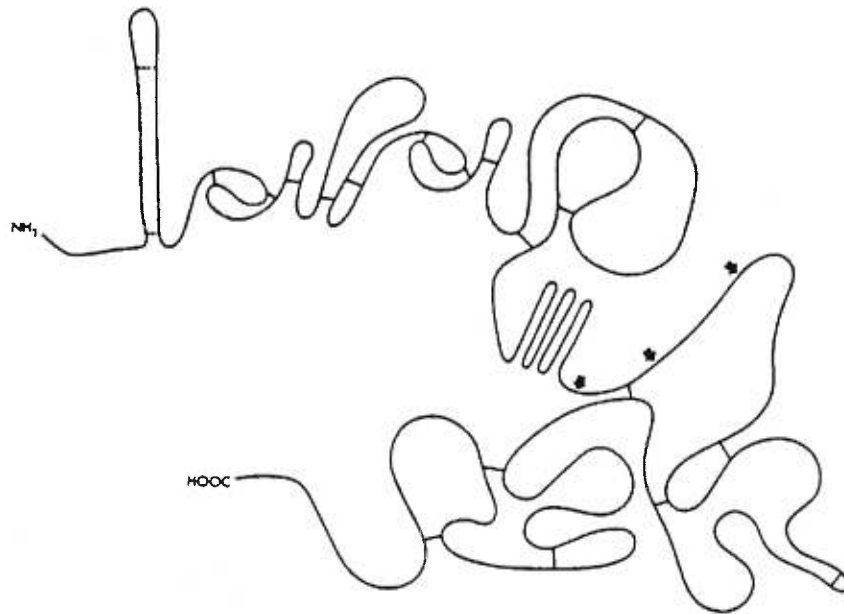
2.1 ACTIVATION DU SYSTÈME DE CONTACT PAR UNE SURFACE CHARGÉE NÉGATIVEMENT

Il existe dans la littérature deux catégories d'hypothèses concernant le mécanisme d'initiation du système de contact par une surface chargée négativement. La première théorie à l'origine proposée par McMillin et coll. (1974) et Ratnoff & Saito (1979), soutient que suite à sa liaison avec une surface, le FXII subit un changement conformationnel par lequel il expose ou crée un site actif capable d'activer la prékallicroïne. Selon cette hypothèse, l'induction d'un faible niveau d'activité enzymatique précède l'observation du clivage du FXII de même que la formation du FXIIa (Ratnoff & Saito, 1979). L'étape du clivage du FXII en FXIIa survient donc ultérieurement à la formation de la kallicroïne et, cette dernière agit sur le FXII par rétroaction positive. Cette théorie d'un changement conformationnel créant un site actif est essentiellement réfutée. La seconde théorie soutient que le FXII lié à la surface est inactif et qu'une protéolyse limitée du facteur est essentielle pour son activation. Cette activation du FXII est très particulière puisque celui-ci est capable de s'autoactiver suite à sa liaison avec une surface chargée négativement. L'autoactivation fait référence à la capacité du FXII activé libre, présent en très faible concentration dans le plasma, à cliver un FXII inactif lié à la surface. Cette très faible quantité de FXIIa proviendrait de l'activité enzymatique d'enzymes plasmatiques tels que la plasmine et la kallicroïne (Kaplan & Silverberg, 1987). Griffin (1978) apporta un second aspect à cette hypothèse protéolytique en incorporant le rôle de la surface chargée négativement. Il démontra que l'activation du FXII par différentes protéases était accélérée en présence d'une telle surface. Il proposa que le FXII, suite à sa liaison avec une surface, subit un changement de conformation le rendant plus susceptible au clivage par le FXIIa. Cette susceptibilité permet au FXII liés d'être graduellement converti en FXIIa. Ainsi, le FXII lié à une surface constitue un meilleur substrat pour le FXIIa (autoactivation) ou pour la kallicroïne plasmatique et cette augmentation de susceptibilité est une composante majeure de l'action catalytique des surfaces. Cette hypothèse d'autoactivation du FXII suite au contact avec une surface chargée négativement est généralement retenue.

Les protéases plasmatiques, incluant la kallibréine et la plasmine, activent le FXII en FXIIa en clivant le lien Arg³⁵³-Val³⁵⁴ à l'intérieur d'un pont disulfure (Figure 5) (Meijers *et al.*, 1992). Ce type de clivage génère une seule molécule comportant deux chaînes mais demeurant liées par le pont disulfure. Le FXIIa résultant est constitué d'une chaîne lourde de 50 kDa et d'une chaîne légère de 28 kDa. La chaîne légère contenant le site actif est dans la partie carboxy-terminale alors que la chaîne lourde, contenant les sites de liaison à une surface anionique, se situe à l'extrémité amino-terminale. Un clivage subséquent peut avoir lieu au niveau carboxy-terminal de la chaîne lourde produisant une série de fragments du FXIIa. Les plus importants sont un fragment de 30 kDa appelé FXII_f (1) de même qu'un fragment de 28.5 kDa nommé FXII_f (2). Pour le FXII_f (1), le clivage s'effectue tout juste à l'extérieur du pont disulfure, au niveau de la chaîne lourde du FXIIa tandis que le FXII_f (2) est obtenu suite à un second clivage au niveau de la chaîne lourde du FXII_f (1), mais à l'intérieur du pont disulfure. Ainsi, ces fragments conservent la chaîne légère du FXIIa mais ne possèdent qu'une fraction de la chaîne lourde originale. Par leur structure ces fragments ne peuvent se fixer à une surface, ayant perdu leur site de liaison, possèdent une moins grande habileté à convertir le FXI en FXIa, ne participent pas à l'autoactivation du FXII, mais ils conservent leur activité enzymatique leur permettant de cliver la prékallibréine plasmatique (Reddigari *et al.*, 1997).

Dès qu'une faible quantité de FXIIa est produite, il y a interaction avec la prékallibréine plasmatique et celle-ci est rapidement convertie en kallibréine, l'enzyme plasmatique principale activant le FXII. Une activation réciproque a donc lieu entre ces deux protéines, chacune clivant l'autre. Cette rétroaction positive par laquelle la kallibréine convertit le FXII lié à la surface pour former le FXIIa de même que le FXII_f, est 50 à 100 fois plus rapide que la réaction d'autoactivation du FXII par le FXIIa (Dunn & Kaplan, 1982). Ainsi, quantitativement, la majorité du FXIIa ou du FXII_f généré suite à l'activation du plasma est le résultat de l'activation du FXII par la kallibréine. La kallibréine plasmatique a donc pour rôle d'amplifier l'activation du FXII, l'autoactivation étant responsable de l'initiation du système.

A



B

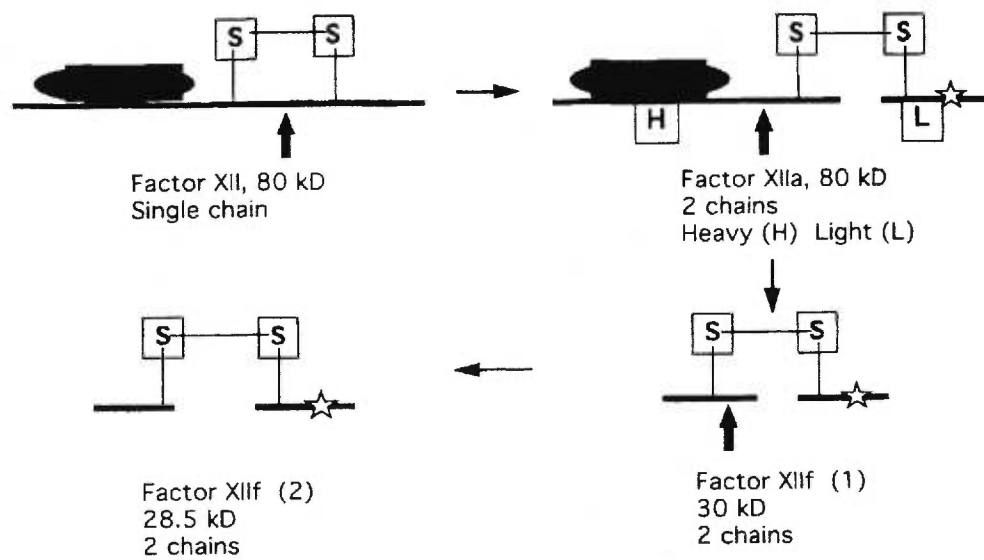


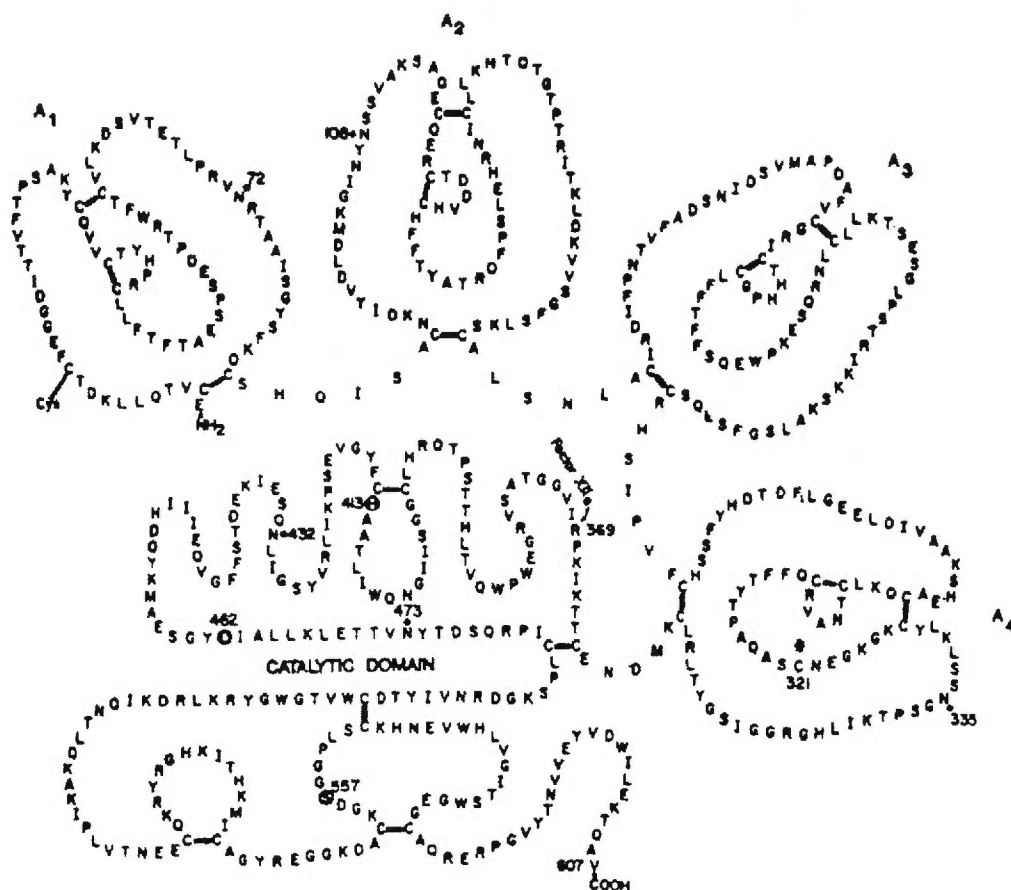
Figure 5. A) Représentation schématique de la structure du FXII humain de la coagulation. Les flèches indiquent les sites clivés par la kallibréine plasmatique. (Meijers *et al.*, 1992).

B) Activation du FXII humain de la coagulation. Les flèches indiquent les sites de clivage et les sites actifs sont représentés par des étoiles. (Reddigari *et al.*, 1997).

Le FXI possède une structure unique parmi tous les facteurs de la coagulation sanguine (Figure 6). En effet, sa structure consiste en deux chaînes polypeptidiques identiques de 607 acides aminés liées par un pont disulfure (Meijers *et al.*, 1992). L'activation du FXI par le FXIIa (ou la thrombine) s'effectue par le clivage du lien peptidique entre l'Arg³⁶⁹-Ile³⁷⁰ à l'intérieur du pont disulfure de chacune des chaînes. Ceci engendre la formation de deux chaînes lourdes, ayant chacune un poids moléculaire de 50 kDa et de deux chaînes légères, de 33 kDa, demeurant liées grâce au pont disulfure entre les chaînes initiales. Le FXIa activé est donc une protéase comportant quatre chaînes polypeptidiques. De plus, ce facteur activé a la particularité d'avoir deux sites actifs puisque chacune de ses chaînes légères (238 acides aminés) en comporte un. Ces sites catalytiques renferment des séquences typiques caractérisant la famille des protéases à sérine et peuvent être inhibés par des inhibiteurs tels que, l'antithrombine III, le C1-estérase inhibiteur et la protéine C inhibitrice. Les chaînes lourdes (369 acides aminés) du FXIa quant à elles, sont constituées de quatre structures répétées de 90 ou 91 acides aminés due à la formation de liens particuliers entre des résidus cystéines à l'intérieur de chacune de ces structures. Ces mêmes structures sont également présentes au niveau de la chaîne lourde de la prékalligréine. Par ses chaînes lourdes, le FXI circule en étant lié au KHPM et la conversion en FXIa doit s'effectuer au niveau de la surface. Le site de liaison du KHPM se situe à l'intérieur de la première structure répétée (N-terminal) et la liaison entre ces deux protéines est de nature non-covalente. Dans le plasma, toutes les molécules de FXI sont complexées au KHPM.

Le KHPM est un procofacteur non enzymatique pouvant être activé en un cofacteur possédant une activité procoagulante (KHPMa), puis clivé en un cofacteur inactif (KHPMi). La prékalligréine et le FXI peuvent se fixer à une surface anionique, mais en absence du KHPM, l'activation n'est pas possible. Ainsi, la fonction du KHPM est de présenter les substrats du FXIIa dans une conformation facilitant leur activation. La prékalligréine et le FXI circulent liés au KHPM, via le domaine D6 de ce dernier, sous forme de complexes bimoléculaires. Dans le plasma normal, le KHPM se fixe aux surfaces chargées négativement, mais très peu de liaison survient lors d'une déficience en FXII. Ces complexes bimoléculaires se lient aux surfaces grâce au domaine D5

A



B

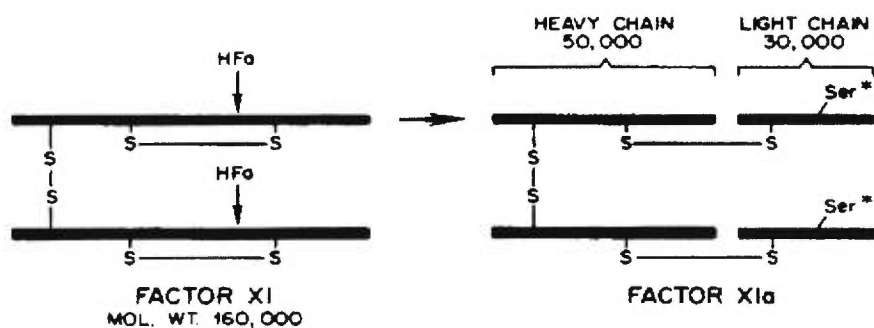


Figure 6. A) Représentation schématique de la structure du FXI humain de la coagulation. Les lettres A₁ à A₄ représentent les quatre domaines « pommes » des chaînes lourdes du FXI humain. (Meijers *et al.*, 1992).
 B) Activation du FXI humain de la coagulation par le FXIIa. Le FXIa comporte deux sites actifs identiques car le facteur XI est dimérique. (Kaplan & Silverberg, 1987).

(riche en histidine) de la chaîne légère du KHPM. Lors du clivage du KHPM (KHPMa), celui-ci subit un changement de conformation favorisant sa liaison avec une surface anionique. Ainsi, le KHPMa permet de positionner la prékallicroïne et le FXI à la surface permettant au FXIIa de cliver la prékallicroïne en kallicroïne et le FXI en FXIa. De plus, la présence du KHPM accélère l'activation du FXII, de la prékallicroïne de même que du FXI (Meier *et al.*, 1977).

La kallicroïne plasmatique peut se dissocier de la surface et diffuser pour hydrolyser son substrat, le KHPM, en KHPMa constitué d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère liées par un pont disulfure. Elle peut également se détacher de la surface pour diffuser vers un FXII, également un substrat de celle-ci, lié à la surface. Le FXIa, contrairement à la kallicroïne, demeure solidement lié au KHPMa, lui-même étroitement fixé à la surface.

2.2 ACTIVATION DU SYSTÈME DE CONTACT AU NIVEAU DE LA CELLULE ENDOTHÉLIALE

Depuis plusieurs années, la notion d'initiation de l'activation du système de contact résultant de l'autoactivation du FXII suite à sa liaison avec une surface chargée négativement, est généralement très bien acceptée. Cette façon d'expliquer l'activation du système de contact implique des surfaces chargées négativement généralement artificielles quoique certaines substances biologiques telles que la chondroïtine sulfate et les cristaux d'urate peuvent être des activateurs faibles du système de contact (Saito, 1980). Il existe une autre approche qui tente d'expliquer l'activation du système de contact, mais de manière physiologique. Cette alternative propose que la liaison des composants de ce système au niveau d'une surface biologique (membrane des cellules endothéliales) permet l'activation de la prékallicroïne en kallicroïne par un mécanisme dépendant ou indépendant du FXIIa.

Il a été démontré que tous les composants du système de contact ont la capacité de se lier aux cellules endothéliales. Schmaier et coll. (1988) et Van Iwaarden et coll. (1988) furent les premiers à décrire chez l'homme la liaison du KHPM aux cellules endothéliales de la veine ombilicale. Le récepteur gC1qR, situé à la surface des cellules endothéliales, permet la liaison du facteur C1q du complément, mais il a également été identifié comme récepteur pour le KHPM de même que pour le FXII (Joseph *et al.*, 1996). Cette fixation du KHPM et du FXII au récepteur est zinc-dépendante et ces deux protéines compétitionnent pour le même site de liaison (Figure 7). Ce site de liaison est situé du côté carboxy-terminal du récepteur gC1qR tandis que l'extrémité amino-terminale renferme le site de liaison pour le facteur C1q, évitant la compétition avec les deux autres protéines. La chaîne lourde de même que la chaîne légère du KHPM peuvent interagir avec les cellules endothéliales via les domaines D3 et D5 respectivement. Reddigari et coll. (1993) ont démontré qu'une lente autoactivation du FXII survient à la suite de la liaison de ce dernier avec le récepteur gC1qR permettant par la suite la libération de la BK grâce à l'activation de la prékallicroïne en kallicroïne par le FXIIa (Kaplan *et al.*, 1998). Cette approche stipule donc que l'activation de la prékallicroïne est dépendante du FXIIa au niveau des cellules endothéliales.

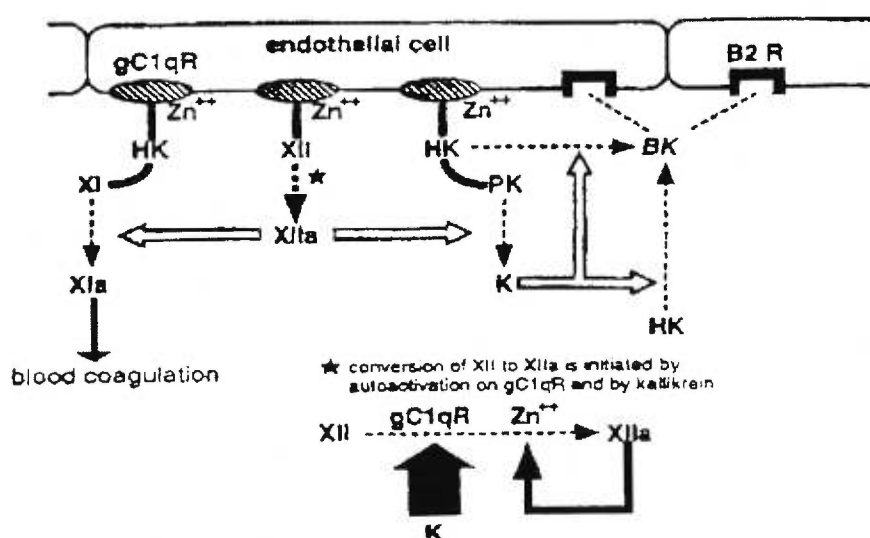


Figure 7. Mécanisme de formation de la BK au niveau de la cellule endothéliale dépendant du FXIIa. Le récepteur gC1qR permet la liaison du KHPM et du FXII. (Kaplan *et al.*, 1998).

Récemment, il a été démontré que le KHPMa peut se fixer au récepteur de l'urokinase (UPAR pour urokinase-type plasminogen activator receptor), situé sur les cellules endothéliales, dans une réaction zinc-dépendante (Colman *et al.*, 1997). D'autres ont démontré la fixation du KHPM à la cytokératine-1 (CK1) (Hasan *et al.*, 1998), également située à la surface des cellules endothéliales. De plus, des interactions entre les composants du système de contact et les plaquettes (Gustafson *et al.*, 1986) et les polynucléaires neutrophiles ont été montrées (Figuroa *et al.*, 1992b).

Une alternative indépendante du FXIIa, à été proposée pour expliquer l'activation du système de contact au niveau de la membrane des cellules endothéliales (Schmaier, 1998). Cette nouvelle hypothèse soutient que l'assemblage d'un complexe multiprotéinique, formé des protéines du système de contact, sur des récepteurs cellulaires au niveau des cellules endothéliales, permet l'activation de ce système. Ainsi, un récepteur multiprotéinique formé par la CK1, l'UPAR et du gC1qR, situé sur les cellules endothéliales, permet la fixation du KHPM. Suite à la liaison sur ce récepteur du KHPM, lié à la prékallitréine ou au FXI, une protéase à cystéine (thiolprotéase) au niveau de la membrane des cellules endothéliales est exprimée pour activer la prékallitréine en kallitréine (Figure 8). Cette activation est dans ce cas-ci, indépendante de l'activation du FXII. Le FXII se lie au gC1qR faisant parti du récepteur multiprotéinique. Cette fixation provoque une lente autoactivation du facteur, mais dans ce cas-ci elle ne sert pas à initier le système. De plus, suite à l'activation de la prékallitréine en kallitréine par la protéase à cystéine, la kallitréine va activer le FXII, lié au gC1qR, en FXIIa. La fonction du FXII est de contribuer au taux et à l'extension de l'activité enzymatique générée sur la membrane des cellules endothéliales. La kallitréine va également provoquer la relâche de la BK à partir du KHPM et va se détacher de la membrane.

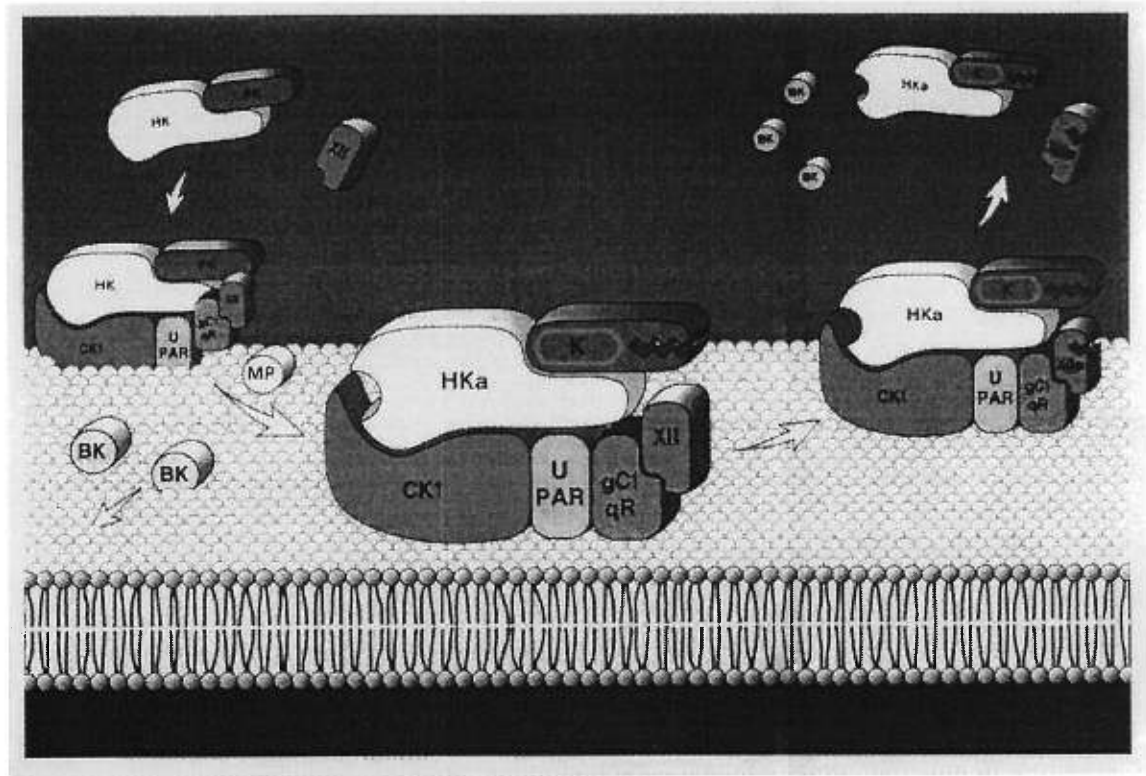


Figure 8. Mécanisme de formation de la BK au niveau de la cellule endothéliale indépendant du FXIIa. Un récepteur multiprotéinique (CK1, U PAR et gC1qR) permet la fixation du KHPM. Une protéase à cystéine membranaire active la prékallicroïne en kallicroïne. (Schmaier, 1998).

La régulation du système de contact s'effectue via des protéases plasmatiques inhibitrices. Le C1-estérase inhibiteur est l'inhibiteur principal du FXIIa et du FXIIif étant responsable à plus de 90% de leur inhibition dans le plasma. Cet inhibiteur se fixe à ces protéases et les inactivent de façon irréversible. L'antithrombine III, protéine critique de contrôle pour une grande partie de la cascade de coagulation, contribue de façon mineure à l'inactivation des FXIIa et FXIIif. La kallicroïne plasmatique est inhibée par le C1-estérase inhibiteur et par l' α_2 -macroglobuline alors que l'activité du FXIa est inhibée principalement par l' α_1 -antitrypsine et le C1-estérase inhibiteur (Kaplan & Silverberg, 1987; Colman & Schmaier, 1997).

3. LES INHIBITEURS DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE

3.1 GÉNÉRALITÉS

Dans les années 60, Ferreira a démontré qu'un mélange de peptides isolé à partir du venin de *Bothrops jararaca*, inhibe la dégradation de la BK et potentialise l'action de cette dernière sur le muscle lisse. Ces facteurs permettant l'accumulation de la BK s'avèrent une famille de peptides inhibant la kininase II de même que l'ECA, ces deux enzymes étant identiques. Les inhibiteurs de l'ECA (iECA) inhibent non seulement la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, mais également la dégradation d'autres substances, incluant la BK, la substance P et les enképhalines. Ainsi, les iECA influencent diverses voies biochimiques.

Plusieurs types d'inhibiteurs ont été synthétisés. Il en existe trois grandes catégories que l'on distingue selon leur structure chimique. Tout d'abord, on retrouve les inhibiteurs comportant un groupement sulfhydryle, structurellement reliés au captopril (fentiapril, pivalopril, zofenopril). La deuxième catégorie renferme un groupement dicarboxylique et ont une structure semblable à l'énalapril (lisinopril, quinapril, ramipril). Finalement, les inhibiteurs ayant un groupement phosphinate et possédant une structure du même type que le fosinopril, constituent la troisième catégorie. La plupart des inhibiteurs constitués d'un groupement ester sont des pro-médicaments de 100 à 1000 fois moins puissants comme inhibiteurs de l'ECA que leurs métabolites actifs, mais ils possèdent une meilleure biodisponibilité orale. De façon générale, les iECA vont différer essentiellement par trois propriétés: 1) la puissance; 2) l'inhibition de l'ECA due au médicament lui-même ou au métabolite formé par la conversion d'un pro-médicament; 3) la pharmacocinétique c'est-à-dire l'absorption, la distribution et l'élimination.

3.2 EFFETS CARDIOPROTECTEURS DES INHIBITEURS DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE

Les iECA sont une classe de médicaments largement utilisés dans le traitement de l'hypertension et des affections cardiovasculaires, notamment l'insuffisance cardiaque. Il a été clairement démontré que les iECA sont cardioprotecteurs chez l'homme. Plusieurs études cliniques ont démontré les bénéfices thérapeutiques des iECA à savoir, l'amélioration de la survie de patients atteints d'insuffisance cardiaque sévère, le retard du développement de l'insuffisance cardiaque chez des patients présentant une dysfonction ventriculaire gauche asymptomatique et la réduction de la mortalité à court et à long terme chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde (Konstam, 1995). De plus, l'inhibition de l'ECA induit une régression de l'hypertrophie ventriculaire gauche chez des patients souffrant d'hypertension (Nakashima *et al.*, 1984) ou consécutive à un infarctus du myocarde (Konstam, 1995). Ces effets bénéfiques sont obtenus suite à l'inhibition de la formation locale d'angiotensine II cardiaque, un puissant vasoconstricteur et facteur de croissance des myocytes et suite à l'inhibition du métabolisme de la BK et à la potentialisation des effets antiprolifératifs et vasodilatateurs de cette dernière (Gavras, 1994; Linz *et al.*, 1995). Plus récemment, l'étude HOPE (The Heart Outcomes Prevention Evaluation) a démontré que le ramipril, un iECA, réduit le risque de cas d'athérosclérose et de mortalité chez des patients présentant un risque élevé d'affections cardiovasculaires mais n'ayant pas de dysfonction ventriculaire gauche ou d'insuffisance cardiaque (Yusuf *et al.*, 2000). En plus d'être utilisés au niveau cardiovasculaire, les iECA peuvent prévenir la perte de fonctions rénales associée à la néphropathie diabétique (Keilani *et al.*, 1995) et diminuer la résistance à l'insuline dans le diabète de type II.

3.3 EFFETS SECONDAIRES AUX INHIBITEURS DE L'ENZYME DE CONVERSION DE L'ANGIOTENSINE

En général, les iECA constituent une classe de médicaments qui sont très bien tolérés et des réactions sévères à ces inhibiteurs sont rares. Cependant, bien qu'étant très bénéfiques, les iECA comportent certains effets secondaires. L'effet secondaire le plus

fréquemment associé à cette classe de médicaments est la toux non productive. Cette toux sèche survient chez 5 à 20% des patients et réapparaît avec la réintroduction du même inhibiteur ou d'un autre type. Cette réaction importunante, n'est généralement pas reliée à la dose, survient plus fréquemment chez les femmes, se développe habituellement entre une semaine et six mois suivant le début du traitement et parfois la cessation du traitement est requise. Cet effet secondaire pourrait être médié par l'accumulation, au niveau des poumons, de la BK, de la substance P, et/ou de prostaglandines, mais actuellement, il n'existe aucune évidence pour une implication de la BK dans la toux. Lors de l'arrêt du traitement, la toux disparaît généralement en moins de quatre jours (Israili & Hall, 1992). D'autres effets secondaires peuvent survenir lors de l'utilisation de fortes doses d'un iECA (captopril) tels que l'altération du goût, la neutropénie, la protéinurie et des éruptions cutanées (Warner & Rush, 1988).

3.3.1 L'ANGIOOEDÈME

L'angiooedème (AO) ou l'oedème angioneurotique est une réaction secondaire aux iECA qui est rare, mais dans certains cas elle peut être fatale (Wood *et al.*, 1987; Slater *et al.*, 1988; Israili & Hall, 1992). Dans la littérature, on classifie l'AO en deux catégories : héréditaire ou acquis. L'AO de type héréditaire est une affection autosomale dominante rare dans laquelle la production (Type I ; 68% des cas) ou la fonction (Type II ; 32% des cas) du C1-estérase inhibiteur est réduite. La catégorie AO de type acquis englobe l'AO induit par des médicaments (iECA), l'AO idiopathique, l'AO causé par des agents physiques, l'AO en association avec le lupus érythémateux ou l'hyperéosinophilie, l'AO suite à une déficience acquise du C1-estérase inhibiteur et l'AO de type allergique (Greaves & Lawlor, 1991; Sabroe & Kobza Black, 1997).

L'AO induit par les iECA se caractérise par un gonflement localisé au niveau du visage, des lèvres, de la bouche, de la langue et de la gorge. Un gonflement au niveau des mains, des pieds et des membranes des muqueuses gastrointestinales et génitales est moins fréquent (Greaves & Lawlor, 1991; Sabroe & Kobza Black, 1997). L'AO localisé au niveau des voies respiratoires supérieures peut provoqué une détresse respiratoire aiguë, l'obstruction des voies respiratoires et la mort (Israili & Hall, 1992).

L'AO survient généralement quelques heures à quelques jours après le début du traitement par un iECA, mais certains cas ont été rapportés suite à une thérapie à long terme (Chin & Buchan, 1990; Israili & Hall, 1992; Bahal O'Mara & O'Mara, 1996; Schiller *et al.*, 1997). Lorsque le traitement est interrompu, l'AO disparaît en quelques heures. De plus, l'AO associée à la prise d'iECA n'apparaît pas comme étant relié à la dose. Les différentes structures des iECA ne semblent pas être un facteur de cause, l'AO serait donc plutôt un effet de classe. Tout ceci suggère que le mécanisme par lequel les iECA induisent l'AO implique une réaction biochimique plutôt qu'immunologique bien que le mécanisme exact soit jusqu'à présent toujours inconnu. Plusieurs études ont émis l'hypothèse que la BK serait responsable de l'AO induit par les iECA (Anderson & deShazo, 1990; Bahal O'Mara & O'Mara, 1996; Sabroe & Kobza Black, 1997). Par contre, une seule publication a rapporté une légère augmentation de la BK endogène au cours d'un épisode d'AO (Nussberger *et al.*, 1998). Blais Jr. et coll. (1999a) ont caractérisé le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK dans le sérum de patients ayant présenté un AO sous iECA. Ils ont démontré que certains patients possèdent une valeur de demi-vie ($t_{1/2}$) de la des-Arg⁹-BK, et non de la BK, significativement plus élevée et celle-ci est encore plus élevée lorsque les échantillons de sérum sont incubés en présence d'un iECA.

3.3.2 LA RÉACTION ANAPHYLACTOÏDE EN HÉMODIALYSE

La réaction anaphylactoïde (RA) ou d'hypersensibilité en hémodialyse est une réaction peu fréquente, mais dans certains cas, elle peut avoir des conséquences graves (Villarroel, 1984). Cette réaction est caractérisée par les signes et symptômes suivants: de l'urticaire, de l'angiooedème, de la dyspnée, un bronchospasme, une hypotension, un collapsus cardiovasculaire et dans certains cas la mort (Daugirdas & Ing, 1988). La RA survient généralement moins de dix minutes suivant le début de la dialyse et elle peut être observée avec tous les types de membranes: flux lent ou rapide, naturelle ou synthétique. Par contre, plusieurs RA ont été observées lors d'une dialyse à l'aide d'une membrane de polyacrylonitrile chargée négativement à flux rapide (AN69) chez des patients simultanément traités au moyen d'un iECA (Tielemans *et al.*, 1990; Verresen *et*

al., 1990). Une implication de la BK dans ce type de réaction a été proposée (Schulman et al., 1993; Tielemans *et al.*, 1990; Verresen *et al.*, 1990). Deux études ont montré chez des patients dialysés au moyen d'une membrane de type AN69, une augmentation significative de la concentration plasmatique de la BK pendant la phase aiguë de la RA (Schaefer *et al.*, 1993; Verresen *et al.*, 1994). Cependant, la concentration plasmatique de la des-Arg⁹-BK n'a pas été mesurée. Afin de mieux comprendre la physiopathologie de cet effet secondaire, Blais Jr. et coll (1999b) ont caractérisé le métabolisme de la BK et celui de la des-Arg⁹-BK dans le sérum de patients ayant présenté une RA (RA+) lorsque dialysés en présence d'une membrane chargée négativement et simultanément traités au moyen d'un iECA. Ils ont montré que ces patients présentent une anomalie non pas du métabolisme de la BK, mais bien de la des-Arg⁹-BK. En effet, la t_{1/2} de la des-Arg⁹-BK est significativement plus élevée dans le sérum de patients RA+ comparativement à des patients dialysés dans des conditions identiques, mais n'ayant pas présenté une telle réaction (RA-). Cette anomalie métabolique est beaucoup plus marquée lors de la préincubation du sérum des patients RA+, en présence d'un iECA. De plus, l'activité sérique de l'APP est significativement diminuée pour les patients RA+. Ils ont également établi une corrélation négative entre l'augmentation de la t_{1/2} de la des-Arg⁹-BK et la diminution de l'activité sérique de l'APP.

D'autres réactions anaphylactoïdes ou atypiques caractérisées par une hypotension, une bradycardie et une dyspnée peuvent être observées chez des patients traités par un iECA et subissant une aphérèse des lipoprotéines de faible densité, une immunothérapie désensibilisante ou un échange de plasma (Owen & Brecher, 1994).

4. LES RÉACTIONS D'HYPOTENSION LORS DE TRANSFUSIONS SANGUINES

Lors d'une transfusion sanguine certaines complications peuvent survenir du à la présence de leucocytes dans le sang total ou dans des produits fractionnés du sang (concentrés de plaquettes ou globules rouges). Parmi ces réactions on retrouve la

réaction fébrile non-hémolytique, l'alloimmunisation aux plaquettes transfusées et la transmission du cytomégalovirus associée à la transfusion. Afin de réduire la fréquence de ces complications, on utilise des produits sanguins déplétés en leucocytes à l'aide de filtres (Higgins, 1996). Cette filtration peut être effectuée près du lit du patient, dans une banque de sang ou dans un centre de prélèvement sanguin.

4.1 LES RÉACTIONS D'HYPOTENSION SÉVÈRES

Plusieurs types de réactions transfusionnelles très bien caractérisées incluant les réactions hémolytiques et allergiques, les réactions septicémiques et "transfusion-related acute lung injury (TRALI)" sont parfois accompagnées d'une hypotension. Dans ces cas, l'hypotension est de faible amplitude et ne caractérise pas ces types de réactions. Récemment, plusieurs études ont rapporté des réactions d'hypotension sévères (RHS) suite à une transfusion, qui présentent des caractéristiques différentes des réactions transfusionnelles généralement observées (Sano *et al.*, 1996; Myers *et al.*, 1996; Hume *et al.*, 1996; Fried *et al.*, 1996; Yenicesu *et al.*, 1998; Belloni *et al.*, 1998; Abe *et al.*, 1998; Sweeney *et al.*, 1998; Mair & Leparç, 1998). Cette RHS est caractérisée par une chute de la pression systolique et/ou diastolique supérieure ou égale à 30 mmHg. La majorité des réactions survient moins d'une heure suivant le début de la transfusion bien que de façon générale les réactions se produisent environ 15 minutes suivant le début de la transfusion. De plus, la RHS est généralement accompagnée d'une détresse respiratoire, de crampes abdominales et de nausées.

Sano et coll. (1996) ont décrit, chez une patiente souffrant d'anémie aplastique et d'une insuffisance rénale chronique, une RHS suite à la transfusion de plaquettes déplétées en leucocytes au moyen d'un filtre chargé négativement (Pall PL-50D). Immédiatement après la transfusion de plaquettes, la patiente a présenté de fortes nausées suivies d'une chute de pression systolique de 130 à 90 mmHg. La transfusion fut arrêtée et la pression s'est rétablie à 110 mmHg en 10 minutes, sans traitement. Une réaction similaire s'est reproduite suite à la transfusion de plaquettes déplétées en leucocytes à l'aide d'un filtre identique, mais aucune réaction n'est survenue lorsque le

filtre chargé négativement a été remplacé par un filtre chargé positivement (SePacell PLS-5A).

Dans une étude rétrospective, Myers et coll. (1996) ont examiné l'association possible entre l'utilisation d'un iECA et les réactions d'hypotension suite à une transfusion sanguine. Parmi les 240 réactions rapportées (représentant 1.3% des 19 115 produits sanguins totaux transfusés), 11 de ces réactions consistaient en une réaction d'hypotension associée à une transfusion sanguine mais d'étiologie inconnue. Ces 11 réactions sont survenues chez 7 patients dont 4 étaient sous iECA et la majorité de ces transfusions consistait en la transfusion de plaquettes déplétées en leucocytes à l'aide d'un filtre chargé négativement. Ces auteurs ont également montré que 57% des patients ayant présenté une réaction d'hypotension suite à une transfusion étaient sous iECA versus 14% de tous ceux ayant reçu une transfusion. Ces même auteurs ont conclu que la majorité des RHS étaient reliées au type de filtration et à l'utilisation d'un iECA par les patients.

“The Transfusion Practices Committee” de l'Association Américaine des Banques de sang (AABB) a publié un rapport résumant les détails des RHS suite à une transfusion de plaquettes (Hume *et al.*, 1996). Dans ce rapport, 17 réactions survenues chez 13 patients sont caractérisées essentiellement par une hypotension sévère, c'est-à-dire par une chute de la pression systolique et/ou diastolique de 30 mmHg ou plus. De plus, la majorité (88%) de ces réactions sont survenues moins d'une heure suivant le début de la transfusion, une détresse respiratoire (dyspnée et/ou désaturation oxygène-hémoglobine) était présente dans la plupart des cas (82%) et ces réactions disparaissaient rapidement après l'arrêt de la transfusion (82%). Dans 88% de ces réactions, les produits sanguins utilisés ont été déplétés en leucocytes au moyen d'un filtre chargé négativement. Seulement 2 des 13 patients étaient sous iECA au moment de la réaction. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ces réactions pouvaient être dues aux cytokines pouvant s'accumuler durant la période d'entreposage des concentrés de plaquettes, mais la possibilité que l'histamine, le facteur activateur de plaquettes ou la BK puissent causer ces réactions ne pouvait être excluse.

Une réaction d'hypotension ayant des caractéristiques similaires, a été observée par Fried et coll. (1996) chez un patient sous iECA, mais recevant une transfusion de plasma déplété en leucocytes à l'aide d'un filtre chargé négativement. D'autres réactions d'hypotension essentiellement similaires mais comportant certaines variantes ont été rapportées par la suite. Yenicesu et coll. (1998) ont constaté, chez trois patients sous iECA, une RHS suite à la transfusion de plaquettes déplétées en leucocytes au moyen d'un filtre chargé positivement. Belloni et coll. (1998) ont quant à eux, rapporté cinq RHS, chez cinq patients, suite à la transfusion de plaquettes déplétées en leucocytes. Par contre, aucun des patients n'étaient traités par iECA et quatre réactions sur cinq ce sont produites avec un filtre chargé négativement, alors qu'une seule réaction est survenue avec un filtre chargé positivement. Ils ont également noté un fait intéressant chez un patient ayant eu une RHS avec un filtre chargé négativement. Ce dernier a reçu une seconde transfusion avec le même concentré de plaquettes, mais cette fois-ci un filtre positif a été utilisé et aucune réaction n'est survenue. Une RHS suite à la transfusion autologue de sang déplété en leucocytes, via un filtre chargé négativement, a été rapportée chez un patient sous iECA par Abe et coll. (1998). Par la suite, la même unité de sang fut transfusée, mais sans déplétion en leucocytes et aucune réaction d'hypotension n'a été observée. D'autres cas d'hypotension sévère ont été rapportés chez deux patients suite à la transfusion de concentrés de globules rouges déplétés en leucocytes au moyen d'un filtre chargé négativement, près du lit du patient. Par contre, ces réactions ont cessé lorsque les transfusions ont été effectuées au moyen de concentrés de globules rouges préalablement déplétés avant la mise en réserve de ceux-ci.

Récemment, des patients sous iECA et subissant une "coronary artery bypass graft" (CABG), ont présenté une RHS suite à la transfusion de plaquettes déplétées en leucocytes au moyen d'un filtre chargé négativement (Mair & Leparc, 1998). Mair et coll. ont fait une rétrospective sur une période de trois mois des cas d'hypotension sur transfusion de plaquettes. Dans cette rétrospective, les patients ayant subi une CABG, traités par un iECA et ayant reçu une transfusion de plaquettes déplétées en leucocytes, ont tous présenté une réaction d'hypotension.

4.2 LES KININES ET LES RÉACTIONS D'HYPOTENSION SÉVÈRES

Tous ces cas d'hypotension associée à une transfusion sanguine, mais d'étiologie inconnue, ont soulevé plusieurs questions. Le fait que la plupart de ces réactions soit survenues suite à la transfusion de produits sanguins déplétés en leucocytes au moyen d'un filtre chargé négativement a mené à l'étude du rôle joué par ces filtres dans ces réactions. De plus, le rôle des iECA dans ces réactions d'hypotension a suscité un questionnement puisque plusieurs des patients ayant présenté ces réactions étaient sous iECA. La nature de ces observations a permis de suggérer un rôle potentiel de la BK dans l'étiologie de ces réactions sachant que lorsque le plasma est en contact avec une surface chargée négativement, il y a activation du système de contact menant à la génération de BK. (Sano *et al.*, 1996; Abe *et al.*, 1998; Sweeney *et al.*, 1998).

Récemment, il a été montré que la BK est générée lors de la transfusion de plaquettes ou de globules rouges déplétés en leucocytes au moyen d'un filtre chargé négativement (Takahashi *et al.*, 1994, 1995a,b; Shiba *et al.*, 1997; Hild *et al.*, 1998). Dans leur étude, Takahashi et coll. ont comparé le taux de BK générée *in vitro*, à l'aide d'un filtre chargé négativement avec celui généré par un filtre chargé positivement. Ils ont ainsi montré que la quantité de BK générée par le filtre chargé positivement est très faible (négligeable). De plus, l'ajout d'un iECA dans le concentré de plaquettes a permis de maintenir un taux plus élevé de BK durant la filtration via le filtre chargé négativement.

Dans une étude menée par Colman et coll. (1996, 1999) (Scott *et al.*, 1998), une analyse du KHPM et du KFPM, par "particle concentration fluorescence immunoassay (PCFIA)", n'a montré aucune évidence d'une activation du système de contact de même qu'une génération cliniquement significative de BK durant la filtration de plaquettes à l'aide d'un filtre chargé négativement. Selon eux, la quantité de BK générée par ce type de filtre est insuffisante pour causer une RHS, même chez des patients sous iECA.

Shiba et coll. (1997), quant à eux, suggère que les niveaux de BK suffisants pour provoquer une hypotension peuvent être générés, chez des patients ayant une basse activité de l'ECA, suite à la transfusion de plaquettes déplétées en leucocytes au moyen d'un filtre chargé négativement. Pour ce faire, ils ont divisé un concentré de plaquettes en deux fractions afin de filtrer par la suite une fraction avec un filtre chargé négativement et l'autre avec un filtre chargé positivement. Les taux de prékallitréine, de KHPM et de BK pré et post-filtration ont été mesurés. Aucun des paramètres mesurés n'a été modifiés suite à une filtration avec le filtre chargé positivement. Par contre, la filtration à l'aide du filtre chargé négativement a provoqué une baisse significative des taux de prékallitréine et une augmentation significative des taux de BK, bien que les taux de KHPM soient inchangés. Le taux maximum de BK fut atteint 5 à 10 minutes après la filtration avec le filtre négatif et le taux de prékallitréine a diminué de 10% (indiquant une activation du système de contact). Ils ont également observé que les taux de BK dans les concentrés de plaquettes étaient inversement reliés à l'activité de l'ECA dans ces derniers. Ces taux de BK ont été mesurés chez quatre patients, deux ayant une activité de l'ECA normale et deux possédant une activité diminuée. Les taux de BK sont demeurés inchangés dans le cas des patients ayant une activité normale de l'ECA, tandis que les patients avec une activité diminuée ont présenté une augmentation significative de BK durant la transfusion du à la baisse du métabolisme de cette dernière.

Dans une autre étude, l'effet de la filtration *in vitro* d'un assemblage de 13 concentrés de plaquettes sur le clivage du KHPM a été investigué (Davenport & Penezina, 1997). Un immunobuvardage de type Western utilisant un anticorps contre la chaîne légère du KHPM, a été réalisé pour mesurer le KHPM. Ainsi, ces auteurs ont observé que la filtration de l'assemblage des concentrés de plaquettes, déplétés en leucocytes au moyen d'un filtre chargé négativement provoque une activation complète du KHPM seulement dans certains groupes de concentrés (9/13).

Un rapport particulièrement intéressant est celui de Abe et coll. (1998) qui ont été capable de comparer les mesures du KHPM intact et clivé, avant et après la transfusion

de sang autologue déplété en leucocytes au moyen d'un filtre chargé négativement, chez un patient présentant une RHS. Ils ont démontré que le taux de KHPM intact était plus bas chez le patient après la réaction hypotensive. C'est la première étude du genre à rapporter de telles mesures chez un patient présentant une RHS.

En résumé, il existe des controverses dans la littérature concernant les taux de BK générés et quant à l'activation du système de contact, suite à une filtration au moyen d'un filtre chargé négativement. La majorité des groupes de recherche (3/4) ont obtenus des résultats supportant l'hypothèse que la BK peut être générée lorsque les concentrés de plaquettes sont exposés à un filtre chargé négativement afin de les déplétées en leucocytes.

5. LE BUT DU TRAVAIL

Au laboratoire, des méthodes de dosages immunologiques hautement spécifiques et sensibles pour la BK et la des-Arg⁹-BK ont été développées (Décarie *et al.*, 1994; Raymond P *et al.*, 1995). Grâce à ces méthodes de dosages, une technique permettant de définir le métabolisme de la BK exogène ajoutée au sérum et de la des-Arg⁹-BK formée a été mise au point (Décarie *et al.*, 1996). Cette technique fut appliquée pour caractériser le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK dans le sérum de diverses espèces animales (rats, chiens et lapins) et dans le sérum d'un nombre limité d'hommes en bonne santé. Ces résultats ont permis de démontrer une différence dans le métabolisme des kinines entre ces différentes espèces. Par la suite, au cours de l'étude des effets secondaires aux iECA, cette même technique a été utilisée pour caractériser le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK dans le sérum de patients ayant présenté un AO aux iECA (Blais *et al.*, 1999a), une RA lorsque dialysés en présence d'une membrane chargée négativement et simultanément traités au moyen d'un iECA (Blais *et al.*, 1999b) et dans le sérum d'un nombre restreint de patients ayant présenté une RHS lors d'une transfusion sanguine (Cyr *et al.*, 1999). Ces études ont montrées, au niveau du sérum, une prolongation de la t_{1/2} de la des-Arg⁹-BK, celle-ci pouvant être corrélée avec une activité diminuée de l'APP. Cette diminution d'activité de l'APP

n'est pas attribuable à un inhibiteur enzymatique endogène circulant mais plutôt à un défaut enzymatique.

Avant d'étudier la génétique de cette anomalie enzymatique et d'étudier un nombre plus élevé de patients ayant présenté soit un AO, une RA ou une RHS aux iECA, il est important de caractériser, au niveau sérique, le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK dans une large population d'individus (environ 100 personnes) en bonne santé afin d'établir des valeurs de références. Le but de ce travail est de définir le profil métabolique des kinines dans le sérum d'individus sains mais également de déterminer la cinétique de l'activation du système de contact pour ces mêmes individus. Pour ce faire, le dosage de la BK exogène ajoutée au sérum et de la des-Arg⁹-BK formée seront mesurés par les méthodes de dosage immunologiques développées au laboratoire. De plus, de façon à définir la participation relative des métallopeptidases dans le métabolisme des kinines l'activité enzymatique de l'ECA, l'APP et de la kininase I sera également déterminée. Pour cette même population, le système de contact du plasma sera activé, en présence d'un iECA, par des billes de verre afin de définir la cinétique de formation de la BK à partir du KHPM endogène et de la des-Arg⁹-BK formée à partir de cette BK endogène. Finalement, une comparaison entre le métabolisme exogène et endogène de la BK sera effectuée.

CHAPITRE 2

**ANOMALY OF THE DES-ARG⁹-BRADYKININ METABOLISM
ASSOCIATED WITH SEVERE HYPOTENSIVE REACTIONS
DURING BLOOD TRANSFUSIONS : A PRELIMINARY STUDY**

**ANOMALY OF THE DES-ARG⁹-BRADYKININ METABOLISM ASSOCIATED
WITH SEVERE HYPOTENSIVE REACTIONS DURING BLOOD TRANSFUSIONS:
A PRELIMINARY STUDY**

M. CYR⁽¹⁾, H. A. HUME⁽²⁾, M. CHAMPAGNE⁽²⁾, J. D. SWEENEY⁽³⁾,
C. BLAIS, JR.⁽¹⁾, N. GERVAIS⁽¹⁾ AND A. ADAM⁽¹⁾.

⁽¹⁾Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montréal, (Québec), Canada;
⁽²⁾Département de pédiatrie, Hôpital Ste-Justine, Université de Montréal, Montréal,
(Québec), Canada; ⁽³⁾Lifespan Academic Medical Center, The Miriam and Rhode Island
Hospitals, Rhode Island, USA.

Running head: des-Arg⁹-BK and severe hypotensive reactions

Abbreviations: ACE = angiotensin-converting enzyme; BK = bradykinin; RBC(s) = red
blood cell(s); WBC(s) = white blood cell(s).

This manuscript was published in: **Transfusion** 1999, volume 39, page 1084-1088.

1. ABSTRACT

BACKGROUND: Severe hypotensive reactions have been described after the transfusion of platelets or red cells through negatively-charged bedside white cell-reduction filters. The possibility of a role for bradykinin (BK) in the genesis of these reactions has been raised.

STUDY DESIGN AND METHODS: To understand if an anomaly of BK metabolism is associated with these reactions, the metabolism of BK and des-Arg⁹-BK was studied in the sera of four patients who presented with a severe hypotensive transfusion reaction. Tests were performed in absence and in presence of a complete in vitro inhibition of angiotensin-converting enzyme (ACE) activity by enalaprilat.

RESULTS: In the presence of ACE inhibition (enalaprilat), the half-life ($t_{1/2}$) of BK measured in the sera of patients who presented with a severe hypotensive transfusion reaction (361 ± 90 sec) was not significantly different from that measured in the sera of normal controls (249 ± 16 sec). In the presence of ACE inhibition (enalaprilat), the $t_{1/2}$ of des-Arg⁹-BK was significantly greater in patients who presented with a severe hypotensive transfusion reaction (1549 ± 319 sec) than in normal controls (661 ± 38 sec) ($p < 0.001$).

CONCLUSION: A metabolic anomaly mainly affecting the degradation of des-Arg⁹-BK could be responsible for its accumulation in vivo. Des-Arg⁹-BK could be responsible, at least in part, for severe hypotensive transfusion reactions.

Indexing terms: hypotensive reactions, blood transfusion, bradykinin,
des-Arg⁹-bradykinin, angiotensin-converting enzyme inhibitor,
kinin metabolism.

2. INTRODUCTION

Several well-categorized types of transfusion reactions, in particular, hemolytic transfusion reactions, septic reactions, anaphylactic reactions, transfusion-related acute lung injury and, in the settings of massive transfusion or plasmapheresis, citrate toxicity may be accompanied by hypotension. Recently, several investigators have reported severe hypotensive transfusion reactions that are not among the transfusion reactions listed above.¹⁻⁹

Several questions have been raised about these unexplained hypotensive reactions. The fact that most of these reactions have occurred in patients receiving blood components transfused through negatively charged bedside white cell (WBC)-reduction filters has led to speculation about the role of such filters in these reactions. Also, the fact that several patients were being treated with an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor has raised questions about its role. The nature of these observations led investigators to suggest that bradykinin (BK) may play an etiologic role in these reactions.^{1,7,8}

BK is a powerful vasodilatory nonapeptide (Arg¹-Pro²-Pro³-Gly⁴-Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸-Arg⁹) with a plasma half-life ($t_{1/2}$) of less than 30 seconds. It exerts its pharmacological activity by activating the constitutively expressed B₂ receptors. Various peptidases are capable of metabolizing BK, but their activity depends on the biological milieu.¹⁰ In humans, ACE, a metallopeptidase, constitutes the main enzyme responsible for the inactivation of BK, accounting for 76.0 ± 7.5 percent of the total metabolic transformation of BK in the blood.^{10,11} Besides ACE, at least, two other enzymes metabolize BK: 1) a metallopeptidase (aminopeptidase P) accounts for approximately 21 percent of the degradation of BK and 2) kininase I (a generic name for various carboxypeptidases that transform BK into its active metabolite des-Arg⁹-BK¹⁰) accounts for only 3.4 ± 1.2 percent of the total serum metabolic activity of BK.¹¹ In its turn, des-Arg⁹-BK is inactivated by two enzymes, namely ACE and the metallopeptidase aminopeptidase P, which is involved in the metabolism of BK. However in the case of

des-Arg⁹-BK, ACE represents only 33.9 ± 1.5 percent of the total degrading activity¹¹ with the remaining activity, approximately 66 percent, being assumed by aminopeptidase P. Unlike BK, des-Arg⁹-BK stimulates the B₁ receptors, whose synthesis has been shown to be upregulated by cytokines, such as during tissue injury or chronic inflammation.^{12,13}

When plasma is in contact with a negatively charged surface, the contact system of plasma (factor XII, prekallikrein and high-molecular-weight kininogen) is activated. This activation leads to the generation of BK, which is further metabolized, at least in part, into des-Arg⁹-BK.¹⁴ Recently, it has been shown that BK is generated when platelet concentrates are WBC reduced by using negatively charged filters.¹⁵

The aim of this pilot study was to define the metabolism of BK and des-Arg⁹-BK in the sera of a limited number of patients who had previously experienced severe hypotensive reactions while receiving platelet or red cell (RBC) transfusions through negatively charged WBC-reduction filters. Using the same experimental approach as previously used to define kinin metabolism in normal sera¹¹ and in the sera of patients who had presented with angioedema or hypersensitivity reactions associated with ACE inhibitor therapy,^{16,17} we defined serum BK and des-Arg⁹-BK metabolism in the absence and the presence of an ACE inhibitor.

3. MATERIELS AND METHODS

3.1 Patients

Five serum samples were obtained from four patients who experienced severe hypotensive reactions while receiving platelet or RBC transfusions through negatively charged WBC-reduction filters. Clinical data have been reported previously⁵ and are briefly summarized in Table 1. Three of the four patients were receiving an ACE inhibitor at the time the hypotensive reaction occurred. Blood samples were taken from Patients 1 and 2 within 4 weeks of the reaction and from Patients 3 and 4 at 9 to 13 months after the reaction. Two days after the first serum sample was collected from

Patient 4, a second sample was taken. Samples were frozen after collection and stored at -18°C until they were analyzed. Serum samples were also acquired from 11 normal, healthy adults; they constitute the control group.¹¹

3.2 Metabolism of BK and des-Arg⁹-BK

3.2.1 Incubation procedure

A first set of incubations was performed to assess the metabolic profile of BK in the absence of in vitro ACE inhibition. BK (final concentration of the immunoreactive peptide, 471 nM) was added to the serum samples, which were incubated at 37°C .¹¹ After various incubation periods (30 sec - 80 min), the reaction was stopped by adding cold anhydrous ethanol at a final concentration of 80 percent (vol/vol). The samples were then incubated for 1 hour at 4°C and centrifuged ($2,000 \times g$, 15 min, 4°C) to allow the complete precipitation of the kinin precursors. The supernatant was decanted and evaporated in a concentrator (Speed Vac, Savant, Farmingdale, NY). The residues were stored at -80°C until quantification of immunoreactive BK and des-Arg⁹-BK was performed.

A second set of incubations was performed to define the influence of total in vitro inhibition of ACE on the metabolism of BK. Serum was incubated with enalaprilat (final concentration, 130 nM) for 15 min at 37°C before the addition of exogenous BK. This solution was then incubated and treated in the same way as described above.

3.2.2 Quantification of BK and des-Arg⁹-BK

The residues of the evaporated ethanol extracts were resuspended in 50 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 100 mM NaCl and 0.05-percent Tween-20. After that, residual BK and des-Arg⁹-BK were quantified by competitive chemiluminescent enzyme immunoassays as described previously.^{14,18} To detect and quantify immune complexes, both immunoassays used highly specific polyclonal rabbit immunoglobulins raised against the carboxy-terminal end of BK and des-Arg¹⁰-kallidin and the digoxigenin-anti-digoxigenin system (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada).

These methods have been validated and their analytical performances reported previously.^{14,18}

3.2.3 Kinetic measures

The kinin (S) hydrolysis rate constant (k) was obtained by using a first-order equation $S = S_0 \times e^{-kt}$, whereas the half-life ($t_{1/2}$) was calculated as $t_{1/2} = \ln(2)/k$.¹⁹

3.3 Serum ACE activity measurement

The Buhlmann ACE radioenzymatic assay (Angiotensin Converting Enzyme ³H REA, ALPCO, Windham, NH) was used under the conditions described by the manufacturer to determine ACE activity in the serum samples. This assay measured the hydrolysis of the synthetic substrate [³H]-hippuryl-glycyl-glycine into [³H]-hippuric acid and a dipeptide. The tritiated hippuric acid was separated from unreacted substrate by solvent extraction and measured in a beta counter. For each sample, tests were performed in duplicate. ACE activity was expressed as ACE units as described by the manufacturer (1 unit ACE = 1 μ mol [³H]-hippuric acid/min/L).

3.4 Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SEM. The significance of any differences between the two groups was tested using a *t* test. A *p* value less than 0.05 was considered significant.

4. RESULTS

The ACE activity and the $t_{1/2}$ of BK and des-Arg⁹-BK for the patients who experienced severe hypotensive reactions while receiving platelet or RBC transfusions through negatively charged WBC-reduction filters are presented in Table 2. ACE serum activity range from 1.6 to 44.7 ACE units and corresponded to the presence or the absence of ACE inhibitor treatment at the time of blood sampling. The variability of ACE activity was reflected in the wide ranges of the $t_{1/2}$ of BK (55 to 224 sec) and des-Arg⁹-BK (467 to 1498 sec).

When serum samples were incubated with enalaprilat at a concentration that completely inhibits ACE activity, the $t_{1/2}$ of BK increased in both groups of samples, but measured values in the patients who experienced a severe hypotensive transfusion reaction (361 ± 90 sec) were not significantly different from those in the sera of normal controls (249 ± 16 sec) (Fig. 1). However, with this complete in vitro inhibition of ACE, the $t_{1/2}$ of des-Arg⁹-BK was significantly greater in the patients who presented severe hypotensive reactions (1549 ± 319 sec) than in the control samples (661 ± 38 sec) ($p < 0.001$) (Fig. 1). For the second serum sample from Patient 4, the $t_{1/2}$ of BK and des-Arg⁹-BK, in the in vitro presence of enalaprilat, was similar to that in the first sample ($t_{1/2}$ of BK: 391 sec and 321 sec; $t_{1/2}$ of des-Arg⁹-BK: 1239 sec and 1482 sec).

5. DISCUSSION

In this preliminary study, we defined for the first time the metabolism of BK and des-Arg⁹-BK in sera from a limited number patients who had previously experienced severe hypotensive reactions while receiving platelet or RBC transfusions through negatively charged WBC-reduction filters. The analytical approach that we used had been developed previously in our laboratory^{14,18} to explore the pathophysiological background of ACE inhibitors side effects.^{16,17} Although it has been suggested that BK could play a role in severe hypotensive reactions,^{1,20} no previous study has been undertaken to define BK metabolism in the serum of patients with these unusual transfusion reactions. In the small group of patients that we studied, we could not demonstrate a difference between patients and normal controls for BK and des-Arg⁹-BK half-life. The values measured in the samples were in fact difficult to compare with those of the control group, because two of the four patients were receiving ACE inhibitor therapy at the time of blood sampling, which resulted in highly variable results for BK and des-Arg⁹-BK half-life. However, once ACE activity was totally inhibited in vitro, des-Arg⁹-BK exhibited a significantly higher $t_{1/2}$ value in the sera of patients who had previously experienced severe hypotensive reactions while receiving platelet or RBC transfusions through negatively charged WBC-reduction filters than in the sera of the control group.

Although measured in only a limited number of patients, this behavior of des-Arg⁹-BK in the presence of in vitro ACE inhibition must be paralleled with two other observations in our laboratory, namely, those obtained in patients who presented with angioedema after ACE inhibitor therapy¹⁶ and those in patients undergoing dialysis who experienced hypersensitivity reactions while being treated with an ACE inhibitor.¹⁷ Both groups of patients demonstrated a significantly higher $t_{1/2}$ value of des-Arg⁹-BK (but not BK), which remained elevated when serum samples were incubated with an ACE inhibitor. Patients who presented hypersensitivity reactions while treated with an ACE inhibitor and undergoing dialysis with a negatively charged membrane exhibited significantly higher des-Arg⁹-BK $t_{1/2}$ values than did patients who never presented with such an acute side effect while undergoing dialysis in the same conditions. Moreover, in the first group, we could measure a significantly decreased activity of aminopeptidase P, and we identified this as the metallopeptidase that accounts for approximately 21 percent and 66 percent of the serum metabolism of BK and des-Arg⁹-BK, respectively. We could also measure a significant negative correlation between the degree of decrease in aminopeptidase P activity and the increase in des-Arg⁹-BK $t_{1/2}$ measured in the presence of ACE inhibition.¹⁷ These observations of hypersensitivity reactions in hemodialysis patients suggest that the same mechanism may be important in the development of hypotensive reactions to blood transfusions. A greater number of patients experiencing these reactions will have to be studied to determine if this hypothesis is correct.

6. ACKNOWLEDGMENT

C. Blais, Jr. is the recipient of a scholarship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

7. REFERENCES

1. Sano H, Koga Y, Hamasaki K, Furuyama H, Itami N. Anaphylaxis associated with white-cell reduction filter. *Lancet* 1996; 347 (9007): 1053.
2. Myers T, Uhl L, Kruskall MS. Association between angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and hypotensive transfusion reactions. *Transfusion* 1996; 36 (Suppl): 60S.
3. Hume HA, Popovsky MA, Benson K, Glassman AB, Hines D, Oberman HA, Pisciotto PT, Anderson KC. Hypotensive reactions: a previously uncharacterized complication of platelet transfusion? *Transfusion* 1996; 36 (10): 904-909.
4. Fried MR, Eastlund T, Christie B, Mullin GT, Key NS. Hypotensive reactions to white cell-reduced plasma in a patient undergoing angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. *Transfusion* 1996; 36 (10): 900-903.
5. Yenicesu I, Tezcan I, Tuncer AM. Hypotensive reactions during platelet transfusions. *Transfusion* 1998; 38 (4): 410.
6. Belloni M, Alghisi A, Bettini C, Soli M, Zampieri L. Hypotensive reactions associated with white cell-reduced apheresis platelet concentrates in patients not receiving angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Transfusion* 1998; 38 (4): 411-413.
7. Abe H, Ikebuchi K, Shimbo M, Sekiguchi S. Hypotensive reactions with a white-cell reduction filter: activation of kallikrein-kinin cascade in a patient. *Transfusion* 1998; 38 (4): 411-412.

8. Sweeney JD, Dupuis M, Mega AJ. Hypotensive reactions to red cells filtered at the bedside, but not to those filtered before storage, in patients taking ACE inhibitors. *Transfusion* 1998; 38 (4): 410-411.
9. Mair B, Leparç GF. Hypotensive reactions associated with platelet transfusions and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Vox Sang* 1998; 74 (1): 27-30.
10. Erdös EG, Skidgel RA. Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease. In: Farmer SG, ed. *Handbook of Immunopharmacology: The Kinin System*. London: Academic Press, 1997: 111-141.
11. Décarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, Adam A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* 1996; 270 (39): H1340- H1347.
12. Marceau F. Kinin B₁ receptors: a review. *Immunopharmacology* 1995; 30 (1): 1-26.
13. Blais C Jr, Couture R, Drapeau G, Colman RW, Adam A. Involvement of endogenous kinins in the pathogenesis of peptidoglycan-induced arthritis in the Lewis rat. *Arthritis Rheum* 1997; 40 (7): 1327-1333.
14. Raymond P, Drapeau G, Raut R, Audet R, Marceau F, Ong H, Adam A. Quantification of des-Arg⁹-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. *J Immunol Methods* 1995; 180 (2): 247-257.
15. Hild M, Söderström T, Egberg N, Lundahl J. Kinetics of bradykinin levels during and after leucocyte filtration of platelet concentrates. *Vox Sang* 1998; 75 (1): 18-25.

16. Blais C Jr, Rouleau JL, Brown NJ, Lepage Y, Spence D, Munoz C, Friberg J, Geadah D, Gervais N, Adam A. Serum metabolism of bradykinin (BK) and des-Arg⁹-BK in patients with ACE inhibitor (ACEI)-associated angioedema (AE) (abstract). Presented at the 15th International Conference on Kinins (Kinin '98 Nara), Nara, Japan, October 19-24, 1998: P-X-21.
17. Blais C Jr, Marc-Aurèle J, Simmons WH, Loute G, Thibault P, Skidgel RA, Adam A. Des-Arg⁹-bradykinin metabolism in patients who presented hypersensitivity reactions during hemodialysis: role of serum ACE and aminopeptidase P. *Peptides* 1999; 20 (4): 421-430.
18. Décarie A, Drapeau G, Closset J, Couture R, Adam A. Development of digoxigenin-labeled peptide: application to chemiluminoenzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues. *Peptides* 1994; 15 (3): 511-518.
19. Moore JW, Pearson RG. Complex reactions. In: Moore JW, Pearson RG, eds. *Kinetics and Mechanisms*. New York: Wiley, 1981: 284-296.
20. Shiba M, Tadokoro K, Sawanobori M, Nakajima K, Suzuki K, Juji T. Activation of the contact system by filtration of platelet concentrates with a negatively charged white cell-removal filter and measurement of venous blood bradykinin level in patients who received filtered platelets. *Transfusion* 1997; 37 (5): 457-462.

TABLE I

Clinical characteristics of the severe hypotensive transfusion reaction

| Patient Characteristics | Product | Temperature (°C) | | Blood Pressure (mm Hg) | | Associated symptoms/signs |
|--|---|------------------|-----------------|------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| | | Pre-transfusion | During reaction | Pre-transfusion | During reaction | |
| 1: 13 yr old, female, osteosarcoma, not on ACEI Rx | Pooled platelet concentrates, 3 days old, Neg LRF | 35.4 | 35.3 | 116/46 | 62/27 | None |
| 2: 15 yr old, male, BMT, on ACEI Rx | Pooled platelet concentrates, 4 days old, Neg LRF | 37.8 | 37.2 | 106/65 | 75/45 | None |
| 3: 70 yr old, male, myelodysplastic syndrome, on ACEI Rx | RBCs in AS-1, 10 days old, Neg LRF | 35.3 | 36.0 | 110/68 | 60/30 | Abdominal cramps, diarrhea, syncope |
| 4: 50 yr old, male, acute leukemia, on ACEI Rx | RBCs in AS-1, 2 days old, Neg LRF | 35.7 | 35.8 | 120/60 | 70/40 | Abdominal cramps, syncope |

BMT: bone marrow transplantation
 ACEI Rx: angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy
 Neg LRF: negatively charged leukocyte reduction filter
 RBCs: red blood cells

TABLE II

ACE activity and half-life of BK and des-Arg⁹-BK (in the absence of incubation with an ACE inhibitor) in the sera of patients who experienced severe hypotensive transfusion reactions

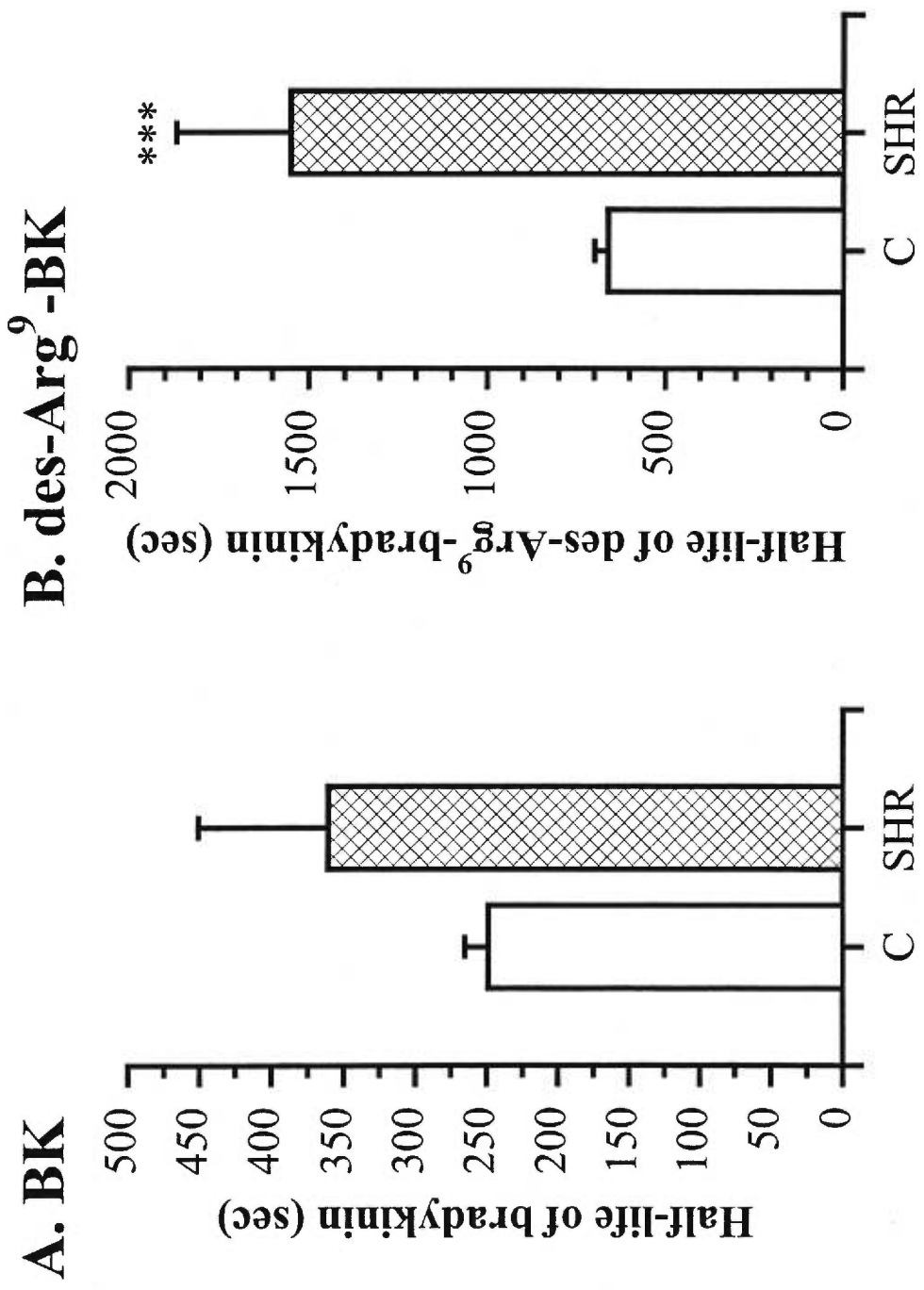
| Patients ^a | Serum ACE activity (ACE units) | t _{1/2} of BK (sec) | T _{1/2} of des-Arg ⁹ -BK (sec) |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---|
| 1 | 44.7 | 55 | 1165 |
| 2 | 17.0 | 91 | 467 |
| 3 | 1.6 | 224 | 1498 |
| 4 (sample 1) | 23.7 | 75 | 740 |
| 4 (sample 2) | 28.5 | 65 | 549 |
| Controls (n = 11) ^b | 41 ± 5 | 35 ± 3 | 383 ± 16 |

^a Patients 2 and 3 were receiving ACE inhibitor treatment at the time of sample collection; patients 1 and 4 were not.

^b Results obtained from reference 11.

FIGURE LEGEND**FIGURE 1**

Half-life of BK (*Panel A*) and des-Arg⁹-BK (*Panel B*) in the sera of normal healthy controls (C, n = 11) and patients who experienced severe hypotensive reactions (SHR, 4 patients; see Tables 1 and 2) after incubation of the sera with the ACE inhibitor, enalaprilat. Data represent means \pm SEM. *** p < 0.001.



CHAPITRE 3

BRADYKININ METABOLISM AND HYPOTENSIVE TRANSFUSION REACTIONS

BRADYKININ METABOLISM AND HYPOTENSIVE TRANSFUSION REACTIONS

M. CYR⁽¹⁾, T. EASTLUND⁽²⁾, C. BLAIS, JR.⁽¹⁾, J.L. ROULEAU⁽³⁾, AND A. ADAM⁽¹⁾.

⁽¹⁾Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montréal, (Québec), Canada;

⁽²⁾Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, USA; ⁽³⁾University Health Network, Toronto General Hospital, Toronto, (Ontario), Canada.

Running head: Bradykinin and transfusion reactions

Acknowledgments: Supported in part by the Fonds de la recherche en santé du Québec (CBJr).

Abbreviations: ACE = angiotensin-converting enzyme; APP = aminopeptidase P; BK = bradykinin; HMWK = high molecular weight kininogen; LMWK = low molecular weight kininogen; NEP = neutral endopeptidase; RBC(s) = red blood cell(s);

This manuscript was accepted for publication in **Transfusion** with minor corrections.

1. INTRODUCTION

Severe life threatening transfusion reactions may have various causes including red blood cell (RBC), leukocyte or plasma protein antibodies in the recipient and bacterial contamination of the transfused component. Fever, rigor and dyspnea are common manifestations of these reactions and may be mediated by cytokines, complement or endotoxin. Hypotension with or without urticaria or erythema may also be a prominent feature and bradykinin (BK) has recently been considered as a mediator. The possible role of BK generation as a mediator of hypotensive transfusion reactions is the subject of this review.

BK is a nonapeptide ($\text{Arg}^1\text{-Pro}^2\text{-Pro}^3\text{-Gly}^4\text{-Phe}^5\text{-Ser}^6\text{-Pro}^7\text{-Phe}^8\text{-Arg}^9$) which causes vasodilation (hypotension, erythema), pain and smooth muscle contraction in a variety of tissues. The effect of BK as a vasodilator is mediated by activation of B_2 -kinin receptors on vascular endothelium acting through release of endothelium-derived nitric oxide (NO), prostacyclin (PGI_2) and endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF).

BK is inactivated through hydrolysis by various peptidases one of which being angiotensin- converting enzyme (ACE). ACE activity can be blocked by ACE inhibitors, a class of drugs that has become one of the most commonly prescribed in the United States. ACE inhibitors are effective therapeutic agents for the treatment of various cardiovascular diseases and their complications: hypertension and concomitant left ventricular hypertrophy, myocardial infarction, heart failure and diabetic and non-diabetic nephropathy. Their cardioprotective and antihypertensive effects can be partially attributed to the potentiation of BK. BK generation in the presence of ACE inhibitors can result in higher than usual concentrations of BK accompanied by hypotension.

2. THE KALLIKREIN-KININ SYSTEM AND GENERATION OF BRADYKININ

2.1 The kallikrein-kinin system.

Like the renin-angiotensin and the coagulation systems, the kallikrein-kinin system is a cascade system. The BK forming system consists of three interacting proteins: coagulation factor XII, prekallikrein and high molecular weight kininogen (HMWK). Through contact activation from exposure to glass, endotoxin, electronegative-charged surfaces or other material, factor XII is cleaved and converted to factor XIIa which interacts with prekallikrein. Rapid conversion of prekallikrein to kallikrein ensues. Ordinarily bound to HMWK, kallikrein cleaves HMWK releasing BK (Figure 1) which exerts its pharmacological activities by stimulating B₂ receptors before inactivation by various peptidases, mainly metallopeptidases.¹

2.1.1 Kallikreins. Kallikreins are specific kininogenases. Two kinds of kallikreins, plasma and tissue, differ in their physicochemical properties (molecular weight, amino acid sequence) and their catalytic characteristics (specificity of the substrate). Both are synthesized from inactive proenzymes, prekallikrein (plasma) and prokallikrein (tissue).¹

2.1.2 Plasma kallikrein. The liver is the main site of synthesis of plasma prekallikrein, a glycoprotein which circulates complexed with HMWK² and is encoded by chromosome 4.³ It consists in a unique 619 amino acid chain, exhibiting a high homology with coagulation factor XI.^{4,5} Its molecular weight (85 and 88 kDa) depends on its degree of glycosylation.⁶ Serine proteases (activated factor XII) transform prekallikrein into its two-chain active form, kallikrein, by hydrolysis of the Arg³⁷¹-Ile³⁷² bond. The light (33 or 36 kDa) and heavy (56 kDa) chains of plasma kallikrein are bound by a disulfide bridge. The amino-terminal heavy chain (371 amino acids) is responsible for the high degree of homology (58%) with factor XI and for the binding of prekallikrein and kallikrein to HMWK. The catalytic site resides in the light chain of

kallikrein.^{4,7} Proteolytic activity of kallikrein is neutralized mainly by plasma C1-esterase inhibitor and α_2 -macroglobulin.⁸ Plasma kallikrein plays a major role in the activation of the intrinsic pathway of coagulation and fibrinolysis and also is involved in the regulation of the vascular tone and the inflammatory reaction^{1,9} by hydrolyzing also HMWK with the release of BK.

2.1.3 Tissue kallikrein. Tissue kallikrein is also a serine protease derived from a proenzyme. In human tissue, kallikrein is the member of a family of 3 proteins encoded by chromosome 19: tissue prokallikrein (hK1), a kallikrein of unknown function (hK2) and prostatic specific antigen (PSA or hK3). Only tissue kallikrein can hydrolyze kininogens.^{10,11} Tissue prokallikrein is a glycoprotein (24 to 45 kDa) and is found in different tissues as pancreas, salivary glands and kidney. The mechanism of activation of prokallikrein into kallikrein remains unknown. In plasma, the serine protease activity due to a triad of amino acids (His⁴¹, Asp⁹⁶ and Ser¹⁸⁹) is neutralized by a specific kallikrein-binding protein.¹² In addition to plasma and tissue kallikreins, other proteases (nonspecific kininogenases) such as trypsin and plasmin, are capable, at least in vitro, of hydrolyzing kininogens and to release kinins.

2.1.4 Kininogens. Kininogens are multifunctional glycoproteins mainly synthesized in the liver but also in the kidney, salivary glands and endothelial cells.^{1,13} Kininogens circulate in human plasma in low (50 to 68 kDa) and high (80 to 120 kDa) molecular weight forms.¹⁴ Both HMWK and LMWK share a common heavy chain and the kinin forming sequence but they differ by their light chain.^{12,14} A unique gene of 11 exons (27 000 bp) encodes for both kininogens, the alternative splicing leading to two different mRNA. The first 9 exons code for the heavy chain, exon 10_[BK] for the BK moiety and the first 12 amino acid of light chain. The portion of exon 10_[HMWK] downstream of the BK sequence codes only for the light chain of HMWK. Exon 11 codes for the light chain of LMWK.^{14,15}

The carboxy-terminal heavy chain of both kininogens consists in three domains (D1-D2-D3). Domains 2 and 3 contain the pentapeptide sequence (Gln-Val-Val-Ala-Gly) responsible for the antithiolprotease activity of both kininogens. D2 inhibits enzyme activity of calpains although domain 3 neutralizes cathepsins, at least in vitro. It has been shown that domain 3 interacts with neutrophils, endothelial cells and platelets.^{15,16} D4 is responsible for the kinin forming capacity of both kininogens, when hydrolyzed by specific or nonspecific kininogenases.

The amino-terminal light chain of LMWK contains a unique domain 5 which function remains unknown. The light chain of HMWK consists in domains 5 and 6 and is responsible for its procoagulant activity. Domain 5, rich in histidine, proline and lysine residues, binds with negatively charged surfaces, concentrating at that level, the substrates of factor XII, prekallikrein and factor XI which circulate in plasma complexed with domain 6 of HMWK.¹⁷

2.2 The contact system activation.

The in vitro contact of plasma with a negatively charged surface (glass, kaolin, dextran sulfate, blood filters, dialysis membranes) activates Hageman factor (coagulation factor XII) which leads to the activation of the intrinsic coagulation cascade (via factor XI) and the BK generation ⁷ (Figure 1). The primary event of activation of the BK generation cascade is the binding of the zymogen, factor XII which leads to a structural change due to a limited autoactivation into factor XIIa which in turn transforms plasma prekallikrein circulating complexed with HMWK into active kallikrein. This serine protease further amplifies the activation of factor XII.^{7,9,18}

Plasma proteases, mainly plasma kallikrein but also plasmin transform factor XII into factor XIIa, cleaving Arg³⁵³ from Val³⁵⁴.⁸ Factor XIIa consists in one heavy (50 kDa) and one light (28 kDa) chain bound by a disulfide bridge. The heavy chain is responsible for the binding of factor XIIa to the negatively charged surface and the light

chain contains the catalytic site. A further proteolysis of the heavy chain of factor XIIa generates a soluble fragment, factor XII_f, which also activates plasma prekallikrein.¹⁸

HMWK plays a cofactor role in the reciprocal activation of prekallikrein and factor XII. In fact, by its domain 6, HMWK circulates in blood complexed with prekallikrein and factor XI.^{2,19} Moreover by its domain 5, rich in lysine, proline and histidine residues HMWK has the capacity to bind to negatively charged surface concentrating near factor XIIa, its substrates (prekallikrein and factor XI) and its activator kallikrein.¹

The activation of the contact system of plasma has several consequences, including the local activation of the intrinsic coagulation pathway via transformation of factor XI into factor XIa, the release of BK by plasma kallikrein from HMWK and also participates in fibrinolysis, complement and renin-angiotensin system activation (Figure 1).

Besides the contact of plasma with a negatively charged surface, it has been reported recently that endothelial cell^{20,21} and platelets²² are susceptible to bind HMWK and factor XII in a specific way. That binding is zinc dependent and involves the same receptor for both factor XII and HMWK. That receptor has been identified as the gC1qR, known to be the receptor for the C1q complement factor.²³ Kaplan and colleagues^{7,24} have shown that the binding of factor XII to that receptor leads to its autoactivation and the release of BK from HMWK. Interactions between the contact system and neutrophils cells have also been shown.²⁵

2.3 Bradykinin and receptors.

BK and related kinins, comprise a family of powerful vasodilatory peptides. BK is released from HMWK by plasma kallikrein although Lys-BK (kallidin) is preferentially generated from LMWK by tissue kallikrein.¹ Both BK and kallidin possess a carboxy-terminal Arg residue and stimulate specific B₂ receptors. Kininase I, a generic name for different carboxypeptidases, transforms both B₂ agonists into their metabolites, lacking

their carboxy-terminal Arg residue, which stimulate specific B₁ receptors. Both B₁ and B₂ receptors are coupled to G proteins linked to phospholipase C β , which activation leads to the formation of inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) and to the mobilization of intracellular calcium.²⁶

Both B₁ and B₂ receptors have been characterized by pharmacological methods which have defined a potency order of both agonists and specific sequence related antagonists.^{26,27} This approach has evidenced that B₂ receptor type mediates the pharmacological effects of BK in normal tissues and normal animals (hemodynamic, proinflammatory, algescic effects). This approach also allowed to show that Lys-des-Arg⁹-BK has a greater affinity for B₁ receptors than des-Arg⁹-BK. This B₁ receptor was not found in normal experimental models but was upregulated by tissue injuries. The de novo B₁ receptor synthesis is upregulated by some cytokines and amplifies inflammatory effects mediated through B₂ receptors.^{26,28} The stimulation of B₂ receptors on endothelium leads to the generation of NO, PGI₂ and EDHF which are considered to be responsible for the vasodilatory and antiproliferative effects of BK.^{29,30}

Both receptors have been cloned and exhibit a 36% homology in humans. In humans, they are both encoded by chromosome 14. Animals with disruption of B₂ receptor gene have also been produced. These animals are phenotypically normal, but they exhibit severe hypertension with end-organ damage when exposed to an excess of dietary sodium chloride, confirming the suspected natriuretic and renal role of the kallikrein-kinin system.^{31,32}

2.4 Bradykinin inactivation and kininases.

BK is metabolically unstable being very susceptible to hydrolysis. Kinins are rapidly degraded exerting their biologic activities for a short duration. BK is inactivated by well-documented peptide hydrolytic pathways but it is also possible that BK can be removed from blood and tissue fluids by specific receptor-mediated endocytosis.

The nature and the properties of the various peptidases metabolizing BK have been reviewed recently.³³ The results from our laboratory and others have shown that in absence of a tissue necrosis, at least five metallopeptidases are responsible for the inactivation and metabolism of BK. Kininase I enzymes (carboxypeptidases N and M) remove the carboxy-terminal Arg from the nonapeptide BK. The kininase II-type enzymes (ACE, neutral endopeptidase 24.11 (NEP)) release the carboxy-terminal dipeptide Phe⁸-Arg⁹. Aminopeptidase P (APP) hydrolyzes the amino-terminal Arg from BK. These peptidases share common characteristics. They are zinc-metallopeptidases and are both bound to the cell membrane and present in a soluble form in biological fluids. In addition to BK, they also metabolize other vasoactive peptides including des-Arg⁹-BK, anaphylatoxins C3a and C5a, natriuretic peptides and endothelins.

2.4.1 Angiotensin-converting enzyme. ACE is a widely distributed membrane-bound zinc peptidase. It consists in two highly homologous domains³⁴ for which kinetic parameters have been carefully characterized.^{35,36} ACE sequentially cleaves two carboxy-terminal dipeptides from BK (Phe⁸-Arg⁹ and Ser⁶-Pro⁷) transforming BK into its inactive final BK_[1-5] product (Figure 2). ACE also metabolizes des-Arg⁹-BK by releasing the carboxy-terminal tripeptide, Ser⁶-Pro⁷-Phe⁸ yielding to the same BK_[1-5] end product as for BK.³⁷ When compared with the kinetic parameters of the reaction which produces angiotensin II from angiotensin I, it appears that ACE has a higher affinity for BK.^{35,36} Due to these enzyme characteristics, ACE is now considered as a kininase (kininase II) rather than an angiotensinase.³⁸

In 1990, a insertion/deletion (I/D) polymorphism in the ACE gene was described.³⁹ A 287 bp DNA fragment is present or absent inside intron 16 of the ACE gene which corresponds to an Alu repetitive sequence. This I/D polymorphism is responsible for half of the inter-individual variance of serum ACE activity. Subjects homozygous for the D allele have a serum activity about twice that of those who are homozygous for the I allele, while heterozygous I/D have intermediate plasma values.³⁹ The relationships between the DD genotype and the incidence of cardiovascular diseases (myocardial

infarction, left ventricular hypertrophy) has been reported by some authors but not confirmed by others.^{40,41}

2.4.2 Neutral endopeptidase. NEP is a membrane-bound ectoenzyme. It is encoded by the 3q21-27 locus of human chromosome 3.^{42,43} NEP inactivates BK by sequential removal of dipeptide Phe⁸-Arg⁹ and tripeptide Phe⁵-Ser⁶-Pro⁷ to yield the BK_[1-4] an inactive metabolite. It also metabolizes des-Arg⁹-BK leading also to the same BK_[1-4] inactive peptide.⁴⁴ In contrast to ACE, NEP is the main enzyme responsible for the metabolism of kinins in the kidney. NEP also participates in hydrolysis of other peptides such as enkephalin, substance P, atrial natriuretic factor, angiotensin I and II and f-Met-Leu-Phe (fMLP), the neutrophil chemoattractant of bacterial origin.

The large extracellular domain of the human RBC Kell antigen has striking sequence homology and structural similarities to NEP and to endothelin-converting enzyme (ECE)⁴⁵, both of which are involved with control of blood pressure and inflammatory responses. Recently, the Kell protein was shown to function as an ECE, cleaving big endothelin-3 yielding the potent vasoconstrictor, endothelin-3. On the other hand, it is not known whether the Kell protein hydrolyzes BK but preliminary data suggests it does not.⁴⁶ In contrast, ECE is able to cleave BK into BK_[1-7] in vitro.⁴⁷

NEP is also present on the plasma membrane of neutrophils⁴⁸ and is identical with the common acute lymphoblastic leukemia antigen.⁴⁹ Its neutrophil membrane location may be important in degrading the biologic activity of BK formed on the external surface of the neutrophil membrane where LMWK, HMWK and prekallikrein are also located.^{1,25} In addition to degrading BK, NEP hydrolyzes fMLP, a bacterial wall-derived neutrophil chemoattractant. Activation of the neutrophil triggers internalization of NEP with reduction of its enzymatic activity. This reduction might alter migration of neutrophils to sites of inflammation.

2.4.3 Carboxypeptidases N and M. Carboxypeptidases N and M present a high percentage of homology. Carboxypeptidase N is synthesized in the liver and secreted in plasma, while carboxypeptidase M is a widely distributed membrane-bound peptidase. Both carboxypeptidases cleave a variety of peptides containing a carboxy-terminal Arg or Lys and transform B₂ receptor agonists, BK and Lys-BK into des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg⁹-BK⁵⁰ which also have vasodilator activity but exert their activities through B₁ receptors.

2.4.4 Aminopeptidase P. APP exists in tissues as a soluble cytosolic form and as a membrane-bound peptidase, representing two different gene products.^{51,52} Both enzymes catalyse the removal of unsubstituted amino-terminal amino acids, adjacent to a penultimate proline residue. In the case of BK, it hydrolyses the Arg¹ residue leading to an inactive product BK_[2-9].^{53,54}

2.5 Plasma metabolism of bradykinin.

The half-life ($t_{1/2}$) of exogenous BK added to serum or plasma and the relative participation of the different peptidases depends on the experimental approach and the concentration of the substrate. The development of highly specific and sensitive enzyme immunoassays for quantification of BK and des-Arg⁹-BK at nanomolar concentrations^{55,56} has allowed the study of BK metabolism in a limited number of healthy subjects. The $t_{1/2}$ of des-Arg⁹-BK (325 ± 12 sec) was approximately 7-fold greater than that of BK (49 ± 2 sec).⁵⁷ Of the several peptidases hydrolyzing BK, we found three to be important, ACE plays a major role accounting for approximately three-fourths of BK hydrolysis, APP constitutes a secondary metabolic pathway and kininase I, plays a minor role, unless ACE is inhibited (Figure 2). Des-Arg⁹-BK, in turn is metabolized by ACE and APP, two enzymes that also inactivate BK. In the case of des-Arg⁹-BK, however, APP is the main degradative enzyme. In plasma, in the presence of an ACE inhibitor, once APP has cleaved the Arg¹ residue, dipeptidyl peptidase IV cleaves the Pro³-Gly⁴ bond leading to a final BK_[4-8] product.⁵⁸ In contrast, to its cell-bound activity

in endothelium, cardiomyocytes and renal tissue, we could not measure a participation of NEP in the plasma metabolism of both BK or des-Arg⁹-BK.

More recently, we have applied our immunological assays to measure the generation of endogenous BK and its active metabolite des-Arg⁹-BK when plasma is incubated in the presence of glass beads.⁵⁹ The kinetic profiles of both kinins released from endogenous HMWK permit examination of the contact activation system and the $t_{1/2}$ of both B₂ and B₁ agonists (Figure 3).

3. KININS AND ACE INHIBITORS

3.1 Kinins and pharmacological properties of ACE inhibitors.

ACE inhibitors have been successful therapeutic agents for the treatment of hypertension, heart failure and diabetic and non-diabetic nephropathy. These beneficial effects were first attributed to the inhibition of the formation of angiotensin II, a powerful vasoconstrictive peptide. However, since ACE acts as a kininase, BK has been suspected for several years to play an important role in the antihypertensive and cardioprotective effects of ACE inhibitors.^{60,61,62} The evidence of the contribution of BK to these beneficial cardiovascular effects is largely based on pharmacological evidence. In various experimental models, the effects of ACE inhibitors are similar to those of BK and they are blocked by icatibant (Hoe 140), a specific antagonist of the B₂-kinin receptors. For example, Wiemer et al.^{63,64} showed that the presence of an ACE inhibitor increased the production of NO and PGI₂ by cultured endothelial cells. These pharmacological effects of ACE inhibitors could be related to the presence of immunoreactive BK in the culture medium. A similar production of BK by cultured cardiomyocytes could be shown and potentiation of BK by an ACE inhibitor corresponded to a decrease creatine kinase (CK) activity in the cell supernatant during hypoxia-reoxygenation.⁶⁵

Perfusion of BK and des-Arg⁹-BK, depending on the experimental models of heart ischemia increased the cardiodynamic parameters during reperfusion, correlating to an increase of ATP and a decreased release of cardiac enzymes.^{66,67} In this case too, ACE inhibitors have been shown to protect endogenous BK/des-Arg⁹-BK released at the reperfusion from the ischemic zone.^{68,69}

In vivo, the role of BK in the hypotensive effect of ACE inhibitors has been studied in different experimental models of hypertension. The role of BK depends on the experimental model and data are conflicting. Recently however, it has been shown in man that short-term treatment with the ACE inhibitor captopril has a more important hypotensive effect than an angiotensin type 1 receptor antagonist.⁷⁰ The difference in the hypotensive effect between both treatments was blocked during the coadministration of icatibant and captopril and was attributed to the participation of BK in the pharmacological effect of ACE inhibitors.⁷⁰

In addition to its role in the cardiovascular effect of ACE inhibitors, evidence now exist for a participation of BK in at least two other metabolic effects of ACE inhibitors. In cultured endothelial cells and also in humans,⁷¹ BK has been shown to increase the release of tissue plasminogen activator (t-PA), and the fibrinolytic potentiating effect of BK was increased by an ACE inhibitor. That effect counterbalances the antifibrinolytic effect of angiotensin II which in the same models potentiates the release of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1).^{72,73} Another metabolic effect of ACE inhibitors may be related to insulin. Chronic treatment with an ACE inhibitor results in the improvement of the action of insulin leading to an improved muscle uptake of glucose in both experimental and clinical studies.^{74,75} Several experimental studies exist now for a role of BK both in the release of insulin from the pancreas and also in the metabolism of glucose at the muscle level.

3.2 Kinins and acute side effects of ACE inhibitors.

3.2.1 Kinins as proinflammatory peptides. Considerable pharmacological evidence support a role of BK and des-Arg⁹-BK as endogenous mediators of inflammation, acute or chronic, depending on the experimental approach. When BK is injected into the skin of experimental animals and human volunteers, it elicits responses that mimic the cardinal signs of inflammation (redness, swelling, heat and pain) as well as the accumulation of leukocytes. When carrageenan, a polyside sulfate well known to activate the contact system of plasma, is injected it induces a swelling which reaches a maximum value 3 hours post-injection.⁷⁶ The intensity of the acute inflammatory response (edema) depends on the concentration of carrageenan,⁷⁷ and is potentiated by an ACE inhibitor, acutely or chronically administred, and supressed by a specific B₂-kinin receptor (icatibant) but not a B₁-kinin receptor antagonist (Lys-[Leu⁸]-des-Arg⁹-BK).^{76,77} Both BK and des-Arg⁹-BK could be measured in the local inflammatory site and their concentration was potentiated by the ACE inhibitor.^{76,77} However, only BK was necessary for the symptoms of inflammation.⁷⁶

Other studies have suggested a role for des-Arg⁹-BK in chronic inflammation. Using a model of arthritis induced in female Lewis rats by intraperitoneal injection of peptidoglycan-polysaccharide extracted from group A streptococci (PG-APS) we could detect the presence of both BK and des-Arg⁹-BK in the inflamed joint.⁷⁸ In this model both B₂ but also B₁-kinin receptor antagonists decreased the local inflammatory reaction. Similarly, Perkins et al.⁷⁹ demonstrated that persistent thermal and mechanical hyperalgesia is reversed by the specific B₁- kinin receptor antagonist [Leu⁸]-des-Arg⁹-BK but not by icatibant, a B₂ receptor antagonist. Recently, Shigematsu et al.⁸⁰ demonstrated that increasing concentrations of BK (>10⁻⁷ M) enhance the rolling and adhesiveness of neutrophils in the mesenteric capillaries in rats. The perfusion of mesentery with low concentration of BK (<10⁻⁷ M) increased blood flow and prevented leukocyte adhesion in a dose dependent manner.

3.2.2 Adverse effects of ACE inhibitors. The use of ACE inhibitors is associated with various adverse effects and some of these are associated with procedures that cause contact activation of BK. Cough happens in 5 to 20% of patients. Cough has been hypothetically attributed to the accumulation of endogenous BK.⁸¹ However and until now no clinical evidence exists that directly implicates endogenous BK in cough. As with cough, BK has been implicated in the pathophysiology of angioedema, but only one study has documented a slight increase in BK concentration during acute angioedema.⁸² Angioedema is a rare acute (0.1-0.2%) but potentially fatal side effect of ACE inhibitors.⁸¹ Its clinical characteristics have been described by different authors.^{83,84,85} Blais et al.⁸⁶ characterized the metabolism of BK and des-Arg⁹-BK in the serum of patients with angioedema associated with ACE inhibitors. They reported that some patients exhibit an increased $t_{1/2}$ of des-Arg⁹-BK but not of BK when plasma was preincubated with an ACE inhibitor.

Another acute side effect of ACE inhibitors with a similar incidence to that of angioedema is the anaphylactoid or hypersensitivity reaction (HSR) observed during hemodialysis.⁸⁷ This reaction is characterized by urticaria, angioedema, dyspnea, bronchospasm, hypotension and is sometimes fatal. It occurs ordinary at the beginning of the dialysis.⁸⁸ Although first associated with a negatively charged membrane, it has been reported with the use of various membranes.

Studies have demonstrated an increased BK concentration in plasma of patients during acute HSR in dialysis. Blais et al.⁸⁹ compared the metabolism of kinins in the serum of dialyzed patients who had hypersensitivity reactions (HSR+) with those who did not (HSR-). Dialysis took place using a negatively charged membrane and patients had been treated with an ACE inhibitor. Patients with hypersensitivity reactions (HSR+) exhibited a significant increase of des-Arg⁹-BK $t_{1/2}$ and this was even greater when the serum was preincubated with an ACE inhibitor and correlated negatively with the APP activity. The APP activity was significantly decreased in the patients with hypersensitivity reactions (HSR+) when compared with the other patients (HSR-).⁸⁹

4. KININS AND HYPOTENSIVE TRANSFUSION REACTIONS

4.1 Reactions to plasma protein fraction and albumin infusions.

Over two decades ago and prior to the widespread use of ACE inhibitors, hypotension with vasodilation and erythema were recognized as a transfusion reaction associated with the rapid infusion of albumin and plasma protein fraction (PPF), a derivative of plasma containing albumin with others proteins.^{90,91,92} Alving et al.⁹⁰ showed that the implicated lots of PPF contained factor XII fragments serving as a prekallikrein activator along with low levels of BK and kallikrein. These were rarely found in albumin. Their data suggested that factor XII fragments were potent hypotensive agents, presumably by triggering BK generation in recipients. Hypotensive reactions were observed most often in surgical patients, especially those undergoing cardiac surgery using cardiopulmonary bypass. Bypassing the lungs with their rich content of BK-degradative enzymes such as ACE, creates a condition whereby BK might not be degraded efficiently and levels may remain elevated longer than normal.

Van Rosevelt et al.⁹¹ demonstrated that following infusion of PPF containing factor XII and prekallikrein to patients during cardiopulmonary bypass, their plasma BK levels increased during the first minute and mean arterial pressure decreased 22 to 54% within 1-5 minutes. Albumin solutions had only a trace of prekallikrein activator and after infusion BK levels rose only slightly with no drop in blood pressure. Heinonen et al.⁹² studied responses in patients during cardiopulmonary bypass surgery after infusion of 20 ml of PPF containing factor XII fragment and prekallikrein activator. The amount of hypotension correlated with the level of prekallikrein activator in the PPF. However, sometimes hypotension followed infusion of albumin containing very low prekallikrein activator levels and vasodilation was often worse in the postoperative period than during cardiopulmonary bypass leading them to conclude that occasional hypotensive reactions are due to mechanisms other than those involving increased prekallikrein activator levels.

4.2 Reactions during therapeutic apheresis.

Treatment of patients with severe hypercholesterolemia by extracorporeal removal of low-density lipoproteins (LDL) generally has been well tolerated.⁹³ During LDL-apheresis, LDL-cholesterol is adsorbed to low-molecular weight dextran sulfate covalently bound to cellulose on the columns. Some patients taking ACE inhibitors experienced hypotension, erythematous skin (particularly on the face and neck), bradycardia, nausea and sometimes with other symptoms such as dyspnea, sweats, headache and abdominal pain.⁹⁴⁻¹⁰² These symptoms started shortly after the treated plasma was returned to the patient and subsided within minutes of discontinuing the infusion. These symptoms were reproduced by starting the plasma infusion again. The reaction was not prevented by prophylactic use of antihistamine or corticosteroids but was avoided by discontinuing use of the ACE inhibitor medication. Dextran sulfate has strong electronegative charges and is known to be a potent activator of the contact system of plasma generating BK. Because ACE inhibitors reduce BK breakdown, BK levels can persist longer than usual and presumably be the cause of these symptoms. Kojima et al.¹⁰³ showed that plasma BK levels increase 27-fold and plasma prostaglandin E₂ levels increase 5-fold during LDL-apheresis. They also showed that the use of thrombin and kallikrein inhibitor nafamostat mesilate, instead of heparin, as an anticoagulant prevents elevations of plasma BK levels during LDL-apheresis and acute hypotensive reactions. Interestingly, Petrucco et al.¹⁰² demonstrated that even with sham LDL-apheresis, where plasma is separated by the negatively charged hollow polysulfone filter and reinfused without passing through the dextran sulfate-cellulose LDL column, a patient taking ACE inhibitors can have acute hypotensive reactions.

Staphylococcal protein A (SPA) column apheresis involves extracorporeal treatment and reinfusion of plasma for treatment of refractory autoimmune thrombocytopenia or rheumatoid arthritis. Immunoglobulins and immune complexes are removed during extracorporeal circulation of blood through columns of silica coated with SPA. Patients who have taken ACE inhibitors have experienced hypotension, vasodilation and facial flushing reactions during SPA column apheresis.

In cryofiltration apheresis procedures, plasma is separated from blood in an automated apheresis process by filtration using membranes. During this type of apheresis, patients taking ACE inhibitors have experienced the same type of reactions.¹⁰⁴ Of 28 patients undergoing 680 procedures, they were 2 of 5 patients who were taking ACE inhibitors that developed facial flushing, warmth, bradycardia and hypotension after receiving 0.5 to 1 liter of processed plasma. In one patient who was tested, there was no significant elevation of plasma prostaglandins or histamine. No investigations of BK generation were reported.

Extracorporeal tryptophan column immunoabsorption therapy is used for some patients with neurological disorders. Acute hypotension has occurred in some patients. Tsuboi et al.¹⁰⁵ helped explain this by demonstrating BK generation during the procedure, related to decreases in blood pressure. They found BK levels were inversely proportional to the patients carboxypeptidase level.

Plasma exchange is a common treatment for several disorders whereby plasma is removed and exchanged using automated centrifugation methods. Except for a small amount contained in the patient's RBC that are reinfused to the patient, the plasma that is removed is not returned but is replaced by another fluid, usually 5% albumin and sometimes donated plasma. In these plasma exchange procedures the blood is exposed to various plastics in the bags, chambers and tubing and sometimes a blood filter is used during reinfusion. Interestingly, even in these procedures, patients taking ACE inhibitors have experienced reactions.^{106,107} Owen et al.¹⁰⁷ reported that 15 of 301 patients were taking ACE inhibitors while undergoing plasma exchange and that all 15 experienced flushing or hypotension during a procedure. Of note, another 11% of patients not receiving ACE inhibitors had similar reactions. Flushing occurred in 71% of the patients who had received ACE inhibitors within 24 hours of the procedure compared to one (0.3%) of the 285 patients not receiving ACE inhibitors. Hypotension occurred in 79% of those taking ACE inhibitors and in 7% of 285 not taking the drug. The combination of flushing and hypotension was seen only in patients receiving ACE

inhibitors. Reactions generally occurred within 15 minutes after receiving less than 500 ml of albumin. Other symptoms included abdominal cramping and diarrhea in 7 of 20 patients and nausea and diaphoresis in others. Fourteen patients underwent 53 plasma exchanges after receiving ACE inhibitor medication within 24 hours prior to the procedure and reactions were observed in 71% of these procedures. No reactions occurred when these same patients underwent exchange without recent use of an ACE inhibitor.

4.3 Bradykinin and hypotensive transfusion reactions.

Over the past decade there has been a rapid rise in the use of leukoreduced platelet transfusions and reports of acute hypotensive reactions of uncertain cause. A common feature has been the use of bedside filtration. Consequently the American Association of Blood Banks and the US FDA issued alerts warning practitioners of this potential danger.^{108,109} There have also been a few reports of acute hypotension with filtered plasma¹¹⁰ and filtered RBC transfusions but most of these puzzling reactions seem to be associated with bedside-filtered platelet transfusions. A multi-hospital survey found unexplained acute hypotensive reactions during the early part of platelet transfusion in 17 patients.¹¹¹ The authors postulated that these reactions could be due to cytokines that accumulated during storage but could not exclude the possibility that histamine, platelet activating factor or BK caused the reactions. Unfortunately, due to inadequate evaluation of the patients and transfused components, there were also other causes such as bacterial contamination which could not be excluded. The report of these reactions has triggered investigations that have supported the concept of filter-related BK generation and recipient use of an ACE inhibitor as possible causes of these reactions.

There have been several clinical reports of hypotensive reactions, sometimes accompanied by facial flushing and respiratory symptoms that were related to the use of negative charged bedside filters in patients taking an ACE inhibitor.^{110,112-114} Mair et al.¹¹² first began receiving reports of hypotensive reactions during platelet transfusions after switching from use of positively charged bedside filters when clinically indicated

to the use of negatively charged bedside filters for all platelet transfusions. They found that of 179 patients receiving platelet transfusions during a three month period, 14 patients experienced 16 hypotensive reactions. All reactions occurred during or within 48 h of coronary artery bypass graft surgery and in patients taking an ACE inhibitor. In an outpatient transfusion case reported by Fried et al.,¹¹⁰ acute hypotension and facial flushing repeatedly followed transfusion of plasma through negatively charged filters but not positively charged filters and only after the dose of the patient's ACE inhibitor had been increased.

In their preliminary report, Myers et al.¹¹⁵ described an investigation of hypotensive transfusion reactions for correlation with recipient use of ACE inhibitors. Of 240 reactions reported to the hospital blood bank, there were 11 unexplained hypotensive reactions, 8 reactions occurring in 4 patients taking long-acting ACE inhibitors. In 7 of these 8 reactions, bedside filtration of platelets took place using negatively charged filters. Fifty-seven percent of patients who experienced transfusion-associated hypotensive reactions were taking ACE inhibitors compared to 14 percent of all transfusion recipients. The authors concluded that most severe hypotensive reactions were related to bedside filtration and recipient ACE inhibitor use. Their data also demonstrated that most transfusion recipients receiving ACE inhibitors do not have hypotensive reactions and one can presume many of these patients may have received bedside-filtered blood. They also demonstrated that nearly half of the unexplained hypotensive reactions were in patients not receiving ACE inhibitor medications.

Hild et al.¹¹⁶ examined BK levels in platelet concentrates before, during and after filtration with three different filters. They found levels of BK up to 26,500 pg/ml during filtration of the initial portion of pooled platelet concentrates using negatively charged filters. A high variation was found between samples obtained from the same concentrate. Generated BK was rapidly degraded. None was detected after storage of the filtered platelet concentrate for one hour. If ACE inhibitor was added, BK generation was enhanced and degradation was delayed.

Takahashi et al.¹¹⁷⁻¹²⁰ reported the generation of BK during filtration of platelet concentrates using negatively charged polyester filters but none if positively charged filters were used. BK levels increased from a mean of 37 pg per ml before filtration, to nearly 7000 pg per ml during filtration and 2500 pg per ml at the end of filtration. The addition of ACE inhibitors increased BK levels further and maintained levels longer. The BK generated was biologically active in that it was able to induce dose-dependent contractions of rat uterus muscle.^{118,120}

In a preliminary report, Davenport and Penezina¹²¹ described filtering pools of platelet concentrates through negatively charged filters which resulted in complete activation of HMWK in 9 of 13 pools. Kallikrein activity was increased after filtration but not maximally activated.

Shiba et al.¹²² studied BK generation in platelet concentrates filtered with negatively and positively charged filters. They did not find a decrease in HMWK levels but observed generation of BK and a 10% decline in prekallikrein levels with a negatively charged filter. The amount of BK in the platelet concentrate that was generated by filtration was inversely correlated with the level of ACE activity in donor plasma. Upon transfusion of platelets filtered with a negatively charged filter, only recipients with intrinsically low levels of ACE activity had demonstrable increases of plasma BK levels. Their study not only documented BK generation by blood filters but pointed out that anomalies in the donor's and recipient's BK metabolism can affect the amount of BK transfused and the amount of BK circulating in plasma of the recipient.

In our small study, BK degradation was studied in four patients on ACE inhibitors who experienced severe hypotensive reactions during transfusions using negatively charged leukoreduction filters at the bedside, two with platelet transfusions and two with RBC transfusions.¹¹³ Interestingly the BK $t_{1/2}$ was normal but the $t_{1/2}$ of des-Arg⁹-BK was prolonged. Des-Arg⁹-BK is an early breakdown product of BK and is physiologically active as a vasodepressor. This raises the possibility that some patients

have an intrinsic anomaly of their BK and des-Arg⁹-BK metabolism increasing their susceptibility to hypotensive reactions from bedside-filtered blood. The prolongation of des-Arg⁹-BK t_{1/2} with a normal BK t_{1/2} in the presence of ACE inhibition, was similar to that observed in patients who had severe hypotensive reactions during dialysis using negatively charged membranes⁸⁹ and in patients who experienced angioedema as a complication of ACE inhibitor medication.⁸⁶

Although, more commonly seen with platelet transfusions, there have been reports suggesting that acute hypotensive reactions experienced with bedside-filtered RBC or whole blood may also be related to BK generation by filters. Abe et al.,¹²³ reported a patient on ACE inhibitor who underwent cardiac bypass surgery and experienced acute hypotension three minutes after beginning transfusion of autologous fresh whole blood through a leukoreduction filter. After the patient recovered and the transfusion was restarted, acute hypotension again developed. The same blood was subsequently transfused without filtration and no hypotension ensued. They demonstrated increased BK levels in the autologous blood after filtration and in the patient. Using Western blot analysis of HMWK, they demonstrated generation of HMWK light chain fragments in both the autologous blood after filtration and in the patient's blood after the hypotensive reaction. They postulated that the filters activated prekallikrein and generated kallikrein which generated BK from HMWK both in the filtered autologous blood and in the patient.

Sweeney et al.¹²⁴ described two patients receiving ACE inhibitors who experience acute hypotensive reactions while they received RBC concentrates that were bedside leukoreduced with negatively-charged filters but not when they received RBC that had been leukoreduced at the time of collection before storage. They suggested that if BK is generated by filtration, it would be degraded during storage and not cause acute hypotension. Hypotensive transfusion reactions were reported to the blood bank in only two patients out of a total of 580 patients receiving 2942 RBC units.¹²⁵ Although other hypotensive reactions might have occurred but not have been reported, one can assume

that there were plenty of other patients who received bedside-filtered RBC and were taking ACE inhibitors but did not experience an acute hypotensive reaction.

Shiba et al.¹²⁶ studied BK levels and ACE activity in RBC concentrates during storage in a commonly used preservative solution containing adenine, saline and mannitol. They demonstrated that mannitol inhibited ACE activity in diluted but not whole plasma and that in the presence of mannitol, BK levels increased during the first several days of RBC storage and then declined. They also showed that BK was generated during filtration. Since filtration-related hypotensive reactions were rarely associated with RBC transfusions, especially when compare to platelet transfusions, these authors concluded that the amount of BK generated during RBC storage in mannitol containing preservative solutions was not by itself likely to be a main cause of hypotensive reactions to RBC transfusion. However, they thought the BK levels were sufficient to cause infusion site pain, a phenomenon postulated to be possibly linked to bedside filtration by Podlosky and Boshkov.¹²⁷ Podlosky and Boshkov¹²⁷ described their change in practice from transfusing washed RBC to chronic anemia patients to transfusing RBCs diluted in a saline and adenine preservative (AS-3) with filtering at the bedside. They noticed many transfusion recipients complaining of infusion site pain and were able to observe that pain was often associated with the use of a filter from a specific manufacturer (Pall RC50) but little to none with another filter (Sepacell R500).

4.4 Uncertain role of kinins.

The role of BK and des-Arg⁹-BK generation by leukoreduction filters in producing acute hypotensive reactions is not certain. How often hypotensive transfusion reactions are mediated by kinins is unknown. There are many other unanswered questions. Even though several investigators have demonstrated BK generation by sampling before and after filtration, particularly with negatively charged filters, some patients have had ACE inhibitor related hypotensive reactions following transfusion with positively charged leukoreduction filters.¹²⁸ Others have found conflicting data regarding BK generation with variability between blood donors and variability between samples from the same

filtrate. Moreover only recently the generation of des-Arg⁹-BK instead of BK has been implicated in these reactions. Hume et al.¹¹¹ and Moore¹²⁹ suggested that cytokines in platelet concentrates may be involved in some hypotensive reactions during platelet transfusion. Hypotensive reactions have also been described in transfusion recipients not receiving ACE inhibitors. Belloni et al.¹³⁰ reported a cluster of five patients having acute hypotensive reactions within five minutes of starting platelet transfusion using bedside leukoreduction filters. The patients were not receiving ACE inhibitors and had previously received bedside-filtered blood components without adverse reactions. Perhaps in these patients there are causes unrelated to BK or these patients may have an intrinsic defect of BK inactivation.

Colman et al.^{131,132} and Scott et al.¹³³ were unable to demonstrate contact system activation during leukoreduction of platelet-rich plasma using two commonly used filters. Colman et al.^{131,132} and Scott et al.¹³³ measured HMWK and LMWK and concluded that the quantities of BK generated by leukoreduction filters were insufficient to cause hypotensive reactions. Renaux¹³⁴ demonstrated that contact activation of platelet rich plasma is very dependent on pH and dilution by non-protein solutions and he suggested that discrepant results found by various investigators might be explained by variations in conditions of the experiment.

There are differences of opinion as to whether sufficient BK is generated during filtration to cause hypotension. Experimental findings and conclusions vary widely including assertions that the amount of BK generated is only one to three percent of the level needed to induce hypotension.¹¹⁶ Others postulate that if the recipient is taking ACE inhibitors that the levels of BK in filtered platelets is sufficient to cause hypotension.^{122,129} No one has carefully correlated the level of BK or des-Arg⁹-BK in the transfused component with the severity of the reactions. Some studies have shown that a small amount of activated kallikrein is present in filtered blood^{121,122} but no studies have shown that this is sufficient to trigger BK generation in patients who experience hypotensive reactions. Two decades ago the levels of prekallikrein activators

or kallikrein in plasma protein fraction seemed to be more important than BK levels in causing acute hypotension. Measurements of these levels in filtered blood have not been directly linked to patients with hypotensive reactions.

4.5 Prevention of bedside filtration and ACE inhibitor-related reactions.

Recently, the FDA ¹⁰⁸ issued a warning letter about hypotension and bedside filters recommending close monitoring of blood pressure during bedside filtration, immediate discontinuation if a precipitous drop in blood pressure develops and, whenever feasible, use of components filtered at the time of collection or during laboratory storage instead of at the bedside during transfusion. Although not part of the FDA's recommendation, avoiding the use of filters with negatively charged materials and avoiding the use of ACE inhibitors in transfusion recipients should be considered even if not practical in most cases.

The BK mediated reactions in patients undergoing extracorporeal blood processing procedures such as hemodialysis and therapeutic apheresis can be prevented by discontinuing use of ACE inhibitors. Withdrawing the use of ACE inhibitors at least 24 hours prior to the procedure is often effective, particularly for ACE inhibitors with relatively short $t_{1/2}$ such as captopril, fosinopril and quinapril.⁹⁷ This does not apply for longer acting ACE inhibitors with $t_{1/2}$ of 11 to 12 hours or more, such as enalapril and lisinopril. For these several days are needed.

Another approach at prevention is the avoidance of apheresis and dialysis supplies and devices that are negatively charged and are known to trigger the contact activation system. Dialysis membranes and blood component filters that do not activate BK metabolism are available. For patients who must use extracorporeal SPA or LDL apheresis, it is best to avoid ACE inhibitors. The use of prophylactic antihistamine and corticosteroid has failed to prevent these reactions.^{95,110} For patients who must undergo these procedures known to activate BK metabolism and who cannot eliminate their use of ACE inhibitors, experimental approaches can be tried. For example the use of

nafamostat mesilate as an anticoagulant has kallikrein inhibitor activity, can inhibit the contact activation system and can block BK generation during LDL-apheresis and may be useful.^{99,103,135} This anticoagulant has been widely used during dialysis in Japan.¹³⁵ Others have tried the use of icatibant to block specific BK B₂ receptors.¹³⁶ Other receptor antagonists have been developed recently.

There may be patients who are not taking ACE inhibitors but have a genetic deficiency of one or more BK- or des-Arg⁹-BK-degrading peptidases and these patients may be predisposed to these reactions. For these patients needing procedures capable of generating BK, similar experimental prophylactic measures may be warranted. Because of the frequent introduction of new filters for blood transfusion and new devices used in extracorporeal blood circulation, some of which may activate BK generation, special caution is warranted when used in patients taking ACE inhibitor medications or those with intrinsically low BK peptidase levels.

5. CONCLUSIONS

About one century ago, Abelous and Bardier¹³⁷ described for the first time the hypotensive activity of kallikrein. More recently its role in causing signs and symptoms of disease, its beneficial effect on cardiovascular diseases and its role in side effects of ACE inhibitors have been demonstrated. BK and des-Arg⁹-BK seem to have a causative role in some patients with hypotensive reactions during blood transfusion, apheresis procedure and dialysis. However, due to the complex metabolism of BK the relationship of endogenous BK and des-Arg⁹-BK to the benefits and side effects of ACE inhibitors remains to be elucidated. It is not clear at the present time at which concentration the endogenous kinins (BK and des-Arg⁹-BK) play a protective role at the vascular level or are proinflammatory substances. Moreover, the finding that some patients with hypotensive reactions have a preexisting low serum activity of APP and an anomaly of des-Arg⁹-BK metabolism^{86,89,113} opens new areas of investigations on the genetic aspects of these diseases and the nature of the polymorphism of peptidases responsible in the presence of ACE inhibition for the accumulation of BK and des-Arg⁹-BK.

6. REFERENCES

1. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992; 44 (1): 1-80.
2. Mandle R Jr, Colman RW, Kaplan AP. Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73 (11): 4179-4183.
3. Beaubien G, Rosinski-Chupin I, Mattei MG, Mbikay M, Chretien M, Seidah NG. Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry* 1991; 30 (6): 1628-1635.
4. Chung DW, Fujikawa K, McMullen BA, Davie EW. Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats. *Biochemistry* 1986; 25 (9): 2410-2417.
5. Fujikawa K, Chung DW, Hendrickson LE, Davie EW. Amino acid sequence of human factor XI, a blood coagulation factor with four tandem repeats that are highly homologous with plasma prekallikrein. *Biochemistry* 1986; 25 (9): 2417-2424.
6. Mandle R Jr, Kaplan AP. Hageman factor substrates. II. Human plasma prekallikrein. Mechanism of activation by Hageman factor and participation in Hageman factor dependent fibrinolysis. *J Biol Chem* 1977; 252 (17): 6097-6104.
7. Kaplan AP, Joseph K, Shibayama Y, Nakazawa Y, Ghebrehiwet B, Reddigari S, Silverberg M. Bradykinin formation. Plasma and tissue pathways and cellular interactions. *Clin Rev Allergy Immunol* 1998; 16 (4): 403-429.

8. Meijers JCM, McMullen BA, Bouma BN. The contact activation proteins: a structure/function overview. *Agents Actions Suppl* 1992; 38/II: 219-230.
9. Kaplan AP, Silverberg M. The coagulation-kinin pathway of human plasma. *Blood* 1987; 70 (1): 1-15.
10. Carbini LA, Scicli AG, Carretero OA. The molecular biology of the kallikrein-kinin system: III. The human kallikrein gene family and kallikrein substrate. *J Hypertens* 1993; 11 (9): 893-898.
11. Clements JA. The human kallikrein gene family: a diversity of expression and function. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 99 (1): C1-C6.
12. Margolius HS. Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses. *Diabetes* 1996; 45 (1): S14-S19.
13. Figueroa CD, Gonzalez CB, Müller-Esterl W, Bhoola KD. Cellular localization of human kininogens. *Agents Actions Suppl* 1992; 38/I: 617-626.
14. Müller-Esterl W, Iwanaga S, Nakanishi S. Kininogens revisited. *Trends Biochem Sci* 1986; 11: 336-339.
15. Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 1997; 90 (10): 3819-3843.
16. Schmaier AH. Gene expression, regulation and cell surface presentation of the kininogens. In: SG Farmer, ed. *Handbook of Immunopharmacology: The Kinin System*. London: Academic Press, 1997; 57-70.

17. DeLa Cadena RA, Colman RW. Structure and functions of human kininogens. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12 (7): 272-275.
18. Reddigari SR, Silverberg M, Kaplan AP. Bradykinin formation in allergic diseases and hereditary angioedema. In: SG Farmer, ed. *Handbook of Immunopharmacology: The Kinin System*. London: Academic Press, 1997; 265-285.
19. Thompson RE, Mandle R Jr, Kaplan AP. Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J Clin Invest* 1977; 60 (6): 1376-1380.
20. Schmaier AH, Kuo A, Lundberg D, Murray S, Cines DB. The expression of high molecular weight kininogen on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 1988; 263 (31): 16327-16333.
21. Van Iwaarden F, de Groot PG, Bouma BN. The binding of high molecular weight kininogen to cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1988; 263 (10): 4698-4703.
22. Gustafson EJ, Schutsky D, Knight LC, Schmaier AH. High molecular weight kininogen binds to unstimulated platelets. *J Clin Invest* 1986; 78 (1): 310-318.
23. Joseph K, Ghebrehiwet B, Peerschke EIB, Reid KBM, Kaplan AP. Identification of the zinc-dependent endothelial cell binding protein for high molecular weight kininogen and factor XII: identity with the receptor that binds to the globular "head" of C1q (gC1q-R). *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93 (16): 8552-8557.

24. Reddigari SR, Shibayama Y, Brunnee T, Kaplan AP. Human Hageman factor (factor XII) and high molecular weight kininogen compete for the same binding site on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 1993; 268 (16): 11982-11987.
25. Figueroa CD, Henderson LM, Kaufman J, DeLa Cadena RA, Colman RW, Müller-Esterl W, Bhoola KD. Immunovisualization of high (HK) and low (LK) molecular weight kininogens on isolated human neutrophils. *Blood* 1992; 79 (3): 754-759.
26. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B₁ receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 1998; 50 (3): 357-386.
27. Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 1980; 32 (1): 1-46.
28. Marceau F. Kinin B₁ receptors : a review. *Immunopharmacology* 1995; 30 (1): 1-26.
29. Auch-Schweik W, Kuchenbuch C, Walther CB, Bossaller C, Friedel N, Graf K, Grafe M, Fleck E. Local regulation of vascular tone by bradykinin and angiotensin converting enzyme inhibitors. *Eur Heart J* 1993; 14 (Suppl 10): 154-156.
30. Mombouli JV, Vanhoutte PM. Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 679-705.
31. Alfie ME, Yang XP, Hess F, Carretero OA. Salt-sensitive hypertension in bradykinin B2 receptor knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224 (3): 625-630.

32. Madeddu P, Varoni MV, Palomba D, Emanuelli C, Demontis MP, Glorioso N, Dessi-Fulgheri P, Sarzani R, Anania V. Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B2-receptor gene. *Circulation* 1997; 96 (10): 3570-3578.
33. Erdös EG, Skidgel RA. Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease. In: SG Farmer, ed. *Handbook of Immunopharmacology: The Kinin System*. London: Academic Press, 1997: 111-141.
34. Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85 (24): 9386-9390.
35. Jaspard E, Alhenc-Gelas F. Catalytic properties of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme on the cell surface. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 211 (2): 528-534.
36. Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem* 1993; 268 (13): 9496-9503.
37. Dorer FE, Ryan JW, Steward JM. Hydrolysis of bradykinin and its higher homologues by angiotensin-converting enzyme. *Biochem* 1974; 141 (3): 915-917.
38. Bunning P, Holmquist B, Riordan JF. Substrate specificity and kinetic characteristics of angiotensin converting enzyme. *Biochemistry* 1983; 22 (1): 103-110.

39. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half of the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86 (4): 1343-1346.
40. Butler R, Morris AD, Struthers AD. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and cardiovascular disease. *Clin Sci* 1997; 93 (5): 391-400.
41. Schunkert H. Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and cardiovascular disease. *J Mol Med* 1997; 75 (11-12): 867-875.
42. Barker PE, Shipp MA, D'Adamio L, Masteller EL, Reinherz EL. The common acute lymphoblastic leukemia antigen maps to chromosomal region 3 (q21-q27). *J Immunol* 1989; 142 (1): 283-287.
43. Tran-Paterson R, Willard HF, Letarte M. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase-3.4.24.11) gene is located on human chromosome 3. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 42 (1): 129-134.
44. Erdös EG. Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 15 (Suppl 6): S20-S24.
45. Cartron JP, Bailly P, Le Van Kim C, Cherif-Zahar B, Matassi G, Bertrand O, Colin Y. Insights into the structure and function of membrane polypeptides carrying blood group antigens. *Vox Sang* 1998; 74 (Suppl 2): 29-64.
46. Lee S, Lin M, Mele A, Cao Y, Farmar J, Russo D, Redman C. Proteolytic processing of big endothelin-3 by the Kell blood group protein. *Blood* 1999; 94 (4): 1440-1450.

47. Hoang MV, Turner AJ. Novel activity of endothelin-converting enzyme: hydrolysis of bradykinin. *Biochem J* 1997; 327 (23-26 Pt 1): 23-26.
48. Connelly JC, Skidgel RA, Schulz WW, Johnson AR, Erdos EG. Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82 (24): 8737-8741.
49. Shipp MA, Richardson NE, Sayre PH, Brown NR, Masteller EL, Clayton LK, Ritz J, Reinherz EL. Molecular cloning of the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA) identifies a type II integral membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85 (13): 4819-4823.
50. Skidgel RA. Basic carboxypeptidases: regulators of peptide hormone activity. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9 (8): 299-304.
51. Venema RC, Ju H, Zou R, Venema VJ, Ryan JW. Cloning and tissue distribution of human membrane-bound aminopeptidase P. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1354 (1): 45-48.
52. Czirják G, Burkhart WA, Moyer MB, Antal J, Shears SB, Enyedi P. Cloning and functional expression of the cytoplasmic form of rat aminopeptidase P. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1444 (3): 326-336.
53. Hooper NM, Hryszko J, Turner AJ. Purification and characterization of pig kidney aminopeptidase P. A glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme. *Biochem J* 1990; 267 (2): 509-515.
54. Simmons WH, Orawski AT. Membrane-bound aminopeptidase P from bovine lung. Its purification, properties, and degradation of bradykinin. *J Biol Chem* 1992; 267 (7): 4897-4903.

55. Décarie A, Drapeau G, Closset J, Couture R, Adam A. Development of digoxigenin-labeled peptide: application to chemiluminoenzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues. *Peptides* 1994; 15 (3): 511-518.
56. Raymond P, Drapeau G, Raut R, Audet R, Marceau F, Ong H, Adam A. Quantification of des-Arg⁹-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. *J Immunol Methods* 1995; 180 (2): 247-257.
57. Décarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, Adam A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* 1996; 270 (39): H1340-H1347.
58. Scharpe S, De Meester I, Vanhoof G, Hendriks D, van Sande M, Van Camp K, Yaron A. Assay of dipeptidyl peptidase IV in serum by fluorometry of 4-methoxy-2-naphthylamine. *Clin Chem* 1988; 34 (11): 2299-2301.
59. Blais C Jr, Marceau F, Rouleau JL, Adam A. The kallikrein-kininogen-system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides* (in press).
60. Unger T, Gohlke P, Gruber MG. Converting enzyme inhibitors. In: Ganten D, Murlow PJ, eds. Pharmacology of anti-hypertensive therapeutics; *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer Verlag, 1990: 377-481.
61. Unger T, Gohlke P. Converting enzyme inhibitors in cardiovascular therapy: current status and future potential. *Cardiovasc Res* 1994; 28 (2): 146-158.
62. Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* 1995; 47 (1): 25-49.

63. Wiemer G, Popp R, Schölkens BA, Gogelein H. Enhancement of cytosolic calcium, prostacyclin and nitric oxide by bradykinin and the ACE inhibitor ramiprilat in porcine brain capillary endothelial cells. *Brain Res* 1994; 638 (1-2): 261-266.
64. Wiemer G, Schölkens BA, Linz W. Endothelial protection by converting enzyme inhibitors. *Cardiovasc Res* 1994; 28 (2): 166-172.
65. Matoba S, Tatsumi T, Keira N, Kawahara A, Akashi K, Kobara M, Asayama J, Nakagawa M. Cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition against hypoxia/reoxygenation injury in cultured rat cardiac myocytes. *Circulation* 1999; 99 (6): 817-822.
66. Linz W, Martorana PA, Schölkens BA. Local inhibition of bradykinin degradation in ischemic hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 15 (Suppl 6): S99-S109.
67. Chahine R, Adam A, Yamaguchi N, Gaspo R, Regoli D, Nadeau R. Protective effects of bradykinin on the ischaemic heart: implication of the B1 receptor. *Br J Pharmacol* 1993; 108 (2): 318-322.
68. Baumgarten CR, Linz W, Kunkel G, Schölkens BA, Wiemer G. Ramiprilat increases bradykinin outflow from isolated hearts of rat. *Br J Pharmacol* 1993; 108 (2): 293-295.
69. Lamontagne D, Nadeau R, Adam A. Effect of enalaprilat on bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin release following reperfusion of the ischaemic rat heart. *Br J Pharmacol* 1995; 115 (3): 476-478.
70. Gainer JV, Morrow JD, Loveland A, King DJ, Brown NJ. Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N Engl J Med* 1998; 339 (18): 1285-1292.

71. Brown NJ, Gainer JV, Stein CM, Vaughan DE. Bradykinin stimulates tissue plasminogen activator release in human vasculature. *Hypertension* 1999; 33 (6): 1431-1435.
72. Vaughan DE, Lazos SA, Tong K. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured endothelial cells. A potential link between the renin-angiotensin system and thrombosis. *J Clin Invest* 1995; 95 (3): 995-1001.
73. Ridker PM, Gaboury CL, Conlin PR, Seely EW, Williams GH, Vaughan DE. Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function. *Circulation* 1993; 87 (6): 1969-1973.
74. King GL. The role of hyperglycaemia and hyperinsulinaemia in causing vascular dysfunction in diabetes. *Ann Med* 1996; 28 (5): 427-432.
75. Sowers JR, Epstein M. Diabetes mellitus and associated hypertension, vascular disease, and nephropathy. An update. *Hypertension* 1995; 26 (6 Pt 1): 869-879.
76. Décarie A, Adam A, Couture R. Effects of captopril and icatibant on bradykinin (BK) and des[Arg⁹]BK in carrageenan induced edema. *Peptides* 1996; 17 (6): 1009-1015.
77. Blais C Jr, Leclair P, Molinaro G, Adam A. Absence of effect of chronic angiotensin II type 1 receptor blockade on endogenous kinin concentrations in the carrageenan-induced paw edema model in the rat. *Peptides* 1999; 20 (3): 343-352.

78. Blais C Jr, Couture R, Drapeau G, Colman RW, Adam A. Involvement of endogenous kinins in the pathogenesis of peptidoglycan-induced arthritis in the Lewis rat. *Arthritis Rheum* 1997; 40 (7): 1327-1333.
79. Perkins MN, Campbell E, Dray A. Antinociceptive activity of the bradykinin B₁ and B₂ receptor antagonists, des-Arg⁹,[Leu⁸]-BK and Hoe 140, in two models of persistent hyperalgesia in the rat. *Pain* 1993; 53 (2): 191-197.
80. Shigematsu S, Ishida S, Gute DC, Korthuis RJ. Concentration-dependent effects of bradykinin on leukocyte recruitment and venular hemodynamics in rat mesentery. *Am J Physiol* 1999; 277 (1 Pt 2): H152-H160.
81. Israili ZH, Hall WD. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. *Ann Intern Med* 1992; 117 (3): 234-242.
82. Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 1998; 351 (9117): 1693-1697.
83. Greaves M, Lawlor F. Angioedema: manifestations and management. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25 (1): 155-165.
84. Sabroe RA, Kobza Black A. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and angio-oedema. *Br J Dermatol* 1997; 136 (2): 153-158.
85. Agah R, Bandi V, Guntupalli KK. Angioedema: the role of ACE inhibitors and factors associated with poor clinical outcome. *Intensive Care Med* 1997; 23 (7): 793-796.

86. Blais C Jr, Rouleau JL, Brown NJ, Lepage Y, Spence D, Munoz C, Friborg J, Geadah D, Gervais N, Adam A. Serum metabolism of bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin in patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema (AE). *Immunopharmacology* 1999; 43 (2-3): 293-302.
87. Villarroel F. Incidence of hypersensitivity in hemodialysis. *Artif Organs* 1984; 8 (3): 278-280.
88. Daugirdas JT, Ing TS. First use reactions during hemodialysis: A definition of subtypes. *Kidney Int* 1988; 33 (Suppl 24): S37-S43.
89. Blais C Jr, Marc-Aurèle J, Simmons WH, Loute G, Thibault P, Skidgel RA, Adam A. Des-Arg⁹-bradykinin metabolism in patients who presented hypersensitivity reactions during hemodialysis: role of serum ACE and aminopeptidase P. *Peptides* 1999; 20 (4): 412-430.
90. Alving BM, Hojima Y, Pisano JJ, Mason BL, Buckingham RE Jr, Mozen MM, Finlayson JS. Hypotension associated with prekallikrein activation (Hageman-factor fragments) in plasma protein fraction. *NEJM* 1978; 299 (2): 66-70.
91. Van Rosevelt RF, Bakker JC, Sinclair DM, Damen J, Van Mourik JA. Bradykinin-mediated hypotension after infusion of plasma-protein fraction. *J Lab Clin Med* 1982; 100 (2): 288-295.
92. Heinonen J, Peltola K, Himberg JJ, Suomela H. Correlation of hypotensive effect of plasma protein fraction with prekallikrein activator activity: a clinical study in patients having open heart surgery. *Annals Thoracic Surg* 1982; 33 (3): 244-249.

93. Bambauer R, Olbricht CJ, Schoeppe E. Low-density lipoprotein apheresis for prevention and regression of atherosclerosis. *Therapeutic Apheresis* 1997; 1 (3): 242-248.
94. Olbricht CJ, Schauman D, Fisher D. Anaphylactoid reactions, LDL apheresis with dextran sulphate, and ACE inhibitors. *Lancet* 1992; 340 (8824): 908-909.
95. Kroon AA, Mol MJTM, Stalenhoff AFH. ACE inhibitors and LDL-apheresis with dextran sulphate adsorption. *Lancet* 1992; 340 (8833): 1476.
96. Koga N, Nagano T, Sato T, Kagasawa K. Anaphylactoid reaction and bradykinin generation in patients treated with LDL apheresis and ACE inhibitor. *ASAIO J* 1993; 39 (3): M288-M291.
97. Keller C, Grutzmacher P, Bahr F, Schwarzbeck A, Kroon AA, Kiral A. LDL-apheresis with dextran sulphate and anaphylactoid reactions to ACE inhibitors. *Lancet* 1993; 341 (8836): 60-61.
98. Sinzinger H, Bednar J, Granegger S, Blazek I, Peskar BA. LDL-apheresis and concomitant ACE-inhibitor therapy. *Atherosclerosis* 1994; 105 (1): 115-116.
99. Kojima S, Ogi M, Yoshitomi Y, Kuramochi M, Ikeda J, Naganawa M, Hatakeyama H. Changes in bradykinin and prostaglandin plasma levels during dextran-sulfate low-density lipoprotein apheresis. *Int J Artif Organs* 1997; 20 (3): 178-183.
100. Kojima S, Harada-Shiba M, Yamamoto A. Plasma constituents other than low-density lipoprotein adsorbed by dextran-sulfate column. *Ther Apher* 1997; 1 (4): 309-313.

101. Elicio N, Bertolini S, Garbarini R, Nardiello G, Elicio A, Aimale V. LDL apheresis with dextran sulfate and angiotensin receptor antagonist (Losartan). *Artif Organs* 1997; 21 (4): 334-335.
102. Petrucco A, Bordin P, DaCol PG, Fonda M, Cattin L. Hypotension during sham apheresis in a patient taking ACE inhibitors. *JAMA* 1995; 273 (7): 520-521.
103. Kojima S, Harada-Shiba M, Nomura S, Kimura G, Tsushima M, Kuramochi M, Yamamoto A, Omae T. Effect of nafamostat mesilate on bradykinin generation during low-density lipoprotein apheresis using a dextran sulfate cellulose column. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1991; 37 (4): 644-648.
104. Siami GA, Siami FS, Morrow JD, Stone WJ. Cryofiltration apheresis and plasma fractionation causing anaphylactoid reactions in patients receiving angiotensin converting enzyme inhibitors. *Therapeutic Apheresis* 1997; 1 (4): 325-329.
105. Tsuboi Y, Takahashi M, Ishikawa Y, Okada H, Yamada T. Elevated bradykinin and decreased carboxypeptidase R as a cause of hypotension during tryptophan column immunoabsorption therapy. *Ther Apher* 1998; 2 (4): 297-299.
106. Brecher ME, Owen HG, Collins ML. Apheresis and ACE inhibitors. *Transfusion* 1993; 33 (11): 963-964.
107. Owen HG, Brecher ME. Atypical reactions associated with use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and apheresis. *Transfusion* 1994; 34 (10): 891-894.
108. Zoon K, Jacobson ED, Woodcock J. Hypotension and bedside leukoreduction filters. CDRH Safety Alert. Center for Biologics Evaluation and Research, US Food and Drug Administration. Rockville, MD. May 4, 1999: 1-3.

109. Anonymous. Adverse reactions to platelet transfusions reported. *Blood Bank Week, American Association of Blood Banks*. 1993;10 (Oct 22/29): 1-2.
110. Fried MR, Eastlund T, Christie B, Mullin GT, Key NS. Hypotensive reactions to white cell-reduced plasma in a patient undergoing angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. *Transfusion* 1996; 36 (10): 900-903.
111. Hume HA, Popovsky MA, Benson K, Glassman AB, Hines D, Oberman HA, Pisciotto PT, Anderson KC. Hypotensive reactions: a previously uncharacterized complication of platelet transfusion? *Transfusion* 1996; 36 (10): 904-909.
112. Mair B, Leparc GF. Hypotensive reactions associated with platelet transfusions and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Vox Sang* 1998; 74 (1): 27-30.
113. Cyr M, Hume HA, Champagne M, Sweeney JD, Blais C Jr, Gervais N, Adam A. Anomaly of the des-Arg⁹-bradykinin metabolism associated with severe hypotensive reactions during blood transfusions: a preliminary study. *Transfusion* 1999; 39 (10): 1084-1088.
114. Sano H, Koga Y, Hamasaki K, Furuyama H, Itami N. Anaphylaxis associated with white-cell reduction filter. *Lancet* 1996; 347 (9007):1053.
115. Myers T, Uhl L, Kruskall MS. Association between angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and hypotensive transfusion reactions. *Transfusion* 1996; 36 (Suppl): 60S.
116. Hild M, Soderstrom T, Egberg N, Lundahl J. Kinetics of bradykinin levels during and after leukocyte filtration of platelet concentrates. *Vox Sanguinis* 1998; 75 (1): 18-25.

117. Takahashi TA, Hosoda M, Abe H, Sekiguchi S. Bradykinin formation in a platelet concentrate filtered with a leukocyte-removal filter made of nonwoven polyester fibers with a negatively charged surface. *Transfusion* 1994 ; 34 (Suppl): S22.
118. Takahashi TA, Abe H, Hosoda M, Nakai K, Sekiguchi S. Bradykinin generation during filtration of platelet concentrates with a white cell-reduction filter. *Transfusion* 1995; 35 (11): 967.
119. Takahashi TA, Hosoda M, Abe H, Ohnishi Y, Sekiguchi S. Bradykinin generation in red cell concentrates filtered with leukocyte-removal filters. *Transfusion* 1995; 35 (Suppl): S76.
120. Takahashi TA, Abe H, Fujihara M, Nakai K, Hosoda M, Ohnishi Y, Sekiguchi S. Quality of platelet components: the role of suspension medium and leukocyte depletion. *Transfusion Clinique et Biologique*. 1994; 1 (6): 481-487.
121. Davenport RD, Penezina OP. Cleavage of high molecular weight kininogen induced by filtration of platelet concentrates. *Transfusion* 1997; 37 (Suppl): S104.
122. Shiba M, Tadokoro K, Sawanobori M, Nakajima K, Suzuki K, Juji T. Activation of the contact system by filtration of platelet concentrates with a negatively charged white cell-removal filter and measurement of venous blood bradykinin level in patients who received filtered platelets. *Transfusion* 1997; 37 (5): 457-462.
123. Abe H, Ikebuchi K, Shimbo M, Sekiguchi S. Hypotensive reactions with a white-cell reduction filter: activation of kallikrein-kinin cascade in a patient. *Transfusion* 1998; 38 (4): 411-412.

124. Sweeney JD, Dupuis M, Mega AJ. Hypotensive reactions to red cells filtered at the bedside, but not to those filtered before storage, in patients taking ACE inhibitors. *Transfusion* 1998; 38 (4): 410-411.
125. Sweeney JD, Dupuis MP, Mega AJ. Hypotensive reactions during transfusion: Is bradykinin the culprit ?. *Transfusion* 1999; 39 (1): 108-109.
126. Shiba M, Tadokoro K, Nakajima K, Juji T. Bradykinin generation in RC-MAP during storage at 4°C and leukocyte removal filtration. *Thromb Res* 1997; 87 (6): 511-520.
127. Podlosky LR, Boshkov LK. Infusion site pain related to bedside white cell reduction filters. *Transfusion* 1995; 35 (4): 362.
128. Yenicesu I, Tezcan I, Tuncer AM. Hypotensive reactions during platelet transfusions. *Transfusion* 1998; 38 (4): 410.
129. Moore SB. Hypotensive reactions: are they a new phenomenon? Are they related solely to transfusion of platelets? Does filtration of components play a role?. *Transfusion* 1996; 36 (10): 852-853.
130. Belloni M, Alghisi A, Bettini C, Soli M, Zampieri L. Hypotensive reactions associated with white cell-reduced apheresis platelet concentrates in patients not receiving angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Transfusion* 1998; 38 (4): 411-413.
131. Colman RW, Scott CF, Brandwein H, Whitbread J. More on kininogen measurements in platelet concentrates that are white cell (WBC) reduced with WBC-reduction filters. *Transfusion* 1996; 36 (10): 939-940.

132. Colman RW, Scott CF. Hypotension reactions during transfusion: is bradykinin the culprit?. *Transfusion* 1999; 39 (1): 107-108.
133. Scott CF, Brandwein H, Whitbread J, Colman RW. Lack of clinically significant contact system activation during platelet concentrate filtration by leukocyte reduction filters. *Blood* 1998; 92 (2): 616-622.
134. Renaux JL. Ex vivo factors affecting contact phase activation in negatively charged medical devices. *Blood* 1999; 93 (6): 2129-2130.
135. Agishi T. Anion-blood contact (ABC reaction) in patients treated with LDL-apheresis with dextran sulfate-cellulose column while receiving ACE inhibitors. *JAMA* 1994; 271 (3): 195-196.
136. Davidson DC, Peart I, Turner S, Sangster M. Prevention with icatibant of anaphylactoid reactions to ACE inhibitor during LDL apheresis. *Lancet* 1994; 343 (8912): 1575.
137. Abelous JE, Bardier E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *C R Soc Biol* 1909; 66: 511-512.

FIGURE LEGEND**FIGURE 1**

The contact activation cascade of plasma by foreign surface leading to bradykinin (BK) generation.

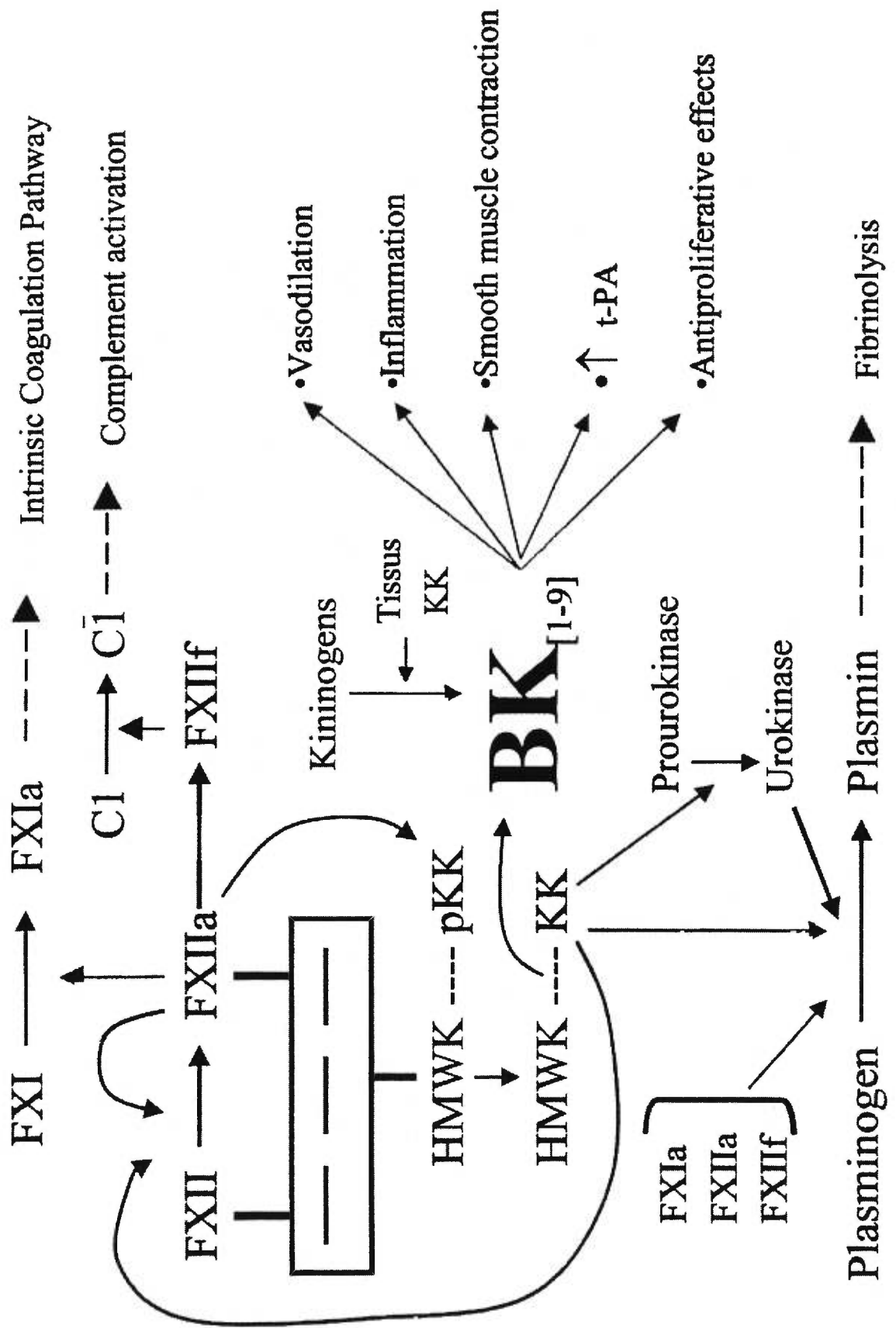


FIGURE 2

Relative contribution of various kininases to the degradation of bradykinin (BK) and des-Arg⁹-bradykinin (des-Arg⁹-BK) in human serum.

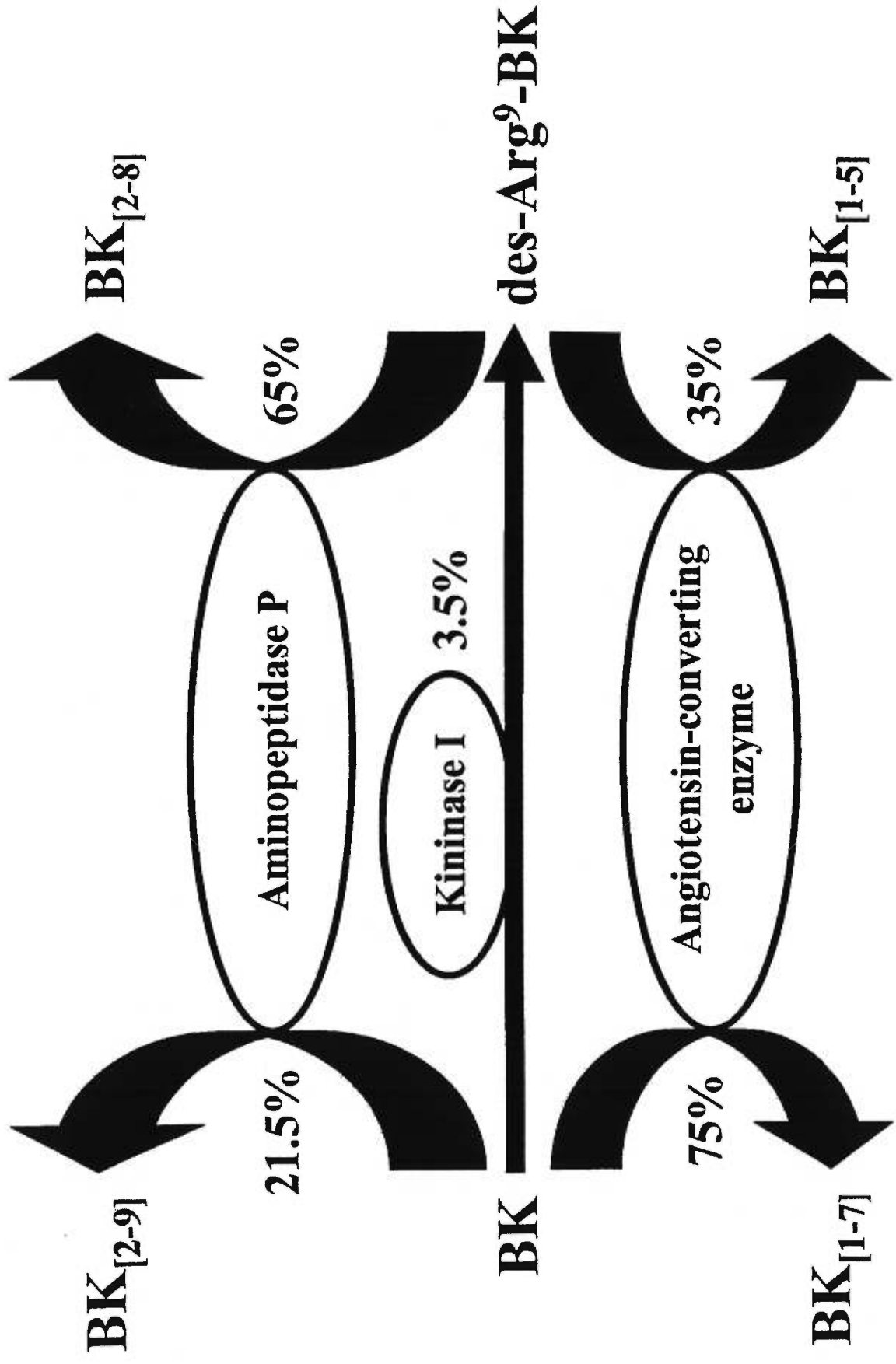
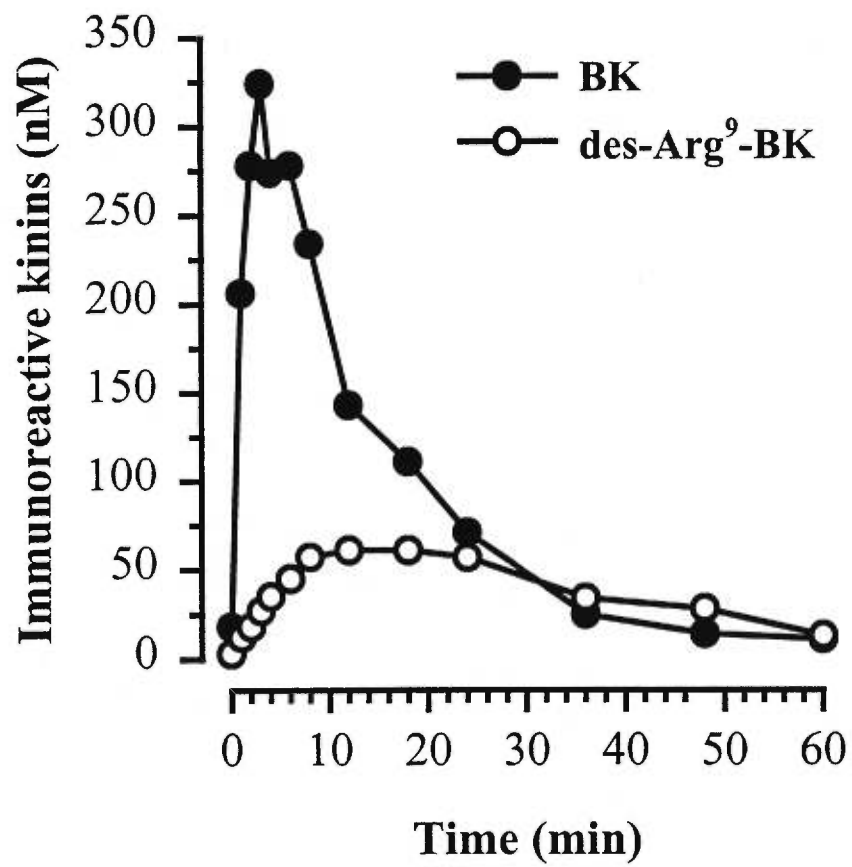


FIGURE 3

Typical kinetic profiles of formation and degradation of bradykinin (BK; filled circles) and des-Arg⁹-bradykinin (des-Arg⁹-BK; open circles) after activation of the contact system with glass beads in normal human plasma.



CHAPITRE 4

**THE BRADYKININ (BK) - DES-ARG⁹-BK
METABOLIC PATHWAY AND THE KINETIC OF
ACTIVATION OF HUMAN PLASMA**

**THE BRADYKININ (BK) AND DES-ARG⁹-BK METABOLIC PATHWAYS AND
THE KINETIC OF ACTIVATION OF HUMAN PLASMA**

Mélanie Cyr⁽¹⁾, Yves Lepage⁽²⁾, Charles Blais, Jr.⁽¹⁾, Nicole Gervais⁽¹⁾,
Massimo Cugno⁽³⁾, Jean-Lucien Rouleau⁽⁴⁾, and Albert Adam⁽¹⁾.

⁽¹⁾Faculté de pharmacie, Université de Montréal, Montréal, (Québec), Canada; ⁽²⁾Faculté des Arts et des sciences, Département des mathématiques et statistique, Université de Montréal, Montréal, (Québec), Canada; ⁽³⁾Department of Internal Medicine, University of Milan, Milano; ⁽⁴⁾University Health Network, Toronto General Hospital, Toronto, (Ontario), Canada.

Running head: Blood kinin metabolism and plasma contact activation

Scientific Section Heading: Hemostasis, Thrombosis, & Vascular Biology

This manuscript was submitted to: **Blood**

1. ABSTRACT

The purpose of this study was to define the metabolism of bradykinin (BK) and des-Arg⁹-BK, in the blood of a large number (n = 116) of normal healthy people. For that purpose, three experimental approaches were used. First, the half-life ($t_{1/2}$) of exogenous BK and des-Arg⁹-BK in the absence and in the presence of an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor was defined in serum. This study was completed by the measurement of the activity of ACE, aminopeptidase P (APP) and kininase I, the three main metallopeptidases responsible for the metabolism of kinins in human serum. Third, the kinetic measurement of endogenous BK and des-Arg⁹-BK was assessed during the contact activation of plasma in the presence of an ACE inhibitor. In serum, BK $t_{1/2}$ (27 ± 10 sec) was lower than that of des-Arg⁹-BK (643 ± 436 sec). The potentiating effect of a preincubation with an ACE inhibitor was however more important for BK (9.0-fold) than for des-Arg⁹-BK (2.2-fold). Only BK $t_{1/2}$ was statistically different in men when compared to women (24 ± 8 sec versus 30 ± 11 sec). The values obtained for serum ACE, APP and kininase I activities were respectively 44 ± 12 ACE units, 22 ± 9 nmol/min/ml and 62 ± 10 nmol/min/ml. ACE and APP activities in women were, respectively, lower (41 ± 11 ACE units) and higher (24 ± 9 nmol/min/ml) than in men (49 ± 13 ACE units and 19 ± 7 nmol/min/ml). A mathematical model ($y = k t^\alpha e^{-\beta t}$, $t > 0$) was applied to the kinetic concentration of BK and des-Arg⁹-BK. It allowed to calculate a significant difference in the formation of BK between men and women. For des-Arg⁹-BK the degradation was higher in women when compared with men. This latter kinetic parameter correlated significantly with the serum APP activity ($y = 6005.46 - 146.43x$, $r^2: 0.6485$; $p < 0.001$) and with the degradation of exogenous des-Arg⁹-BK in presence of an ACE inhibitor ($y = 1004.20 + 1.27x$, $r^2: 0.8269$; $p < 0.001$). In conclusion, these results obtained by a multiexperimental approach constitute a basis for further metabolic studies on the role of kinins in cardioprotective and side effects of ACE inhibitors and also in different inflammatory processes where the activation of the contact system of plasma and the kinins have been involved.

2. INTRODUCTION

Bradykinin (BK) is a nonapeptide which is released from high molecular weight kininogen (HK) when hydrolyzed by plasma kallikrein. Plasma kallikrein originates from prekallikrein during the activation of the contact system of plasma by a negatively charged surface.¹ This activation has been considered for a long time as the unique mechanism leading to the release of BK. Recently however, two different laboratories have described an activation of HK by plasma kallikrein at the endothelial level.^{2,3}

BK exerts its pharmacological activities, mainly vasodilation, by activating the constitutively expressed B₂ receptors. However, that peptide is short lived in the various biological milieus by an important metabolism. The different purified peptidases susceptible to degrade BK have been extensively reviewed.⁴ The importance of their participation in the metabolism of BK depends however on the nature of the biological milieu, the pathophysiological and the experimental conditions.^{4,5} Previously, we have developed an analytical approach which has allowed to define the metabolism of exogenous BK in a limited number of human serum samples using that substrate at a nanomolar concentration.⁶ We have shown that BK is metabolized by three metallopeptidases. Angiotensin-converting enzyme (ACE) constitutes the main degrading pathway that transforms BK into its final inactive metabolite BK_[1-5].^{4,6} The second metabolic pathway in importance is aminopeptidase P (APP) which transforms BK into BK_[2-9], this latter being transformed in its turn into BK_[4-9] by dipeptidyl peptidase IV.⁷ Finally, kininase I, a generic name for different carboxypeptidases that transform BK into des-Arg⁹-BK,⁴ constitutes a minor metabolic pathway unless ACE is inhibited. Des-Arg⁹-BK, the active metabolite of BK, stimulates B₁ receptors at least if expressed during experimental inflammatory conditions.^{8,9,10} In its turn, des-Arg⁹-BK is metabolized by ACE and APP, already involved in the inactivation of BK. However, in the case of des-Arg⁹-BK, APP represents the main metabolic pathway.⁷

As ACE has a higher affinity for BK than for angiotensin I^{11,12} it is now considered as a kininase rather than an angiotensinase.^{11,12,13} These kinetic characteristics and a lot of experimental evidence, mainly of pharmacological nature, plead for a role of BK in

the cardiovascular and metabolic effects of ACE inhibitors.^{14,15,16} Besides these beneficial effects, ACE inhibitors are also endowed with acute and chronic side effects among which angioedema (AE), hypersensitivity reactions (HSR) during hemodialysis, severe hypotensive reaction (SHR) associated with some blood products transfusions and cough.^{17,18,19} Although BK has been claimed to be responsible for these side effects, its participation has been scarcely documented and only poor experimental evidence, if any, pleads for such a pathophysiological role of the B₂ agonist. To try to elucidate a potential role of kinins in the pathophysiology and in the symptoms of these acute and chronic side effects to ACE inhibitors, we have investigated the metabolism of BK in the serum of a limited number of patients who presented such side effects.^{7,20,21} Patients having in the past presented an HSR or a SHR associated with an ACE inhibitor exhibited, at the serum level, an increased half-life ($t_{1/2}$) of des-Arg⁹-BK, this kinetic parameter correlating negatively with the APP activity.

Due to the fact that the decrease activity of APP was not attributed to a circulating inhibitor but rather to an enzyme defect,^{7,20,21} and before to extend these preliminary studies to larger groups of patients who presented either an ACE inhibitor associated AE, HSR or SHR and to their relatives, we would, in the present paper, define the metabolic profile of BK and its active metabolite des-Arg⁹-BK in a large number of healthy individuals (men and women) to determine reference values. For doing so, we will in a first part apply to these samples the experimental approach we have developed previously for a small number of men.⁶ The calculated kinetic parameters will be completed by the measurement of the metallopeptidase activities (ACE, APP and kininase I) responsible for the serum metabolism of kinins. In a second part, the kinetic of generation of endogenous BK and des-Arg⁹-BK from HK in presence of an ACE inhibitor when the contact system is activated by glass beads will be assessed. Finally, the comparison will be performed between the results obtained in the different analytical approaches.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1 Blood samples

Twenty ml of blood were obtained by venipuncture in the forearm of 117 healthy Caucasian volunteers—70 women and 47 men—who were not under any medication (the mean age: 33 ± 14 years, range 19 to 77). Total blood was collected by half into dry tubes, and the other half into tubes containing 0.1 mol/L sodium citrate as anticoagulant (one volume of sodium citrate to nine volumes of blood). After centrifugation (14°C , 15 min, $2500 \times g$) serums and plasmas were decanted and stored at -20°C until biochemical investigations.

This study was approved by the ethics committee on human subjects of the University of Montreal.

3.2 Drugs, peptides and reagents

BK and des-Arg⁹-BK were acquired from Peninsula Laboratories (Belmont, CA, USA). The ACE inhibitor, enalaprilat, was from Merck Frosst Canada (Kirkland, QC, Canada). L-arginine, dansyl-Ala and *o*-phthalaldehyde were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Arg-Pro-Pro was obtained from Bachem (Torrance, CA, USA). Dansyl-Ala-Arg was a generous gift from Dr. R.A. Skidgel (Department of Pharmacology, University of Illinois, College of Medicine, Chicago, IL, USA). β -mercaptoethanol and chloroform were from Fisher Scientific (Montréal, QC, Canada). Ethanol of HPLC grade was obtained from American Chemicals (Montréal, QC, Canada).

3.3 Metabolism of exogenous BK and des-Arg⁹-BK

3.3.1 Incubation procedure

A first set of incubations was performed to assess the metabolic profile of exogenous BK in the absence of *in vitro* ACE inhibition. Synthetic BK was added to the serum samples [final concentration of the peptide = 471 nM].⁶ After various incubation periods at 37°C , ranging from 30 sec to 120 min, the reaction was stopped by adding

cold anhydrous ethanol at a final concentration of 80% vol/vol. The samples were then incubated at 4°C for 1 hour and centrifuged (4°C, 15 min, 3000 × g) to allow the complete precipitation of the kinin precursors. The supernatant was decanted and evaporated to dryness in a Speed Vac Concentrator (Savant, Farmingdale, NY, USA). The residues were stored at -20°C until quantification of immunoreactive peptides, BK and des-Arg⁹-BK, was performed.

A second set of incubations was achieved to define the influence of a complete *in vitro* inhibition of ACE on the metabolism of BK. Serum was preincubated at 37°C for 20 min with enalaprilat [final concentration = 130 nM] before the addition of exogenous BK. This solution was then incubated and treated in the same manner as described above.

3.3.2 Quantification of BK and des-Arg⁹-BK

The residues of the evaporated ethanolic extracts were resuspended in 50 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 100 mM NaCl and 0.05% Tween-20. After resuspension, residual BK and formed des-Arg⁹-BK were quantified by two specific competitive chemiluminescent enzyme immunoassays as previously described.^{22,23} To detect and quantify immune complexes, both assays used highly specific polyclonal rabbit immunoglobulins raised against the carboxy-terminal end of BK and des-Arg¹⁰-kallidin and the digoxigenin-anti-digoxigenin system (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada). These methods have been validated and their analytical performances previously reported.^{7,22-24}

3.3.4 Kinetic parameters

The kinin (S) hydrolysis rate constant (k) was obtained using a first-order equation $S = S_0 \times e^{-kt}$. The $t_{1/2}$ was calculated as $t_{1/2} = \ln(2)/k$.²⁵ The hydrolysis constant rate without [k(-)] or with [k(+)] enalaprilat was used to estimate the ACE relative activity (ACE% = 100 × [1-k(+)/k(-)]). The relative participation of kininase I in the metabolism of BK in the absence and presence of an ACE inhibitor was expressed as the percentage of added BK transformed into des-Arg⁹-BK.

3.4 Serum metallopeptidase activity measurement

3.4.1 Serum ACE activity

ACE activity in serum samples was determined using the Buhlmann ACE radioenzymatic assay (Angiotensin-Converting Enzyme ^3H REA, ALPCO, Windham, NH, USA) under the conditions described by the manufacturer. This assay measured the hydrolysis of the synthetic substrate [^3H]-hippuryl-glycyl-glycine into [^3H]-hippuric acid and a dipeptide. A solvent extraction was used to separate the tritiated hippuric acid from unreacted substrate and the radioactivity was measured in a beta counter. For each sample, tests were performed in duplicate. ACE activity was expressed as ACE units as described by the manufacturer (1 unit ACE = 1 nmol of formed [^3H]-hippuric acid/min/ml).

3.4.2 Serum APP activity

APP activity was measured in serum samples using a modified version of the assay published earlier by Simmons and Orawski.^{7,26} Briefly, 20 μl of serum were incubated with Arg-Pro-Pro [final concentration = 0.5 mM] in 0.1 M HEPES buffer, pH 7, 200 μl final volume. After an incubation period of 6 hours at 37°C, the reaction was stopped by adding cold anhydrous ethanol (800 μl). The samples were then centrifugated (4°C, 15 min, 3000 \times g) and the supernatant was decanted and incubated at room temperature (between 10 to 30 min) with 3 ml of the revelation buffer [0.05 M borate buffer, pH 9.5, containing *o*-phthalaldehyde (150 mg/l) and β -mercaptoethanol (50 $\mu\text{l/l}$)]. The fluorescence emission was read on an Aminco-Bowman Luminescence Spectrometer (Rochester, NY, USA). The excitation and emission wavelengths were respectively, 310 and 455 nm. The emission intensity of a calibration curve with L-arginine (0 to 5 mM) was obtained in the same conditions. The results are expressed as nmoles of arginine released/min/ml of serum sample.

3.4.3 Serum kininase I activity

Kininase I activity was measured by a modification of the method published by R.A. Skidgel.²⁷ Briefly, 20 μl of serum were incubating at 37°C, for 70 min, with dansyl-Ala-Arg [final concentration: 0.2 mM] in 0.1 M HEPES buffer, pH 7 (total

volume: 250 μ l). After the incubation period, the reaction was stopped by adding citric acid 1 M (150 μ l). Dansyl-Ala was extracted (15 sec) by 3 ml of chloroform. After centrifugation (4°C, 10 min, 1000 \times g) and removing of the aqueous phase, the fluorescence of the organic phase was measured as described for APP using, respectively, 340 and 495 nm as excitation and emission wavelengths. The emission intensity of a calibration curve (dansyl-Ala 0 to 1 mM) was performed in the same conditions. The results are expressed as nmoles of dansyl-Ala released/min/ml of serum sample.

3.5 Kinetic of release of endogenous BK and des-Arg⁹-BK during plasma activation

3.5.1 Contact system activation

After preincubating 1 ml of plasma with enalaprilat [final concentration = 130 nM] for 20 min at 37°C in polypropylene tubes, the contact system was activated by incubation of plasma with glass beads (37°C, with agitation) using a modification of the method published by Renaux et al.²⁸ The reaction was stopped after various incubation periods (0, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 36, 60 min for BK and in the case of des-Arg⁹-BK, 0, 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 120 min) by adding cold anhydrous ethanol at a final concentration of 80% vol/vol. The samples were then treated as described above for the metabolism of exogenous kinins before the quantification of endogenous BK and des-Arg⁹-BK.

3.5.2 Mathematical treatment

For the endogenous measures observed at different times t , the mathematical model $y = k t^\alpha e^{-\beta t}$, $t > 0$, is fitted for each subjects. This model with three parameters k , α and β ($k > 0$, $\alpha \geq 0$, $\beta \geq 0$) corresponds to a form similar to the gamma distribution.²⁹ The parameter k represents a scale parameter: large (small) values of k are for large (small) values of the endogenous measures. When α is small (large), the speed to obtain the maximum is fast (slow) while for small (large) values of β , the speed at which the curve decreases to 0 is slow (fast). The parameter α is therefore related to the shape of the first

part of the curve (the part which corresponds to the formation) while the parameter β is related to the second part of the curve, corresponding to the degradation.

In order to study the various curves, different functions of the parameters were calculated: *time of maximum*: the value of the time t for which the maximum of the curve is obtained $t = \alpha/\beta$, *maximum*: value of the maximum of the curve which corresponds at the value of the curve for $t = \alpha/\beta$, *area*: area under the curve which is mathematically given by $k\Gamma(\alpha + 1)/\beta^{\alpha + 1}$ where $\Gamma(\alpha + 1)$ is the gamma function, *half-life of formation* (t_f): the value t_f in the interval 0 to α/β for which $t^\alpha e^{-\beta t} = (0.5) (\alpha/\beta)^\alpha e^{-\alpha}$, *half-life of degradation* (t_d): the value t_d in the interval α/β to ∞ for which $t^\alpha e^{-\beta t} = (0.5) (\alpha/\beta)^\alpha e^{-\alpha}$, *slope of the half-life of formation*: the value of the slope of the curve at the half-life formation = $k e^{-\beta t_f} t_f^{\alpha-1} (\alpha - \beta t_f)$ and *slope of the half-life of degradation*: the value of the slope of the curve at the half-life degradation: $k e^{-\beta t_d} t_d^{\alpha-1} (\alpha - \beta t_d)$.

3.6 Statistical analysis

All data are expressed as mean \pm SD. The comparisons between men and women were performed by a Student t test. A p value less than 0.05 was considered significant. Reference limits were determined nonparametrically by using the conventional empirical 2.5 and 97.5 percentiles.

4. RESULTS

4.1 Metabolism of exogenous BK and des-Arg⁹-BK

4.1.1 Half-life of BK and des-Arg⁹-BK

The $t_{1/2}$ of BK and des-Arg⁹-BK, in the absence and presence of enalaprilat, for 116 healthy individuals are presented in Table 1. In absence of ACE inhibition, BK is rapidly degraded ($t_{1/2} = 27 \pm 10$ sec). This value contrasts with the $t_{1/2}$ of des-Arg⁹-BK which is 24 time higher (mean value 643 ± 436 sec). When serum samples were preincubated with enalaprilat at a concentration that completely inhibits ACE activity, the $t_{1/2}$ of BK and des-Arg⁹-BK were increased (respectively 244 ± 83 sec and 1410 ± 1149 sec). The potentiating effect of enalaprilat was more important in the case of BK,

the $t_{1/2}$ being increased by 9.0-fold comparatively to 2.2-fold for des-Arg⁹-BK. The mean values for des-Arg⁹-BK $t_{1/2}$ (in absence and presence of enalaprilat) present elevated standard deviations due to the wide ranges of the $t_{1/2}$ without (196 to 2878 sec) and with (330 to 6704 sec) enalaprilat.

When the values of BK and des-Arg⁹-BK $t_{1/2}$ measured in men ($n = 46$) were compared with those obtained for women ($n = 70$) no statistical difference could be measured for the $t_{1/2}$ of BK in the presence of ACE inhibition ($p = 0.6858$) and for the $t_{1/2}$ of des-Arg⁹-BK with and without enalaprilat ($p = 0.1484$, $p = 0.0721$, respectively). Only $t_{1/2}$ of BK (in absence of enalaprilat) was significantly lower in men when compared to women (24 ± 8 sec versus 30 ± 11 sec, $p = 0.0017$).

For $t_{1/2}$ of BK and des-Arg⁹-BK no significant influence of age could be calculated, neither for the other kinetic parameters.

4.1.2 Relative participation of ACE and kininase I in the metabolism of kinins

The relative contribution of the various metallopeptidases in the degradation of BK and des-Arg⁹-BK in human serum is shown in Table 1. ACE constitutes the main enzyme responsible for the inactivation of BK accounting for $88 \pm 6\%$ of the total metabolic transformation of BK. Also, this relative participation of ACE in the metabolism of BK was statistically higher between men and women ($90 \pm 3\%$, $n = 46$ versus $87 \pm 7\%$, $n = 70$, $p = 0.0032$). The kininase I participation in the metabolism of BK is minor ($11 \pm 5\%$) it becomes however more important ($46 \pm 23\%$) when ACE is inhibited. In the case of des-Arg⁹-BK, ACE represents only $50 \pm 12\%$ of the total degrading activity. The relative participation of both metallopeptidases in the serum metabolism of kinins is not statistically different between both sexes.

4.1.3 Serum metallopeptidase activities

As total serum protein concentration was similar in both groups, the enzyme activities are expressed per ml.

The values obtained for serum ACE, APP and kininase I are represented in Table 2. The difference in ACE activity was strongly significant between men ($n = 46$) and women ($n = 70$) (49 ± 13 ACE units versus 41 ± 11 ACE units, $p = 0.0006$). Similarly, a significantly higher serum APP activity was measured in women (24 ± 9 nmol/min/ml, $n = 70$) when compared to men (19 ± 7 nmol/min/ml, $n = 46$) ($p = 0.0033$). On its turn, kininase I exhibited similar values in both groups of subjects (60 ± 10 nmol/min/ml versus 63 ± 11 nmol/min/ml, men and women respectively).

4.1.4 Reference intervals

Reference intervals for all variables ($t_{1/2}$ of BK with and without enalaprilat, $t_{1/2}$ of des-Arg⁹-BK in the presence or the absence of enalaprilat, relative participation of ACE and kininase I in the serum metabolism of BK and des-Arg⁹-BK and serum ACE, APP and kininase I activities) were determined from 116 healthy individuals and are represented in Table 3. When significant differences between men and women were observed that is for the variables, $t_{1/2}$ of BK in the absence of enalaprilat, the relative participation of ACE in the metabolism of BK, ACE and APP activities (see Table 1 and 2), separated reference intervals for men and women are represented in Table 3.

4.1.5 Correlation between kinetic parameters and enzyme activities.

Table 4 represents the correlation between serum enzymatic activities (ACE and APP) and the $t_{1/2}$ of BK and des-Arg⁹-BK, in the presence and the absence of enalaprilat. A strongly significant inverse relation could be calculated between the measured $t_{1/2}$ of BK, in the absence of ACE inhibition and the serum ACE activity ($r = -0.6677$; $p = 0.0001$). Also, significant correlations could be calculated between serum APP activity and the calculated $t_{1/2}$ of BK, in the presence and the absence of enalaprilat ($r = -0.5206$; $p = 0.0001$, $r = 0.2433$; $p = 0.0085$, respectively) and the $t_{1/2}$ of des-Arg⁹-BK in the absence ($r = -0.6924$; $p = 0.0001$) and the presence ($r = -0.6840$; $p = 0.0001$) of enalaprilat. In addition, the relation between serum APP activity and the relative contribution of ACE in the metabolism of BK was also significant ($r = -0.6403$; $p = 0.0001$) (data not shown).

4.2 Metabolism of endogenous BK and des-Arg⁹-BK

The comparison between men and women for the different parameters characterising the gamma model fitted to the endogenous measures in time has shown a significant result in the means for alpha parameter ($p = 0.0002$), the constant k ($p = 0.0001$), the maximum time ($p = 0.0018$) and the slope of formation ($p = 0.0001$) for BK while for des-Arg⁹-BK, the significant differences in the means are for the parameter beta ($p = 0.0227$), the constant k ($p = 0.0013$) and the slope of degradation ($p = 0.0006$). It is thus interesting to observe that for BK the differences between men and women are in the formation part of the curves while for des-Arg⁹-BK it is in the degradation part but the means of the total area under the curve are not significantly different ($p = 0.3207$ for BK and $p = 0.803$ for des-Arg⁹-BK). Results are displayed in Table 5. Mean kinetic profiles showing the formation and degradation of endogenous BK and des-Arg⁹-BK for men ($n = 40$) and women ($n = 69$) after activation of the contact system, in the presence of ACE inhibition, with glass beads in normal plasma are shown in Figure 1.

4.3 Comparison between exogenous and endogenous metabolism of BK

Correlations have been calculated between different metabolic parameters obtained from the different experimental approaches. A highly significant correlation could be calculated between the $t_{1/2}$ of des-Arg⁹-BK generated from both exogenous and endogenous BK in the presence of an ACE inhibition ($y = 1004.20 + 1.27x$, $r^2 = 0.8269$; $p < 0.001$). Moreover, a highly significant correlation could also be assessed between the $t_{1/2}$ of endogenous des-Arg⁹-BK (in the presence of enalaprilat) and the APP activity ($y = 6005.46 - 146.43x$, $r^2 = 0.6485$; $p < 0.001$).

5. DISCUSSION

In this paper, we present for the first time a global view of the kinetic activation of the contact system of plasma and the characteristics of both BK and des-Arg⁹-BK metabolic pathways in the blood of a large number of healthy people. For that purpose, we use three different analytical approaches. First, we calculate the $t_{1/2}$ of BK and des-Arg⁹-BK in the absence or the presence of an ACE inhibitor when BK is added to serum.⁶ Second, we measure the enzyme activities of the metallopeptidases responsible

for the metabolism of BK in serum.⁶ Third, we define the kinetic of release and degradation of endogenous BK and des-Arg⁹-BK when contact system of plasma is activated with a negatively charged surface.^{3,28}

The first experimental approach extent the results obtained precedently on a limited number of healthy male people.⁶ The results have been obtained in serum rather than in plasma. In fact, we have shown previously that $t_{1/2}$ of BK measured in anticoagulant plasma does not follow a first order kinetic although $t_{1/2}$ of BK and des-Arg⁹-BK are similar in both conditions. Using that approach,⁶ we show that BK $t_{1/2}$ is significantly higher in women than in men although lower than 50 sec. When serum were preincubated with enalaprilat, this difference was not further observed. In the case of des-Arg⁹-BK, the $t_{1/2}$ is higher than that of BK. The preincubation of serum with an ACE inhibitor, increases also des-Arg⁹-BK $t_{1/2}$ but this potentiating effect is lower than that observed for BK. These results confirm our precedent observations showing that ACE, the main degrading pathway of BK, is a secondary pathway for des-Arg⁹-BK.⁶ In these conditions, kininase I is a very minor pathway which importance increase however when ACE is inhibited.

We have precedently used this approach to define the metabolism of exogenous kinins in the serum of patients who presented an acute side effect while treated with an ACE inhibitor. In patients who presented HSR in hemodialysis while treated with an ACE inhibitor and dialysed with a negatively charged membrane, we measured a significantly higher $t_{1/2}$ of des-Arg⁹-BK but not of BK when compared to patients who never developed such acute side effect while dialysed in the same conditions.⁷ This difference affecting des-Arg⁹-BK degradation was exacerbated when serum samples were preincubated with an ACE inhibitor. A similar anomaly affecting des-Arg⁹-BK metabolism could be observed in patients who presented a SHR while treated with an ACE inhibitor and transfused with platelets or red blood cells leukocyte depleted through a negatively charged membrane.²¹ When applied to the serum of patients who presented an AE associated with an ACE inhibitor, we could not however measure a difference when compared with healthy people.²⁰

We have previously reported that BK is mainly metabolized in serum by three metallopeptidases, ACE, APP and kininase I although des-Arg⁹-BK in its turn is degraded by only ACE and APP. In this study, we measure lower activity of ACE for women. This observation must be related with the BK $t_{1/2}$ and the relative participation of ACE. Recently, it was reported that estrogen treatment modulates ACE mRNA concentration in rat tissues, with a resultant attenuation of tissue and serum ACE activity.³⁰ Moreover, a decreased plasma level of ACE activity with a concomitant increase of plasma BK levels were observed in both hypertensive and normotensive postmenopausal women under hormone replacement therapy.³¹

We have precedently shown that APP is significantly lower in patients dialysed on a negatively charged membrane with a history of HSR (HSR+) when compared with patients who did not present such reactions (HSR-), these activities being negatively correlated with des-Arg⁹-BK $t_{1/2}$ calculated in the presence of an ACE inhibitor.⁷ In this study, we confirm the highly significant correlation between both parameters. Moreover, the higher activity of APP in women can be related to the fact that this metallopeptidase is encoded at the chromosome X.^{32,33}

Activation of plasma by its contact with a negatively charged membrane is classically used to trigger the intrinsic pathway of the coagulation.³ However and until now, its influence on the kinetic release and degradation of BK and des-Arg⁹-BK has been poorly if any documented. This approach which reflects the activation of HK by plasma kallikrein is important for at least two reasons. First, it allows a more comprehensive approach of the metabolism of BK and des-Arg⁹-BK than that obtained by spiking plasma with exogenous BK, even at a nanomolar concentration. Second, it could allow very interesting data on the in vivo activation of the contact system in different pathophysiological conditions where the role of that system has been suspected.^{34,35} To do that we activate the plasma with glass beads, a process which has been reported to be efficient to trigger the contact system.³ This activation is obtained in the presence of an ACE inhibitor to increase the importance of the BK/des-Arg⁹-BK metabolic pathway. The development of a mathematical model allows us to analyse

different parameters regarding the genesis of both B₁ and B₂ agonists and their degradation. We could observe that men and women differ in their formation of BK while a difference is seen in the degradation of des-Arg⁹-BK.

When compared with the results obtained above, t_{1/2} of endogenous des-Arg⁹-BK could be correlated not only with t_{1/2} of des-Arg⁹-BK generated from exogenous BK but also with the APP activity. These observations show for the first time that this metallopeptidase is physiologically relevant in the degradation of the endogenous B₁ agonist.

The results presented in the present study constitute a new basis for further studies not only of the BK and des-Arg⁹-BK metabolic pathways but also of the contact system of plasma. First, they will be used to future studies on the pharmacogenetic aspect of side effects to ACE inhibitors. In fact, as APP has been shown to be encoded by the chromosome X and as we have previously shown a decreased activity of that enzyme in HSR+ patients, we will now define the genetic aspects of these side effects. This kind of study could also be extended to SHR. For ACE inhibitor-associated AE, in whom we previously failed to evidence an anomaly of des-Arg⁹-BK metabolic pathway, we cannot exclude a dissociation between the metabolism of exogenous and that of endogenous BK, BK being generated and degraded locally. These reference values could also be used as a basis to study the predisposition to such side effects to ACE inhibitors. In fact, the role of BK and des-Arg⁹-BK in the cardioprotective effects and in the proinflammatory side effects of ACE inhibitors remains to be established.

Finally, the kinetic release of BK from endogenous HK could open new area of research to reassess the role of endogenous kinins in different pathological states,^{34,35} where the activation of the contact system of plasma has been evidenced.

6. ACKNOWLEDGMENTS

C. Blais, Jr. is the recipient of a scholarship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

We are grateful to Dr. R.A. Skidgel for providing the substrate dansyl-Ala-Arg for measurement of serum kininase I activity.

7. REFERENCES

1. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992; 44 (1): 1-80.
2. Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 1997; 90 (10): 3819-3843.
3. Kaplan AP, Joseph K, Shibayama Y, Nakazawa Y, Ghebrehiwet B, Reddigari S, Silverberg M. Bradykinin formation. Plasma and tissue pathways and cellular interactions. *Clin Rev Allergy Immunol* 1998; 16 (4): 403-429.
4. Erdös EG, Skidgel RA. Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease. In: SG Farmer, ed. *Handbook of Immunopharmacology: The Kinin System*. Academic Press, San Diego, 1997; 111-141.
5. Blais C Jr, Marceau F, Rouleau JL, Adam A. The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides* (in press).
6. Décarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, Adam A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* 1996; 270 (39): H1340-H1347.
7. Blais C Jr, Marc-Aurèle J, Simmons WH, Loute G, Thibault P, Skidgel RA, Adam A. Des-Arg⁹-bradykinin metabolism in patients who presented hypersensitivity reactions during hemodialysis: role of serum ACE and aminopeptidase P. *Peptides* 1999; 20 (4): 412-430.
8. Marceau F. Kinin B₁ receptors: a review. *Immunopharmacology* 1995; 30 (1): 1-26.

9. Blais C, Jr., Couture R, Drapeau G, Colman RW, Adam A. Involvement of endogenous kinins in the pathogenesis of peptidoglycan-induced arthritis in the Lewis rat. *Arthritis Rheum* 1997; 40 (7):1327-1333.
10. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B₁ receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 1998; 50 (3): 357-386.
11. Jaspard E, Wei L, Alhenc-Gelas F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem* 1993; 268 (13): 9496-9503.
12. Jaspard E, Alhenc-Gelas F. Catalytic properties of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme on the cell surface. *Biochem Biophys Res Comm* 1995; 211 (2): 528-534.
13. Bunning P, Holmquist B, Riordan JF. Substrate specificity and kinetic characteristics of angiotensin converting enzyme. *Biochemistry* 1983; 22 (1): 103-110.
14. Unger T, Gohlke P, Gruber MG. Converting enzyme inhibitors. In: Ganten D, Murlow PJ, eds. Pharmacology of anti-hypertensive therapeutics; *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer Verlag, 1990: 377-481.
15. Unger T, Gohlke P. Converting enzyme inhibitors in cardiovascular therapy: current status and future potential. *Cardiovasc Res* 1994; 28 (2): 146-158.
16. Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* 1995; 47 (1): 25-49.

17. Israili ZH, Hall WD. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. *Ann Intern Med* 1992; 117 (3): 234-242.
18. Verresen L, Waer M, Vanrenterghem Y, Michielsen P. Angiotensin-converting-enzyme inhibitors and anaphylactoid reactions to high-flux membrane dialysis. *Lancet* 1990; 336 (8727): 1360-1362.
19. Fried MR, Eastlund T, Christie B, Mullin GT, Key NS. Hypotensive reactions to white cell-reduced plasma in a patient undergoing angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. *Transfusion* 1996; 36 (10):900-903.
20. Blais C Jr, Rouleau JL, Brown NJ, et al. Serum metabolism of bradykinin and des-Arg⁹-bradykinin in patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Immunopharmacology* 1999; 43 (2-3): 293-302.
21. Cyr M, Hume HA, Champagne M, Sweeney JD, Blais C, Jr, Gervais N, Adam A. Anomaly of the des-Arg⁹-bradykinin metabolism associated with severe hypotensive reactions during blood transfusions: a preliminary study. *Transfusion* 1999; 39 (10): 1084-1088.
22. Décarie A, Drapeau G, Closset J, Couture R, Adam A. Development of digoxigenin-labeled peptide: application to chemiluminoenzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues. *Peptides* 1994; 15 (3): 511-518.
23. Raymond P, Drapeau G, Raut R, Audet R, Marceau F, Ong H, Adam A. Quantification of des-Arg⁹-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. *J Immunol Methods* 1995; 180 (2): 247-257.

24. Blais C, Jr, Drapeau G, Raymond P, Lamontagne D, Gervais N, Venneman I, Adam A. Contribution of angiotensin-converting enzyme to the cardiac metabolism of bradykinin: a interspecies study. *Am J Physiol* 1997; 273 (5 Pt 2): H2263-H2271.
25. Moore JW, Pearson RG. Complex reactions. In: Moore JW, Pearson RG, eds. *Kinetics and Mechanisms*. New York, NY: Wiley; 1981:284-296.
26. Simmons WH, Orawski AT. Membrane-bound aminopeptidase P from bovine lung. Its purification, properties, and degradation of bradykinin. *J Biol Chem* 1992; 267 (7): 4897-4903.
27. Skidgel RA. Human carboxypeptidase N: lysine carboxypeptidase. *Methods Enzymol* 1995; 248: 653-663.
28. Renaux JL, Thomas M, Crost T, Loughraieb N, Vantard G. Activation of the kallikrein-kinin system in hemodialysis: role of membrane electronegativity, blood dilution, and pH. *Kidney Int* 1999; 55 (3):1097-1103.
29. Rice JA. *Mathematical statistics and data analysis*. Second edition. Belmont, CA: Duxbury Press; 1995.
30. Gallagher PE, Li P, Lenhart JR, Chappell MC, Brosnihan KB. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension* 1999; 33 (1 Pt 2): 323-328.
31. Sumino H, Ichikawa S, Kanda T, et al. Hormone replacement therapy in postmenopausal women with essential hypertension increases circulating plasma levels of bradykinin. *Am J Hypertens* 1999; 12 (10 Pt 1): 1044-1047.
32. Venema RC, Ju H, Zou R, Venema VJ, Ryan JW. Cloning and tissue distribution of human membrane-bound aminopeptidase P. *Biochem Biophys Acta* 1997; 1354 (1): 45-58.

33. Sprinkle TJ, Stone AA, Venema RC, Denslow ND, Caldwell C, Ryan JW. Assignment of the membrane-bound human aminopeptidase P gene (XPNPEP2) to chromosome Xq25. *Genomics* 1998; 50 (1): 114-116.
34. Martinez-Brotons F, Oncins JR, Mestres J, Amargos V, Reynaldo C. Plasma kallikrein-kinin system in patients with uncomplicated sepsis and septic shock: comparison with cardiogenic shock. *Thromb Haemos* 1987; 58 (2): 709-713.
35. DeLa Cadena RA, Suffredini AF, Page JD, Pixley RA, Kaufman N, Parrillo JE, Colman RW. Activation of the kallikrein-kinin system after endotoxin administration to normal volunteers. *Blood* 1993; 81 (12): 3313-3317.

TABLE I
Half-life of bradykinin (BK) and des-Arg⁹-BK with or without enalaprilat and the relative participation of ACE and kininase I
in the sera of 116 healthy individuals (men n = 46, women n = 70). Data represent mean \pm SD.

| | | <i>t</i> _{1/2} (sec) | | | |
|--|-------------|-------------------------------|--------------|--------------------------|-----------------|
| | | BK | | des-Arg ⁹ -BK | |
| | | With enalaprilat | | Without enalaprilat | |
| | | Men | Women | Men | Women |
| Without enalaprilat | | 27 \pm 10 | | 1410 \pm 1149 | |
| Men | Women | 240 \pm 80 | 246 \pm 86 | 732 \pm 417 | 584 \pm 442 |
| 24 \pm 8 | 30 \pm 11 | | | 1600 \pm 1182 | 1285 \pm 1118 |
| <i>p</i> = 0.0017 | | | | | |
| Relative participation of ACE and kininase I | | | | | |
| BK | | | | | |
| % ACE | | % kininase I | | % ACE | |
| 88 \pm 6 | | 11 \pm 5 | | 50 \pm 12 | |
| Men | Women | Men | Women | Men | Women |
| 90 \pm 3 | 87 \pm 7 | 11 \pm 5 | 12 \pm 5 | 50 \pm 13 | 51 \pm 12 |
| <i>p</i> = 0.0032 | | | | | |

^a n = 110, ^b n = 43, ^c n = 67

TABLE II

Enzymatic activities in the serum of 116 healthy individuals (men n = 46, women n = 70). Data represent mean \pm SD.

| ACE (ACE units) | | Serum enzymatic activities | | | |
|-----------------|-------------|----------------------------|------------|--------------------------|-------------|
| | | APP (nmol/min/ml) | | Kininase I (nmol/min/ml) | |
| 44 ± 12 | | 22 ± 9 | | 62 ± 10 | |
| Men | Women | Men | Women | Men | Women |
| 49 ± 13 | 41 ± 11 | 19 ± 7 | 24 ± 9 | 60 ± 10 | 63 ± 11 |
| $p = 0.0006$ | | $p = 0.0033$ | | | |

TABLE III

Distribution of the variables in a healthy population. Data represent reference interval (2.5 to 97.5 percentiles of each distribution).

| Variable | Total population (n = 116) | Men (n = 46) | Women (n = 70) |
|---|-------------------------------|-----------------|-------------------|
| Serum enzymatic activities | | | |
| ACE (ACE units) | 23 – 69 | 26 – 72 | 23 – 63 |
| APP (nmol/min/ml) | 7 – 39 | 7 – 30 | 7 – 39 |
| Kininase I (nmol/min/ml) | 37 – 80 | | |
| $t_{1/2}$ BK (sec) | | | |
| Without enalaprilat | 15 – 53 | 15 – 41 | 15 – 54 |
| With enalaprilat | 123 – 478 | | |
| $t_{1/2}$ des-Arg ⁹ -BK (sec) | | | |
| Without enalaprilat | 236 – 1901 | | |
| With enalaprilat | 468 – 4473 | | |
| Relative participation of ACE and kininase I BK | | | |
| % ACE | 68 – 95 | 83 – 94 | 68 – 95 |
| % kininase I | 4 – 22 | | |
| % kininase I + enalaprilat | 9 – 91 | | |
| des-Arg ⁹ -BK | | | |
| % ACE | 27 – 72 | | |

TABLE IV

Correlations between enzymatic activities and the half-life of bradykinin (BK) and des-Arg⁹-BK in the serum of 116 healthy individuals (in the absence and the presence of enalaprilat). Data represent Pearson correlation coefficient.

| | $t_{1/2}$ | | | |
|-----|-------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| | BK | | des-Arg ⁹ -BK | |
| | Without enalaprilat | With enalaprilat | Without enalaprilat | With enalaprilat |
| APP | 0.2433 $p = 0.0085$ | -0.5206 $p = 0.0001$ | -0.6924 $p = 0.0001$ | -0.6840 $p = 0.0001$ |
| ACE | -0.6677 $p = 0.0001$ | | | |

TABLE V

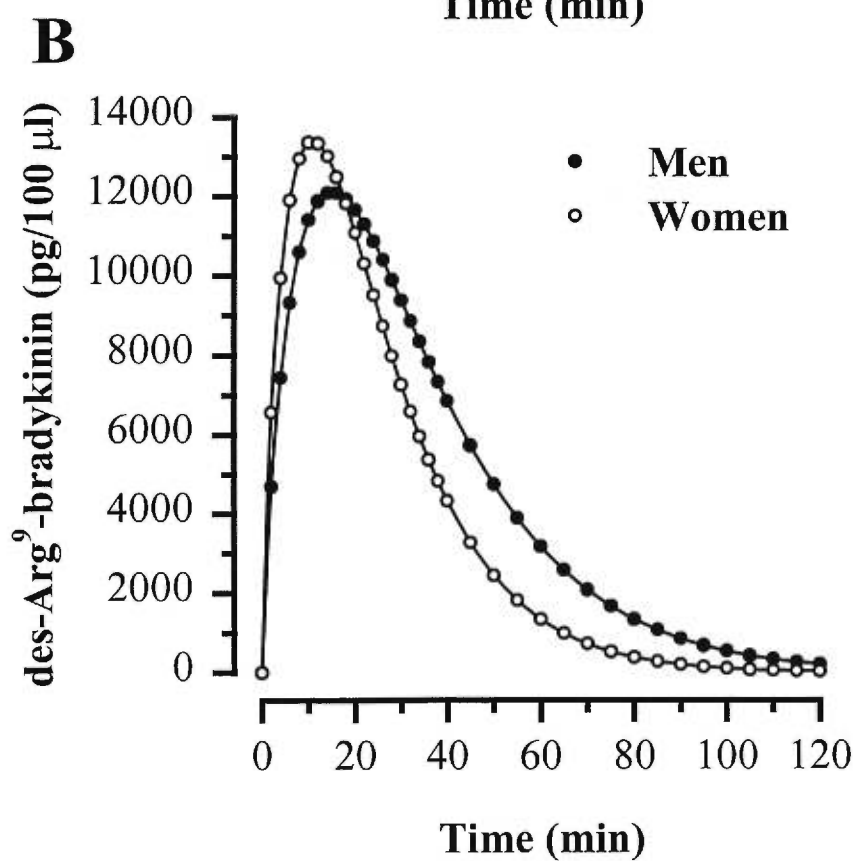
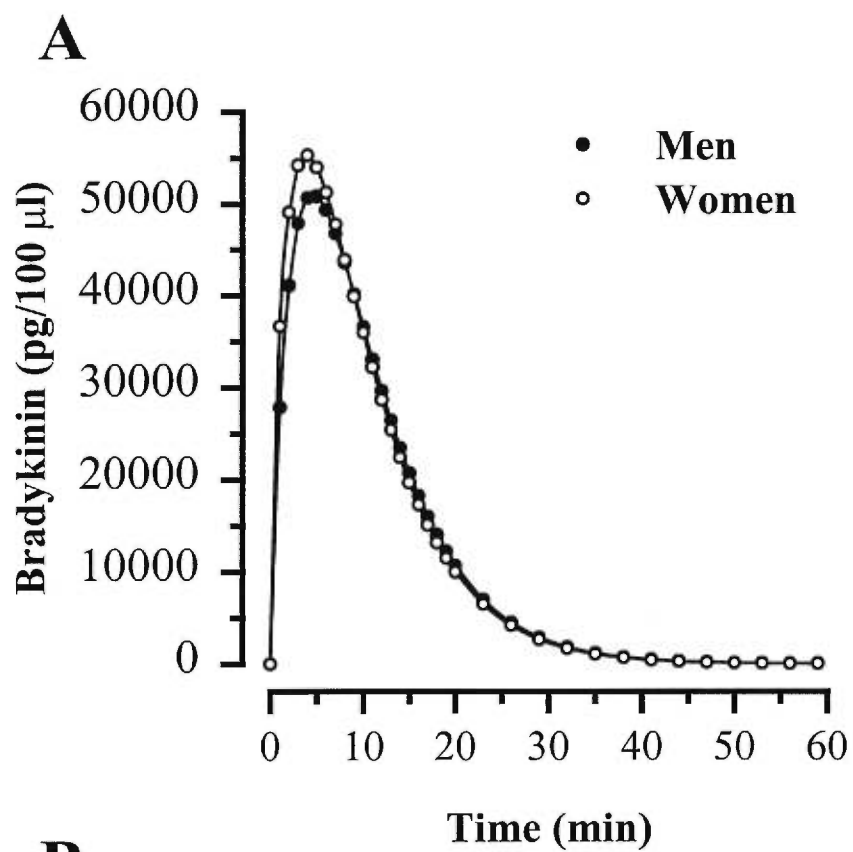
Parameters characterising the gamma model fitted to endogenous measures. Data represent mean \pm SD.

| Parameter | BK | | des-Arg ⁹ -BK | |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| | Men (n = 40) | Women (n = 69) | Men (n = 40) | Women (n = 69) |
| Alpha (α) | 0.82 \pm 0.18 | 0.66 \pm 0.19 | 0.82 \pm 0.20 | 0.82 \pm 0.22 |
| | $p = 0.0002$ | | | |
| Beta (β) | 0.18 \pm 0.05 | 0.17 \pm 0.06 | 0.06 \pm 0.03 | 0.08 \pm 0.05 |
| | $p = 0.0227$ | | | |
| Constant k | 33 323 \pm 9276 | 43 638 \pm 10 729 | 2943 \pm 1265 | 4336 \pm 2485 |
| | $p = 0.0001$ | | | |
| Time of maximum (min) | 5 \pm 1 | 4 \pm 1 | 18 \pm 8 | 15 \pm 9 |
| | $p = 0.0018$ | | | |
| Maximum (pg/100 μ l) | 51 243 \pm 13 537 | 55 853 \pm 10 657 | 13 130 \pm 5787 | 14 227 \pm 5631 |
| Area (min*pg/100 μ l) | 747 440 \pm 249 324 | 805 113 \pm 309 689 | 815 377 \pm 590 987 | 774 716 \pm 917 135 |
| Slope of the $t_{1/2}$ of formation | 19 886 \pm 5418 | 29 498 \pm 11 297 | 1386 \pm 631 | 2961 \pm 6980 |
| | $p = 0.0001$ | | | |
| Slope of the $t_{1/2}$ of degradation | -2999 \pm 982 | -3316 \pm 1166 | -212 \pm 102 | -309 \pm 155 |
| | $p = 0.0006$ | | | |

FIGURE LEGEND**Figure 1**

Mean kinetic profiles of formation and degradation of bradykinin (*panel A*) and des-Arg⁹-bradykinin (*panel B*) for men (filled circles) and women (open circles) after activation of the contact system, in the presence of enalaprilat, with glass beads in normal human plasma.

The kinetic profile for bradykinin shows a difference between men (n = 40) and women (n = 69) in the formation part of the curve while for des-Arg⁹-BK a difference is seen at the degradation level.



CHAPITRE 5

DISCUSSION GÉNÉRALE

L'utilisation des iECA dans le traitement de l'hypertension et de l'insuffisance cardiaque s'est avérée très efficace. Outre cette utilisation, les iECA peuvent prévenir la perte de fonctions rénales associée à la néphropathie diabétique et diminuer la résistance à l'insuline dans le diabète de type II. À côté de leurs effets bénéfiques cependant, ces médicaments comportent des effets secondaires aigus et chroniques. Parmi ceux-ci, l'AO, la RA en hémodialyse, la RHS lors de transfusions sanguines et la toux. L'effet secondaire le plus fréquemment associé à la prise d'iECA est la toux sèche, survenant chez 5 à 20% des patients (Israili & Hall, 1992). L'AO est une réaction secondaire rare (0,1 à 0,2%) mais ayant de graves conséquences (Israili & Hall, 1992). La RA en hémodialyse et la RHS sont également peu fréquentes mais leurs conséquences sont tout aussi importantes (Verresen *et al.*, 1990; Hume *et al.*, 1996).

L'implication de la BK dans la physiopathologie de ces effets secondaires a été soulevée. L'hypothèse qu'une accumulation de BK endogène au niveau des poumons serait responsable de la toux survenant chez des patients traités par un iECA, a été émise. À l'heure actuelle, il n'existe cependant aucune évidence clinique qui implique directement la BK dans la toux. Comme pour la toux, la BK a été proposée comme médiateur de l'AO. En effet, plusieurs études ont émis l'hypothèse que la BK serait responsable de l'AO induit par les iECA (Anderson & deShazo, 1990; Bahal O'Mara & O'Mara, 1996; Sabroe & Kobza Black, 1997). Par contre, une seule publication a rapporté une légère augmentation de la BK endogène au cours d'un épisode d'AO (Nussberger *et al.*, 1998). De plus, des études ont montré une augmentation de la concentration plasmatique de la BK pendant la phase aiguë de la RA (Schaefer *et al.*, 1993; Verresen *et al.*, 1994). Plus récemment, la BK a été rendue responsable de la RHS lors de transfusions sanguines. Certaines études ont observé que la RHS survenait suite à la transfusion de produits sanguin au travers d'un filtre chargé négativement en combinaison avec l'administration d'un iECA (Sano *et al.*, 1996; Fried *et al.*, 1996). D'autres études ont montré que la BK était générée lors de la transfusion de plaquettes déplétées en leucocytes au moyen d'un filtre chargé négativement (Takahashi *et al.*, 1995; Shiba *et al.*, 1997; Hild *et al.*, 1998). La surface négative du filtre permettrait d'activer le système de contact du plasma provoquant ainsi la libération de BK.

Afin de mieux comprendre la physiopathologie de ces effets secondaires, nous avons investigué le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK dans le sérum de patients ayant présenté des effets secondaires aigus aux iECA (Blais *et al.*, 1999a; Blais *et al.*, 1999b; Cyr *et al.*, 1999). Tout d'abord, au laboratoire, Blais et coll. (1999a) ont caractérisé le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK dans le sérum de patients ayant présenté un AO aux iECA. Ces auteurs ont démontré que la moitié de ces patients présentaient au niveau du sérum, une anomalie au niveau d'une enzyme impliquée dans le métabolisme de la des-Arg⁹-BK, provoquant ainsi son accumulation. Ce défaut enzymatique a pour conséquence de prolonger la $t_{1/2}$ de la des-Arg⁹-BK et non celle de la BK. Ces mêmes auteurs ont de plus, caractérisé le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK dans le sérum de patients ayant présenté une RA lorsque dialysés en présence d'une membrane chargée négativement et simultanément traités au moyen d'un iECA (patients RA+) (Blais *et al.*, 1999b). Pour ce faire, ils ont comparé le métabolisme des kinines dans le sérum de patients RA+ avec celui de patients RA- (dialysés dans des conditions identiques mais n'ayant pas présenté de RA). Les patients RA+ présentaient une anomalie non pas au niveau du métabolisme de la BK, mais bien au niveau du métabolisme de la des-Arg⁹-BK. En effet, la $t_{1/2}$ de la des-Arg⁹-BK était significativement plus élevée dans le sérum de patients RA+. Cette augmentation de la $t_{1/2}$ de la des-Arg⁹-BK a pu être corrélée négativement avec l'activité sérique de l'APP. L'activité de l'APP était diminuée de façon significative chez les patients RA+ lorsque comparée aux patients RA- (Blais *et al.*, 1999b).

Au cours de ce travail de maîtrise, nous avons également effectué une étude préliminaire afin de caractériser le métabolisme de la BK et de la des-Arg⁹-BK dans le sérum d'un nombre limité de patients ($n = 4$) ayant présenté une RHS lors de la transfusion de plaquettes ou de globules rouges déplétés en leucocytes au moyen d'un filtre chargé négativement (Cyr *et al.*, 1999). Trois de ces patients étaient sous iECA au moment de la RHS. Pour ce faire, nous avons comparé les patients ayant présenté une RHS avec un petit groupe de sujets sains. Pour ce groupe d'individus sains, nous avons repris les valeurs précédemment publiées par Décarie et coll. (1996). Ainsi, nous avons observé pour ces patients, une anomalie au niveau du métabolisme de la des-Arg⁹-BK.

En effet, en présence d'un iECA, la $t_{1/2}$ de la BK n'était pas statistiquement différente entre le groupe d'individus sains et le groupe ayant présenté une RHS, mais la $t_{1/2}$ de la des-Arg⁹-BK que nous avons observé était significativement plus élevée chez les patients ayant présenté une RHS (Cyr *et al.*, 1999).

Ces investigations biochimiques préliminaires nous amènent donc à émettre l'hypothèse que ces effets secondaires aigus aux iECA sont des réactions multifactorielles qui résulte de la combinaison d'au moins trois facteurs. Le premier facteur est de nature métabolique, il consiste en une activité de l'APP faible responsable d'un métabolisme diminué de la des-Arg⁹-BK. Le second est de nature pharmacologique, c'est-à-dire qu'un iECA bloque la seconde voie métabolique de la des-Arg⁹-BK. Un mécanisme responsable de l'activation du système de contact, menant à la libération de la BK, constitue le troisième facteur. En effet, l'exploration du métabolisme des kinines dans le sérum de patients ayant présenté des effets secondaires aigus aux iECA nous a permis d'observer une anomalie au niveau du métabolisme de la des-Arg⁹-BK étant responsable de la prolongation de la $t_{1/2}$ de la des-Arg⁹-BK (Blais *et al.*, 1999a; Blais *et al.*, 1999b; Cyr *et al.*, 1999). Cette élévation de la $t_{1/2}$ a été associée à une baisse de l'activité de l'APP due à un déficit enzymatique et non pas à un inhibiteur enzymatique endogène circulant. Cette déficience enzymatique, ouvre de nouveaux champs d'investigations sur l'aspect génétique de celle-ci et sur la nature d'un polymorphisme de l'APP. Présentement, des études au niveau du gène de l'APP sont effectuées, en collaboration, au laboratoire de neurogénétique du Dr. Guy Rouleau à l'Hôpital général de Montréal pour tenter d'identifier les variantes polymorphiques au niveau de ce gène. Par la suite, d'autres études devront être effectuées afin de démontrer l'expression des récepteurs B₁.

Ces observations nous ont donc amené à nous interroger sur la prédisposition aux effets secondaires aigus des iECA. Afin de mieux caractériser le métabolisme des kinines pour ces patients, il est important d'augmenter les études métaboliques chez un nombre de patients présentant ces effets secondaires mais il est aussi essentiel de définir le profil métabolique des kinines pour une population d'individus sains n'ayant jamais été traités par iECA, dans le but de déterminer la distribution de ces différents

paramètres cinétiques et enzymatiques. Au cours de ce travail de maîtrise, nous avons donc défini le métabolisme des kinines au niveau sérique et la cinétique d'activation du système de contact du plasma pour une population d'individus ($n = 117$), hommes et femmes, en bonne santé. Pour ce faire, nous avons tout d'abord caractérisé, le métabolisme des kinines en étudiant la cinétique de dégradation de la BK exogène ajoutée au sérum et les cinétiques de formation et de dégradation de la des-Arg⁹-BK, par des méthodes immunologiques spécifiques et sensibles (Décarie *et al.*, 1994; Raymond *et al.*, 1995). De plus, de façon à définir la contribution relative des métallopeptidases (ECA, APP et kininase I) dans le métabolisme des kinines, l'activité enzymatique de celles-ci a été déterminée. Pour ce faire l'ECA a été mesurée à l'aide d'un test radioenzymatique utilisant le substrat ³H-hippuryl-glycylglycine et l'activité de l'APP et de la kininase I a été mesurée par spectrofluorimétrie à l'aide du substrat H-Arg-Pro-Pro (version modifiée de Simmons & Orawski, 1992) et le substrat dansyl-Ala-Arg (version modifiée de Skidgel, 1995) respectivement.

Le système de contact du plasma a été activé, en présence d'un iECA, à l'aide de billes de verre afin de définir la cinétique de formation de la BK à partir du KHPM endogène et de la des-Arg⁹-BK formée à partir de la BK endogène. Ces profils cinétiques de la BK et de la des-Arg⁹-BK générés de façon endogène, nous ont permis d'examiner l'activation du système de contact du plasma et la $t_{1/2}$ de formation et de dégradation pour chacune de ces kinines. La modélisation mathématique de ces courbes d'activation et de dégradation, nous a permis de calculer une différence de formation de BK et de dégradation de des-Arg⁹-BK entre les hommes et les femmes.

Ce travail présente donc, pour la première fois, une vision globale de la cinétique d'activation du système de contact du plasma et des caractéristiques des profils métaboliques de la BK et de la des-Arg⁹-BK dans le sang d'un grand nombre d'individus en bonne santé. Au niveau du métabolisme exogène des kinines, nos résultats viennent confirmer ceux publiés précédemment par Décarie et coll. (1996) qui montrait que l'ECA constitue la voie de dégradation principale pour la BK mais qu'elle est secondaire dans le cas de la des-Arg⁹-BK. De plus, le métabolisme endogène des

kinines s'avère une approche plus physiologique que l'ajout exogène de la BK au plasma. La comparaison de ces deux approches métaboliques a permis de mettre en évidence une corrélation entre la $t_{1/2}$ de la des-Arg⁹-BK générée de façon endogène et la $t_{1/2}$ de la des-Arg⁹-BK, obtenue par la méthode exogène, mais également avec l'activité de l'APP. Ces observations montrent pour la première fois que l'APP est physiologiquement importante dans la dégradation de la des-Arg⁹-BK endogène.

Les valeurs de référence que nous avons déterminées au cours de ce travail, constituent une nouvelle base pour des études futures non seulement du métabolisme des kinines mais également du système de contact du plasma. Ces valeurs seront utilisés pour d'autres études portant sur l'aspect pharmacogénétique des effets secondaires aux iECA. Ces valeurs serviront également de base pour étudier les prédispositions aux effets secondaires des iECA (toux, AO, RA en hémodialyse et la RHS lors de transfusions sanguines). Finalement, la libération de la BK à partir du KHPM endogène ouvre de nouveaux champs de recherche pour réévaluer le rôle des kinines endogènes dans différents états pathologiques où l'activation du système de contact du plasma a été mise en évidence (Martinez-Brotons *et al.*, 1987; DeLa Cadena *et al.*, 1993).

BIBLIOGRAPHIE

Abe H, Ikebuchi K, Shimbo M, Sekiguchi S. Hypotensive reactions with a white-cell reduction filter: activation of kallikrein-kinin cascade in a patient. *Transfusion* 1998; 38 (4): 411-412.

Adam A, Adelin A, Calay G, Closset J, Damas J, Franchimont P. Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values. *Clin Chem* 1985; 31 (3): 423-426.

Anderson MW, deShazo RD. Studies of the mechanism of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor-associated angioedema: the effect of an ACEi on cutaneous responses to bradykinin, codeine, and histamine. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85 (5): 856-858.

Auch-Schwelk W, Kuchenbuch C, Walther CB, Bossaller C, Friedel N, Graf K, Graf M, Fleck E. Local regulation of vascular tone by bradykinin and angiotensin converting enzyme inhibitors. *Eur Heart J* 1993; 14 (Suppl 10): 154-156.

Bahal O'Mara N, O'Mara EM Jr. Delayed onset of angioedema with angiotensin-converting enzyme inhibitors: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy* 1996; 16 (4): 675-679.

Barker PE, Shipp MA, D'Adamio L, Masteller EL, Reinherz EL. The common acute lymphoblastic leukemia antigen maps to chromosomal region 3 (q21-q27). *J Immunol* 1989; 142 (1): 283-287.

Beaubien G, Rosinski-Chupin I, Mattei MG, Mbikay M, Chretien M, Seidah NG. Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry* 1991; 30 (6): 1628-1635.

Belloni M, Alghisi A, Bettini C, Soli M, Zampieri L . Hypotensive reactions associated with white cell-reduced apheresis platelet concentrates in patients not receiving angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Transfusion* 1998; 38 (4): 411-413.

Bernstein KE, Martin BM, Edwards AS, Bernstein EA. Mouse angiotensin-converting enzyme is a protein composed of two homologous domains. *J Biol Chem* 1989; 264 (20): 11945-11951.

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992; 44 (1): 1-80.

Blais C Jr, Couture R, Drapeau G, Colman RW, Adam A. Involvement of endogenous kinins in the pathogenesis of peptidoglycan-induced arthritis in the Lewis rat. *Arthritis Rheum* 1997; 40 (7): 1327-1333.

Blais C Jr, Rouleau JL, Brown NJ, Lepage Y, Spence D, Munoz Claudio, Friborg J, Geadah D, Gervais N, Adam A. Serum metabolism of bradykinin and des-Arg⁹-BK in patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Immunopharmacology* 1999a; 43 (2-3): 293-302.

Blais C Jr, Marc-Aurèle J, Simmons WH, Loute G, Thibault P, Skidgel RA, Adam A. Des-Arg⁹-bradykinin metabolism in patients who presented hypersensitivity reactions during hemodialysis: role of serum ACE and aminopeptidase P. *Peptides* 1999b; 20 (4): 412-430.

Carbini LA, Scicli AG, Carretero OA. The molecular biology of the kallikrein-kinin system: III. The human kallikrein gene family and kallikrein substrate. *J Hypertens* 1993; 11 (9): 893-898.

Carretero OA, Carbini LA, Scicli AG. The molecular biology of the kallikrein-kinin system: I. General description, nomenclature and mouse gene family. *J Hypertens* 1993; 11 (7): 693-697.

Chin HL, Buchan DA. Severe angioedema after long-term use of an angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Ann Intern Med* 1990; 112 (4): 312-313.

Chung DW, Fujikawa K, McMullen BA, Davie EW. Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats. *Biochemistry* 1986; 25 (9): 2410-2417.

Clements JA. The human kallikrein gene family: a diversity of expression and function. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 99 (1): C1-C6.

Colman RW, Scott CF, Brandwein H, Whitbread J. More on kininogen measurements in platelet concentrates that are white cell (WBC) reduced with WBC-reduction filters. *Transfusion* 1996; 36 (10): 939-940.

Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 1997; 90 (10): 3819-3843.

Colman RW, Pixley RA, Najamunnisa S, Yan WY, Wang J, Mazar A, McCrae KR. Binding of high molecular weight kininogen to human endothelial cells is mediated via a site within domain 2 and 3 of the urokinase receptor. *J Clin Invest* 1997; 100 (6): 1481-1487.

Colman RW, Scott CF. Hypotension reactions during transfusion: is bradykinin the culprit?. *Transfusion* 1999; 39 (1): 107-108.

Connelly JC, Skidgel RA, Schulz WW, Johnson AR, Erdos EG . Neutral endopeptidase 24.11 in human neutrophils: cleavage of chemotactic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82 (24): 8737-8741.

Corvol P, Williams TA. Biochemical and molecular aspects of angiotensin I converting enzyme. In: Kenny AJ, Boustead CM, eds. *Cell-Surface Peptidases in Health and Disease*. BIOS Scientific, Oxford, 1997; 99-117.

Cyr M, Hume HA, Champagne M, Sweeney JD, Blais C, Jr, Gervais N, Adam A. Anomaly of the des-Arg⁹-bradykinin metabolism associated with severe hypotensive reactions during blood transfusions: a preliminary study. *Transfusion* 1999; 39 (10): 1084-1088.

Czirják G, Burkhart WA, Moyer MB, Antal J, Shears SB, Enyedi P. Cloning and functional expression of the cytoplasmic form of rat aminopeptidase P. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1444 (3): 326-336.

Daugirdas JT, Ing TS. First use reactions during hemodialysis: A definition of subtypes. *Kidney Int* 1988; 33 (Suppl 24): S37-S43.

Davenport RD, Penezina OP. Cleavage of high molecular weight kininogen induced by filtration of platelet concentrates. *Transfusion* 1997; 37 (Suppl): S416.

Décarie A, Drapeau G, Closset J, Couture R, Adam A. Development of digoxigenin-labeled peptide: application to chemiluminoenzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues. *Peptides* 1994; 15 (3): 511-518.

Décarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, Adam A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* 1996; 270 (39): H1340-H1347.

DeLa Cadena RA, Colman RW. Structure and functions of human kininogens. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12 (7): 272-275.

DeLa Cadena RA, Suffredini AF, Page JD, Pixley RA, Kaufman N, Parrillo JE, Colman RW. Activation of the kallikrein-kinin system after endotoxin administration to normal human volunteers. *Blood* 1993 ; 81 (12): 3313-3317.

Dorer FE, Ryan JW, Steward JM. Hydrolysis of bradykinin and its higher homologues by angiotensin-converting enzyme. *Biochem J* 1974; 141 (3): 915-917.

Dunn JT, Kaplan AP. Formation and structure of human Hageman factor fragments. *J Clin Invest* 1982; 70 (3): 627-631.

Erdös EG. Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 15 (Suppl 6): S20-S24.

Erdös EG, Skidgel RA. Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease. In: SG Farmer, ed. *Handbook of Immunopharmacology: The Kinin System*. Academic Press, San Diego, 1997; 111-141.

Faussner A, Proud D, Towns M, Bathon J. Influence of the cytosolic carboxy termini of B1 and B2 kinin receptors on ligand internalization. Presented at the *International Multidisciplinary Symposium on Peptide Receptors*, Montreal, Canada 1996, July 28-August 1.

Ferreira SH. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *Bothrops jararaca*. *Br J Pharmacol Chemother* 1965; 24 (1): 163-169.

Figueroa CD, Gonzalez CB, Müller-Esterl W, Bhoola KD. Cellular localization of human kininogens. *Agents Actions Suppl* 1992a; 38/I: 617-626.

Figueroa CD, Henderson LM, Kaufman J, DeLa Cadena RA, Colman RW, Müller-Esterl W, Bhoola KD. Immunovisualization of high (HK) and low (LK) molecular weight kininogens on isolated human neutrophils. *Blood* 1992b; 79 (3): 754-759.

Fried MR, Eastlund T, Christie B, Mullin GT, Key NS . Hypotensive reactions to white cell-reduced plasma in a patient undergoing angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. *Transfusion* 1996; 36 (10): 900-903.

Gavras H. Corcoran Lecture. Angiotensin-converting enzyme inhibition and the heart. *Hypertension* 1994; 23 (6 Pt 2): 813-818.

Greaves M, Lawlor F. Angioedema: manifestations and management. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25 (1): 155-165.

Griffin JH. Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation Factor XII). *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75 (4): 1998-2002.

Gustafson EJ, Schutsky D, Knight L, Schmaier AH. High molecular weight kininogen binds to unstimulated platelets. *J Clin Invest* 1986; 78 (1): 310-318.

Hasan AAK, Zisman T, Schmaier AH. Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95 (7): 3615-3620

Hess JF, Borkowski JA, Young GS, Strader CD, Ransom RW. Cloning and pharmacological characterization of a human bradykinin (BK-2) receptor. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; 184 (1): 260-268.

Higashiyama S, Ohkubo I, Ishiguro H, Sasaki M. Heavy chain of human high molecular weight and low molecular weight kininogens binds calcium ions. *Biochemistry* 1987; 26 (23): 7450-7458.

Higgins VL. Leukocyte-reduced blood components: patient benefits and practical applications. *Oncol Nurs Forum* 1996 ; 23 (4): 659-667.

Hild M, Söderström T, Egberg N, Lundahl J. Kinetics of bradykinin levels during and after leucocyte filtration of platelet concentrates. *Vox Sang* 1998; 75 (1): 18-25.

Hooper NM, Hryszko J, Turner AJ. Purification and characterization of pig kidney aminopeptidase P. A glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme. *Biochem J* 1990; 267 (2): 509-515.

Hume HA, Popovsky MA, Benson K, Glassman AB, Hines D, Oberman HA, Pisciotto PT, Anderson KC. Hypotensive reactions: a previously uncharacterized complication of platelet transfusion? *Transfusion* 1996; 36 (10): 904-909.

Israili ZH, Hall WD. Cough and angioneurotic edema associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy. *Ann Intern Med* 1992; 117 (3): 234-242.

Joseph K, Ghebrehiwet B, Peerschke EIB, Reid KB, Kaplan AP. Identification of the zinc-dependent endothelial cell binding protein for high molecular weight kininogen and factor XII : Identity with the receptor that binds to the globular "heads" of C1q (gC1qR). *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93 (16): 8552-8557.

Kaplan AP, Silverberg M. The coagulation-kinin pathway of human plasma. *Blood* 1987; 70 (1): 1-15.

Kaplan AP, Joseph K, Shibayama Y, Nakazawa Y, Ghebrehiwet B, Reddigari S, Silverberg M. Bradykinin formation. plasma and tissue pathways and cellular interactions. *Clin Rev Allergy Immunol* 1998; 16 (4): 403-429.

Keilani T, Schlueter W, Batle D. Selected aspects of ACE inhibitor therapy for patients with renal disease : impact on proteinuria, lipids and potassium. *J Clin Pharmacol* 1995; 35 (1): 87-97.

Konstam MA. Role of angiotensin converting enzyme inhibitors in preventing left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Eur Heart J* 1995; 16 (Suppl): K 42-48.

Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA. Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* 1995; 47 (1): 25-49.

Mair B, Leparc GF. Hypotensive reactions associated with platelet transfusions and angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Vox Sang* 1998; 74 (1): 27-30.

Mandle R Jr, Colman RW, Kaplan AP. Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73 (11): 4179-4183.

Mandle R Jr, Kaplan AP. Hageman factor substrates. II. Human plasma prekallikrein. Mechanism of activation by Hageman factor and participation in Hageman factor dependent fibrinolysis. *J Biol Chem* 1977; 252 (17): 6097-6104.

Marceau F. Kinin B₁ receptors : a review. *Immunopharmacology* 1995; 30 (1): 1-26.

Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B₁ receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 1998; 50 (3): 357-386.

Margolius HS. Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses. *Diabetes* 1996; 45 (1): S14-S19.

Martinez-Brotons F, Oncins JR, Mestres J, Amargos V, Reynaldo C. Plasma kallikrein-kinin system in patients with uncomplicated sepsis and septic shock: comparison with cardiogenic shock. *Thromb Haemost* 1987; 58 (2): 709-713.

McMillin CR, Saito H, Ratnoff OD, Walton AG. The secondary structure of human Hageman factor (factor XII) and its alteration by activating agents. *J Clin Invest* 1974; 54 (6): 1312-1322.

Meier HL, Pierce JV, Colman RW, Kaplan AP. Activation and function of human Hageman factor. The role of high molecular weight kininogen and prekallikrein. *J Clin Invest* 1977; 60 (1): 18-31.

Meijers JCM, McMullen BA, Bouma BN. The contact activation proteins: a structure/function overview. *Agents Actions Suppl* 1992; 38/II: 219-230.

Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess FJ. Expression cloning of a human B₁ bradykinin receptor. *J Biol Chem* 1994; 269 (34): 21583-21586.

Mombouli JV, Vanhoutte PM. Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 679-705.

Müller-Esterl W, Iwanaga S, Nakanishi S. Kininogens revisited. *Trends Biochem Sci* 1986; 11: 336-339.

Murray SR, Chao J, Lin F, Chao L. Kallikrein multigene families and the regulation of their expression. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 15 (Suppl 6): S7-S16.

Myers T, Uhl L, Kruskall MS. Association between angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and hypotensive transfusion reactions. *Transfusion* 1996; 36 (Suppl): 60S.

Nagae A, Deddish PA, Becker RP, Anderson CH, Abe M, Skidgel RA, Erdös EG. Carboxypeptidase M in brain and peripheral nerves. *J Neurochem* 1992; 59 (6): 2201-2212.

Nagae A, Abe M, Becker RP, Deddish PA, Skidgel RA, Erdös EG. High concentration of carboxypeptidase M in lungs: presence of the enzyme in alveolar type I cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993; 9 (2): 221-229.

Nakashima Y, Fouad FM, Tarazi RC. Regression of left ventricular hypertrophy from systemic hypertension by enalapril. *Am J Cardiol* 1984; 53 (8): 1044-1049.

Nussberger J, Cugno M, Amstutz C, Cicardi M, Pellacani A, Agostoni A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 1998; 351 (9117): 1693-1697.

Orawski AT, Simmons WH. Purification and properties of membrane-bound aminopeptidase P from rat lung. *Biochemistry* 1995;34 (35): 11227-11236.

Owen HG, Brecher ME. Atypical reactions associated with use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and apheresis. *Transfusion* 1994; 34 (10): 891-894.

Page JD, Colman RW. Localization of distinct functional domains on prekallikrein for interaction with both high molecular weight kininogen and activated factor XII in a 28-kDa fragment (amino acids 141-371). *J Biol Chem* 1991; 266 (13): 8143-8148.

Ratnoff OD, Saito H. Amidolytic properties of single-chain activated Hageman factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76 (3): 1461-1463.

Raymond P, Drapeau G, Raut R, Audet R, Marceau F, Ong H, Adam A. Quantification of des-Arg⁹-BK using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. *J Immunol Methods* 1995; 180 (2): 247-257.

Reddigari SR, Shibayama Y, Brunnée T, Kaplan AP. Human Hageman factor (FXII) and high molecular weight kininogen compete for the same binding site on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 1993; 268 (16): 11982-11987.

Reddigari SR, Silverberg M, Kaplan AP. Bradykinin formation in allergic diseases and hereditary angioedema. In: SG Farmer, ed. *Handbook of Immunopharmacology: The Kinin System*. London: Academic Press, 1997; 265-285.

Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 1980; 32 (1): 1-46.

Sabroe RA, Kobza Black A. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and angio-oedema. *Br J Dermatol* 1997; 136 (2): 153-158.

Saito H. The "Contact System" in Health and Disease. *Adv Intern Med* 1980; 25: 217-238.

Sano H, Koga Y, Hamasaki K, Furuyama H, Itami N. Anaphylaxis associated with white-cell reduction filter. *Lancet* 1996; 347: 1053.

Schaefer RM, Fink E, Schaefer L, Barkhausen R, Kulzer P, Heidland A. Role of bradykinin in anaphylactoid reactions during hemodialysis with AN69 dialyzers. *Am J Nephrol* 1993; 13 (6): 473-477.

Scharpe S, De Meester I, Vanhoof G, Hendriks D, van Sande M, Van Camp K, Yaron A. Assay of dipeptidyl peptidase IV in serum by fluorometry of 4-methoxy-2-naphthylamine. *Clin chem* 1988; 34: 2299-2301.

Schiller PI, Langauer Messmer S, Haefeli WE, Schlienger RG, Bircher AJ. Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema: late onset, irregular course, and potential role of triggers. *Allergy* 1997; 52 (4): 432-435.

Schmaier AH, Gustafson EG, Idell S, Colman RW. Plasma prekallikrein assay: Reversible inhibition of C1 inhibitor by chloroform and its use in measuring prekallikrein in different mammalian species. *J Lab Clin Med* 1984; 104 (6): 882-892.

Schmaier AH, Bradford H, Silver LD, Farber A, Scott CF, Colman RW. High molecular weight kininogen is an inhibitor of platelet calpain. *J Clin Invest* 1986; 77 (5): 1565-1573.

Schmaier AH, Kuo A, Lundberg D, Murray S, Cines DB. The expression of high molecular weight on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 1988; 263 (31): 16327-16333.

Schmaier AH. Gene expression, regulation and cell surface presentation of the kininogens. In: SG Farmer, ed. *Handbook of Immunopharmacology: The Kinin System*. Academic Press, San Diego, 1997; 57-70.

Schmaier AH. Plasma contact activation : A revised hypothesis. *Biol Res* 1998; 31 (3): 251-262.

Schulman G, Hakim R, Arias R, Silverberg M, Kaplan AP, Arbeit L. Bradykinin generation by dialysis membranes: possible role in anaphylactic reaction. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3 (9): 1563-1569.

Scott CF, Brandwein H, Whitbread J, Colman RW. Lack of clinically significant contact system activation during platelet concentrate filtration by leukocyte reduction filters. *Blood* 1998; 92 (2): 616-622.

Shiba M, Tadokoro K, Sawanobori M, Nakajima K, Suzuki K, Juji T. Activation of the contact system by filtration of platelet concentrates with a negatively charged white cell-removal filter and measurement of venous blood bradykinin level in patients who received filtered platelets. *Transfusion* 1997; 37 (5): 457-462.

Simmons WH, Orawski AT. Membrane-bound aminopeptidase P from bovine lung. Its purification, properties, and degradation of bradykinin. *J Biol Chem* 1992; 267 (7): 4897-4903.

Skeggs LT Jr, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med* 1956; 103 (3): 295-299.

Skidgel RA, Davis RM, Erdös EG. Purification of a human urinary carboxypeptidase (kininase) distinct from carboxypeptidase A, B, or N. *Anal Biochem* 1984; 140 (2): 520-531.

Skidgel RA. Basic carboxypeptidases: regulators of peptide hormone activity. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9 (8): 299-304.

Skidgel RA. Human carboxypeptidase N: lysine carboxypeptidase. *Methods Enzymol* 1995; 248: 653-663.

Slater EE, Merrill DD, Guess HA, Roylance PJ, Cooper WD, Inman WHW, Ewan PW. Clinical profile of angioedema associated with angiotensin converting-enzyme inhibition. *JAMA* 1988; 260 (7): 967-970.

Soubrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, Allergrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85 (24): 9386-9390.

Stewart JM. The kinin system in inflammation. *Agents Actions Suppl* 1993; 42: 145-157.

Sweeney JD, Dupuis M, Mega AJ. Hypotensive reactions to red cells filtered at the bedside, but not to those filtered before storage, in patients taking ACE inhibitors. *Transfusion* 1998; 38 (4): 410-411.

Takahashi TA, Hosoda M, Abe H, Sekiguchi S. Bradykinin formation in a platelet concentrate filtered with a leukocyte-removal filter made of nonwoven polyester fibers with a negatively charged surface. *Transfusion* 1994 ; 34 (Suppl): S22.

Takahashi TA, Abe H, Hosoda M, Nakai K, Sekiguchi S. Bradykinin generation during filtration of platelet concentrates with a white cell-reduction filter. *Transfusion* 1995a; 35 (11): 967.

Takahashi TA, Hosoda M, Abe H, Ohnishi Y, Sekiguchi S. Bradykinin generation in red cell concentrates filtered with leukocyte-removal filters. *Transfusion* 1995b ; 35 (Suppl): S76.

Tielemans C, Madhoun P, Lenaers M, Schandene L, Goldman M, Vanherweghem JL. Anaphylactoid reactions during hemodialysis on AN69 membranes in patients receiving ACE inhibitors. *Kidney Int* 1990; 38 (5): 982-984.

Tran-Paterson R, Willard HF, Letarte M. The common acute lymphoblastic leukemia antigen (neutral endopeptidase-3.4.24.11) gene is located on human chromosome 3. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 42 (1): 129-134.

Van Der Graaf F, Tans G, Bouma BN, Griffin JH. Isolation and functional properties of the heavy and light chains of human plasma kallikrein. *J Biol Chem* 1982; 257 (23): 14300-14305.

Van Iwaarden F, deGroot PG, Bouma BN. The binding of high molecular weight kininogen to cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1988; 263 (10): 4698-4703.

Venema RC, Ju H, Zou R, Venema VJ, Ryan JW. Cloning and tissue distribution of human membrane-bound aminopeptidase P. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1354 (1): 45-48.

Verresen L, Waer M, Vanrenterghem Y, Michielsen P. Angiotensin-converting-enzyme inhibitors and anaphylactoid reactions to high-flux membrane dialysis. *Lancet* 1990; 336 (8727): 1360-1362.

Verresen L, Fink E, Lemke HD, Vanrenterghem Y. Bradykinin is a mediator of anaphylactoid reactions during hemodialysis with AN69 membranes. *Kidney Int* 1994; 45 (5): 1497-1503.

Villarroel F. Incidence of hypersensitivity in hemodialysis. *Artif Organs* 1984; 8 (3): 278-280.

Warner NJ, Rush JE. Safety profiles of the angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Drugs* 1988; 35 (Suppl 5): 89-97.

Werle E, Gotze W, Keppler A. Über die wirkung des kallikreins auf den isolierten darm und über eine neue darmkontrahierende substanz. *Biochem J* 1937; 289: 217-233.

Wood SM, Mann RD, Rawlins MD. Angio-oedema and urticaria associated with angiotensin converting enzyme inhibitors. *Br Med J* 1987; 294 (6564): 91-92.

Yang HYT, Erdös EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta* 1970a; 214: 374-376.

Yang HYT, Jenssen TA, Erdös EG. Conversion of angiotensin I by a kininase preparation. *Clin Res* 1970b; 18 (1): 88.

Yenicesu I, Tezcan I, Tuncer AM. Hypotensive reactions during platelet transfusions. *Transfusion* 1998; 38 (4): 410.

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000; 342 (3): 145-153.