



**Université de Montréal**

**Rôle des Kinines dans la Physiopathologie des Effets Secondaires Causés par  
les Héparines Contaminées d'Origine Chinoise : Approche Expérimentale**

**par**

**Nicolas MONTPAS**

**Faculté de Pharmacie**

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Sciences Pharmaceutiques  
option analyse**

**Juillet, 2010**

**© Nicolas MONTPAS, 2010**

**Université de Montréal**  
**Faculté des études supérieures et postdoctorales**

**Ce mémoire intitulé :**  
**Rôle des Kinines dans la Physiopathologie des Effets Secondaires Causés par**  
**les Héparines Contaminées d'Origine Chinoise : Approche Expérimentale**

**présenté par :**  
**Nicolas MONTPAS**

**a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :**

**Daniel Lamontagne, B.Pharm., Ph. D., président-rapporteur**

**Albert Adam, Ph.D., directeur de recherche**

**Denis Deblois, Ph.D., membre du jury**

## RÉSUMÉ FRANÇAIS ET MOTS CLÉS

En janvier 2008, une éclosion de réactions anaphylactoïdes (RA) potentiellement mortelles associées à l'injection intraveineuse d'héparine manufacturées en Chine et contaminée par le chondroïtine sulfate hypersulfaté (CSHS) a forcé le rappel de ces dernières par la *U.S. Food and Drug Administration*. Ces RA ont rapidement été attribuées à la libération de la bradykinine (BK) suite à l'activation du système de contact par le CSHS. Cependant, aucune évidence expérimentale définitive n'est à ce jour venue appuyer directement cette hypothèse.

En se basant sur le nombre de morts déclaré et associé à la contamination (>150 morts au niveau mondial) ainsi qu'aux données épidémiologiques, qui stipulent que 25% des patients ayant développés une RA aux États-Unis étaient essentiellement des insuffisant rénaux en dialyse traités au moyen d'un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (iECA), nous avons émis l'hypothèse suivante : les RA causées par l'injection intraveineuse d'héparine contaminée au CSHS sont de nature multifactorielle et complexe.

Le but de notre travail est donc, dans un premier temps, d'évaluer le pouvoir kininogène du CSHS en présence d'un iECA et de le comparer à celui du sulfate de dextran, un activateur de référence du système de contact. Comme les RA associées à l'injection intraveineuse d'héparine contaminée par le CSHS se produisent généralement dans les premières minutes des séances de dialyse, nous allons étudier l'effet de la dilution du plasma sur la quantité de BK libérée en présence ou en absence d'un iECA. Nous allons également mesurer les profils cinétiques de la libération de la BK sur un plasma stimulé par différents lots d'héparine contaminée, et associée à des RA, et nous comparerons cette cinétique avec celles d'une héparine de référence complémentée ou non avec différentes concentrations de CSHS synthétique. Enfin, nous allons caractériser le profil de libération de la BK et de son métabolite actif, la des-Arg<sup>9</sup>-BK, dans le plasma de patients dialysé ayant présenté une RA associée à une membrane de dialyse chargée négativement.

L'application de méthodes expérimentales développées dans notre laboratoire nous a permis de montrer, pour la première fois, que l'héparine contaminée au CSHS a la capacité de libérer la BK à des concentrations susceptibles d'expliquer le rôle de ce peptide inflammatoire dans la physiopathologie des RA causées par l'injection intraveineuse d'héparine d'origine chinoise contaminée au CSHS.

**Mots Clés :** héparine d'origine chinoise, chondroïtine sulphate hypersulfaté, bradykinine, des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine et réaction anaphylactoïde

## RÉSUMÉ ANGLAIS ET MOTS CLÉS

In January 2008, fatal anaphylactoid reaction (AR) has been associated to oversulfated chondroitin sulphate (OSCS) contaminated heparin. Although attributed to bradykinin (BK) released during contact system activation by OSCS, no definitive evidence exists until now for a BK release during incubation of contaminated heparin with human plasma.

While looking at the number of death associated with OSCS (>150 worldwide) and at the epidemiologic fact, who state that 25% of the cases of AR associated to OSCS in United-States were treated with an angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEi), we hypothesis that: AR associated with bolus injection of OSCS contaminated heparin are bind to a complex and multi-factorial aspect.

The first objective of our study is to measure the kinetics of BK release in human plasma incubated with OSCS in presence of an ACEi and to compare it to the kinetics profile of the reference activator dextran sulfate. As the AR associated with OSCS contaminated heparin occurred mainly in the first minutes of dialysis session, we also studied the effect of the plasma dilution on the amount of BK released when treated or not with an ACEi. We also quantify the BK forming capacity of different batches of OSCS contaminated heparin responsible for AR and we compare this effect with reference heparin spiked or not with increasing concentrations of synthetic OSCS. Finally, we measure the kinetics of BK and des-Arg<sup>9</sup>-BK, its active metabolite, release in human plasma collected from patients who developed an AR associated to negatively charged dialysis membrane. The application of experimental method developed in our laboratory show, for the first time, that OSCS contaminated heparin incubated with human plasma has the capacity to liberate BK at a concentration that could explain the role of this inflammatory peptide in the pathophysiology of AR associated with OSCS contaminated Chinese heparins.

**Keywords:** Chinese heparin, oversulfated chondroitin sulphate, bradykinin, des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin and anaphylactoid reaction

## TABLE DES MATIÈRES

|  |       |
|--|-------|
| RÉSUMÉ FRANÇAIS ET MOTS CLÉS .....           | iii   |
| RÉSUMÉ ANGLAIS ET MOTS CLÉS .....            | v     |
| TABLE DES MATIÈRES .....                     | vi    |
| LISTES DES FIGURES .....                     | x     |
| LISTES DES TABLEAUX .....                    | xiii  |
| LISTE DES ABRÉVIATIONS.....                  | xiv   |
| REMERCIEMENTS .....                          | xviii |
| INTRODUCTION .....                           | 1     |
| 1. Coagulation et anticoagulant.....         | 1     |
| 1.1 La coagulation .....                     | 1     |
| 1.1.1 Le clou plaquettaire.....              | 1     |
| 1.1.2 Le caillot de fibrine .....            | 1     |
| 1.1.3 La régulation de la coagulation .....  | 2     |
| 1.2 Les anticoagulants .....                 | 2     |
| 2. Héparine et molécules apparentées .....   | 4     |
| 2.1 L'héparine .....                         | 4     |
| 2.1.1 Origine .....                          | 4     |
| 2.1.2 Définition .....                       | 8     |
| 2.1.3 Propriétés .....                       | 9     |
| 2.2 Molécules apparentées à l'héparine ..... | 11    |
| 2.2.1 L'héparane sulfate.....                | 11    |
| 2.2.2 Le chondroïtine sulfate.....           | 12    |
| 2.2.3 Le dermatan sulfate .....              | 12    |
| 2.2.4 Le sulfate de dextran .....            | 13    |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.    | Le chondroïtine sulfate hypersulfaté.....  | 15 |
| 4.    | Effets secondaires liés à l'héparine.....  | 16 |
| 4.1   | Les thrombocytopénies.....   | 16 |
| 4.2   | Les réactions anaphylactiques.....   | 16 |
| 5.    | Les réactions d'hypersensibilité associées à des préparations d'héparine d'origine chinoise..... | 17 |
| 5.1   | Les faits.....   | 17 |
| 5.2   | La production d'héparine d'origine chinoise.....   | 17 |
| 5.3   | Les investigations menées par la FDA.....  | 20 |
| 5.3.1 | L'inspection des installations de SPL-CZ en Chine : Rapport de la FDA.....                       | 20 |
| 5.3.2 | Analyse des lots d'héparine associée avec les RA.....  | 21 |
| 5.4   | L'héparine d'origine chinoise contaminée par le CSHS : une épidémie?.....                        | 22 |
| 5.5   | Physiopathologie des RA associées à l'héparine contaminée par du CSHS.....                       | 24 |
| 6.    | Les RA en hémodialyse.....   | 25 |
| 6.1   | Définition.....  | 25 |
| 6.2   | Mécanismes physiopathologiques.....  | 25 |
| 7.    | Le système des kinines.....  | 27 |
| 7.1   | Les kinines : définition et propriétés.....  | 27 |
| 7.2   | Les précurseurs des kinines.....   | 28 |
| 7.3   | Les systèmes kininogénétiques.....   | 29 |
| 7.3.1 | Les enzymes kininogénétiques.....  | 29 |
| 7.3.2 | La kininogénèse plasmatique.....   | 30 |
| 7.4   | Les récepteurs des kinines.....  | 31 |



|        |   |    |
|--------|---|----|
| 7.4.1  | Définition et propriétés .....  | 31 |
| 7.4.2  | Mode d'action des récepteurs .....  | 32 |
| 7.5    | Le métabolisme des kinines .....  | 33 |
| 7.5.1  | L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA).....   | 34 |
| 7.5.2  | L'aminopeptidase P (APP).....   | 35 |
| 7.5.3  | L'endopeptidase neutre 24.11 (EPN).....   | 36 |
| 7.5.4  | Les carboxypeptidases M et N (CPM et CPN) .....   | 36 |
| 7.5.5  | Autres peptidases .....   | 37 |
| 8.     | Rôle des kinines dans la physiopathologie des RA en hémodialyse : Apport de notre laboratoire .....   | 39 |
|        | OBJECTIFS DE L'ÉTUDE .....  | 40 |
|        | MÉTHODOLOGIE.....   | 41 |
| 1.     | Matériel et réactifs .....  | 41 |
| 2.     | Échantillon de plasma .....   | 41 |
| 3.     | Préparation des solutions stock des différents activateurs potentiels du système de contact .....   | 42 |
| 4.     | Méthodes analytiques.....   | 43 |
| 4.1    | Incubation du plasma avec les différents activateurs potentiels.....  | 43 |
| 4.1.1  | Définition du pouvoir kininogène du CSHS et des molécules apparentées.....  | 43 |
| 4.1.2  | Effet de la dilution du plasma et de l'iECA sur le pouvoir kininogène du CSHS.....  | 44 |
| 4.1.3  | Étude du pouvoir kininogène de différents lots d'héparine contaminée par le CSHS .....  | 44 |
| 4.1.4- | Effet de l'activité plasmatique de l'aminopeptidase P sur les profils métaboliques de la BK et de la des-Arg <sup>9</sup> -BK dans le plasma incubé en présence d'héparine contaminée au CSHS ..... | 45 |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 4.2 | Dosage des kinines .....   | 46 |
| 5.  | Caractérisation de la BK immunoréactive .....  | 49 |
| 5.1 | Caractérisation pharmacologique .....  | 49 |
| 5.2 | Caractérisation physicochimique des kinines immunoréactives par<br>séparation par chromatographie liquide à haute pression. .... | 50 |
| 6.  | Dosage de l'activité plasmatique de l'APP .....  | 51 |
| 7.  | Traitement statistique des résultats .....   | 51 |
|     | PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS .....  | 52 |
| 1.  | Pouvoir kininogène du CSHS : comparaison avec celui du SD .....  | 52 |
| 2.  | Effet de la dilution du plasma sur le pouvoir kininogène du CSHS et du<br>SD .....   | 56 |
| 3.  | Effet de l'inhibition de l'ECA sur le pouvoir kininogène du CSHS.....  | 57 |
| 4.  | Pouvoir kininogène de l'héparine contenant ou non du CSHS.....   | 58 |
| 5.  | Effet de l'activité plasmatique de l'APP sur le pouvoir kininogène.....  | 61 |
| 6.  | Caractérisation de la BK .....   | 63 |
| 6.1 | Caractérisation pharmacologique .....  | 63 |
| 6.2 | Caractérisation physicochimique des kinines immunoréactives par<br>séparation par chromatographie liquide à haute pression. .... | 65 |
|     | DISCUSSION .....   | 67 |
|     | CONCLUSION .....   | 74 |
|     | BIBLIOGRAPHIE .....  | 75 |

## LISTES DES FIGURES

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figure 1.....</b>  | <b>3</b>  |
| Cascades de la coagulation.   |           |
| <b>Figure 2.....</b>  | <b>6</b>  |
| Biosynthèse de l'héparine.  |           |
| <b>Figure 3.....</b>  | <b>9</b>  |
| Structure de l'héparine.  |           |
| <b>Figure 4.....</b>  | <b>11</b> |
| Représentation de la liaison entre l'ATIII et l'héparine.   |           |
| <b>Figure 5.....</b>  | <b>14</b> |
| Structure des molécules apparentées à l'héparine.   |           |
| <b>Figure 6.....</b>  | <b>15</b> |
| Unité de structure du chondroïtine sulfate hypersulfaté.  |           |
| <b>Figure 7.....</b>  | <b>19</b> |
| Les étapes de la fabrication de l'héparine.   |           |
| <b>Figure 8.....</b>  | <b>21</b> |
| Analyse de l'héparine contaminée par HPLC échangeuse d'anion.   |           |
| <b>Figure 9.....</b>  | <b>23</b> |
| Carte représentant les 11 pays ayant rapporté la présence de lots d'héparine d'origine chinoise contaminée. |           |
| <b>Figure 10.....</b>   | <b>38</b> |
| Schéma représentant l'activation du système de contact du plasma.   |           |
| <b>Figure 11.....</b>   | <b>47</b> |
| Schéma représentant les différentes étapes de la méthode immunoenzymatique pour le dosage de la BK.         |           |

- Figure 12.....48**  
 Courbe de calibration typique de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK obtenue par un immunoessai compétitif.
- Figure 13.....54**  
 A : Profils cinétiques moyens (n=6) de la BK obtenu lorsque le plasma (90%) est incubé avec 100 µg/ml de SD (●), 100 µg/ml de CSHS (○) et avec le tampon PBS seul (□) en présence d'un iECA. B : ASC (n=3) correspondant aux profils cinétiques du pool de plasma lorsqu'incubé avec du SD (■) ou du CSHS (□) à des concentrations de 1, 10, 100 et 1000 µg/ml. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type; lorsque la valeur est trop basse, la barre n'est pas indiquée. (\*p<0,0001 comparé au PBS)
- Figure 14.....55**  
 A : Profils cinétiques moyens (n=3) de la BK dosée sur un pool de plasma activé par 100 µg/ml de CSHS (■), 100 µg/ml de CSA (□), 100 µg/ml de CSB (○) ou 100 µg/ml d'héparine non contaminée (●) en présence d'un iECA. B : ASC (n=3) correspondant aux profils cinétiques représentés en A. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type; lorsque la valeur est trop basse, la barre n'est pas indiquée. (\*p<0,002 comparé au PBS, ∞p<0,0001 comparé au CSHS)
- Figure 15.....56**  
 ASC (n=3) correspondant à la quantité totale de BK libérée pendant 120 minutes d'activation de différentes dilutions du pool de plasma (20, 40, 60, 80, 90%) avec 100 µg/ml de SD (■) ou de CSHS (□) en présence d'un iECA. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type.
- Figure 16.....57**  
 Profils cinétiques moyens (n=3) de la BK obtenus lorsque le pool de plasma (50%) est activé par 100 µg/ml de CSHS en absence (●) ou en présence (○) d'un iECA. Dans l'encadré sont illustrées les ASC correspondant aux deux profils cinétiques. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type. (\*<p0,0001)

- Figure 17.....59**  
**A** : Profils cinétiques moyens (n=3) de la BK obtenu lorsqu'un pool de plasma est incubé avec du PBS (□), 410 µg/ml d'héparine non contaminée (●) ou 410 µg/ml d'héparine contaminée avec le CSHS (○) en présence d'un iECA. Les figures **B** et **C** représentent respectivement l'ASC et les concentrations maximales de BK des deux profils cinétiques présentés en A. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type. (\*<p0,0001)
- Figure 18.....60**  
 Corrélation entre la concentration de CSHS (%) contaminant (●) ou complémentant (■) l'héparine et le pic de libération (**A**) ou la quantité totale libérée (**B**) pendant 120 minutes dans un pool de plasma dilué à 50% et activé par 410 µg/ml d'héparine en présence d'un iECA (n=6). Les lots d'héparine associés aux RA sont représentés par des cercles vides (○). Les barres d'erreurs représentent l'erreur type; lorsque la valeur est trop basse, la barre n'est pas indiquée. (\*p<0,0001 comparé à l'héparine non contaminée)
- Figure 19.....62**  
 Les figures (**A**) et (**B**) représentent respectivement les profils cinétiques moyens (n=3) de la libération de BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK sur des plasmas activés par 410 µg/ml d'héparine contaminée et ayant une activité plasmatique de l'APP haute (●) ou basse (○). **C** : ASC correspondant aux profils cinétiques illustrés en A et en B. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type. (\*p<0,02 comparé aux plasmas ayant une activité de l'APP haute)
- Figure 20.....64**  
 Réponses signalétiques de cellules HEK 293 surexprimant RB2 couplés à la GFP suite à leur induction par des extraits éthanoliques de plasma.
- Figure 21.....66**  
 Profil d'élution de la BK immunoréactive suite à une HPLC.

## LISTES DES TABLEAUX

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tableau 1</b> .....  | <b>7</b>  |
| Les 10 plus grands producteurs de porcs au niveau mondial en 2007.  |           |
| <b>Tableau 2</b> .....  | <b>27</b> |
| Séquence peptidique des différentes kinines retrouvées chez l'Homme.  |           |
| <b>Tableau 3</b> .....  | <b>43</b> |
| Les différentes concentrations d'activateur testées pour la définition du pouvoir kininogène du CSHS et des molécules apparentées.  |           |
| <b>Tableau 4</b> .....  | <b>45</b> |
| Identification des différents lots d'héparine contaminée au CSHS testés accompagné de leur % de CSHS (poids/poids) respectif et de la concentration finale de CSHS pour 410 µg/ml d'héparine. |           |
| <b>Tableau 5</b> .....  | <b>68</b> |
| Prix de vente moyen de l'héparine d'origine chinoise à la fin de l'année 2006 versus celui de la fin de l'année 2007.   |           |
| <b>Tableau 6</b> .....  | <b>68</b> |
| Profits engendrés par la substitution de l'héparine par du CSHS.  |           |

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

APP : aminopeptidase P

APPc : Aminopeptidase P cytosolique

APPm : Aminopeptidase P membranaire

ASC : Aires sous la courbe

ATIII : Antithrombine III

BK : Bradykinine

C<sub>1</sub>INH : C1-inhibiteur

CDC : Center for disease control

CPM : Carboxypeptidase M

CPN : carboxypeptidase N

CSA : Chondroïtine sulfate A

CSB : Dermatan sulfate/Chondroïtine sulfate B

CSHS : Chondroïtine sulfate hypersulfater

DAG : Diacylglycérol

Des-Arg<sup>10</sup>-KD : Des-arginine<sup>10</sup>-kallidine

Des-Arg<sup>9</sup>-BK : Des-arginine<sup>9</sup>-bradykinine

DIG : digoxigénine

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine I

EPN : Endopeptidase neutre

FDA : Food and Drug Administration

FII : Facteur II

FIIa : Facteur II activé

FIX : Facteur IX

FIXa : Facteur IX activé

FT : Facteur tissulaire

FVII : Facteur VII

FVIIa : Facteur VII activé

FX : Facteur X

FXa : Facteur X activé

FXI : Facteur XI

FXIa : Facteur XI activé

FXII : Facteur XII / Facteur de Hageman

FXIIa : Facteur XII activé

GAG : Glycosaminoglycane

GalNAc : *N*-acétyl-D-galactosamine

GFP : Protéine fluorescente verte

GlcA : Acide D-glucuronique

GlcNAc : *N*-acétyl-D-glucosamine

GMPC : Guanosine monophosphate cyclique

GP-Ia : Glycoprotéine Ia



GPI : Glycosylphosphatidylinositol

HBPM : Héparine de bas poids moléculaire

HCII : cofacteur II de l'héparine

HPLC : Chromatographie liquide à haute pression

HS : Héparane sulfatate

IdoA : Acide L-iduronique

iECA : Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

IP<sub>3</sub> : Inositol triphosphate

JAK : « Janus kinases »

KBPM : Kininogène de bas poids moléculaire

KD : Kallidine

KHPM : Kininogène de haut poids moléculaire

KK : Kallicéine plasmatique

MAPK : « Mitogen-activated protein kinases »

NO : Monoxyde d'azote

NOS : Monoxyde d'azote synthase

PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

PBS : Tampon phosphate salin

PIP<sub>2</sub> : Phosphatidylinositol biphosphate

PKC : Protéine kinase C

PLA<sub>2</sub> : Phospholipase A<sub>2</sub>

PLC- $\beta$  : Phospholipase C- $\beta$

RA : Réaction anaphylactoïde

RB1 : Récepteur B1

RB2 : Récepteur B2

RMN : Résonance magnétique nucléaire

SD : Sulfate de dextran

SDS : Sodium dodécyle sulfate

SPL : Scientific Protein Laboratories

SPL-CZ : Scientific Protein Laboratories, Changzhou, Chine

SPL-ÉU : Scientific Protein Laboratories, Wisconsin, États-Unis

STAT : « Signal transducers and activators of the transcription »

TIH : Thrombocytopenie induite par l'héparine

UmA : Unité de milli-absorbance

USP : « United-States Pharmacopeia »

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Albert Adam de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir fait confiance. Les nombreuses conversations autant sur le plan scientifique que sur l'actualité m'ont inspiré dans mon développement intellectuel et personnel. Ses précieux conseils m'ont grandement aidé dans les moments plus difficiles. Il a toujours su trouver les mots pour aller chercher le meilleur de moi-même.

Je veux ensuite remercier Anik Désormeaux, l'agente de recherche, de m'avoir appris toutes les techniques de laboratoires que je maîtrise. Elle m'a soutenu tout au long de mon stage et au début de ma Maîtrise dans la mise en route de mon projet. Les journées passées à travailler à ses côtés semblaient toujours plus courtes.

J'adresse également mes remerciements à nos collaborateurs de la FDA, les Docteurs Benjamin Westenberger et David Keire, pour nous avoir fourni les échantillons de chondroïtine sulfate hypersulfaté et d'héparine contaminée ainsi que pour la discussion critique de nos résultats.

Enfin, je remercie chaleureusement ma copine, Catherine Proulx, mes parents et mes amis pour tout le support qu'ils m'ont apporté.

*Celui qui ne connaît pas l'histoire est condamné à la revivre*

**KARL MARX**

## **INTRODUCTION**

### **1. Coagulation et anticoagulant**

#### **1.1 La coagulation**

Dans les conditions physiologiques, la coagulation est une réaction localisée qui a pour but de colmater une brèche vasculaire par formation d'un caillot (Muller and Renne, 2008). Dans un souci de clarté, on distingue deux grandes étapes dans la formation du caillot : la formation du clou plaquettaire et la coagulation proprement dite.

##### **1.1.1 Le clou plaquettaire**

La formation du clou plaquettaire est le résultat de l'hémostase primaire, celle-ci étant centrée sur les thrombocytes ou plaquettes (Davi and Patrono, 2007, Varga-Szabo *et al.*, 2008). Elle comprend différentes étapes successives : l'adhésion des plaquettes aux fibres de collagène lésées; cette étape implique la participation d'une cytoadhésine, le facteur de Von Willebrand, et d'un récepteur cellulaire, la glycoprotéine Ia (GP-Ia). La deuxième étape consiste en une activation cellulaire caractérisée par la libération de substances agrégantes et vasoactives comme la thromboxane A<sub>2</sub>, la sérotonine, l'épinéphrine et la thrombine (Jennings, 2009). Vient enfin l'agrégation plaquettaire médiée par la fibronectine et le fibrinogène et qui implique la participation de récepteurs plaquettaires, les intégrines GP-IIa-IIIa.

##### **1.1.2 Le caillot de fibrine**

Le caillot de fibrine vient renforcer le clou plaquettaire instable. La fibrine est le produit ultime de la coagulation proprement dite. Celle-ci consiste en une activation en cascade de proenzymes en enzymes, faisant toutes parties de la famille des protéases à sérine, selon le schéma réactionnel représenté à la figure 1 (Macfarlane, 1964, Davie and Ratnoff, 1964). En fait, le processus de coagulation qui aboutit à la formation de fibrine se compose de trois voies métaboliques : la voie intrinsèque, la voie extrinsèque et le tronc commun à ces deux voies. Comme indiqué à cette même figure 1, l'activation du système de contact du plasma est le

mécanisme déclenchant de la voie intrinsèque (Cochrane and Griffin, 1982, Colman and Schmaier, 1997).

### 1.1.3 La régulation de la coagulation

Différents mécanismes physiologiques assurent le contrôle de la formation et de l'extension du caillot. Ce sont principalement les antiprotéases et la fibrinolyse.

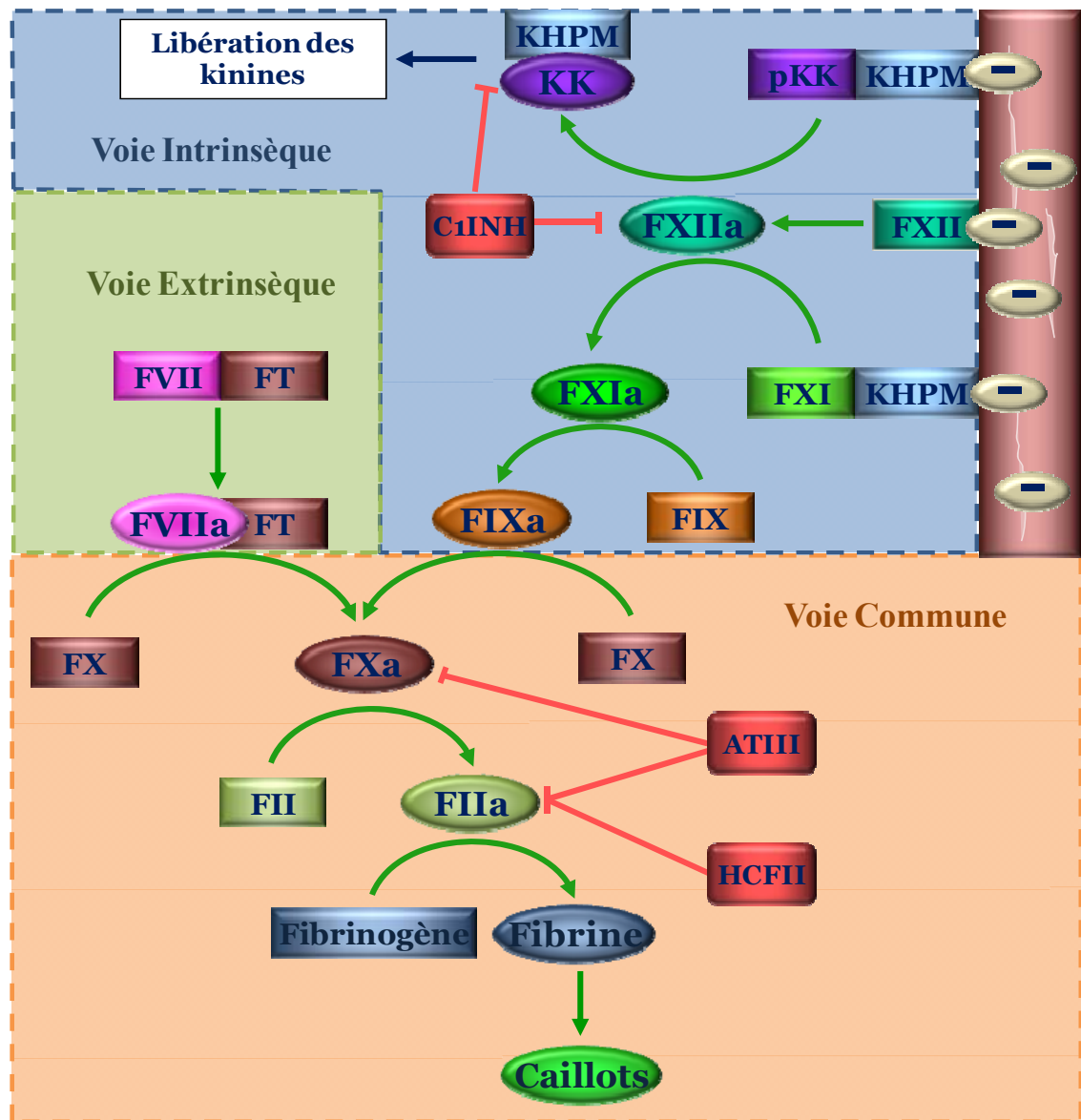
Parmi les antiprotéases, citons le C1-inhibiteur (C<sub>1</sub>INH) qui neutralise dans un premier temps, l'activité sérine protéase du facteur XII activé (FXIIa) et de la kallicroïne (Silverman *et al.*, 2001), ainsi que, dans un deuxième temps, l'antithrombine III (ATIII) qui inhibe principalement les FIIa et Xa (Rosenberg and Damus, 1973, Kurachi *et al.*, 1976). D'autres antiprotéases jouent également un rôle important dans la régulation de la coagulation dont le cofacteur de l'héparine II (HCII) (Tollefsen *et al.*, 1982).

Quant à elle, la fibrinolyse est un mécanisme physiologique assurant la lyse du caillot de fibrine (Shetty *et al.*, 2008).

## 1.2 Les anticoagulants

Différents médicaments sont utilisés pour prévenir la formation pathologique de caillot. Ce sont :

- Les antiagrégants plaquettaires qui agissent principalement sur la formation du clou plaquettaire (Kiefer and Becker, 2009).
- Les anticoagulants proprement dits parmi lesquels on distingue deux grands groupes : les héparines et les antivitamines K (Wardrop and Keeling, 2008). Les héparines non fractionnées et de faible poids moléculaire agissent directement au niveau du plasma en augmentant l'activité antiprotéasique de l'ATIII pour les FXa et/ou FIIa. Les antivitamines K de type coumarinique inhibent la synthèse hépatique de la forme active des facteurs II, VII, IX et X.
- D'autres molécules comme les dérivés de l'hirudine peuvent également être utilisés pour inhiber la thrombine (Greinacher and Warkentin, 2008).



**Figure 1. Cascades de la coagulation.** Où KHPM = kininogène de haut poids moléculaire, KK = kallibréine plasmatique et pKK = prékallibréine

## 2. Héparine et molécules apparentées

### 2.1 L'héparine

#### 2.1.1 Origine

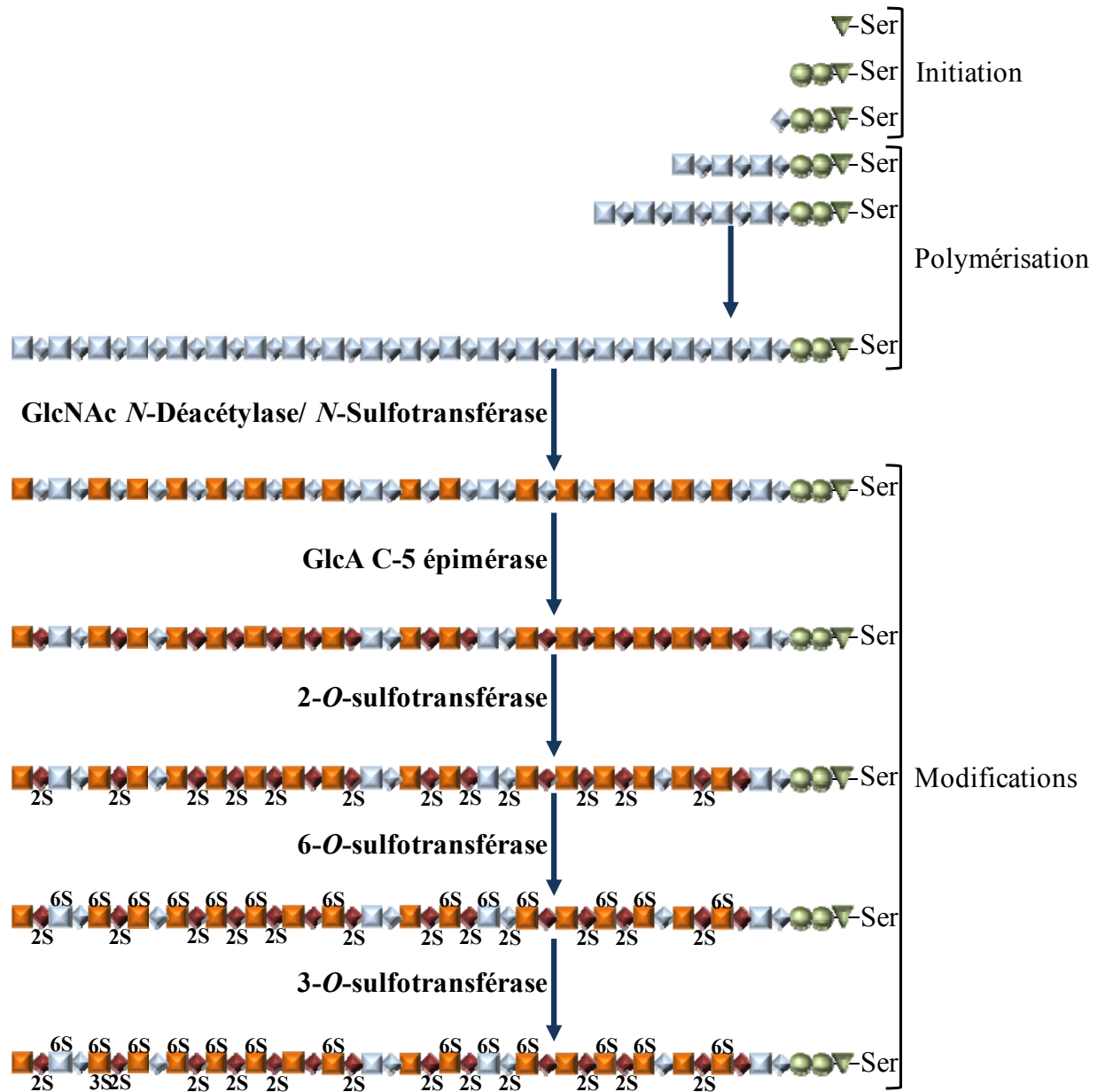
En 1916, Jay Mclean, un étudiant en deuxième année de médecine à l'Université John Hopkins de Baltimore, isolait une fraction protéinique à partir du foie de chien qui a la capacité d'inhiber la coagulation sanguine (McLean, 1916, McLean, 1959, Roden, 1989, Liu *et al.*, 2009). Deux ans plus tard, cette fraction fut nommée « héparine », du grec « hepar » qui signifie le foie (Howell and Holt, 1918, Wardrop and Keeling, 2008). Dans les années 1920, plusieurs compagnies pharmaceutiques se sont attaquées à la production industrielle de l'héparine à des fins d'utilisation clinique, sans grand succès cependant, à cause du degré d'impureté des préparations obtenues. En 1933, Charles Best, le futur prix Nobel torontois, publie un protocole de purification efficace de l'héparine à partir du poumon de bœuf. L'héparine ainsi purifiée fut utilisée avec succès pour la première fois en clinique humaine au cours d'une chirurgie réalisée par le Dr. Gordon Murray en 1938 (Murray and Best, 1938, Linhardt, 2003). Pendant plusieurs décennies, l'héparine fut isolée à partir de la muqueuse intestinale et du poumon de porc et de bœuf. Cependant, l'apparition de l'encéphalopathie spongiforme bovine (également appelé « maladie de la vache folle ») en 1986 a amené les agences sanitaires à autoriser uniquement l'utilisation de la muqueuse intestinale porcine pour la production de l'héparine (Levieux and Levieux, 2001).

L'héparine endogène est une molécule qui fait partie de la famille des protéoglycans. Les protéoglycans sont formés d'un corps protéique auquel sont attachées des chaînes de glycosaminoglycans (GAG). Les GAG sont des complexes structurels sulfatés et linéaires composés d'une alternance d'unité disaccharidique comprenant un uronate (acide D-glucuronique (GlcA) ou acide L-iduronique (IdoA)) et un hexosamine (glucosamine ou galactosamine) (Kimata *et al.*, 1973). La synthèse des GAG ne suit pas un modèle précis, il existe une hétérogénéité dans la longueur des chaînes et dans leur niveau de sulfatation. L'héparine est présente de manière constitutive dans les granules des mastocytes, un type



cellulaire retrouvé dans les tissus conjonctifs des organes exposés régulièrement aux microorganismes tels que : le foie, le poumon et l'intestin (Nader and Dietrich, 1989, Warda *et al.*, 2003).

Le corps protéique de l'héparine endogène est synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique et est essentiellement composé de la répétition du dipeptide sérine-glycine (Robinson *et al.*, 1978). Lors de son transit dans le Golgi, la polymérisation de la chaîne polysaccharidique est initiée par l'addition successive d'un xylose, de deux galactoses et d'un GlcA sur les résidus sérines du corps polypeptidique (**Figure 2.**). L'addition de ce tétrasaccharide est suivie par la synthèse d'un copolymère constitué d'une répétition de GlcA et de *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) (Esko and Selleck, 2002). Différentes modifications sont ensuite opérées sur cette molécule via l'action successive des *N*-déacétylase/*N*-sulfotransférase, de la C-5 épimérase et des 2-, 6-, et 3-*O*-sulfotransférases. Le GAG résultant de ces modifications, hautement sulfaté et riche en IdoA, est l'héparine (Toida *et al.*, 1997, Casu, 1985). À ce jour, la fonction physiologique de l'héparine endogène n'est pas connue, par contre des évidences expérimentales tentent à montrer que cette dernière ne serait pas impliquée dans le processus de la coagulation (Enerbäck, 1989, Linhardt, 2003).



**Figure 2. Biosynthèse de l'héparine.** (▼) Xylose; (●) galactose; (◆) GlcA; (■) GlcNAc; (◆) IdoA; (■) GlcN2S; (S) Sulfate (Figure adaptée de (Linhardt, 2003)).

L'héparine utilisée en clinique est préparée commercialement et est dépourvue de corps protéique. Elle est employée par voie sous-cutanée, intraveineuse, en bolus ou en perfusion. Encore aujourd'hui, c'est l'un des anticoagulants les plus utilisés lors de chirurgie cardiaque, au cours des séances d'hémodialyses et dans le traitement des thromboses (Liu *et al.*, 2009). Selon l'*Immuno Diffusion Biotechnologies*, la consommation annuelle mondiale de cet anticoagulant est évaluée à plus de 500 millions de doses, ce qui correspond à 100 tonnes d'héparine. Étant les plus grands producteurs de porcs au niveau planétaire (voir **Tableau 1.**), la Chine produit plus de 50 % de l'héparine utilisée en clinique (Chatellier, 2009). Il faut savoir que la muqueuse intestinale d'un porc permet l'obtention d'environ 300 mg de ce GAG.

**Tableau 1.** Les 10 plus grands producteurs de porcs au niveau mondial en 2007 (Tableau adapté de (Chatellier, 2009))

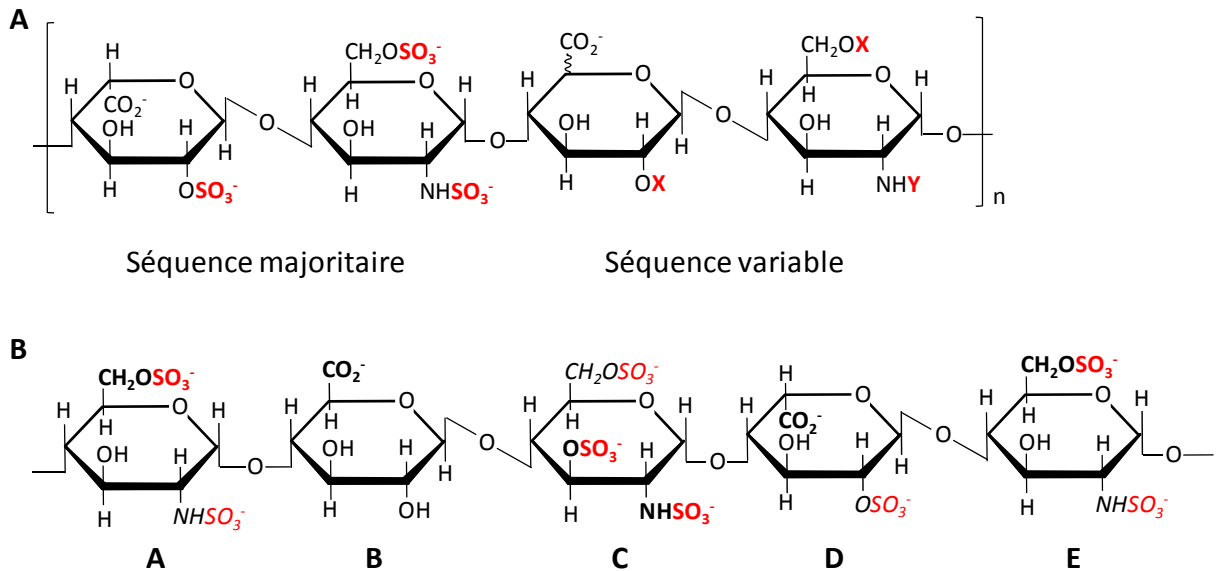
| <b>Pays</b>             | <b>Production en 2007<br/>(millions de tonnes)</b> |
|-------------------------|--|
| <b>Chine</b>            | 47,000   |
| <b>Union Européenne</b> | 22,040   |
| <b>États-Unis</b>       | 9,960  |
| <b>Brésil</b>           | 2,980  |
| <b>Russie</b>           | 1,880  |
| <b>Canada</b>           | 1,850  |
| <b>Japon</b>            | 1,260  |
| <b>Mexique</b>          | 1,200  |
| <b>Philippines</b>      | 1,245  |
| <b>Corée du Sud</b>     | 1,065  |

### 2.1.2 Définition

Deux types d'héparine sont utilisés en clinique humaine, l'une non fractionnée dite aussi de haut poids moléculaire, l'autre fractionnée ou de bas poids moléculaire.

L'héparine non fractionnée est un mélange hétérogène de chaînes disaccharidiques de différente longueur dont la masse moléculaire varie entre 5 et 40 kDa, ce qui correspond à une masse moléculaire moyenne de 12 kDa. Les chaînes sont majoritairement composées d'unités disaccharides trisulfatées (environ 80 % de la molécule), l'acide 2-*O*-sulfo- $\alpha$ -L-iduronique lié par une liaison [1→4] à la 6-*O*-sulfo-*N*-sulfo- $\alpha$ -D-glucosamine (Linhardt *et al.*, 1988). Le pourcentage restant, soit quelque 20 % de la molécule, est composé d'unités disaccharides ayant une quantité variable de groupements sulfates (**Figure 3.A**) (Linhardt *et al.*, 1990b, Pervin *et al.*, 1995). En raison de ses séquences variables, l'héparine a un niveau de sulfatation moyen correspondant à 2,5 résidus sulfates par unité disaccharide. Cette sulfatation importante et la présence de groupes carboxyles confèrent à l'héparine une densité de charge de -3,7 par unité disaccharide. Les interactions électrostatiques des ponts hydrogènes créés entre les groupements sulfates et carboxyle de l'héparine et les acides aminés basiques des protéines sont responsables de ses fonctions biologiques (Olson *et al.*, 1992, Jin *et al.*, 1997).

Outre cette héparine de haut poids moléculaire, il existe des héparines de bas poids moléculaire (HBPM). Plusieurs types d'HBPM sont commercialisés et ont une masse moléculaire moyenne variant entre 4 et 7 kDa. Elles sont obtenues par dépolymérisation chimique (acide nitrique) ou enzymatique (héparinase) de l'héparine non fractionnée (Fareed *et al.*, 1998, Linhardt *et al.*, 1990a). Les HBPM ont des propriétés chimiques et physiques comparables à l'héparine non fractionnée, mais différent par certaines de leurs caractéristiques structurales et biochimiques (Linhardt *et al.*, 1990a, Fareed *et al.*, 1998).



**Figure 3. Structure de l'héparine :** **A.** Séquence répétitive majoritaire composée d'un disaccharide trisulfaté (80% de la molécule) attaché à une séquence ayant une quantité variable de résidus sulfate (20 % de la molécule, X =  $\text{SO}_3^-$  ou H, Y =  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$  ou H). **B.** Pentasaccharide représentant le site de liaison de l'héparine à l'ATIII. Les groupements anioniques en gras sont essentiels à la liaison (si enlevé, 95% de perte d'affinité) et ceux en italique sont importants (25 à 50% de perte d'affinité si enlevée). (Figure adapté de ((Linhardt, 2003)))

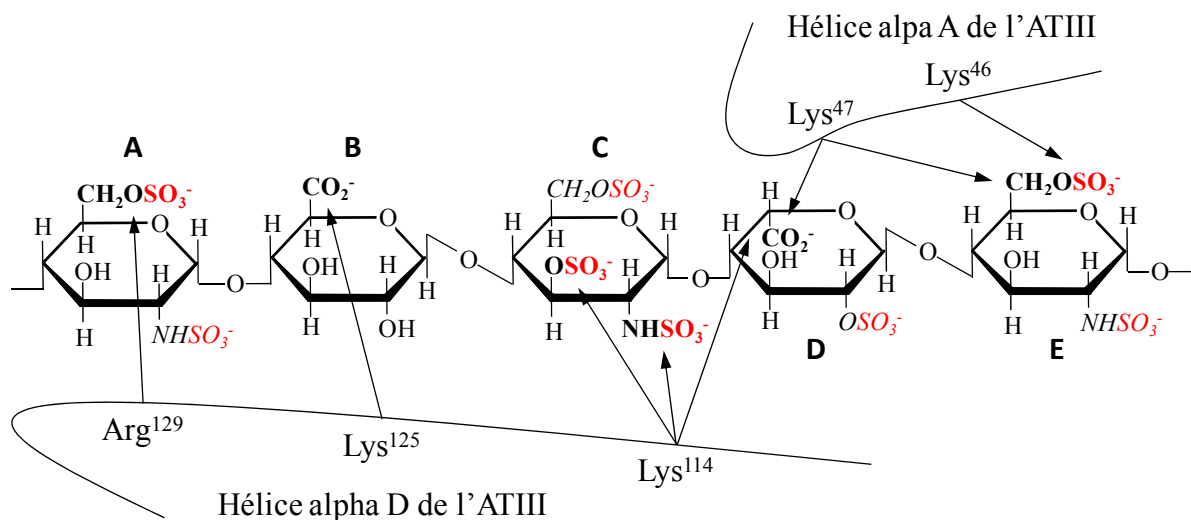
### 2.1.3 Propriétés

L'activité anticoagulante de l'héparine est médiée par sa capacité à créer des interactions électrostatiques telles que des ponts hydrogènes avec les acides aminés basiques de certaines protéines dont : l'ATIII, la thrombine et l'HCII (Capila and Linhardt, 2002, Casu, 1985, Munoz and Linhardt, 2004).

L'ATIII est considérée comme le principal acteur lors d'un traitement à l'héparine. Près du tiers de la molécule d'héparine est composée d'un pentasaccharide de structure unique formant un site de liaison hautement spécifique à l'ATIII (**Figure 3.B**) (Lindahl *et al.*, 1980, Roden, 1989). Les liaisons hydrogène reliant l'héparine à l'ATIII s'effectuent en deux étapes (**figure 4.**). L'Arg<sup>129</sup>, la Lys<sup>125</sup> et la Lys<sup>114</sup> de

l'hélice alpha D de l'ATIII lie les saccharides A, B et C du pentasaccharide de l'héparine provoquant un changement de conformation de l'ATIII (Petitou *et al.*, 1997, Desai *et al.*, 1998). Ce changement conformationnel cause le rapprochement de l'hélice alpha A de l'ATIII et permet de renforcer l'interaction héparine-ATIII par la liaison des acides aminés Arg<sup>47</sup> et Arg<sup>46</sup> avec les saccharides D et E du pentasaccharide de l'héparine (Jin *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 2009). La liaison de l'ATIII à l'héparine potentialise son activité inhibitrice vis-à-vis de la thrombine et du FXa. La haute densité de charge négative de l'héparine lui permet d'interagir de manière non spécifique avec la thrombine. Sur les chaînes d'héparine non fractionnée suffisamment longue, il y a formation d'un complexe héparine-ATIII-thrombine qui accélère l'inhibition de la thrombine par l'ATIII (Liu *et al.*, 2009). L'HBPM ainsi que les chaînes polysaccharidiques courtes de l'héparine non fractionnée ne sont pas assez longues pour accommoder la liaison de la thrombine (Barrowcliffe, 1995). Dans ce cas, la neutralisation de la coagulation par l'ATIII passe majoritairement par l'inhibition du FXa.

L'héparine non fractionnée et l'HBPM potentialisent également l'activité inhibitrice de l'HCII, un inhibiteur spécifique de la thrombine (Pike *et al.*, 2005). Lorsque lié à l'héparine, l'HCII subit un changement conformationnel qui augmente son affinité pour la thrombine (Van Deerlin and Tollefsen, 1991). L'HCII interagit avec les zones de l'héparine ayant une densité de charge électro-négative élevée, leur liaison est donc beaucoup moins spécifique que celle reliant l'héparine à l'ATIII.



**Figure 4. Représentation de la liaison entre l'ATIII et l'héparine.** L'Arg<sup>129</sup>, la Lys<sup>125</sup> ainsi que la Lys<sup>114</sup> de l'hélice alpha D de l'ATIII se lient aux saccharides A, B et C du pentasaccharide de l'héparine. Le changement de conformation de l'ATIII provoque le rapprochement de son hélice alpha A et l'interaction entre la Lys<sup>47</sup> et la Lys<sup>46</sup> et les saccharides D et E du pentasaccharide de l'héparine (figure adaptée de (Petitou and van Boeckel, 2004)).

## 2.2 Molécules apparentées à l'héparine

### 2.2.1 L'héparane sulfate

L'héparane sulfate (HS) (masse moléculaire de 5 à 70 kDa) fait partie de la famille des GAG et possède une structure similaire à celle de l'héparine (Gallagher, 2006, Iozzo, 2001). Contrairement à la chaîne d'héparine, la chaîne d'HS est majoritairement composée de GlcA lié à du GlcNAc unis par une liaison [1→4] (Tyrell *et al.*, 1995, Munoz and Linhardt, 2004). Les groupements sulfates sont également moins nombreux que pour l'héparine et, de ce fait, la molécule d'HS possède une densité de charge négative moindre que son homologue soit un peu moins de 2 charges par unité disaccharide. Cette similitude de structure fait de l'HS un contaminant naturel des préparations d'héparine (Linhardt, 2003).

L'HS est une molécule ubiquitaire localisée à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire où elle est impliquée dans différents processus biologiques dont : l'inflammation, la différenciation, la migration et la croissance cellulaire (Tyrell *et al.*, 1995, Linhardt, 2003). L'HS peut également lier l'ATIII, mais avec moins d'affinité cependant que l'héparine.

### 2.2.2 Le chondroïtine sulfate

Le chondroïtine sulfate, également appelé chondroïtine sulfate A (CSA), est aussi un polysaccharide linéaire (**Figure 5.A**). Le CSA fait partie de la famille des GAG et est composé de GlcA et de *N*-acétyl-D-Galactosamine (GalNAc) reliés par une liaison [1→3] (Kimata *et al.*, 1973, Maruyama *et al.*, 1998). Il contient en moyenne un groupement sulfate par unité disaccharide et ce dernier est généralement situé sur le GalNAc. Les groupements disaccharides sont reliés entre eux par des liaisons [1→4] (Rodgers *et al.*, 2008).

Le CSA est localisé à la surface des cellules ainsi que dans la matrice extracellulaire et joue un rôle structural au niveau des membranes cellulaires (Yamaguchi, 2000). Malgré la similarité de structure du CSA avec l'héparine et l'héparane sulfate, ce dernier est démuné d'activité anticoagulante à cause de l'absence d'IdoA et de son faible degré de sulfatation (Sie *et al.*, 1986, Trowbridge and Gallo, 2002).

### 2.2.3 Le dermatan sulfate

Le dermatan sulfate, également appelé chondroïtine sulfate B (CSB), est un GAG extracellulaire (**Figure 5.B**). Le CSB se distingue du CSA par l'action des dermatan sulfate épimérase 1 et 2 qui provoquent la transformation partielle du GlcA en IdoA (Pacheco *et al.*, 2009, Trowbridge and Gallo, 2002). Le taux de sulfatation du CSB varie de 1 à 3 groupements sulfate par unité disaccharide.

Le CSB est synthétisé dans plusieurs tissus animaux et principalement dans les fibroblastes de la peau, les cellules de la cornée, du cartilage et des os (Day *et al.*, 1986, Fisher *et al.*, 1989, Trowbridge and Gallo, 2002). Il possède la capacité de lier et d'activer l'HCII menant ainsi à l'inhibition de la thrombine, donc de la



coagulation (Maimone and Tollefsen, 1990). Cependant, son incapacité à lier l'ATIII rend son action anticoagulante vingt fois moins efficace que celle de l'héparine. De petites quantités de CSB se retrouvent dans les préparations d'héparine brute, mais ce dernier est éliminé lors des étapes de purification (Liu *et al.*, 2009).

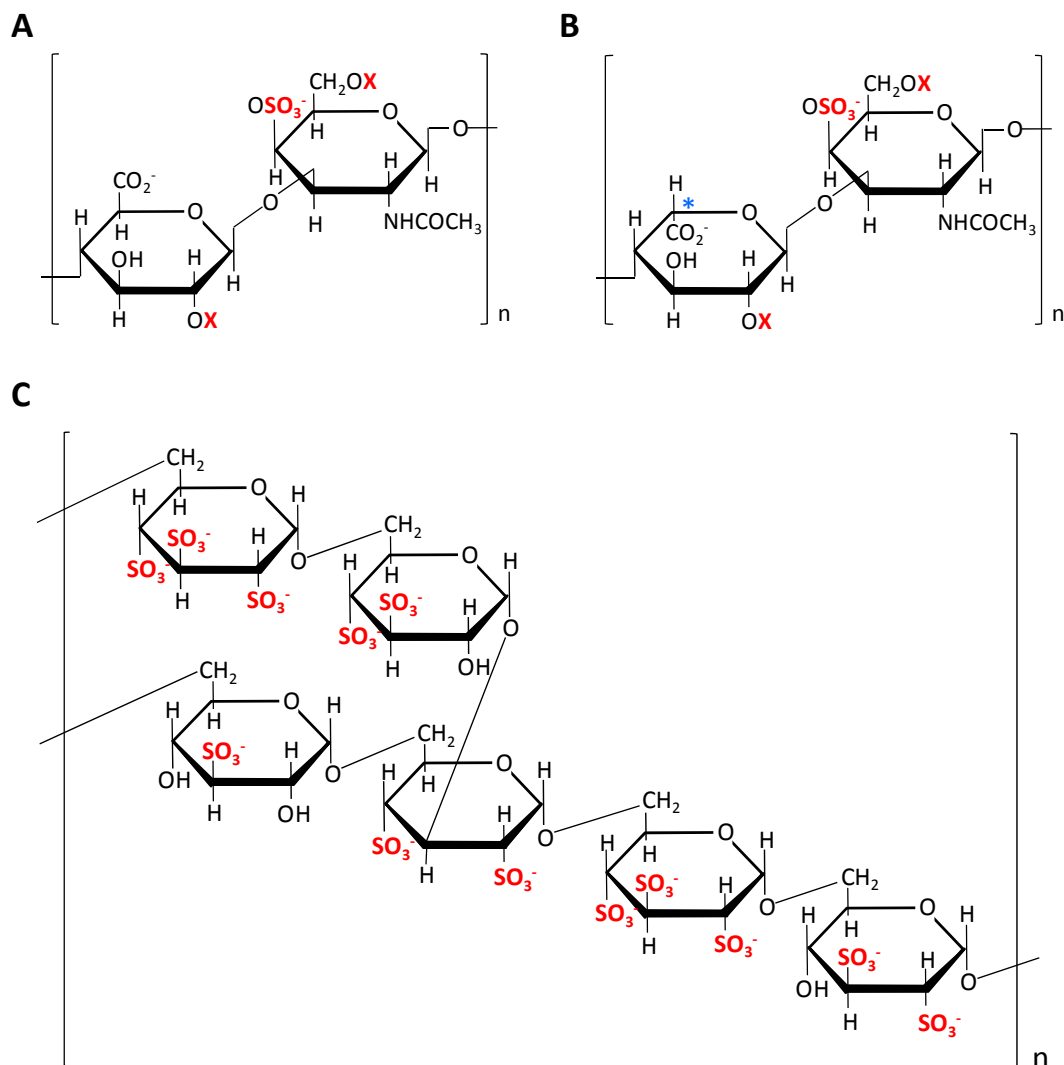
#### 2.2.4 Le sulfate de dextran

Le sulfate de dextran (SD) est une molécule semi-synthétique obtenue par sulfatation d'un polymère de glucose (**Figure 5.C**). Les monosaccharides sont liés par des liaisons [1→6] et les chaînes polyglucosées unies par des liaisons [1→3]. Il existe deux formes de SD, une de haut (environ 500 000 g/mol) et l'autre de bas poids moléculaire (de 9 000 à 20 000 g/mol) (Femia *et al.*, 2009, Banz *et al.*, 2009). Le taux de sulfatation moyen de la molécule est d'environ 2,3 groupements sulfate par molécule de glucose.

Plusieurs études ont montré les différentes propriétés biologiques du SD de bas poids moléculaire dans le plasma. *Wuillemin et collaborateurs* ont notamment démontré qu'il agirait comme un inhibiteur de la cascade du complément en potentialisant l'activité antiprotéase du C1-inhibiteur (Wuillemin *et al.*, 1997). De plus, le SD de bas poids moléculaire possède la capacité de lier le facteur H, une protéine régulatrice de la voie alterne du complément (Pangburn *et al.*, 1991). Ce dernier se comporte également comme un anticoagulant via l'ATIII mais aussi en interférant dans l'adhésion plaquettaire (Wuillemin *et al.*, 1996, Zeerleder *et al.*, 2002). Différents groupes de recherche tentent de mettre à profit ces propriétés à des fins cliniques notamment pour diminuer les dommages des cellules endothéliales causés par les facteurs du complément suite à une ischémie-réperfusion lors d'une transplantation d'organe par exemple (Banz *et al.*, 2009, Spirig *et al.*, 2008).

Le SD de haut poids moléculaire est employé à de tout autres fins. Il est utilisé *in vivo* comme un agent inflammatoire pouvant, en présence d'azoxyméthane (un agent mutagène), accélérer le développement de cancer colorectal chez la souris (Neufert *et al.*, 2007, Femia *et al.*, 2009). Lors d'expériences réalisées *in vitro*, sa

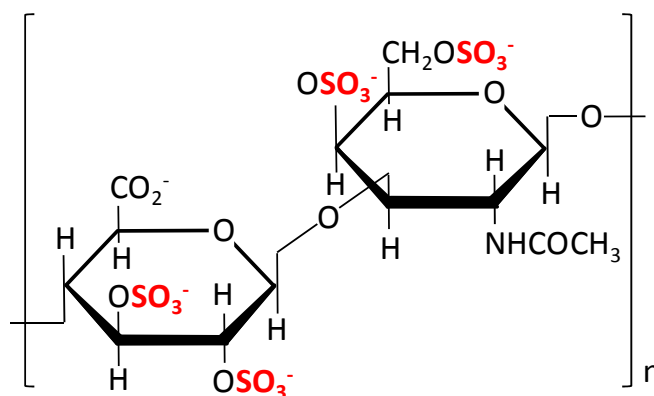
forte densité de charges électro-négatives permet aussi de l'utiliser en tant qu'activateur du système de contact du plasma (Scott and Colman, 1992).



**Figure 5. Structure des molécules apparentées à l'héparine. A.** Structure du CSA ( $X=\text{SO}_3^-$  ou H) **B.** Structure du CSB ( $X=\text{SO}_3^-$  ou H et \*peut également être un acide D-glucuronique). **C.** Structure du SD (figure adapté de (Rodgers *et al.*, 2008, SigmaAldrich, 2001))

### 3. Le chondroïtine sulfate hypersulfaté

Le chondroïtine sulfate hypersulfaté (CSHS) est une molécule semi-synthétique obtenue par la sulfatation du CSA, lui conférant ainsi 4 groupements sulfate par unité disaccharide (**Figure 6.**) (Maruyama, Toida et al. 1998). Il possède une masse moléculaire moyenne de 18 kDa ainsi qu'une densité de charges négatives de -5 par disaccharide, soit -1,3 de plus que l'héparine (Liu *et al.*, 2009). Les expériences menées par *Maruyama et collaborateurs* ont démontré que le CSHS a la capacité de diminuer l'activité de la thrombine aussi efficacement que l'HBPM. Cette diminution d'activité n'est cependant pas observée pour le FXa. Ce résultat suggère donc que le CSHS, grâce à sa densité de charge négative, serait en mesure de potentialiser l'activité inhibitrice de l'HCII aussi efficacement que l'héparine. Étant hypersulfaté, le CSHS ne possède pas le pentasaccharide de structure unique nécessaire à la liaison de l'ATIII et menant à l'inhibition du FXa. En plus du CSHS, il existe des intermédiaires de synthèse possédant 2 et 3 résidus sulfates par unité disaccharide, ces derniers ne possèdent cependant pas une assez grande densité de charges négatives pour se lier à l'HCII et potentialiser son activité anticoagulante (Maruyama *et al.*, 1998).



**Figure 6. Unité de structure du chondroïtine sulfate hypersulfaté.** (Figure adapté de (Liu *et al.*, 2009)).

## **4. Effets secondaires liés à l'héparine**

### **4.1 Les thrombocytopénies**

L'injection intraveineuse ou sous-cutanée d'héparine est souvent associée à une diminution du taux des plaquettes sanguines (Warkentin *et al.*, 1998). Il existe deux types de thrombocytopénies induites par l'héparine (TIH). La TIH de type I est une réaction bénigne (nombre de plaquettes  $> 100 \times 10^9$  cellules/L), apparaissant dans les premiers jours qui suivent le début de l'héparinothérapie (Shantsila *et al.*, 2009, Fabris *et al.*, 1983, Chong and Ismail, 1989). Le risque de développer une thrombose est faible et le nombre de plaquettes sanguines revient à la normale sans interruption du traitement. On l'observe chez 10 à 30 % des patients traités; elle serait due à une liaison directe de l'héparine aux membranes des plaquettes (Salzman *et al.*, 1980).

La TIH de type II, plus sévère que le type I, est de nature immune, médiée par des immunoglobulines G (Shantsila *et al.*, 2009). Elle apparaît généralement plus de 5 jours après le début de l'héparinothérapie et s'observe chez 2 à 3 % des patients. Dans ce cas, comme la chute du taux plaquettaire est importante (nombre de plaquettes  $< 100 \times 10^9$  cellules/L), le traitement doit être interrompu et remplacé par une autre classe d'anticoagulant (Laster *et al.*, 1989). Selon une étude multicentrique récente, chez les patients ayant développé une TIH de type II secondaire à une injection intraveineuse d'héparine, de 20 à 50 % de ces patients développeront une thrombose pouvant mener à l'amputation d'un membre, un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral si le traitement à l'héparine n'est pas interrompu (Lubenow *et al.*, 2004).

### **4.2 Les réactions anaphylactiques**

L'anaphylaxie associée à l'injection d'héparine est une réaction systémique aiguë, imprévisible et potentiellement mortelle. De nature immune, elle est médiée par les immunoglobulines E (Cohen and Zelaya-Quesada, 2002). Elle s'observe lors d'un second contact avec l'héparine et implique la dégranulation des mastocytes (Kemp and Lockey, 2002). Quelques rares cas sont rapportés dans la littérature; leur symptomatologie associe une hypotension sévère, une insuffisance respiratoire, un

épisode d'angioœdème, des douleurs abdominales, de l'urticaire, de la bradycardie et des bronchospasmes (Bottio *et al.*, 2003, Berkun *et al.*, 2004, Basic-Jukic and Kes, 2004, Smith and Harkness, 2004).

## **5. Les réactions d'hypersensibilité associées à des préparations d'héparine d'origine chinoise.**

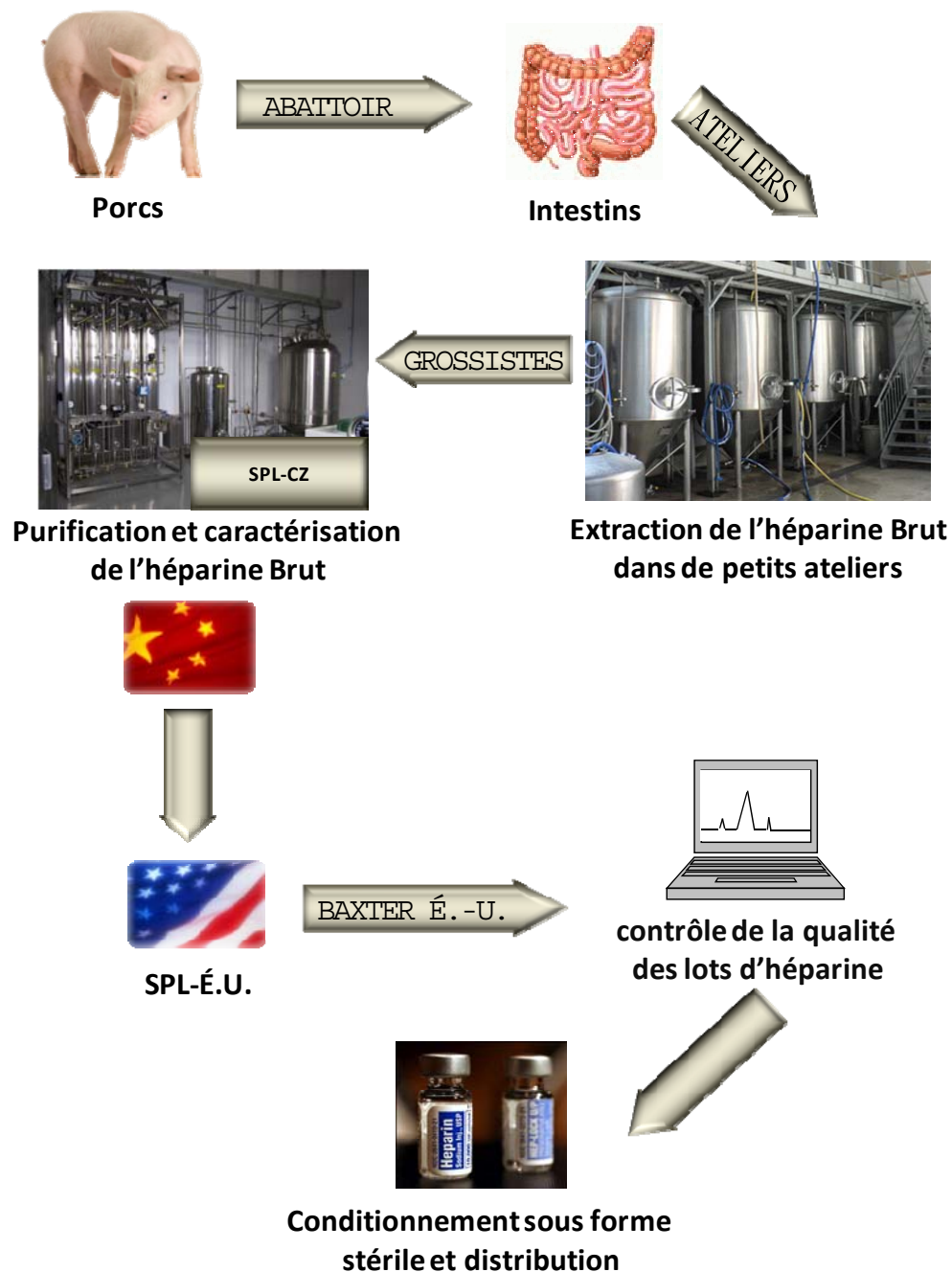
### **5.1 Les faits**

En janvier 2008, le *Center for Disease Control* (CDC), une filiale du *U.S. Department of Health & Human Services*, est averti par le Département de la Santé du Missouri que, depuis la mi-novembre 2007, huit épisodes de réactions anaphylactoïdes (RA) ont été observés au cours de séances d'hémodialyse dans un hôpital pédiatrique (CDC, 2008). L'analyse des rapports de cas révéla que, au cours de cette période, plus de 50 patients avaient développé ce type de réaction suite à l'injection intraveineuse d'héparine non fractionnée. Dans 94 % des cas, l'héparine en cause provenait de la compagnie Baxter HealthCare Corporation (Deerfield, Illinois). C'est ainsi que, le 17 janvier 2008, Baxter, le principal fournisseur d'héparine aux États-Unis, initia une campagne de rappel volontaire des formats multi doses de neuf lots d'héparine associés à ces RA (FDA, 2008). Ce rappel fut étendu de manière préventive à l'ensemble des lots d'héparine Baxter en circulation en mars 2008.

### **5.2 La production d'héparine d'origine chinoise**

Sur le million de flacons d'héparine commercialisés aux États-Unis chaque mois, plus de la moitié est distribuée par Baxter HealthCare Corporation (Levieux, 2008). Baxter ne produit cependant pas son héparine. Cette dernière est extraite de la muqueuse intestinale de porcs dans de petits ateliers situés à proximité des abattoirs chinois (**Figure 7.**) (Gorp and Schubert, 1997, Liu *et al.*, 2009). Ces ateliers fournissent ensuite des grossistes qui approvisionnent les compagnies telles que Scientific Protein Laboratories (SPL). Ainsi, la filiale de SPL basée à Changzhou (SPL-CZ), en Chine, procède à la purification et à la caractérisation physique, chimique et biochimique de l'héparine qui est ensuite transférée à la

filiale américaine de SPL basée au Wisconsin (SPL-ÉU). SPL-ÉU approvisionne ensuite Baxter qui procède à différents contrôles de qualité avant de conditionner l'héparine sous forme stérile et de la distribuer.



**Figure 7. Les étapes de la fabrication de l'héparine.** L'héparine est d'abord extraite de la muqueuse de l'intestin de porcs dans des ateliers situés à proximité des abattoirs. L'héparine brute est ensuite transportée dans les installations de la compagnie SPL-CZ où elle est caractérisée et purifiée. L'héparine brute est ensuite transférée dans les installations américaines de SPL où elle est distribuée notamment à Baxter qui procède au conditionnement sous forme stérile et à la distribution de l'anticoagulant.

### **5.3 Les investigations menées par la FDA**

#### **5.3.1 L'inspection des installations de SPL-CZ en Chine : Rapport de la FDA**

Suite au scandale des héparines contaminées, une inspection des différentes installations impliquées dans la fabrication de l'héparine fut initiée par la Food and Drug Administration (FDA) afin de déterminer la source de la contamination (Friedman, 2008). Au cours de cette enquête, quatre lacunes significatives par rapport aux bonnes pratiques de fabrication ont été décelées chez SPL-CZ.

D'abord, aucune évaluation n'était pratiquée afin de vérifier l'efficacité du processus de purification. Au cours de ce processus, plusieurs paramètres étaient non définis ou tout simplement non contrôlés. De plus, les profils des impuretés potentielles de l'héparine n'avaient jamais été établis. Les techniques de détection des impuretés ont même été jugées inadéquates par les inspecteurs de la FDA.

Ensuite, une lacune a été détectée au niveau de la traçabilité de l'héparine brute fournie par les différents grossistes. En effet, plusieurs lots ont été traités par SPL et envoyés aux États-Unis alors qu'ils provenaient d'un atelier dont les techniques d'extraction d'héparine avaient été jugées comme inacceptables par SPL.

D'autre part, les différents tests de contrôles réalisés afin de respecter les standards du *United-States Pharmacopeia* (USP) présentaient plusieurs faiblesses. Certaines méthodes analytiques utilisées, telles que la quantification des protéines, n'avaient jamais été validées dans les conditions dans lesquelles elles étaient employées.

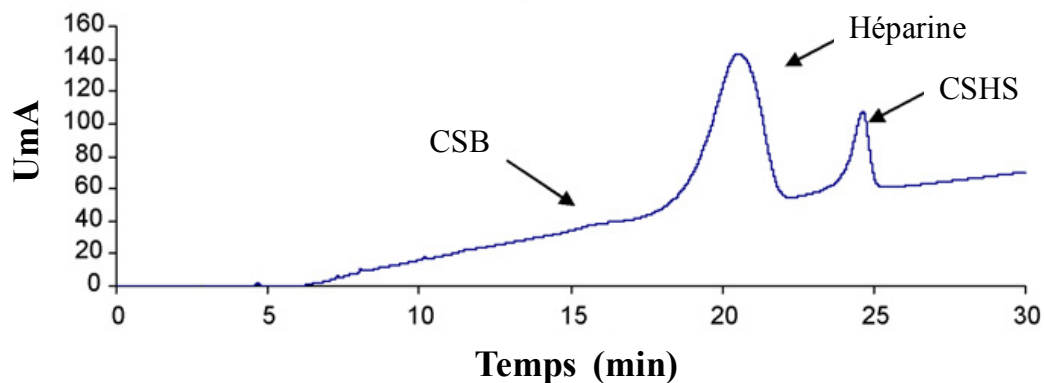
Finalement, les récipients métalliques utilisés dans les étapes finales de la purification de l'héparine n'étaient pas lavés adéquatement et présentaient des impuretés incrustées à leur surface interne.

Le manque de rigueur chez SPL-CZ face à plusieurs aspects critiques de la fabrication de l'héparine, tant au niveau du contrôle de la provenance, que de la salubrité des différentes installations ainsi que des méthodes de purification utilisées, est à l'origine de cette crise.



### 5.3.2 Analyse des lots d'héparine associée avec les RA

L'analyse des lots d'héparine associée aux RA par résonance magnétique nucléaire (RMN) à une et deux dimensions ainsi que la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) échangeuse d'anion a permis de détecter la présence d'un contaminant ayant un signal différent des impuretés généralement retrouvées dans l'héparine telles que le CSB (**figure 8.**) (Trehy *et al.*, 2009). Ces différentes analyses ont permis l'identification d'un contaminant hautement sulfaté et apparenté à l'héparine, soit le CSHS (Guerrini *et al.*, 2008). La présence de cette molécule semi-synthétique représentait jusqu'à près de 25 % de la concentration d'héparine de certains lots (FDA, 2008).

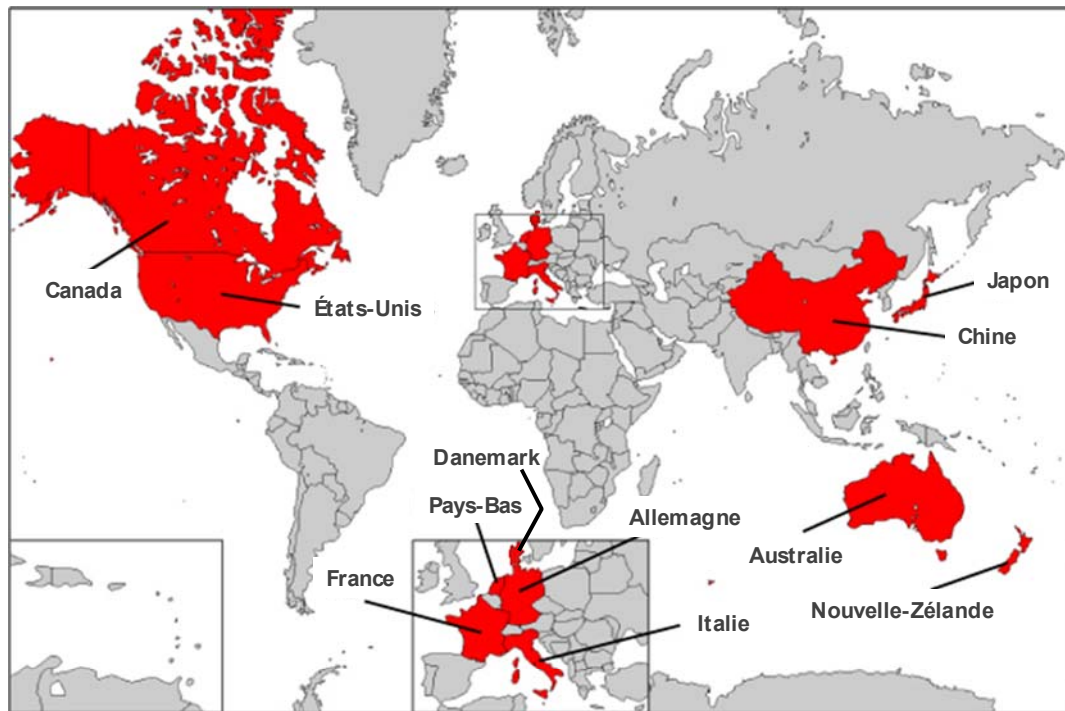


**Figure 8. Analyse de l'héparine contaminée par HPLC échangeuse d'anion.** Unité de milli-absorbance (UmA) en fonction du temps. L'ordre d'élution des différents composés est : CSB, héparine et finalement le CSHS (figure adapté de (Trehy *et al.*, 2009)).

#### 5.4 L'héparine d'origine chinoise contaminée par le CSHS : une épidémie?

Suite à l'augmentation accrue des RA en hémodialyse, une étude épidémiologique réalisée avec la participation de 44 centres de dialyse aux États-Unis fut initiée (Blossom *et al.*, 2008). Cette étude, qui recensa 159 patients ayant développé une RA, fut la première à démontrer une forte association causale (plus de 81%, dont plus du quart des patients étaient traités par un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (iECA)) entre les lots d'héparine Baxter contaminée au CSHS et l'incidence des réactions observées en hémodialyse. Cette étude ne présente cependant qu'une vision limitée de l'étendue de cette crise. Afin d'en avoir une image globale, deux facteurs sont à prendre en considération soit : le nombre limité de centre de dialyse ayant participé à l'étude et la quantité d'héparine vendue par Baxter durant la période de la crise (environ 10 millions de doses aux États-Unis). Considérant ces facteurs, l'incidence réelle des RA est très certainement plus élevée que celle ressortant de cette étude et il est donc tout à fait légitime de qualifier cette crise d'épidémie.

Conséquemment, la FDA a lancé une alerte aux agences sanitaires des différents pays afin d'évaluer l'ampleur de cette épidémie. Au total, le CSHS a été identifié dans différents lots d'héparine utilisés dans 11 pays dont : l'Allemagne, l'Australie, le Canada, la Chine, le Danemark, les États-Unis, la France, les Pays-Bas, l'Italie, le Japon et la Nouvelle-Zélande (**Figure 9.**) (FDA, 2008). Même si aucune RA n'a été rapportée en France, 13 lots, 2 provenant de Panpharma et 11 de Sanofi-Aventis, ont du être retirés du marché par *l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé* après avoir été testés positifs pour la présence du CSHS.



**Figure 9. Carte représentant les 11 pays ayant rapporté la présence de lots d'héparine d'origine chinoise contaminée.** Les pays sont : l'Allemagne, l'Australie, le Canada, la Chine, le Danemark, les États-Unis, la France, les Pays-Bas, l'Italie, le Japon et la Nouvelle-Zélande (figure adapté de (FDA, 2008)).

Pendant la période qui précéda le retrait des lots d'héparine contaminée par le CSHS, près de mille patients, dont 80 en Allemagne, ont présenté une RA associée à l'injection intraveineuse d'héparine d'origine chinoise en cours de séance d'hémodialyse, de transfusions sanguines et de chirurgie cardiaque (Liu *et al.*, 2009). La FDA rapporte, aux États-Unis seulement, plus d'une centaine de morts reliées directement à l'injection d'héparine en bolus préparée et purifiée en Chine. Les symptômes de ces RA sont : l'angioœdème localisé au niveau du visage, la tachycardie, l'hypotension sévère, la présence d'urticaire et de nausée (CDC, 2008, FDA, 2008, Blossom *et al.*, 2008). La symptomatologie de ces RA rappelle celle des RA rapportées chez des patients traités par un iECA et dialysés au moyen d'une membrane de dialyse chargée négativement. Ce même type de réaction a

aussi été décrit lors de transfusions sanguines associant la présence d'un iECA et un filtre de leucoréduction chargé négativement. Ces RA ont été attribuées aux kinines libérées lors de l'activation du système de contact par une surface chargée négativement (Moreau *et al.*, 2005).

### **5.5 Physiopathologie des RA associées à l'héparine contaminée par du CSHS**

Une seule étude publiée récemment a été consacrée aux effets biologiques et pharmacologiques du CSHS. Ces auteurs décrivent deux types de phénomènes. D'une part, ils montrent que le CSHS ou l'héparine contaminée avec ce produit de synthèse a la capacité de produire une activité amidasique mesurée au moyen d'un substrat chromogène : Pro-Phe-Arg-pNA. D'autre part, ils montrent que, injectée à un nombre limité de porcs (n=6), cette héparine contaminée a provoqué chez trois d'entre eux une réaction hypotensive passagère. Ces auteurs concluent à une activation de la phase contact par le CSHS, menant à une activation de la prékallitréine plasmatique en kallitréine, enzyme capable d'hydrolyser le KHPM et de libérer la bradykinine (BK), un puissant vasodilatateur (Kishimoto *et al.*, 2008).

Cependant, les résultats publiés ne montrent pas de façon définitive une participation des kinines dans la physiopathologie des RA observées suite à l'injection d'une héparine contaminée au CSHS chez des patients en hémodialyse. En effet, l'activation du système de contact, mesurée au moyen d'une activité amidasique, ne démontre pas un pouvoir kininogène associé à cette activation. En d'autres termes, ces auteurs ne mesurent pas la quantité de kinines libérées au cours de l'incubation *in vitro* du plasma avec le CSHS ou différents lots d'héparine contaminée. Or la quantité de kinines accumulées au cours de cette activation dépend non seulement de l'activation de ce système de contact, mais aussi du métabolisme de ces peptides vasodilatateurs. De plus, *In vivo*, la spécificité de l'effet pharmacologique (une hypotension) mesuré lors de l'injection du même matériel contaminé n'est pas vérifiée au moyen d'un antagoniste des récepteurs B2 et/ou B1 (Kishimoto *et al.*, 2008).

## **6. Les RA en hémodialyse**

### **6.1 Définition**

Les RA, également appelés réactions d'hypersensibilité, apparaissent généralement dans les minutes qui suivent le branchement du patient au dialyseur et l'intensité des réactions varie de légère à modérée, mais dans certains cas, ces dernières peuvent être mortelles (Verresen *et al.*, 1990). Elles sont caractérisées par la manifestation d'au moins deux des signes cliniques suivant : des douleurs abdominales, des nausées, des vomissements, de la diarrhée, une dyspnée, une oppression thoracique, de l'angioœdème, une hypotension sévère, de la bradycardie ou un érythème facial (Daugirdas and Ing, 1988, Bright *et al.*, 1999)

Les RA sont des réactions rarement observées en hémodialyse. Initialement, elles étaient associées à l'utilisation de membranes de dialyse cellulosique en présence d'un dialysat non stérilisé contaminé par des bactéries (Lonnemann, 2000, Nube and Grooteman, 2001). Suite à l'apparition des membranes synthétiques, un nombre accru de ces réactions indésirables a été rapporté et elles furent interprétées comme un problème de bio-incompatibilité avec les lignes et membranes du circuit extracorporel (Chanard, 2008). Cependant, il est vite apparu que la nature du polymère composant la membrane d'hémodialyse, notamment les membranes en polyacrylonitrile fortement électronégatives telles que l'AN69<sup>TM</sup>, pouvait être à l'origine de ces réactions (Verresen *et al.*, 1990, Schaefer *et al.*, 1994). Plusieurs études multicentrées ont montré une association causale entre les RA chez les patients dialysés avec de telles membranes et simultanément traités au moyen d'un iECA (Verresen *et al.*, 1991, Lacour and Maheut, 1992, Simon *et al.*, 1996).

### **6.2 Mécanismes physiopathologiques**

Malgré la similitude de la symptomatologie entre la réaction anaphylactique et la RA, les mécanismes physiopathologiques de l'une et de l'autre sont bien différents (Chanard, 2008). En effet, contrairement à la réaction anaphylactique, la réaction anaphylactoïde n'implique pas la dégranulation des mastocytes par les immunoglobulines E, ne nécessite aucun contact préalable avec l'agent causal et

n'implique pas la libération de l'histamine. Les RA contrairement aux réactions anaphylactiques ne sont donc pas de nature immune.

Différents auteurs ont tôt émis l'hypothèse que le système de contact serait activé par un facteur physicochimique (les membranes de dialyse électronégatives) entraînant la libération des kinines, en particulier la BK, et que cette dernière pourrait être l'agent causal de ces RA (Schaefer *et al.*, 1994, Verresen *et al.*, 1994, Blais *et al.*, 1999a, Cyr *et al.*, 1999). Des expériences réalisées *in vivo* sur des moutons ont montré que l'intensité des RA était dose dépendante de la concentration d'iECA. De plus, l'utilisation d'un antagoniste du récepteur B2 (Icatibant) chez ces mêmes moutons inhibait totalement l'incidence de ces réactions, et ce, même si les concentrations sanguines de BK étaient élevées (Van der Niepen and Verbeelen, 1995, Krieter *et al.*, 1998).

## 7. Le système des kinines

### 7.1 Les kinines : définition et propriétés

La BK est le prototype de la famille des kinines qui, chez l'Homme, renferme trois autres peptides pharmacologiquement actifs. Il s'agit de : la Lys-BK ou kallidine (KD) et les métabolites actifs dépourvus de l'arginine en position carboxy-terminal, la des-arginine<sup>9</sup>-bradykinine (des-Arg<sup>9</sup>-BK) et la des-arginine<sup>10</sup>-kallidine (des-Arg<sup>10</sup>-KD) (voir **Tableau 2.**). D'autres kinines ont également été identifiées et caractérisées comme la T-kinine (Ile-Ser-BK) et la Met-T-kinine, ces dernières sont cependant propres au rat (Okamoto and Greenbaum, 1983, Sakamoto *et al.*, 1987).

Les kinines sont des peptides générés par les kininogénases à partir de leurs précurseurs respectifs. Elles participent dans plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques (Bhoola *et al.*, 1992). Elles sont parmi les premiers médiateurs générés lors de la lésion d'un tissu et sont responsables de la douleur et de l'inflammation. Cette caractéristique provient de leur capacité à activer les cellules endothéliales, menant ainsi à la production de monoxyde d'azote (NO) et à la mobilisation de l'acide arachidonique, deux facteurs responsables de la vasodilatation accrue et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Kaplan *et al.*, 2002).

**Tableau 2.** Séquence peptidique des différentes kinines retrouvées chez l'Homme.

| Les kinines                            | Séquence peptidique |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                                      |
|--|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------------|
| <b>Bradykinine</b>                     | Arg <sup>1</sup> -  | Pro <sup>2</sup> - | Pro <sup>3</sup> - | Gly <sup>4</sup> - | Phe <sup>5</sup> - | Ser <sup>6</sup> - | Pro <sup>7</sup> - | Phe <sup>8</sup> - | Arg <sup>9</sup>                     |
| <b>Des-Arg<sup>9</sup>-bradykinine</b> | Arg <sup>1</sup> -  | Pro <sup>2</sup> - | Pro <sup>3</sup> - | Gly <sup>4</sup> - | Phe <sup>5</sup> - | Ser <sup>6</sup> - | Pro <sup>7</sup> - | Phe <sup>8</sup> - |                                      |
| <b>Kallidine</b>                       | Lys <sup>1</sup> -  | Arg <sup>2</sup> - | Pro <sup>3</sup> - | Pro <sup>4</sup> - | Gly <sup>5</sup> - | Phe <sup>6</sup> - | Ser <sup>7</sup> - | Pro <sup>8</sup> - | Phe <sup>9</sup> - Arg <sup>10</sup> |
| <b>Des-Arg<sup>10</sup>-kallidine</b>  | Lys <sup>1</sup> -  | Arg <sup>2</sup> - | Pro <sup>3</sup> - | Pro <sup>4</sup> - | Gly <sup>5</sup> - | Phe <sup>6</sup> - | Ser <sup>7</sup> - | Pro <sup>8</sup> - | Phe <sup>9</sup> -                   |

## 7.2 Les précurseurs des kinines

Les kinines ne sont pas des peptides préformés. Elles sont libérées localement à partir de leurs précurseurs, les kininogènes, soumis à la protéolyse par des kininogénases. Deux formes de kininogènes sont présentes dans le plasma humain : le KHPM et le kininogène de bas poids moléculaire (KBPM) (Müller-Esterl *et al.*, 1986). Le foie est le principal organe responsable de la synthèse de ces deux glycoprotéines. Le KHPM et le KBPM proviennent de l'épissage alternatif d'un seul gène composé de 11 exons situé au locus 3q26 du chromosome 3 (Takagaki *et al.*, 1985, Kitamura *et al.*, 1985). Les neuf premiers exons codent pour la chaîne lourde commune aux deux types de kininogène, le dixième pour la séquence kininomatrice et la chaîne légère du KHPM différente de la chaîne légère du KBPM.

Le KHPM est une  $\alpha$ -globuline de 88 à 120 kDa circulant dans le plasma à des concentrations de 70 à 90  $\mu\text{g/ml}$  (Adam *et al.*, 1985). Cette protéine multifonctionnelle comprend six domaines ayant chacun une fonction distincte. Les domaines 1 à 3 forment la chaîne lourde (amino-terminal/64 kDa) alors que les domaines 5 et 6 se retrouvent sur la chaîne légère (carboxy-terminal/56 kDa) (Kellermann *et al.*, 1986). Le domaine 4 est la zone où se trouve la séquence kininomatrice et elle fait la liaison entre la chaîne lourde et légère. Le domaine 1 contient un site de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  (Higashiyama *et al.*, 1987), tandis que les domaines 2 et 3 sont doués d'une activité inhibitrice pour les protéases à cystéine (Salvesen *et al.*, 1986, Vogel *et al.*, 1988). De plus, le domaine 3 possède un site de liaison aux plaquettes et aux cellules endothéliales (Jiang *et al.*, 1992). Les deux domaines de la chaîne légère du KHPM sont responsables de l'activité procoagulante de ce kininogène (DeLa Cadena and Colman, 1991). Le domaine 5, riche en acides aminés basiques (lysine et histidine), a la capacité de se lier aux surfaces chargées négativement telles que les membranes de dialyse synthétiques en polyacrylonitrile, les billes de verres, le SD, mais aussi l'héparine (Mandle *et al.*, 1976, Lin *et al.*, 2000). Le domaine 6 possède un site de liaison pour la prékallitréine plasmatique et le FXI de la coagulation (Thompson *et al.*, 1977, Tait and Fujikawa, 1987). Grâce à sa capacité à lier les surfaces électro-négatives



(domaine 5) et la prékallicréine (domaine 6), le KHPM exerce une fonction essentielle lors de l'activation du système de contact (Silverberg *et al.*, 1980).

Le KBPM est une  $\beta$ -globuline présente dans le plasma à des concentrations de 170 à 220  $\mu\text{g/ml}$  et a une masse moléculaire variant de 50 à 68 kDa (Müller-Esterl *et al.*, 1986, Adam *et al.*, 1985). Il possède les mêmes caractéristiques structurales de base que le KHPM soit : une chaîne lourde attachée à une chaîne légère via le segment contenant la séquence des kinines. Cependant, la chaîne légère a une masse moléculaire n'excédant pas 5 kDa et il ne possède pas de domaine 6. Encore aujourd'hui, la fonction du domaine 5 du KBPM reste inconnue.

### 7.3 Les systèmes kininogénétiques

#### 7.3.1 Les enzymes kininogénétiques

##### 7.3.1.1 Les kallicréines

Les kallicréines sont divisées en deux groupes distincts : la kallicréine plasmatique (KK) et la kallicréine tissulaire (Fiedler, 1979, Movat, 1979).

La KK est une sérine protéase. Elle est sécrétée majoritairement par les hépatocytes sous forme inactive, la prékallicréine, encodée par le gène *KLKB1* situé dans la région q34-q35 du chromosome 4 (Beaubien *et al.*, 1991); elle circule dans le plasma à des concentrations de 35 à 50  $\mu\text{g/ml}$  (Reddigari and Kaplan, 1989). Près de 80 à 90 % de la prékallicréine est complexée sous forme d'hétérodimère avec le KHPM (Mandle *et al.*, 1976, Bhoola *et al.*, 1992). La KK est formée lors du clivage de la liaison Arg<sup>371</sup>-Ile<sup>372</sup> de la prékallicréine par le FXIIa de la coagulation. Cette activation a pour conséquence la formation d'une enzyme à deux sous-unités composée d'une chaîne lourde amino-terminal de 55 kDa liée par un pont disulfure à une chaîne légère carboxy-terminal de 36 kDa (Chung *et al.*, 1986). La chaîne légère renferme le site actif de l'enzyme. Une fois activée, la KK hydrolyse le KHPM pour en libérer la BK. Différentes antiprotéases possèdent la capacité d'inhiber l'activité protéolytique de la KK; la principale étant le C1 inhibiteur dont le déficit génère une anomalie au niveau du contrôle du système de contact responsable de l'angioœdème héréditaire (Agostoni *et al.*, 2004, Meijers *et al.*, 1988)

La kallibréine tissulaire est une glycoprotéine de 25 à 45 kDa qui, tout comme la KK, est synthétisée sous forme de proenzyme (Kaplan *et al.*, 1998, Bhoola *et al.*, 1992). Elle est codée par le gène KLK1 situé au locus q13.1-q13.2 du chromosome 19 (Clements *et al.*, 2001, Mahabeer and Bhoola, 2000). La kallibréine tissulaire est exprimée dans plusieurs tissus dont : les glandes salivaires, le pancréas, la prostate, les polynucléaires neutrophiles et la glande surrénale (Margolius, 1998). Plusieurs protéinases ont la capacité d'activer la prékallibréine tissulaire *in vitro*, cependant, la protéinase responsable de son activation *in vivo* reste à être identifiée (Takada *et al.*, 1985, Takahashi *et al.*, 1986, Margolius, 1996). Lorsqu'elle est activée, elle hydrolyse le KBPM afin d'en libérer la KD (Mahabeer and Bhoola, 2000, Fogaca *et al.*, 2004).

### 7.3.1.2 Autres enzymes

En plus des deux formes de kallibréine décrites précédemment, d'autres protéases ont la capacité de libérer les kinines des kininogènes (Dobrovolsky and Titaeva, 2002). C'est le cas entre autres de la plasmine, une enzyme protéolytique responsable de la lyse du caillot de fibrine (Norris, 2003, Molinaro *et al.*, 2002b).

### 7.3.2 La kininogénèse plasmatique

La formation des kinines dans le plasma requiert la transformation de proenzymes à sérine en enzymes actives lors de l'activation du système de contact du plasma.

Deux enzymes et un cofacteur sont essentiels à la kininoformation soit : le FXII, la prékallibréine et le KHPM. Le FXII, lorsque lié à une surface chargée négativement, subit un changement conformationnel lui procurant une activité enzymatique suffisante à son autoactivation en FXIIa (Kaplan *et al.*, 1997). Le FXIIa transforme la prékallibréine en sa forme active, la KK. Une fois activée, la KK active le FXII amplifiant ainsi le signal initial. La grande quantité de KK générée par cette boucle d'activation hydrolyse les liaisons Lys<sup>362</sup>-Arg<sup>363</sup> et Arg<sup>371</sup>-Ser<sup>372</sup> du KHPM libérant ainsi la BK (Mori *et al.*, 1981). Ce mécanisme est la base des observations réalisées *ex vivo* et *in vitro* sur la libération des kinines lors de la circulation sanguine extracorporelle ou lors du contact du plasma avec

une surface chargée négativement telle que les billes de verres ou le SD (Kaplan *et al.*, 1997, Kaplan *et al.*, 1998, Kaplan *et al.*, 2001, Joseph *et al.*, 2001).

Un second mécanisme a également été décrit pour l'activation plasmatique du système kallicroïnes-kinines *in vitro*. Celui-ci dépend de l'adhésion  $Zn^{2+}$ -dépendante du KHPM à un complexe multimérique - composé de cytokératine 1, du récepteur gC1qR et du récepteur de l'activateur du plasminogène - situé à la surface membranaire des cellules endothéliales (Hasan *et al.*, 1998, Shariat-Madar *et al.*, 1999, Herwald *et al.*, 1996, Joseph *et al.*, 1996, Colman *et al.*, 1997, Schmaier, 2000). Cette liaison mène à l'activation de la prékallikréine en KK, donc à la libération de la BK du KHPM (Lin *et al.*, 2000, Motta *et al.*, 1998, Nishikawa *et al.*, 1992, Zhao *et al.*, 2001).

## 7.4 Les récepteurs des kinines

### 7.4.1 Définition et propriétés

L'action des kinines est médiée par des récepteurs à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G hautement spécifiques (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

À la fin des années 1970, différents groupes de recherche ont montré au moyen d'arguments pharmacologiques la présence de deux types de récepteurs pour les kinines : les récepteurs B1 (RB1) et B2 (RB2) (Regoli *et al.*, 1977, Regoli *et al.*, 1978, Drouin *et al.*, 1979). Ces récepteurs ont été mis en évidence à la surface de différents types cellulaires, parmi ceux-ci: les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules mésangiales, certains neurones, les astrocytes et les polynucléaires neutrophiles, entre autres (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005, Marceau, 1995). Plusieurs études ont montré que le RB2 est préférentiellement stimulé par les kinines dites « natives » telles que la BK et la KD qui possèdent un résidu Arg en partie carboxy-terminal. Le RB1, par contre, est activé par leurs métabolites actifs, la des-Arg<sup>9</sup>-BK ainsi que la des-Arg<sup>10</sup>-KD (Vavrek and Stewart, 1985, Regoli and Barabe, 1980, Marceau, 1995).

Les gènes codant pour les récepteurs B1 et B2 (*BDKRB1* et *BDKRB2* respectivement) sont tous deux localisés sur le chromosome 14, séparés par une séquence nucléotidique de 12 kilobases (Cayla *et al.*, 2002). Le RB1 et le RB2, constitués de 353 et 391 acides aminés respectivement, présentent une homologie de séquence de 35% chez l'Homme (Gutowski *et al.*, 1991). Ils possèdent tous deux une structure typique des récepteurs couplés aux protéines G consistant en une chaîne polypeptidique à sept passages transmembranaires avec la partie amino-terminal extracellulaire et carboxy-terminal intracellulaire.

L'activation du RB2 est à l'origine des symptômes observés lors de la phase aiguë de la douleur et de l'inflammation (Couture *et al.*, 2001, Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Comme ce type de récepteur est constitutif à la plupart des cellules et des tissus, la réponse à son activation est donc puissante, mais de courte durée. Suite à une stimulation, le RB2 subit une désensibilisation via une séquestration de son ligand et une internalisation (Munoz and Leeb-Lundberg, 1992, Munoz *et al.*, 1993, Mathis *et al.*, 1996, Marceau *et al.*, 2001). De plus, lors d'une stimulation prolongée, l'expression génomique du récepteur est inhibée.

Contrairement au RB2, le RB1 est inductible et ne subit aucune désensibilisation (Mathis *et al.*, 1996, Austin *et al.*, 1997). Ce type de récepteur est très peu exprimé en temps normal et est surtout associé à des événements pathologiques chroniques. Le RB1 est induit lorsqu'il est exposé à long terme à son agoniste, la des-Arg<sup>9</sup>-BK. Étant donné son niveau d'expression, ce type de récepteur est donc impliqué dans la réponse inflammatoire et algésique chronique (Faussner *et al.*, 1999, Liesmaa *et al.*, 2005, Decarie *et al.*, 1996a, Cruwys *et al.*, 1994, Pesquero *et al.*, 2000).

#### 7.4.2 Mode d'action des récepteurs

L'induction des récepteurs par les kinines mène à l'activation de plusieurs cascades signalétiques.

Une de ces voies passe par l'activation de la sous-unité G $\alpha$  qui conduit à l'activation de la phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ), enzyme responsable de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-disphosphate (PIP<sub>2</sub>) en inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>)

et en diacylglycérol (DAG) (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). L'IP<sub>3</sub> de pair avec la sous-unité G $\alpha$  activée vont respectivement provoquer l'ouverture des canaux calciques du réticulum endoplasmique et de la membrane cellulaire déclenchant ainsi une augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. L'augmentation de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire provoque l'activation de la NO synthase (NOs). La NOs produit le NO qui mènera à la production de guanylate monophosphate cyclique (GMPc) par l'activation de la guanylate cyclase. Le DAG, de son côté, activera la cascade des « mitogen-activated protein kinases » (MAPK) par l'induction de la protéine kinase C (PKC). La voie des MAPK culmine par la phosphorylation de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Une fois phosphorylée, la PLA<sub>2</sub> interagit avec le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire afin de provoquer la production des prostaglandines, métabolites de l'acide arachidonique responsables de l'activation de l'adénylate cyclase. L'adénylate cyclase entraîne la production de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc et le GMPc sont des molécules ayant un effet vasodilatateur, antiprolifératif et antiischémique sur les cellules musculaires lisses (Regoli *et al.*, 1990).

Une étude réalisée sur des cellules endothéliales d'aorte bovine en culture a également montré que le RB2, lorsque stimulé par la BK, active la voie des « Janus kinases/signal transducers and activators of the transcription » (JAK/STAT) (Ju *et al.*, 2000). La phosphorylation de Tyk2, une tyrosine kinase de la famille des JAK, entraîne l'activation de la protéine STAT3 qui se déplace dans le noyau de la cellule afin de réguler la transcription de gènes spécifiques. La nature de ces gènes reste encore à être identifiée.

### **7.5 Le métabolisme des kinines**

Les kinines sont des peptides dont l'activité pharmacologique est largement régulée par leur métabolisme. Ainsi, cinq peptidases, au moins, ont été identifiées comme principales responsables de leur métabolisme (Erdös and Skidgel, 1997). Il y a l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA), l'aminopeptidase P (APP), l'endopeptidase neutre 24.11 (EPN) et les carboxypeptidase M et N (CPM et CPN). Ces enzymes font toutes parties de la famille des métallopeptidases à zinc,

leur activité requiert donc un cation  $Zn^{2+}$  dans leur site catalytique. Elles sont également toutes des glycoprotéines membranaires.

#### 7.5.1 L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA)

L'ECA, ou kininase II, est une carboxypeptidase membranaire  $Zn^{2+}$ -dépendante régulant l'activité des peptides vasoactifs tels que l'angiotensine I et la BK, tous deux responsables du contrôle de la pression artérielle (Turner and Hooper, 2002). Deux isoformes de l'ECA sont exprimés chez l'humain, l'ECA somatique et l'ECA germinale. Ces isoformes proviennent d'un même gène situé au locus 17q23 du chromosome 17 et utilisant un promoteur alternatif (Hubert *et al.*, 1991). L'ECA somatique, d'une masse moléculaire de 150-180 kDa, est composée de 1300 acides aminés et est présente dans plusieurs tissus dont : l'endothélium vasculaire, les cellules musculaires lisses, les myocytes et les fibroblastes cardiaques, la bordure en brosse du tubule proximal rénal, ainsi que dans le cerveau (Erdos, 1990). L'ECA germinale (100-110 kDa) est composée de 730 acides aminés et est retrouvée exclusivement dans les testicules où elle jouerait un rôle dans la fertilité (Hagaman *et al.*, 1998, Turner and Hooper, 2002).

L'ECA est la principale voie de dégradation de la BK. Elle libère séquentiellement les dipeptides Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> et Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup> en position carboxy-terminal, transformant ainsi la BK en résidu BK<sub>[1-5]</sub>. Elle est également capable d'inactiver la des-Arg<sup>9</sup>-BK en hydrolysant le tripeptide Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup>-Phe<sup>8</sup> en carboxy-terminal, ce qui produit le même métabolite inactif BK<sub>[1-5]</sub>.

En plus de la dégradation de la BK, l'ECA possède la capacité de convertir l'angiotensine I, inactive, en angiotensine II, un puissant vasoconstricteur, et ce, en hydrolysant le dipeptide His<sup>9</sup>-Leu<sup>10</sup> en carboxy-terminal. Initialement, l'angiotensine I était considérée comme le principal substrat de l'ECA ( $K_m = 16 \mu M$ ), mais des études ont montré que l'ECA avait une bien meilleure affinité pour la BK ( $K_m = 0,18 \mu M$ ) et elle est maintenant considérée comme une kininase plutôt qu'une angiotensinase (Blais *et al.*, 2000, Erdos, 1990).

### 7.5.2 L'aminopeptidase P (APP)

L'APP humaine existe sous deux formes connues : l'une membranaire (APPM) et l'autre cytosolique (APPc). L'APPc est codée par le gène *XPNPEP1* qui est localisé au locus 10q25.3 du chromosome 10 (Sprinkle *et al.*, 2000). Cette dernière est un homodimère formé de sous unités de 70 kDa (Cottrell *et al.*, 2000). L'APPM est, quant à elle, codée par le gène *XPNPEP2* localisé sur le chromosome X à la sous-location q25-26.1 (Sprinkle *et al.*, 1998). L'APPM est accrochée à la surface des cellules grâce à une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) située en carboxy-terminal. Tout comme l'APPc, l'APPM est un homodimère ayant une masse moléculaire légèrement plus grande que son homologue, soit 90 kDa (Venema *et al.*, 1997). Malgré une faible homologie de séquence (43 %), ces deux APP possèdent un repliement moléculaire semblable de type « pain pita » en partie carboxy-terminal et ont la même spécificité de substrats (Bazan *et al.*, 1994). Ce type de repliement représente un échafaudage de feuillettes  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$  assurant la fonction catalytique. C'est à ce niveau que se situe le site actif renfermant un cation  $Zn^{2+}$  (Bazan *et al.*, 1994). L'APPM est exprimée à la surface de différentes cellules dont : l'endothélium vasculaire et à la surface des cellules épithéliales de la bordure en brosse de l'intestin et du tubule proximal rénal (Hooper and Turner, 1988, Ryan *et al.*, 1994, Prechel *et al.*, 1995, Ersahin and Simmons, 1997, Ryan *et al.*, 1996, Lasch *et al.*, 1998).

Les deux formes de l'APP possèdent la capacité de cliver un acide aminé en partie amino-terminal de différents peptides avec pour spécificité la séquence X-Pro (Rawlings and Barrett, 2000, Bazan *et al.*, 1994, Wilce *et al.*, 1998). Plusieurs fonctions physiologiques ont été proposées pour l'APPM, dont une activité kininasique : elle a la capacité de cliver le résidu Arg<sup>1</sup> en partie amino-terminal de la BK et de son métabolite actif la des-Arg<sup>9</sup>-BK menant à leur inactivation. Dans le plasma humain, l'APPM représente la principale voie de dégradation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK en plus d'être la deuxième en importance dans la dégradation de la BK (Erdös and Skidgel, 1997, Decarie *et al.*, 1996b, Blais *et al.*, 1999a).

### 7.5.3 L'endopeptidase neutre 24.11 (EPN)

L'EPN est codé par le gène *MME* localisé sur le chromosome 3 au locus q21-q27 (Barker *et al.*, 1989). Cette métalloendopeptidase est synthétisée dans divers tissus, dont les cellules épithéliales des reins, le système nerveux central, l'endothélium, les testicules, les poumons, les glandes salivaires et la moelle osseuse (Kerr and Kenny, 1974, Hooper, 1994).

Tout comme l'ECA, l'EPN inactive la BK en clivant d'abord le dipeptide Phe<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> en carboxy-terminal produisant donc BK<sub>[1-7]</sub>. Contrairement à l'ECA, elle hydrolyse ensuite le tripeptide Phe<sup>5</sup>-Ser<sup>6</sup>-Pro<sup>7</sup> produisant le métabolite inactif BK<sub>[1-4]</sub> (Gafford *et al.*, 1983). Cette même hydrolyse se produit sur la des-Arg<sup>9</sup>-BK générant le même métabolite inactif BK<sub>[1-4]</sub>. L'EPN ne joue pas un rôle significatif dans le plasma, cependant, c'est la principale voie de dégradation des kinines au niveau du tubule rénal (Gafford *et al.*, 1983).

L'EPN possède également une activité enzymatique sur d'autres peptides. Il inactive notamment les enképhalines, les peptides natriurétiques, les neurokinines et le peptide  $\beta$ -amyloïde, un marqueur de la maladie d'Alzheimer dans le système nerveux central (Kanazawa *et al.*, 1992).

### 7.5.4 Les carboxypeptidases M et N (CPM et CPN)

La CPM et la CPN, toutes deux connues sous le nom de kininase I, sont des métallopeptidases zinc-dépendantes possédant une homologie de séquence de 41% (Tan *et al.*, 1989).

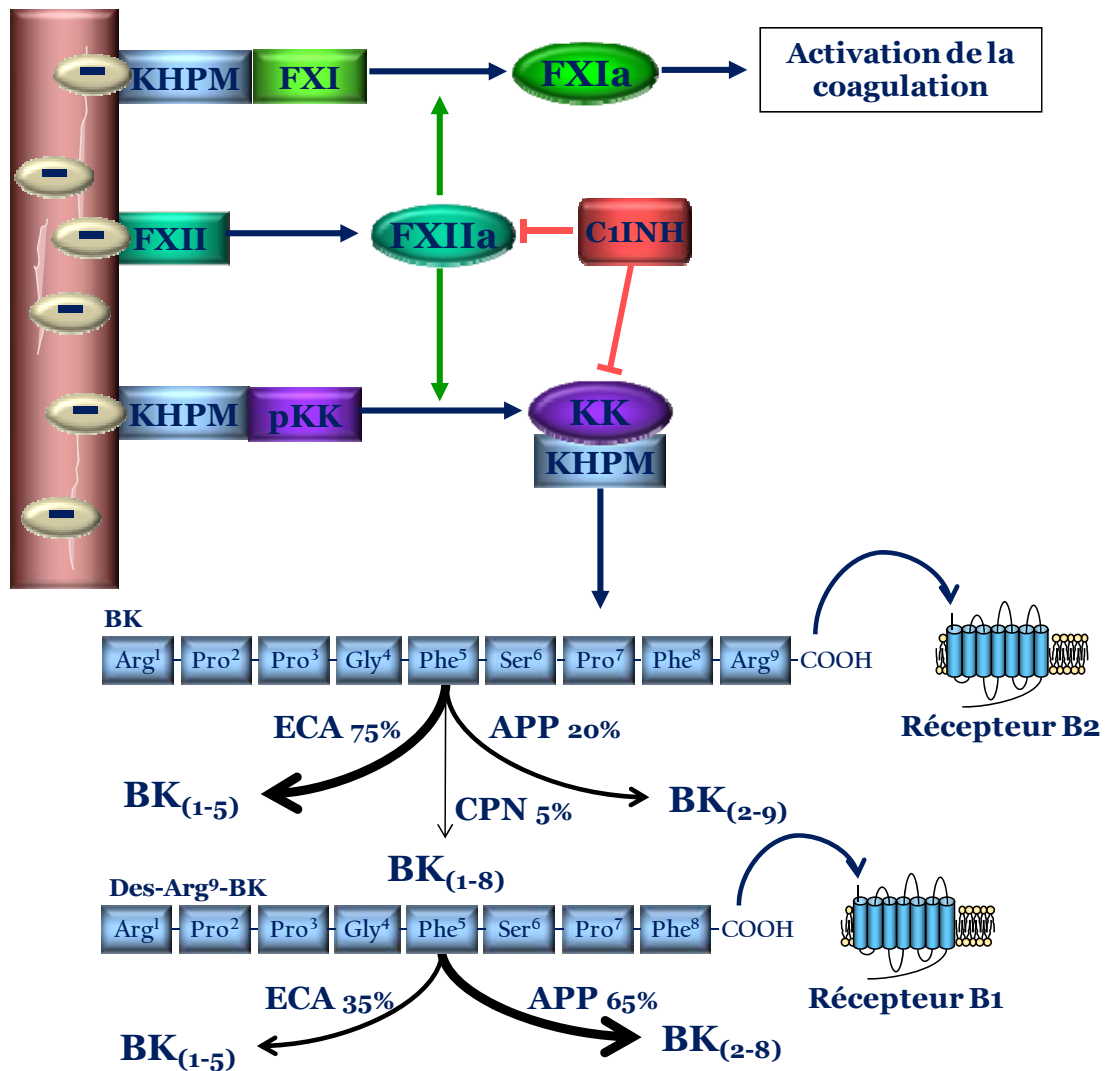
La CPN est une enzyme tétramérique de 280 kDa synthétisée par le foie à partir de l'assemblage de deux sous-unités codées par les gènes localisés aux locus 8q22-23 et 10q23-25 et libérée dans la circulation sanguine (Tan *et al.*, 1990). La CPM est une peptidase d'environ 62 kDa ancrée à la membrane par une attache de type GPI et est principalement retrouvée à la surface des cellules épithéliales du poumon et du rein. Ces deux peptidases clivent une variété de peptides contenant une Arg ou une Lys en position carboxy-terminal (Skidgel, 1988). L'action de ces peptidases sur les kinines transforme la BK et la KD en leurs métabolites actifs, la des-Arg<sup>9</sup>-



BK et la des-Arg<sup>10</sup>-KD. Cependant, cette activité kininasique constitue une voie métabolique mineure (Erdös and Skidgel, 1997, Skidgel, 1988, Blais *et al.*, 1997a).

#### 7.5.5 Autres peptidases

Plusieurs autres peptidases possèdent une activité kininasique : la dipeptidyl peptidase IV (également appelé CD26) et l'aminopeptidase N (également appelé CD13) (Lambeir *et al.*, 2003, Hooper, 1994). Ces dernières jouent cependant un rôle secondaire dans le métabolisme des kinines en hydrolysant soit : un métabolite déjà inactif dans le cas du dipeptidyl peptidase IV ou en transformant la des-Arg<sup>10</sup>-KD en des-Arg<sup>9</sup>-BK dans le cas de l'aminopeptidase N (Lambeir *et al.*, 2003, Pelorosso *et al.*, 2005).



**Figure 10.** Schéma représentant l'activation du système de contact du plasma.

Les charges négatives activent le FXII en FXIIa qui à son tour active la prékallitréine (pKK) en kallitréine (KK). La KK libère la BK du KHPM. La BK, qui agit via le récepteur B2, est métabolisée principalement par l'ECA et l'APP alors que la CPN libère le métabolite actif de la BK, la des-Arg<sup>9</sup>-BK. La des-Arg<sup>9</sup>-BK agit via le récepteur B1 et est inactivée principalement par l'APP et l'ECA.

## **8. Rôle des kinines dans la physiopathologie des RA en hémodialyse : Apport de notre laboratoire**

Au cours des dernières années, certains travaux de notre laboratoire ont visé à une meilleure compréhension de la physiopathologie des RA chez le patient dialysé. Nous avons montré que ces RA étaient de nature multifactorielle. Tout comme les réactions d'hypotension sévère au cours des transfusions sanguines, elles résultent de la rencontre d'au moins trois facteurs de nature physicochimique, pharmacologique et métabolique (Blais *et al.*, 1999b, Blais *et al.*, 1999a, Cyr *et al.*, 1999, Molinaro *et al.*, 2006, Desormeaux *et al.*, 2008).

Le facteur physicochimique est une surface chargée négativement capable d'activer le système de contact. Cette activation conduit à la libération de la BK. Ainsi, nous avons montré que la neutralisation des charges négatives d'une membrane de dialyse supprime son pouvoir kininogène (Desormeaux *et al.*, 2008).

Le facteur pharmacologique est la présence d'un iECA. Ce dernier neutralise la voie de dégradation principale de la BK, augmentant ainsi sa demi-vie et celle de son métabolite actif, la des-Arg<sup>9</sup>-BK (Blais *et al.*, 1999b).

Le troisième facteur est de nature métabolique, il caractérise l'activité de l'APP plasmatique, deuxième voie métabolique de la BK et première de la des-Arg<sup>9</sup>-BK. Les patients ayant présenté une RA en hémodialyse ont au niveau plasmatique une activité significativement diminuée de cette métallopeptidase associée à une accumulation de des-Arg<sup>9</sup>-BK lors de l'activation du système de contact *in vitro* (Blais *et al.*, 1999a). Cette activité diminuée est associée à un polymorphisme (C-2399A) au niveau du promoteur du gène XPNPEP2 qui code pour l'APPm (Molinaro *et al.*, 2006, Duan *et al.*, 2005).

## OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Les travaux menés à ce jour pour élucider les mécanismes physiopathologiques des RA associées à l'injection d'héparine contaminée par le CSHS chez le patient dialysé n'ont fait l'objet que d'une publication (Kishimoto *et al.*, 2008). Comme discuté précédemment, les résultats publiés ne montrent pas de manière définitive une participation des kinines dans la physiopathologie de tels effets secondaires, potentiellement mortels

Face à ce manque d'évidences expérimentales définitives montrant une participation des kinines à la physiopathologie des RA associées à l'injection d'héparine contaminée par le CSHS chez le patient dialysé, nous avons formulé l'hypothèse suivante : ces RA sont de nature multifactorielle, comme les RA provoquées par une membrane chargée négativement chez des patients traités au moyen d'un iECA.

Afin de vérifier cette hypothèse,

- 1- Nous avons évalué le pouvoir kininogène du CSHS en mesurant la cinétique de formation et de dégradation de la BK lors de l'activation du système de contact *in vitro*. Nous avons défini l'effet d'un iECA sur cette cinétique de libération.
- 2- Nous avons mesuré le pouvoir kininogène de l'héparine contaminée avec différentes concentrations de CSHS et ce, après avoir montré l'importance de la dilution du plasma sur l'accumulation de la BK.
- 3- Nous avons enfin défini l'effet de l'activité de l'APP plasmatique sur la cinétique de dégradation de la BK et de son métabolite actif, la des-Arg<sup>9</sup>-BK, libérées lors de l'incubation du plasma avec de l'héparine contaminée.

## MÉTHODOLOGIE

### 1. Matériel et réactifs

La BK et la des-Arg<sup>9</sup>-BK ont été achetées chez Peninsula Laboratories (Belmont, CA, États-Unis). Les échantillons d'héparine contaminée et non contaminée ainsi que le CSHS purifié nous ont été fournis par les Drs B. Westenberger et D. Keire (FDA, Saint-Louis, MO, États-Unis). Le CSHS a été synthétisé par le laboratoire d'analyse pharmaceutique de la FDA (Maruyama *et al.*, 1998). La concentration de CSHS des différents lots d'héparine contaminée a été dosée par méthode de HPLC (Keire *et al.*, 2009). L'énalaprilat provient de Merck Frosst (Kirkland, QC, Canada). Le SD de haut poids moléculaire (PM : > 500 000), le CSA, le CSB, le tampon phosphate salin (PBS) et le peroxyde d'urée proviennent de chez Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). La digoxigénine (DIG), le tris-HCl et le blocking reagent pour le dosage immunoenzymatique de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK ont été obtenus chez Roche (Laval, QC, Canada). Le bicarbonate de sodium, le chlorure de sodium et le Tween 20 ont été achetés chez Bioshop Canada (Burlington, ON, Canada). Le substrat fluorescent K(Dnp)-PPK-(Abz) utilisé pour le dosage de l'activité de l'APP plasmatique a été développé en collaboration avec le Dr. Adrianna K. Carmona (Université de São Paulo, Brésil) (Molinario *et al.*, 2005). L'ECA a été dosée au moyen d'une méthode radioenzymatique (ALPCO Diagnostics, Salem, NH, États-Unis). L'eau purifiée déionisée provient de la compagnie Les Eaux Saint-Léger (Boucherville, QC, Canada). L'éthanol anhydre a été acheté de Les Alcools de Commerce (Boucherville, QC, Canada). Tous les autres réactifs sauf indication proviennent de chez Fisher Scientific (Montréal, QC, Canada).

### 2. Échantillon de plasma

Sauf indication contraire, les différentes investigations biochimiques ont été réalisées sur un pool de plasmas citratés recueilli chez des volontaires sains. Ces investigations font l'objet d'un certificat d'éthique délivré par le *Comité d'Éthique*

de la Recherche des Sciences de la Santé de l'Université de Montréal (dossier numéro 650).

A cet effet, 18 ml de sang veineux ont été prélevés par écoulement libre dans des tubes de polypropylène contenant 2 ml d'une solution de citrate de sodium trisodique (0,1 mol/L, pH7,4). Après centrifugation (1250 g pendant 20 minutes à température de la pièce), le plasma est récupéré par décantation, aliquoté en fraction de 1 ml dans des tubes de polypropylène puis entreposé à -80°C. Les différentes activations ont été réalisées sur un pool de cinq plasmas. Les plasmas sont décongelés à 37°C pendant 10 minutes, vortexés et ensuite poolés à volume égal dans des tubes en polypropylène.

### **3. Préparation des solutions stock des différents activateurs potentiels du système de contact**

Une solution stock des différents activateurs potentiels (CSHS, SD, CSA, CSB, héparine, héparine contaminée par le CSHS) est obtenue par dissolution de ces différentes molécules à la concentration de 10 mg/ml dans le tampon PBS. Ces solutions sont stockées dans des tubes de polypropylène à -20°C. Lors de leur utilisation, ces échantillons sont décongelés à la température de la pièce pendant 30 min et vortexés avant la préparation des différentes dilutions à être testées. Lors d'une injection en bolus d'héparine, la concentration plasmatique atteinte est de 410 µg/ml, ce qui correspond à une concentration de 100 µg/ml de CSHS dans le lot le plus contaminé (Baglin *et al.*, 2006). La concentration de 100 µg/ml sera donc considérée comme standard pour tester les différents agents.

## 4. Méthodes analytiques

### 4.1 Incubation du plasma avec les différents activateurs potentiels

#### 4.1.1 Définition du pouvoir kininogénateur du CSHS et des molécules apparentées.

Pour l'obtention d'une inhibition complète de l'ECA, des concentrations plasmatiques allant de 500 à 800 nM d'énalaprilate (un iECA) sont utilisées en clinique. Ainsi, afin d'inhiber complètement l'ECA, le pool de plasmas défini à la section précédente est préincubé à 37°C pendant 15 min avec une concentration finale de 520 nM d'énalaprilate. Un volume de 450 µL de plasma est déposé goutte à goutte sur 50 µL d'une solution d'activateur ou de tampon PBS. Les concentrations (µg/ml de plasma) testées sont représentées au Tableau 3. L'échantillon est alors vortexé, puis incubé à 37°C pour une période de 120 min avec agitation. La réaction est arrêtée à différents temps (0, 5, 10, 20, 40, 60 et 120 minutes) par l'addition de 50 µL de plasma activé dans 2 ml d'éthanol anhydre froid à une concentration finale de 80% v/v. Les échantillons sont incubés pendant 1 heure à 4°C pour permettre la précipitation des protéines. Ils sont ensuite centrifugés (3000 g pendant 15 :min à 4°C). Le surnageant, contenant les peptides solubles dont les kinines, est récupéré par décantation et évaporé à sec dans un Speed Vac (Savant, Farmingdale, NY, USA). Les culots sont gardés à -20°C jusqu'à leur utilisation pour le dosage de la BK immunoréactive.

**Tableau 3.** Les différentes concentrations d'activateur testées pour la définition du pouvoir kininogénateur du CSHS et des molécules apparentées.

| Activateurs potentiels | [Activateurs]<br>(µg/ml) |
|------------------------|--------------------------|
| SD                     | 1; 10; 100; 1000         |
| CSHS                   | 1; 10; 100; 1000         |
| CSA                    | 100                      |
| CSB                    | 100                      |
| Héparine               | 100                      |

#### **4.1.2 Effet de la dilution du plasma et de l'iECA sur le pouvoir kininogène du CSHS**

Dans un premier temps, l'effet de la dilution du plasma a été testé sur le pouvoir kininogène du CSHS et du SD. Pour ce faire, nous avons incubé différentes dilutions du pool de plasma (20%, 40%, 60% et 80% de plasma dans du PBS) avec le CSHS et le SD à la concentration finale de 100 µg/ml, et ce, en présence d'un iECA dans les conditions d'incubation décrites au point 4.1.1.

Dans un deuxième temps, 450 µL du pool de plasma dilué à 50% dans le PBS est préincubé ou non avec l'iECA (concentration finale de 520 nM) avant d'être incubé avec 50 µL de CSHS (concentration finale de 100 µg/ml). L'incubation est poursuivie comme décrit ci-dessus.

#### **4.1.3 Étude du pouvoir kininogène de différents lots d'héparine contaminée par le CSHS**

Les différents lots d'héparine contenant des concentrations variables de CSHS sont représentés au tableau 4. Dans tous les cas, la concentration finale d'héparine utilisée était de 410 µg/ml, ce qui représente une concentration de CSHS de 100 µg/ml pour le lot d'héparine renfermant la concentration la plus élevée de contaminant. Chacune de ces activations a été réalisée sur le pool de plasma porté à la dilution sélectionnée ci-dessus et dans laquelle l'activité de l'ECA a été préalablement neutralisée.



**Tableau 4.** Identification des différents lots d'héparine contaminée au CSHS testés accompagné de leur % de CSHS (poids/poids) respectif et de la concentration finale de CSHS pour 410 µg/ml d'héparine.

| Échantillons #                       | % de CSHS dans les préparations d'héparine | Concentration de CSHS testée (µg/mL) |
|--------------------------------------|--|--------------------------------------|
| <b>Héparine complétement de CSHS</b> |  |                                      |
| 1                                    | 0  | 0,0                                  |
| 2                                    | 9,7  | 40,0                                 |
| 3                                    | 4,7  | 19,0                                 |
| 4                                    | 1,1  | 4,5                                  |
| <b>Héparine contaminée au CSHS</b>   |  |                                      |
| 5                                    | 1,3  | 5,3                                  |
| 6*                                   | 3,1  | 13,0                                 |
| 7                                    | 5,9  | 24,0                                 |
| 8                                    | 10   | 41,0                                 |
| 9*                                   | 16,7                                       | 60,0                                 |
| 10*                                  | 24,3                                       | 100,0                                |

\*Lots d'héparine contaminée au CSHS ayant provoqué une RA

#### 4.1.4- Effet de l'activité plasmatique de l'aminopeptidase P sur les profils métaboliques de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK dans le plasma incubé en présence d'héparine contaminée au CSHS

Pour ce faire, nous avons utilisé des plasmas de patients dialysés qui ont été caractérisés précédemment (Desormeaux *et al.*, 2008). Six de ces plasmas avaient une activité moyenne d'APP plasmatique haute égale à  $357 \pm 165$  U (allant de 166 U à 488 U), alors que les huit autres avaient une activité moyenne de l'APP plasmatique basse égale à  $16 \pm 3$  U (allant de 4 U à 27 U). Chaque plasma dilué à 50 % dans le PBS est préincubé avec de l'énalaprilate avant d'être incubé avec 410 µg/ml d'héparine contaminée (échantillon numéro 10, **Tableau 4.**) contenant 100 µg/ml de CSHS. Les conditions d'incubations utilisées sont décrites en 4.1.1.

## 4.2 Dosage des kinines

Les culots d'évaporation des différents extraits éthanoliques sont remis en solution dans du tampon d'incubation (Tris-HCl 50mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,05 % v/v, pH 7,4) avant le dosage des kinines immunoréactives.

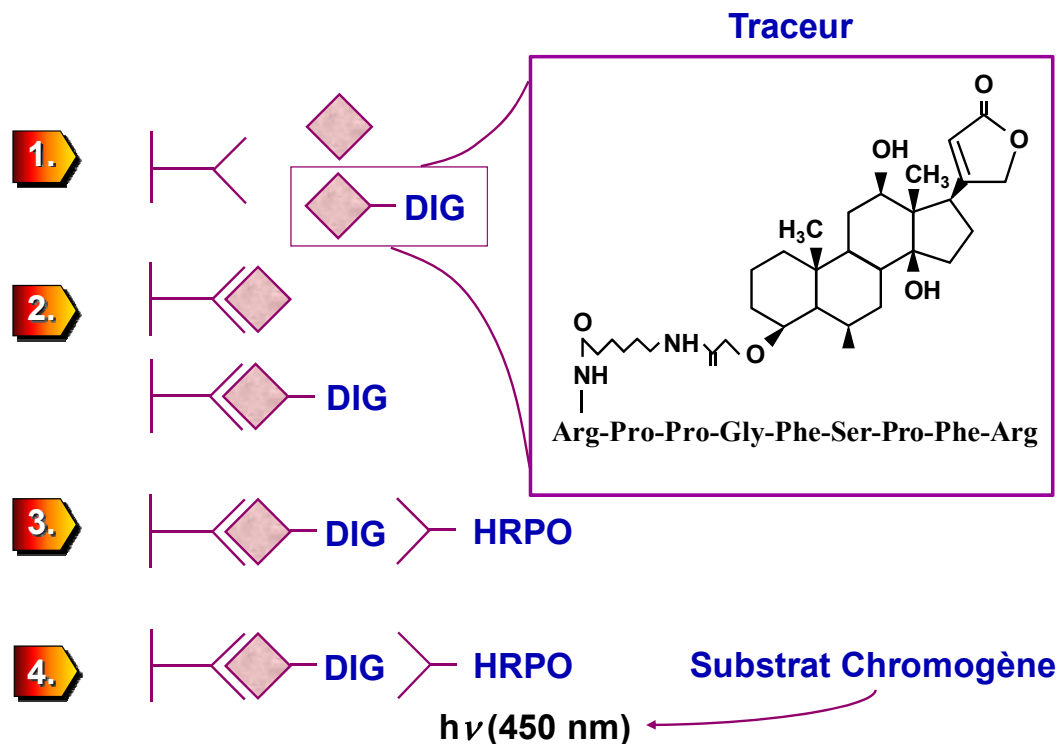
Seule la BK a été dosée pour les 3 premières conditions d'incubation (4.1.1 à 4.1.3) visant à mettre en évidence et à caractériser le pouvoir kininogène des différents GAG et en particulier celui du CSHS. La BK et la des-Arg<sup>9</sup>-BK ont été dosées pour la partie de notre travail visant à étudier l'influence de l'activité de l'APP (4.1.4) sur l'accumulation des kinines au cours de l'activation du système de contact par l'héparine contaminée.

La BK et la des-Arg<sup>9</sup>-BK sont dosées par des méthodes immunoenzymatiques compétitives développées et validées dans notre laboratoire (**figure 11.**) (Decarie *et al.*, 1994, Raymond *et al.*, 1995). Pour ce faire, des immunoglobulines G polyclonales de lapin hautement spécifiques dirigées contre la partie carboxy-terminal de la BK ou de la des-Arg<sup>9</sup>-BK sont utilisées pour couvrir la surface des puits d'une plaque de 96 puits. Les traceurs sont produits par le couplage de la BK ou de la des-Arg<sup>9</sup>-BK à la DIG en partie amino-terminal.

Des plaques de 96 puits sont recouvertes (18 heures, 4°C) d'immunoglobuline G anti-BK ou anti-des-Arg<sup>9</sup>-BK (concentration finale de 62,5 ng/ml pour BK et de 1,2 µg/ml pour la des-Arg<sup>9</sup>-BK) dans du tampon de fixation (bicarbonate 100 mM, pH 9,5). Après lavage au moyen du tampon d'incubation, les puits sont saturés au moyen de ce même tampon pendant 2 heures à 37°C.

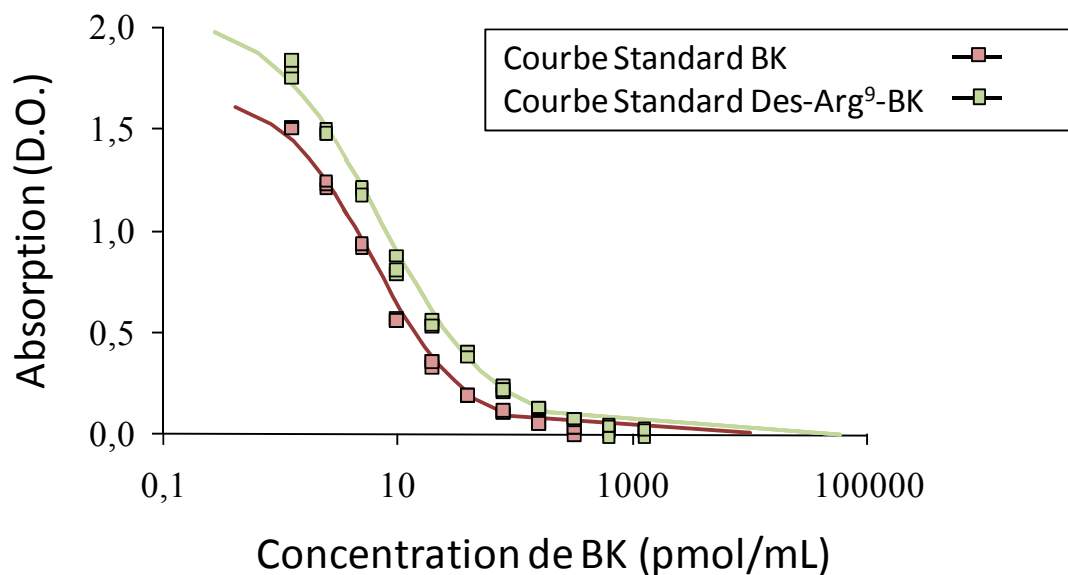
Après une nouvelle étape de lavage, on procède à l'étape d'immunoréaction compétitive. Celle-ci consiste en une réaction de compétition (18 heures, 4°C) entre la BK ou la des-Arg<sup>9</sup>-BK de la courbe de calibration (BK : 1179 pmol/ml à 1,15 pmol/ml; des-Arg<sup>9</sup>-BK : 1383 pmol/ml à 1,35 pmol/ml) ou du résidu d'évaporation et leur traceur respectif (concentration finale de 155 fmol/ml pour BK-DIG et 251 fmol/ml pour des-Arg<sup>9</sup>-BK-DIG) pour les sites anticorps fixés sur le support solide. Après un nouveau cycle de lavage, la DIG fixée réagit avec des

fragments Fab anti-DIG couplés avec la peroxydase de Raifort (HRPO) (dilution 1 :3000, 2 heures, 25°C). Après lavage, la présence de complexes immuns est révélée par la mesure de l'activité de la peroxydase. Cette dernière est effectuée en incubant pendant 45 minutes à 25°C les plaques avec une solution d'*o*-phénylènediamine (1 mg/ml) dans du tampon citrate (citrate de sodium 50 mM, acide citrique 30 mM, peroxyde d'urée 0,01% p/v, pH5,0).



**Figure 11. Schéma représentant les différentes étapes de la méthode immunoenzymatique pour le dosage de la BK.** D'abord, les immunoglobulines G anti-BK sont déposées dans les puits d'une plaque de 96 puits. Ensuite, l'échantillon à doser ou le standard est mis en compétition avec une quantité connue de BK couplé au traceur (DIG). Par la suite, des anticorps anti-DIG couplé à la HRPO sont déposés dans chacun des puits. Finalement, une solution contenant de l'*o*-phénylènediamine est incubée dans chaque puits. L'absorption du substrat oxydé est lue à 450 nm.

L'absorption de chaque puits est mesurée à 450 nm avec une longueur d'onde référence à 630 nm (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, États-Unis). La concentration de BK ou de des-Arg<sup>9</sup>-BK de l'échantillon est ensuite mesurée en rapportant son absorption sur la courbe de calibration (**Figure 12.**). Les valeurs de l'ED-50 de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK sont respectivement de 8 et 10 pmol/ml. Les limites de détection des immunoessais sont de 0,1 fmol/ml pour la BK et 27 fmol/ml pour la des-Arg<sup>9</sup>-BK.



**Figure 12. Courbe de calibration typique de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK obtenue par un immunoessai compétitif.**

## 5. Caractérisation de la BK immunoréactive

Les anticorps utilisés pour le dosage immunologique de la BK ont été induits contre la partie carboxy-terminal de chaque peptide. La caractérisation de la spécificité de cet anticorps a mis en évidence une réaction croisée des peptides BK<sub>[2-9]</sub> démunis d'activité pharmacologique (Raymond *et al.*, 1995, Decarie *et al.*, 1994). Il est donc nécessaire de vérifier la nature de la partie amino-terminal et l'activité pharmacologique de chaque peptide immunoréactif dosé. Pour ce faire, le pool de plasma, préalablement traité avec 520 nM d'énalaprilate, est activé avec 100 µg/ml de CSHS, 100 µg/ml de SD ou 410 µg/ml d'héparine contaminée (échantillon numéro 10, **Tableau 4.**) ou sans activateur. Les fractions correspondant au pic de la BK immunoréactive sont recueillies (voir **Tableau 5**) et soumises aux tests de caractérisations.

### 5.1 Caractérisation pharmacologique

La présence de l'activité pharmacologique de BK a été testée en utilisant un essai mesurant la phosphorylation de ERK1/2, des protéines de la famille des MAPK (Bawolak *et al.*, 2007). Les extraits éthanoliques sont d'abord resuspendus dans 300 µL de saline (0,9% p/v). Des cellules HEK 293 surexprimant le RB2 conjugué à la protéine fluorescente verte (GFP) sont traitées pendant 10 minutes avec différentes dilutions de cette solution (1 :450, 1 :180 et 1 :45), combiné ou non avec l'antagoniste du RB2, le LF16-0687 (Laboratoires Fournier, Daix, France (Pruneau *et al.*, 1999)), dans un milieu de culture cellulaire standard contenant du sérum bovin. Les cellules sont ensuite récupérées et mises dans un tampon de lyse (10 mM Tris, 1,0 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1,0% SDS, pH 7,4, 5 minutes, 100°C). Le lysat cellulaire est par la suite centrifugé à 15 000 g pendant 5 minutes. Les protéines sont dosées par la méthode utilisant l'acide bicinchoninique (Pierce, Rockford, IL, États-Unis). Le lysat (25 µg des protéines totales) est analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyle sulfate (SDS-PAGE, gel de séparation concentré à 9% (Bachvarov *et al.*, 2001)) et transféré sur une membrane de polyvinylidène bifluoride. La membrane est rincée pendant 20 secondes dans du méthanol et séchée pendant 1 heure à 25°C. La membrane est

ensuite immergée dans un tampon de blocage (tampon de lavage (10 mM Tris pH7,5, 100 mM NaCl, 0,1 % tween 20), 5% lait écrémé) pendant 1 heure à température pièce. La membrane est incubée par la suite pendant 2 heures avec les anticorps primaires anti-phospho-ERK1/2 et anti-ERK1/2 totale (anticorps monoclonal et polyclonal respectivement, dilution 1 :1000, Cell Signaling Technology, Boston, MA, États-Unis). Après 30 minutes d'incubation dans le tampon de lavage, les anticorps primaires sont conjugués à un anticorps secondaire lié à la peroxydase de raifort (anticorps anti-immunoglobulines G de souris, dilution 1 :16 000, une heure, 25°C, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, États-Unis). Après un lavage de 30 minutes, les anticorps sont révélés en utilisant le kit Western Blot Chemoluminescence Reagent Plus (NEN Life Science Products, Waltham, MA, États-Unis).

## **5.2 Caractérisation physicochimique des kinines immunoréactives par séparation par chromatographie liquide à haute pression.**

Les résidus de l'extrait éthalonique contenant de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK sont dissous dans 200 µL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM à pH 3,0 contenant 25% d'acétonitrile et 1,0% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. La séparation par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) à été réalisée sur un Agilent 1100 Series (Agilent Technologies Canada, Mississauga, ON, Canada) avec une colonne d'aspartamide 2-sulfoéthyle (PolySULFOETHYL A<sup>TM</sup>, The Nest Group Inc., Southborough, MA, États-Unis) et en utilisant un gradient linéaire de KCl (0 à 300 mM) dans du KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5 mM, 25 % d'acétonitrile (v/v), pH 3,0) pour 30 minutes à un débit de 1 ml/minute. Les différentes fractions récupérées sont évaporées avant la quantification de la BK par immunoessai tel que décrit ci-dessus. Le temps de rétention de toutes les fractions immunoréactives est ensuite comparé à celui des peptides standards (Decarie *et al.*, 1994, Raymond *et al.*, 1995).

## 6. Dosage de l'activité plasmatique de l'APP

L'activité de l'APP plasmatique est mesurée en cinétique à l'aide du substrat fluorescent K(Dnp)-PPK-(Abz) (Synthétisé par le Pr. Adrianna Carmona, département de biophysique, Escola Paulista de Medecine, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brésil (Molinaro *et al.*, 2005)). Chaque échantillon est dosé en triplicata. Un volume de 10  $\mu\text{L}$  de plasma est déposé avec 125  $\mu\text{L}$  de tampon HEPES (100 mM, pH 7,4) contenant de l'énalaprilat (concentration finale de 5,2  $\mu\text{M}$ ). Un volume de 15  $\mu\text{L}$  de substrat fluorescent est ajouté (concentration finale de 10  $\mu\text{M}$ ). La fluorescence émise est lue à l'aide d'un fluorimètre FL600 microplate fluorescence reader (BioTek, Winooski, VT, États-Unis) à une longueur d'onde d'excitation de 340 nm et une longueur d'onde d'émission de 420 nm. L'analyse s'effectue sur 1 heure et les mesures sont prises toutes les 5 minutes (Molinaro *et al.*, 2005). Les unités de fluorescence sont converties en pmol de substrat hydrolysé en utilisant une courbe standard de la fluorescence émise par l'hydrolyse complète de huit concentrations différentes de substrat. Les résultats sont exprimés en pmol de substrat hydrolysé/min/ml de plasma.

## 7. Traitement statistique des résultats

Pour chaque condition d'incubation, nous avons calculé les aires sous la courbe (ASC) et le pic de concentration des différents profils cinétiques de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK. Ces ASC ont été calculées par la méthode trapézoïdale en utilisant le programme GraphPad Prism 4,0.

Les résultats obtenus (moyenne  $\pm$  écart-type) ont été comparés en utilisant un test t de Student ou une ANOVA selon le cas.  $P < 0,05$  a été considéré significatif pour les différentes comparaisons.

## PRÉSENTATION ET ANALYSE DES RÉSULTATS

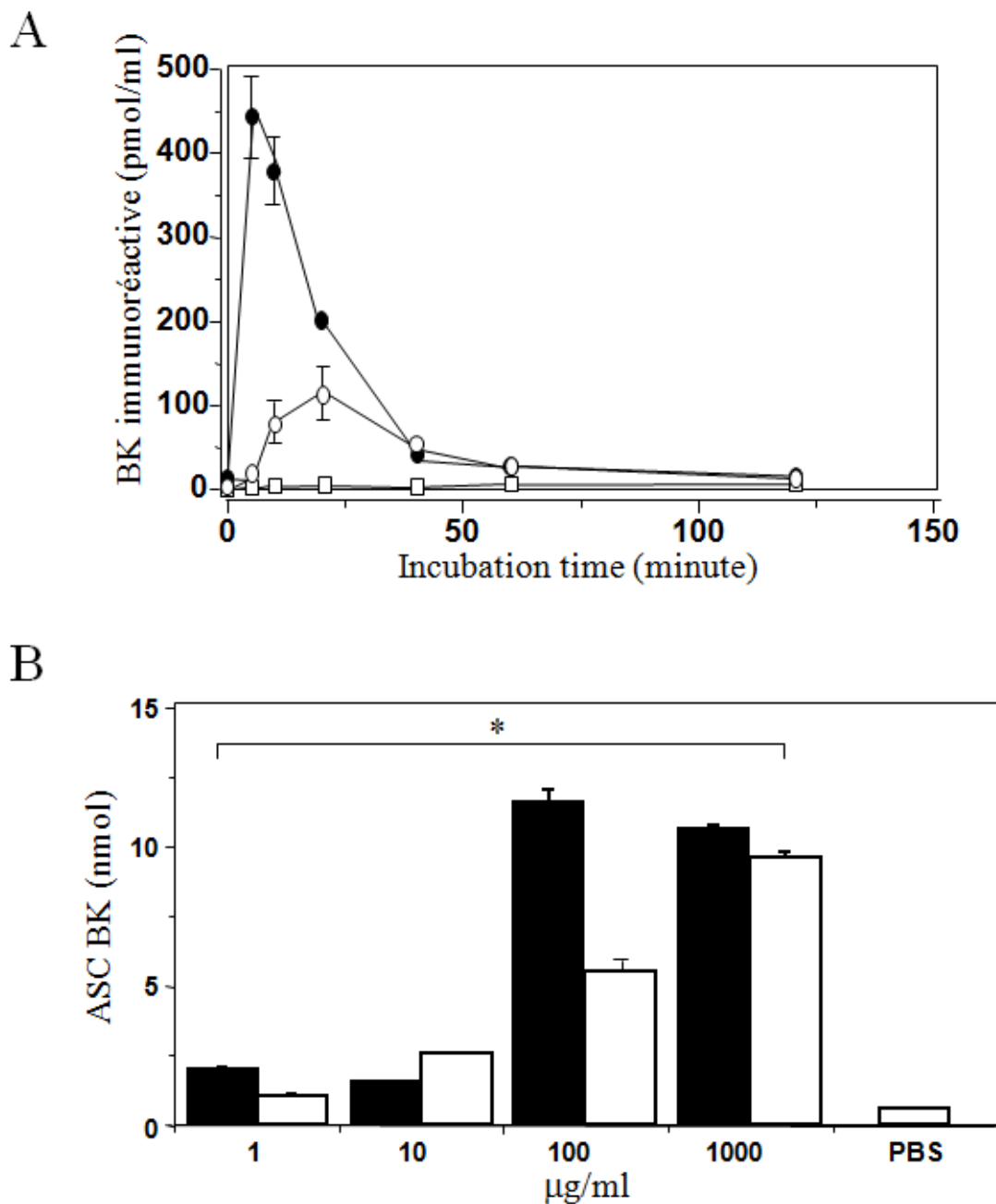
### 1. Pouvoir kininogénerateur du CSHS : comparaison avec celui du SD

La figure 13A représente de façon comparative la cinétique de libération de la BK lorsque le pool de plasma, préincubé avec l'énalaprilat, est incubé en présence de CSHS et de SD à la concentration finale de 100 µg/ml. La concentration maximale de BK mesurée pendant le processus d'activation en présence de CSHS ( $115 \pm 28$  pmol/ml) est significativement inférieure à celle observée en présence de SD ( $377 \pm 42$  pmol/ml). De plus, cette concentration maximale en présence de CSHS apparaît plus tardivement ( $19,2 \pm 06$  min) que celle en présence de SD ( $7,2 \pm 04$  min). La quantité de BK mesurée pendant les 120 minutes d'incubation en présence de CSHS ou de SD pour des concentrations variant de 1 à 1000 µg/ml a été estimée par le calcul de l'ASC des différents profils cinétiques pour ces différentes concentrations. Les valeurs sont représentées de façon comparative à la figure 13B. Pour des concentrations variant entre 1 et 10 µg/ml, les quantités de BK mesurées en présence de SD sont respectivement de  $1,86 \pm 0,02$  nmol et de  $1,58 \pm 0,03$  nmol. La quantité de BK libérée est par contre semblable pour des concentrations de SD de 100 et de 1000 µg/ml (respectivement  $11,38 \pm 0,72$  nmol et  $10,76 \pm 15$  nmol). Par contre, les quantités de BK mesurées en présence de CSHS augmentent progressivement ( $1,31 \pm 0,02$ ,  $2,84 \pm 0,02$ ,  $5,31 \pm 0,49$ ,  $9,15 \pm 0,09$  nmol) pour des concentrations d'activateur allant de 1 à 1000 µg/ml.

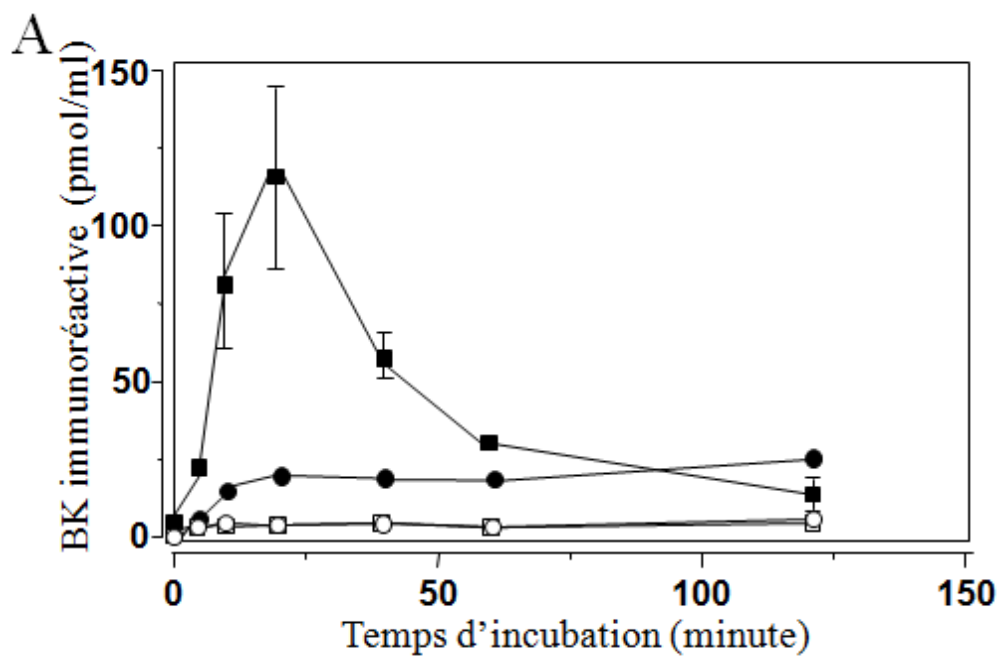
Dans des conditions identiques d'incubation, la quantité totale de BK mesurée en présence de CSA, de CSB et d'héparine ( $0,57 \pm 0,01$ ,  $0,63 \pm 0,01$  et  $2,38 \pm 0,06$  nmol) est significativement inférieure à celle mesurée en présence de CSHS à la même concentration de 100 µg/ml ( $5,31 \pm 0,49$  nmol). Ces quantités sont cependant toutes supérieures à celle mesurée lorsque le plasma est incubé en absence d'activateur ( $0,38 \pm 0,02$  nmol). Enfin, contrairement au CSHS, les profils



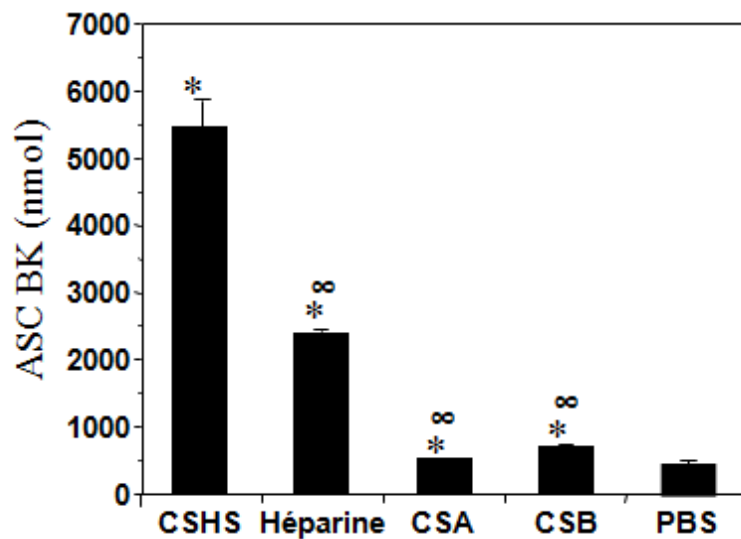
mesurés en présence de CSA, de CSB et d'héparine ne présentent pas de pic de concentration (**Figure 14 A et B**).



**Figure 13. A :** Profils cinétiques moyens (n=6) de la BK obtenu lorsque le plasma (90%) est incubé avec 100 µg/ml de SD (●), 100 µg/ml de CSHS (○) et avec le tampon PBS seul (□) en présence d'un iECA. **B :** ASC (n=3) correspondant aux profils cinétiques du pool de plasma lorsqu'incubé avec du SD (■) ou du CSHS (□) à des concentrations de 1, 10, 100 et 1000 µg/ml. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type; lorsque la valeur est trop basse, la barre n'est pas indiquée. (\*p<0,0001 comparé au PBS)



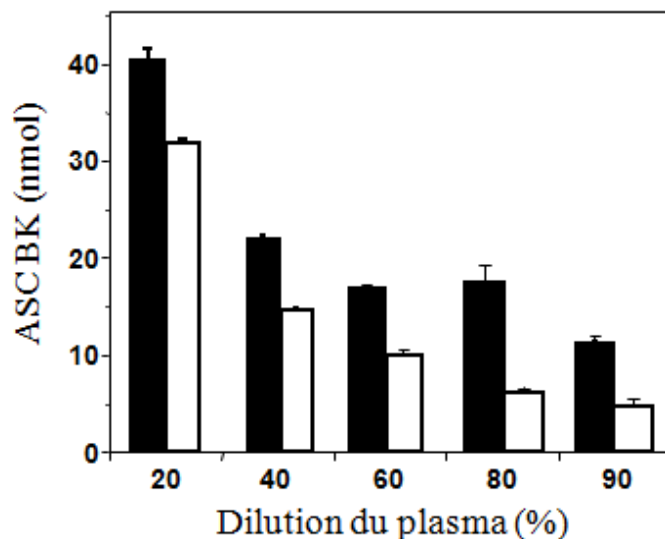
**B**



**Figure 14.** **A** : Profils cinétiques moyens (n=3) de la BK dosée sur un pool de plasma activé par 100 µg/ml de CSHS (■), 100 µg/ml de CSA (□), 100 µg/ml de CSB (○) ou 100 µg/ml d'héparine non contaminée (●) en présence d'un iECA. **B** : ASC (n=3) correspondant aux profils cinétiques représentés en A. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type; lorsque la valeur est trop basse, la barre n'est pas indiquée. (\*p<0,002 comparé au PBS, ∞p<0,0001 comparé au CSHS)

## 2. Effet de la dilution du plasma sur le pouvoir kininogénerateur du CSHS et du SD

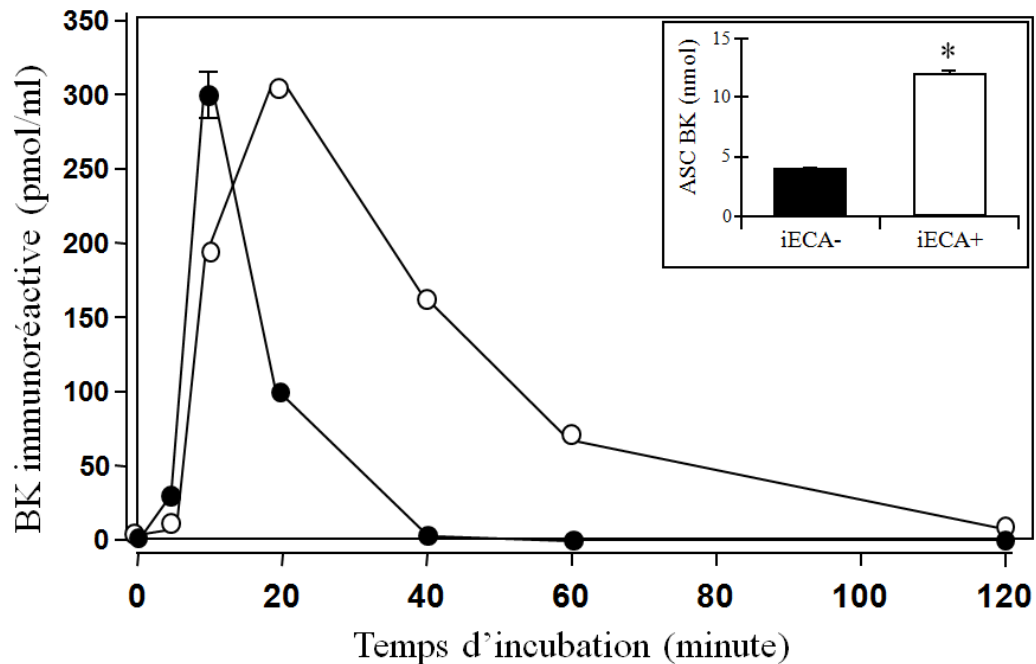
La quantité de BK libérée, estimée par le calcul de l'ASC, augmente progressivement lorsque des dilutions successives du plasma, préincubée avec de l'énalaprilate, sont incubées avec le CSHS ( $5,31 \pm 0,49$  à  $31,88 \pm 0,50$  nmol) ou le SD ( $11,38 \pm 0,72$  à  $40,4 \pm 1,14$  nmol) à la concentration finale de  $100 \mu\text{g/ml}$  (**Figure 15**). Une dilution du plasma de 50 %, intermédiaire entre 40 et 60%, a été sélectionnée pour la suite de notre travail puisqu'elle est compatible avec la dilution du plasma du patient dialysé au moment du branchement.



**Figure 15.** ASC (n=3) correspondant à la quantité totale de BK libérée pendant 120 minutes d'activation de différentes dilutions du pool de plasma (20, 40, 60, 80, 90%) avec  $100 \mu\text{g/ml}$  de SD (■) ou de CSHS (□) en présence d'un iECA. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type.

### 3. Effet de l'inhibition de l'ECA sur le pouvoir kininogénerateur du CSHS

La figure 16 illustre de façon comparative les profils cinétiques de la BK lorsqu'une dilution de 50 % du plasma préincubé ou non en présence d'énalaprilate est incubée en présence de CSHS à la concentration finale de 100 µg/ml. La partie descendante de ce profil est ralentie en présence d'iECA ce qui correspond à l'inhibition de la voie métabolique principale de la BK. L'inhibition de l'ECA s'accompagne d'une augmentation significative de l'ASC (12,26 ± 0,21 nmol versus 3,93 ± 0,06 nmol).

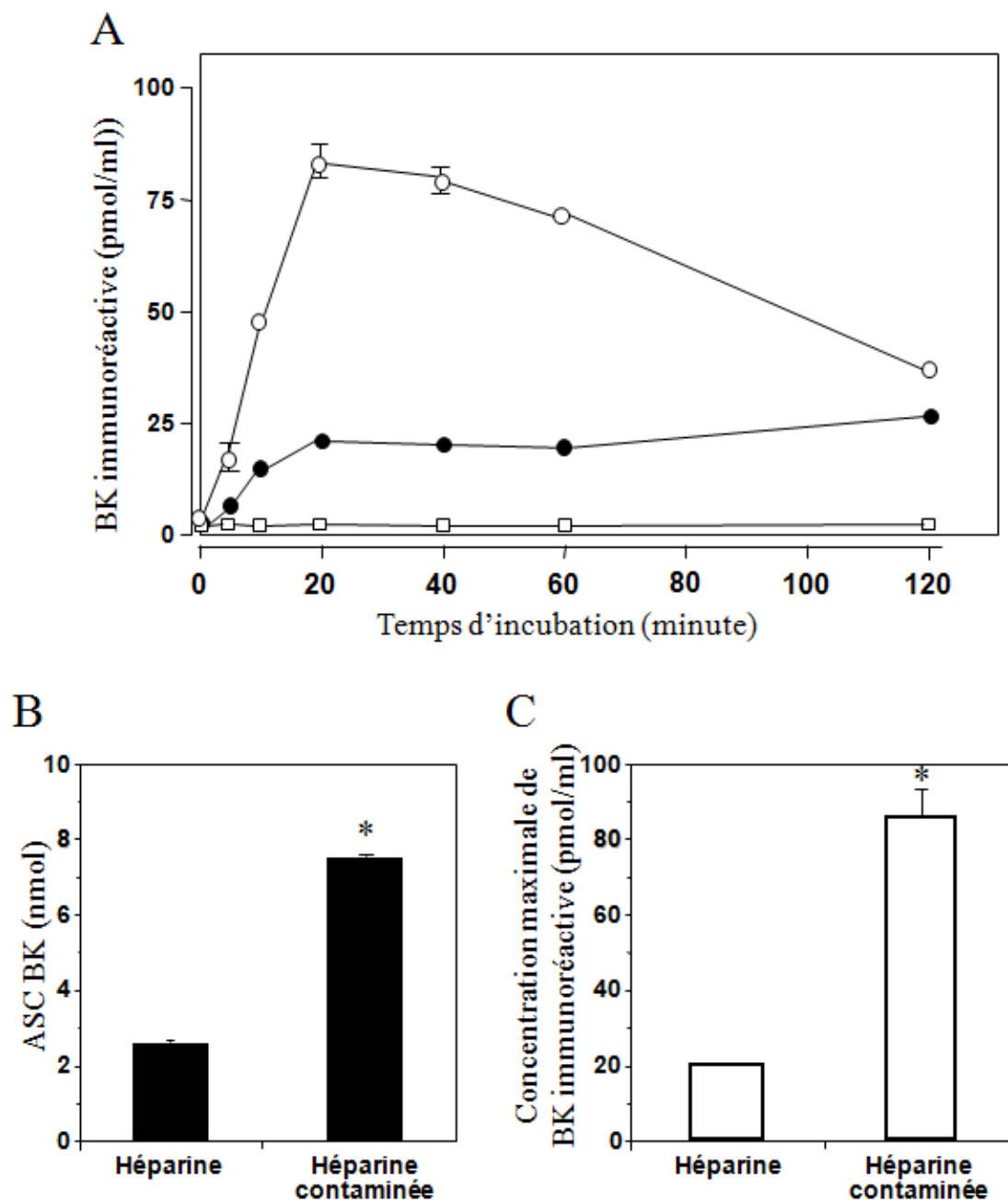


**Figure 16.** Profils cinétiques moyens (n=3) de la BK obtenus lorsque le pool de plasma (50%) est activé par 100 µg/ml de CSHS en absence (●) ou en présence (○) d'un iECA. Dans l'encadré sont illustrées les ASC correspondant aux deux profils cinétiques. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type. (\*<p0,0001)

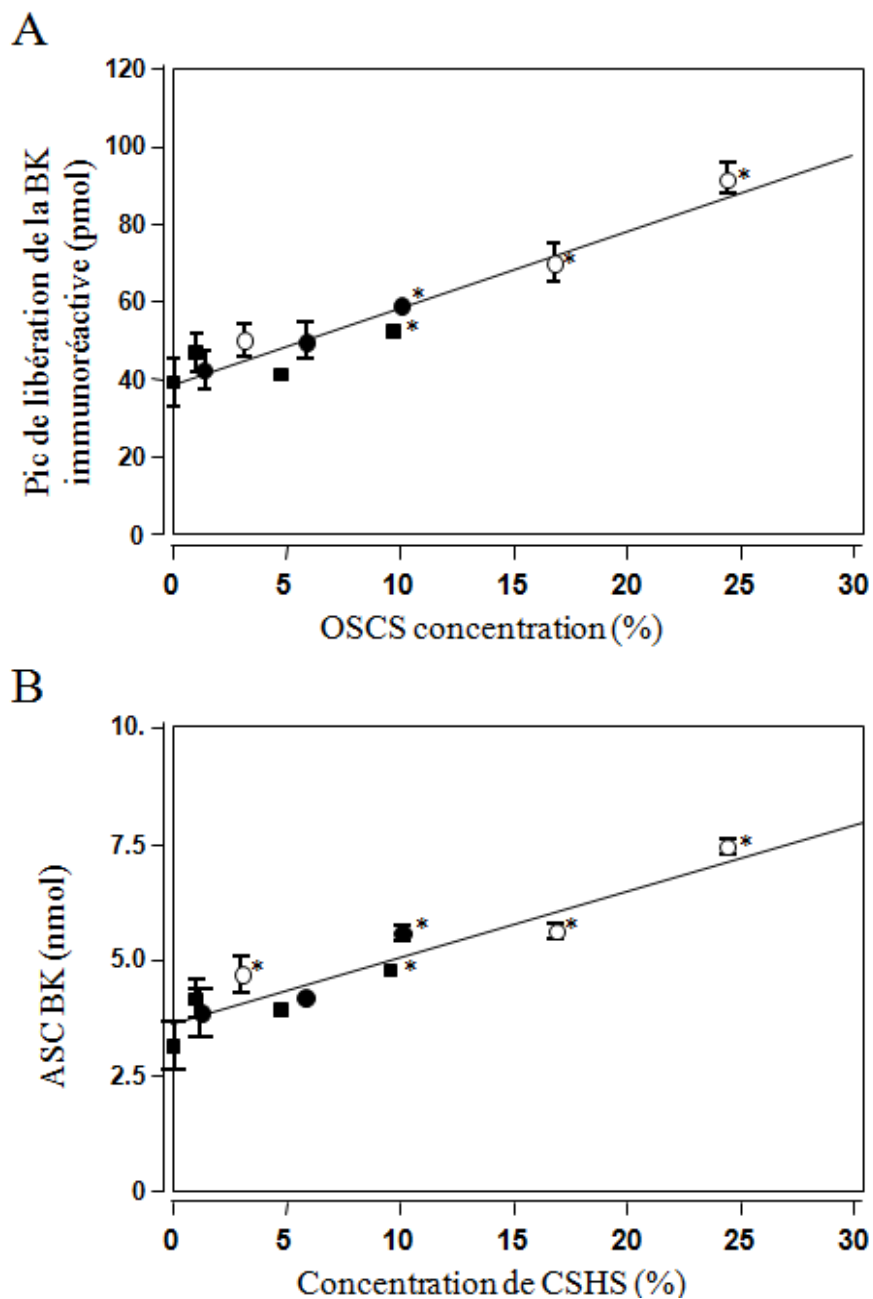
#### 4. Pouvoir kininogénerateur de l'héparine contenant ou non du CSHS

Comme le montre la figure 17, l'incubation du plasma, préincubé avec de l'énalaprilat et dilué (50%), avec l'héparine seule s'accompagne de la libération de BK qui est significativement supérieure à celle mesurée pour le plasma dilué seul. Par contre, la concentration maximale ( $20,6 \pm 0,5$  pmol/ml) et la quantité totale ( $2,38 \pm 0,06$  nmol) libérée en présence de l'héparine seule sont significativement inférieures à celles libérées en présence de la même quantité d'héparine (410 µg/ml) contaminée à 24,3% de CSHS ( $7,4 \pm 0,15$  nmol et  $87,2 \pm 6,8$  pmol/ml).

La figure 18 illustre de façon comparative la corrélation calculée entre la quantité ajoutée ou contaminée de CSHS dans 410 µg d'héparine et, d'une part (**figure 18A**) le pic de concentration de BK ( $y=2,04x+38,10$ ;  $R^2=0,93$ ) ou, d'autre part (**figure 18B**), la quantité totale de BK libérée ( $y=0,150x+3,535$ ;  $R^2=0,87$ ). De plus, les lots d'héparine contaminée au CSHS ayant été associés aux RA ont tous mené une libération hautement significative de BK dans le plasma.



**Figure 17. A :** Profils cinétiques moyens (n=3) de la BK obtenu lorsqu'un pool de plasma est incubé avec du PBS (□), 410 µg/ml d'héparine non contaminée (●) ou 410 µg/ml d'héparine contaminée avec le CSHS (○) en présence d'un iECA. Les figures **B** et **C** représentent respectivement l'ASC et les concentrations maximales de BK des deux profils cinétiques présentés en A. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type. (\*<math>p</math>0,0001)

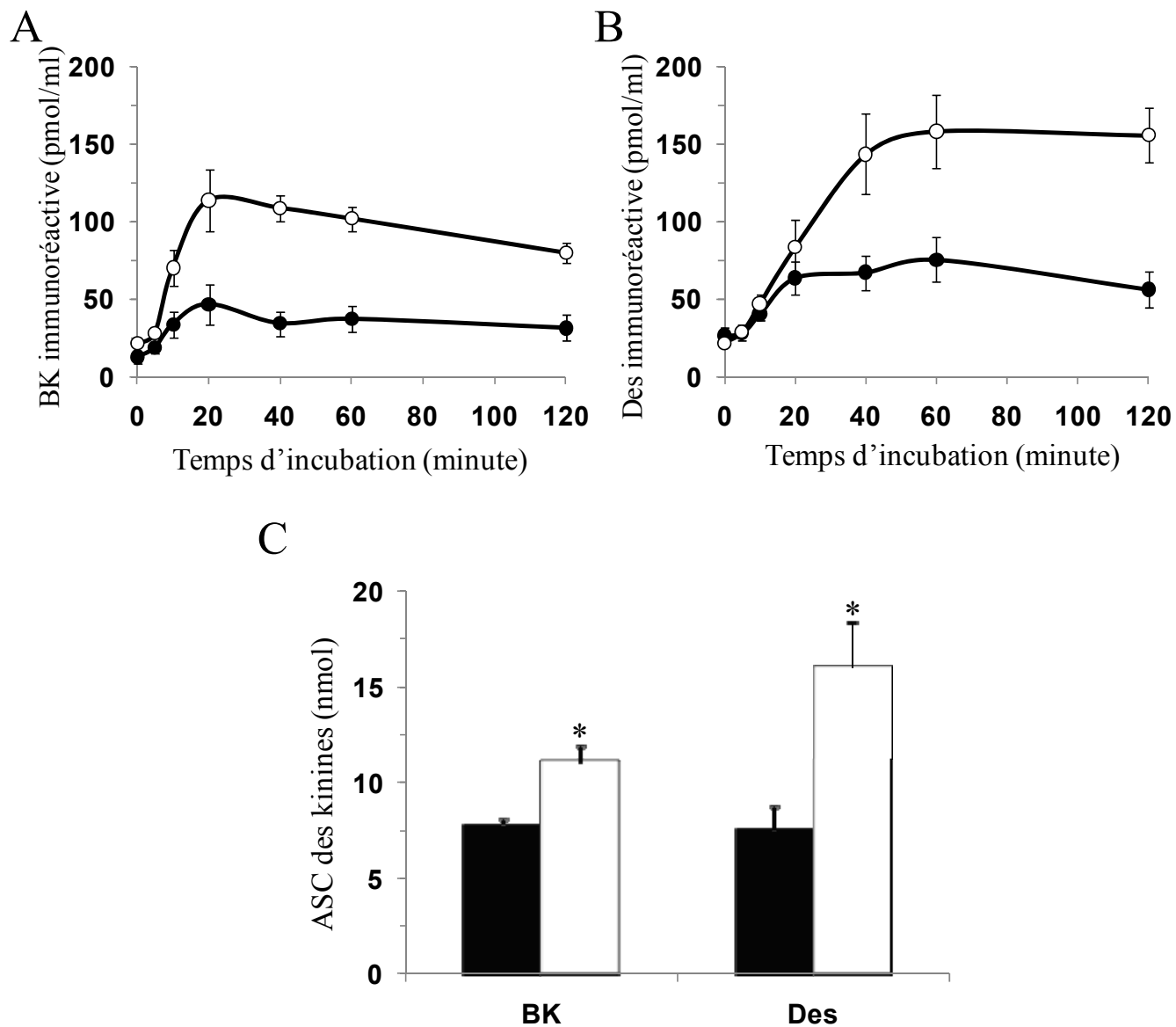


**Figure 18.** Corrélation entre la concentration de CSHS (%) contaminant (●) ou complémentant (■) l'héparine et le pic de libération (A) ou la quantité totale libérée (B) pendant 120 minutes dans un pool de plasma dilué à 50% et activé par 410 µg/ml d'héparine en présence d'un iECA (n=6). Les lots d'héparine associés aux RA sont représentés par des cercles vides (○). Les barres d'erreurs représentent l'erreur type; lorsque la valeur est trop basse, la barre n'est pas indiquée. (\*p<0,0001 comparé à l'héparine non contaminée)



## **5. Effet de l'activité plasmatique de l'APP sur le pouvoir kininogénerateur**

Les figures 19A et B illustrent de manière comparative les profils cinétiques moyens de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK respectivement lorsque les plasmas dilués à 50%, présentant une activité plasmatique de l'APP basse ou élevée, préincubés avec de l'énalaprilat, sont incubés en présence de 410 µg/ml d'héparine contaminée à 24,3 % par du CSHS (lot numéro 10) en présence d'un iECA. Autant pour la BK que pour la des-Arg<sup>9</sup>-BK, le pic de libération est significativement plus élevé pour les APP basses (BK : 114 ± 19 pmol/ml; des-Arg<sup>9</sup>-BK : 158 ± 24 pmol/ml) que pour l'APP haute (BK : 47 ± 13 pmol/ml; des-Arg<sup>9</sup>-BK : 75 ± 15 pmol/ml). Les plasmas ayant une activité plasmatique de l'APP basse ont un métabolisme des kinines qui est diminué (ASC BK : 11,1 ± 0,8 nmol; ASC des-Arg<sup>9</sup>-BK : 16 ± 2 nmol) par rapport aux plasmas ayant une activité élevée de l'APP (ASC BK : 7,8 ± 0,3 nmol; ASC des-Arg<sup>9</sup>-BK : 8 ± 1 nmol).

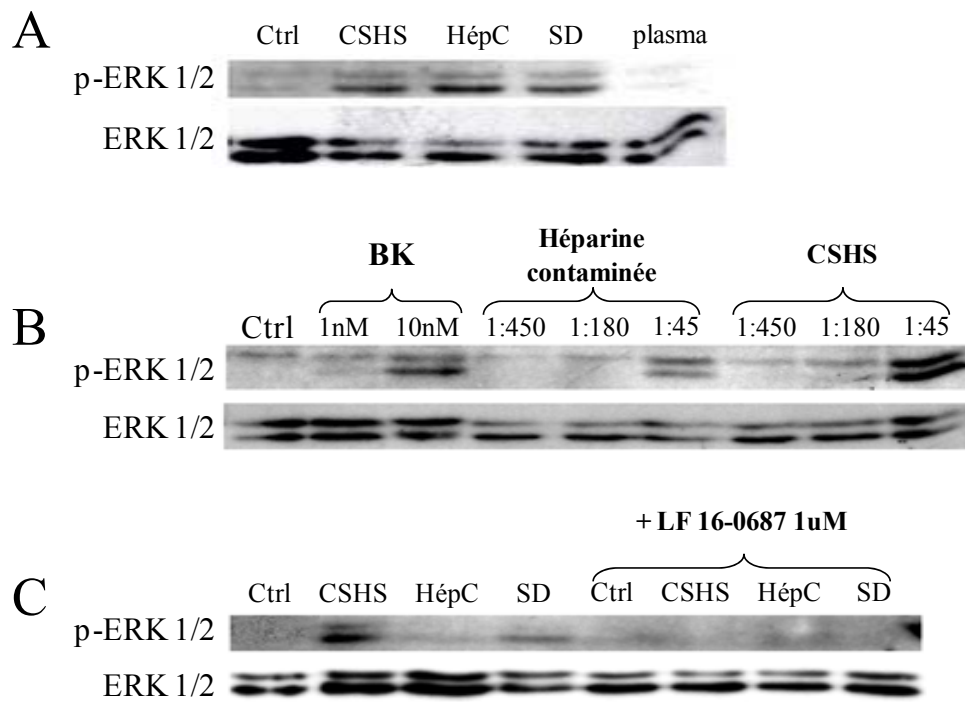


**Figure 19.** Les figures (A) et (B) représentent respectivement les profils cinétiques moyens (n=3) de la libération de BK et de la des-Arg<sup>9</sup>-BK sur des plasmas activés par 410 µg/ml d'héparine contaminée et ayant une activité plasmatique de l'APP haute (●) ou basse (○). C : ASC correspondant aux profils cinétiques illustrés en A et en B. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type. (\*p<0,02 comparé aux plasmas ayant une activité de l'APP haute)

## 6. Caractérisation de la BK

### 6.1 Caractérisation pharmacologique

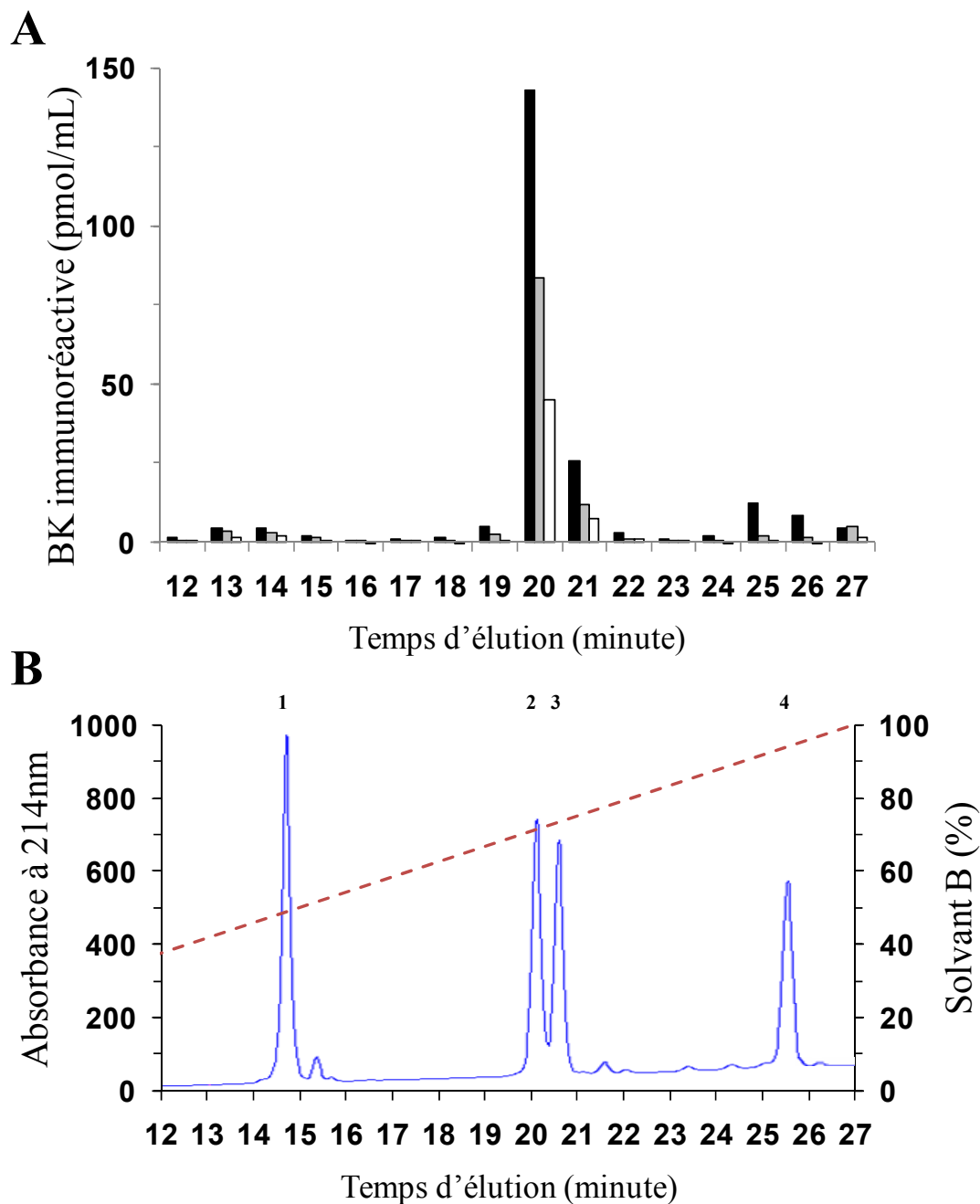
Dans des cellules HEK 293 surexprimant le RB2 lié à la GFP, les extraits éthanoliques des plasmas activés par le 100 µg/ml de CSHS, de SD ou de 410 µg/ml d'héparine contaminée (lot #10) active la phosphorylation de ERK1/2 (dilution finale de 1:45; **Figure 20A**). Cette activation n'est pas observée lorsque les cellules sont stimulées par des extraits éthanoliques de plasma n'ayant pas été activé préalablement. La figure 20B montre que plus l'extrait éthanolique est dilué, moins ERK1/2 sera activé. Une calibration réalisée avec de la BK pur permet également d'évaluer la quantité de BK présente dans les extraits éthanoliques dilués à 1:45 à près de 10 nM. De plus, lors de l'utilisation d'un antagoniste du RB2 (LF16-0687), l'activité pharmacologique des extraits éthanoliques provenant de plasmas activés avec du CSHS, du SD ou de l'héparine contaminée est grandement diminuée (**Figure 20C**).



**Figure 20. Réponses signalétiques de cellules HEK 293 surexprimant RB2 couplés à la GFP suite à leur induction par des extraits éthanologiques de plasma. A :** Immunoblots de ERK1/2 phosphorylé et de ERK1/2 total suite à 10 minutes d'incubation des cellules avec les extraits éthanologiques dilués (1:45) provenant de plasma ayant précédemment été incubés avec 100  $\mu\text{g/ml}$  de CSHS, de SD ou avec 410  $\mu\text{g/ml}$  d'héparine contaminée (hépC), ou du PBS correspondant respectivement à une concentration de BK immunoréactive de 5,6; 4,8; 18,1 et 0,0 pmol/ml. **B.** Effet de l'ajout de BK au milieu de culture ou de différentes dilutions des extraits éthanologiques provenant de l'activation du plasma par l'héparine contaminée ou par le CSHS. **C.** Effet de l'antagoniste du RB2 LF 16-0687 (1  $\mu\text{M}$ ) sur l'activation de ERK1/2 induite par les extraits éthanologiques.

## **6.2 Caractérisation physicochimique des kinines immunoréactives par séparation par chromatographie liquide à haute pression.**

Comme le montre la figure 21, un pic d'immunoréactivité (**figure 21A**) a pu être mesuré après 20 minutes d'élution. Ce pic correspond au temps de rétention de la BK standard illustré à la figure 21B.



**Figure 21. Profil d'élution de la BK immunoréactive suite à une HPLC.** A. BK libéré suite à l'activation du plasma par du SD (■), du CSHS (◻) ou de l'héparine contaminée au CSHS (□) B. Profil chromatographique standard des kinines dans un système HPLC utilisant une colonne échangeuse de cations (1 = des-Arg<sup>9</sup>-BK; 2 = BK; 3 = lys-BK; 4 = lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK).

## DISCUSSION

Quoique découverte il y a environ 100 ans, l'héparine est encore utilisée en clinique humaine (McLean, 1916, Liu *et al.*, 2009). Contrairement à d'autres médicaments d'origine biologique, tels que l'insuline ou l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant, l'héparine extraite des tissus animaux, en particulier de la muqueuse intestinale de porc, n'a pas, à ce jour, été remplacée par une héparine issue d'une méthode biotechnologique, et ce, même si des recherches intenses sont actuellement menées à cette fin (Toschi and Lettino, 2007, Lindahl *et al.*, 2005, Linhardt *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2008, Munoz *et al.*, 2006).

Le mécanisme d'action unique de l'héparine explique pourquoi à l'heure actuelle les besoins en cet anticoagulant sont si importants. De plus, le fait que le porc soit la seule source d'héparine permet de comprendre pourquoi la Chine (le plus important producteur de porcs) est le fournisseur principal d'héparine dont les besoins mondiaux sont estimés à plus de 100 tonnes/année (Villax, 2008).

Au milieu de l'année 2006, les porcs chinois ont été touchés par un virus s'attaquant au système reproducteur et respiratoire, communément appelé : « *Blue-Ear Disease* ». Au même moment, le coût de la nourriture pour les porcs a significativement augmenté. Ne pouvant financièrement supporter cette hausse du coût de production ainsi que les pertes occasionnées par le virus, un grand nombre d'éleveurs de porcs ont dû abandonner cette activité (Villax, 2008).

L'augmentation de la demande mondiale en héparine, la diminution du nombre d'éleveurs de porc en Chine ainsi que l'augmentation du coût d'élevage du porc a occasionné une augmentation directe du coût de production et du prix de vente de l'héparine (voir **Tableau 5.**). La combinaison de ces trois éléments pourrait expliquer pourquoi cette situation mondiale a conduit à l'introduction délibérée d'un contaminant proche de l'héparine douée de propriétés anticoagulantes et au coût de production étant 10 fois moindre (voir **Tableau 6.**) (Villax, 2008).

**Tableau 5.** Prix de vente moyen de l'héparine d'origine chinoise à la fin de l'année 2006 versus celui de la fin de l'année 2007 (Villax, 2008).

| Prix de vente de l'héparine |           |
|-----------------------------|-----------|
| 2006                        | 2007      |
| 1300\$/kg                   | 2700\$/kg |

Même si la source de cette contamination reste à ce jour inconnue, elle serait vraisemblablement passée inaperçue si ce ne fut cette incidence de RA associées à l'injection intraveineuse d'héparine d'origine chinoise principalement chez des patients dialysés. Le nombre de ces réactions, considéré par certains auteurs comme une véritable épidémie (Blossom *et al.*, 2008) ne rend cependant pas compte des réactions associées à l'utilisation des différents lots d'héparine contaminées et dispersées dans 11 pays et qui n'ont pas été rapportées aux autorités compétentes.

La détection du CSHS a en effet nécessité la mise en œuvre de méthodes d'investigations sophistiquées telle que la RMN à deux dimensions et l'électrophorèse capillaire. Le mécanisme physiopathologique des RA n'a cependant été que partiellement élucidé. Même si certaines évidences indirectes plaident pour un rôle des kinines, et en particulier de la BK, dans la symptomatologie de ces RA, aucune évidence définitive n'existait au moment de débiter mes travaux de maîtrise pour montrer que le contaminant d'origine synthétique possède un pouvoir kininogène.

**Tableau 6.** Profits engendrés par la substitution de l'héparine par du CSHS (Villax, 2008).

| Coût de Production |           | Marge de profit net | % de CSHS moyen par lot | Quantité d'héparine exporté durant la crise | Profit net           |
|--------------------|-----------|---------------------|-------------------------|---|----------------------|
| Héparine           | CSHS      |                     |                         |   |                      |
| >1000\$/kg         | <100\$/kg | 90%                 | 10%                     | 10 à 30 tonnes                              | 1 à 3 millions de \$ |



Pour tenter de mettre en évidence le pouvoir kininogène du CSHS, nous avons adapté, en le modifiant, un protocole expérimental mis au point dans notre laboratoire pour la définition des différents paramètres cinétiques caractérisant le métabolisme plasmatique des kinines chez le sujet normal (Decarie *et al.*, 1994, Raymond *et al.*, 1995) et chez les patients traités par un iECA et qui avaient développé un angioœdème (Adam *et al.*, 2002, Molinaro *et al.*, 2002a), une RA en dialyse (Molinaro *et al.*, 2006, Desormeaux *et al.*, 2008), ou une réaction d'hypotension sévère lors d'une transfusion sanguine (Moreau *et al.*, 2007, Arnold *et al.*, 2004).

Dans notre travail de Maîtrise, nous avons cependant remplacé l'activateur de référence de la phase contact de matière solide, les billes de verre, par un activateur soluble dans le plasma, le SD, plus proche par sa nature des différents GAG à être testés et, en particulier, du CSHS et de l'héparine contaminée. Au cours d'essais préliminaires, nous avons pris grands soins de standardiser les différents paramètres : prise de sang, préparation et conservation du plasma, des solutions stock des différents activateurs. Cette façon de faire nous a permis de mieux contrôler les facteurs de variations aléatoires associés à l'origine biologique des différents activateurs.

Dans ces conditions optimales d'incubations, nous avons, dans un premier temps, montré que le CSHS avait la capacité de libérer la BK immunoréactive lorsqu'il est incubé dans le pool de plasma en présence d'énalaprilat à la concentration nécessaire pour inhiber l'activité de l'ECA. Le pic de concentration de la BK libérée est cependant moindre et plus tardif que celui du SD à la même concentration. Cette observation peut être expliquée par une différence de structure et de masse moléculaire des deux activateurs. Le caractère tardif du pic de la BK relâché en présence de CSHS pouvait aussi suggérer l'activation d'une autre voie kininogène. En effet, dans une étude princeps consacrée au rôle des kinines dans la physiopathologie des angioœdèmes chez les patients souffrant d'un accident vasculaire cérébral et traités au moyen de l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant, Molinaro *et collaborateurs* avaient montré que la

plasmine a la capacité d'hydrolyser le KHPM et de libérer la BK avec un pic de concentration plus tardif (3 heures) que celui observé lors de l'activation de la phase contact (5 minutes) (Molinaro *et al.*, 2002b). Même si, Carranza *et collaborateurs* ont montré récemment que le CSHS potentialise l'action activatrice de l'activateur tissulaire du plasminogène, nous n'avons pu montrer une activation du plasminogène par le CSHS ni la libération subséquente de la BK (données non montrées)(Carranza *et al.*, 2008a, Carranza *et al.*, 2008b).

Dans ces mêmes conditions et à cette même concentration de 100 µg/ml, nous avons aussi observé un pouvoir kininogène, moins élevé cependant, du CSA, du CSB et de l'héparine. Ce pouvoir kininogène était environ 100 fois moindre. Ainsi, ces études nous montrent l'importance de la masse moléculaire et de la charge négative des différents GAG dans la libération des kinines. Cette première série d'incubation a été réalisée en présence d'un iECA pour 3 raisons au moins. D'abord, la présence de l'iECA rend moins fugace le pic de BK. En effet, dans des études précédentes (Decarie *et al.*, 1996b, Blais *et al.*, 1997b), nous avons montré que l'ECA est la voie métabolique majeure de la BK et compte pour plus de 50% de l'activité kininogène totale dans le plasma humain. La deuxième raison est que nous avons, dès le début, suspecté une similitude de physiopathologie entre les RA associées aux héparines contaminées par le CSHS et les RA associées à une membrane de dialyse chargée négativement chez les patients recevant un iECA. La troisième raison est que le quart des patients au moins ayant présenté une RA suite à l'injection intraveineuse d'héparine contaminée par le CSHS était traité par un iECA (Blossom *et al.*, 2008).

Le deuxième facteur que nous avons étudié est l'influence de la dilution du plasma sur la quantité de BK libérée au cours de l'incubation avec le CSHS ou le SD. Le facteur nous a semblé important à étudier puisque les RA se produisent au début de la dialyse au moment du branchement. À ce moment, le sang du patient arrive en contact avec le liquide de rinçage du dialyseur, le plus souvent une solution physiologique, et est dilué par ce dernier. C'est à ce moment que se produit un déséquilibre entre les protéases (FXIIa et KK) formées lors de l'activation du

système de contact et l'antiprotéase ( $C_1$ INH) responsable de l'inhibition de ces protéases à sérine. Ce déséquilibre est responsable de la formation de BK en quantité plus importante, non compensée par un métabolisme équivalent puisque l'ECA est bloquée et l'activité de l'APP et de la CPN est diminuée dans les mêmes proportions par la dilution du plasma. La quantité de BK accumulée lors de l'incubation en présence de SD et de CSHS augmente pour des concentrations de plasma variant de 90% à 20%, montrant ainsi que la quantité de KHPM n'est pas un facteur limitant de la quantité de BK libérée. Nous avons choisi pour la suite de notre travail une dilution de 50% compatible avec la situation clinique. Les essais réalisés sur une telle dilution du plasma en présence et en absence d'un iECA confirment et renforcent l'importance de l'inhibition de l'ECA dans la quantité de BK libérée et accumulée. De plus, dans ces mêmes conditions, nous montrons clairement qu'une concentration d'héparine de référence, compatible avec la concentration obtenue *in vivo* suite à un bolus intraveineux (Otterstad and Brosstad, 2003), à la capacité de libérer la BK à partir de son précurseur. Cette libération est cependant tout à fait différente tant qualitativement que quantitativement au profil mesuré en présence d'héparine contaminée et associée à une RA.

Dans ces conditions, compatibles avec la situation rencontrée au début de la dialyse, nous avons testé différents lots d'héparine soit additionnée de CSHS soit contaminée avec ce dernier. Nous montrons clairement une relation hautement significative entre la quantité de CSHS et le pic de concentration mesuré ou la quantité totale de BK accumulée au cours de l'incubation. Cette relation est particulièrement intéressante pour les lots d'héparine contaminée ayant causé une RA.

De plus, la corrélation hautement significative calculée entre la quantité de CSHS contaminant ou ajouté et le pic de concentration ou la quantité totale de BK libérée plaide en faveur d'une identité entre le CSHS de synthèse (Maruyama *et al.*, 1998) et celui isolé des lots d'héparine contaminée.

Après avoir étudié la nature du facteur kininogène, l'importance de la présence d'un agent pharmacologique (l'iECA) et de la dilution du plasma sur le profil cinétique de libération de la BK lors de l'activation du plasma, nous avons testé le facteur patient dans l'hypothèse d'un aspect multifactoriel des RA associées aux héparines contaminées d'origine chinoise. Pour ce faire, nous avons utilisé deux groupes de plasma provenant de patients dialysés avec une membrane en polyacrylonitrile, chargée négativement, et simultanément traités au moyen d'un iECA. La valeur de l'APP, deuxième voie métabolique de la BK et seule voie de dégradation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK en présence d'un iECA, permet de séparer ces échantillons plasmatiques. Les plasmas avec une activité plasmatique de l'APP basse proviennent de patients ayant présenté une RA dans les conditions de dialyse discutées ci-dessus. Les patients avec une activité de l'APP à l'intérieur de l'intervalle de référence n'avaient jamais présenté ce type d'inconvénient. Dans les conditions d'incubations discutées ci-dessus, nous montrons clairement que la valeur de l'APP influence la quantité de des-Arg<sup>9</sup>-BK formée, observation déjà rapportée par notre groupe pour les RA classiques en cours de dialyse. Cependant, dans ces conditions, pour la première fois, nous mettons en évidence l'influence de l'activité de l'APP sur l'accumulation de la BK et ce, grâce à la dilution du plasma.

La caractérisation physico-chimique, pharmacologique et métabolique de la BK immunoréactive complète les évidences partielles de la participation de la BK dans la physiopathologie des RA (Kishimoto *et al.*, 2008). Les évidences rapportées plus tôt par *Kishimoto et collaborateurs* consistent en une réaction hypotensive lorsque le matériel contaminé est injecté à un nombre limité de porcs, sans même apporter de précision sur la spécificité de l'effet pharmacologique. Cette spécificité aurait pu être mesurée à l'aide d'un antagoniste du RB2 tout comme rapporté lors des RA associées aux membranes de polyacrylonitrile (Krieter *et al.*, 1998).

Comme les anticorps utilisés pour la quantification de la BK réagissent également significativement avec la BK<sub>[2-9]</sub> dépourvue d'arginine en position 1 et d'activité pharmacologique, l'immunoréactivité détectée après séparation par HPLC

confirme que le peptide relâché durant l'activation du système de contact par le CSHS, l'héparine contaminée ou le SD correspond à la forme native de la BK et possède une activité pharmacologique pour le RB2.

La question que nous pouvons nous poser est la suivante : qu'elle est la signification physiopathologique de nos résultats? La quantité totale de BK pharmacologiquement active libérée lors de l'incubation du plasma avec les différents lots d'héparine contaminée variait entre 1,38 et 7,43 nmol. Cette quantité totale mesurée à l'aide de l'ASC corrobore avec le pic de concentration de BK des différentes conditions d'incubations. De plus, de telles quantités de BK libéré se retrouvent dans le même intervalle que les valeurs chez les patients traités au moyen d'un iECA et ayant présenté une RA en dialyse avec une membrane électronegative (Adam *et al.*, 2007). De même, une expérience *in vivo* a montré que le SD injecté par voie intraveineuse chez le lapin traité au moyen d'un iECA conduit à une réaction d'hypotension importante correspondant spécifiquement à l'hydrolyse du KHPM et à la libération de BK, cette hypothèse étant supprimée par l'injection d'un antagoniste du RB2 (Sabourin *et al.*, 2001).

## CONCLUSION

Dans ce mémoire, nous avons appliqué l'expertise développée dans notre laboratoire à l'étude d'un problème de santé publique associée à la mondialisation : le rôle des kinines, et en particulier celui de la BK et de la des-Arg<sup>9</sup>BK, dans la physiopathologie de RA associées à l'injection d'héparine contaminée par le CSHS.

Nos résultats complètent ceux publiés jusqu'à présent, mais montrent également le caractère complexe et multifactoriel des mécanismes conduisant à l'accumulation de BK et de des-Arg<sup>9</sup>-BK à des concentrations potentiellement responsables de la symptomatologie de ces RA potentiellement mortelles.

L'approche expérimentale développée dans notre mémoire peut être appliquée à des RA qui pourraient être associées à des contaminants d'autres médicaments injectables d'origine biologique comme le collagène ou le CSA par exemple.

D'autre part, des efforts de recherche intense sont actuellement développés pour remplacer l'héparine extraite de tissus animaux par une ou des héparines d'origine biotechnologique. Dans ce cas également, notre travail de mémoire pourrait être utile pour prévoir ce type d'effet secondaire avant la mise en marché de ces nouveaux médicaments injectables.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adam A., Albert A., Calay G., Closset J., Damas J. & Franchimont P. (1985) Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values. *Clin Chem* **31**, 423-426.
- Adam A., Cugno M., Molinaro G., Perez M., Lepage Y. & Agostoni A. (2002) Aminopeptidase P in individuals with a history of angio-oedema on ACE inhibitors. *Lancet* **359**, 2088-2089.
- Adam A., Desormeaux A. & Moreau M. E. (2007) [Physiopathology of the acute adverse effects of angiotensin-converting-enzyme inhibitors]. *Bull Acad Natl Med* **191**, 1433-1443; discussion 1443-1434.
- Agostoni A., Aygoren-Pursun E., Binkley K. E., Blanch A., Bork K., Bouillet L., Bucher C., Castaldo A. J., Cicardi M., Davis A. E., De Carolis C., Drouet C., Duponchel C., Farkas H., Fay K., Fekete B., Fischer B., Fontana L., Fust G., Giacomelli R., Groner A., Hack C. E., Harmat G., Jakenfelds J., Juers M., Kalmar L., Kaposi P. N., Karadi I., Kitzinger A., Kollar T., Kreuz W., Lakatos P., Longhurst H. J., Lopez-Trascasa M., Martinez-Saguer I., Monnier N., Nagy I., Nemeth E., Nielsen E. W., Nuijens J. H., O'grady C., Pappalardo E., Penna V., Perricone C., Perricone R., Rauch U., Roche O., Rusicke E., Spath P. J., Szendei G., Takacs E., Tordai A., Truedsson L., Varga L., Visy B., Williams K., Zanichelli A. & Zingale L. (2004) Hereditary and acquired angioedema: problems and progress: proceedings of the third C1 esterase inhibitor deficiency workshop and beyond. *J Allergy Clin Immunol* **114**, S51-131.
- Arnold D. M., Molinaro G., Warkentin T. E., Ditomasso J., Webert K. E., Davis I., Lesiuk L., Dunn G., Heddle N. M., Adam A. & Blajchman M. A. (2004) Hypotensive transfusion reactions can occur with blood products that are leukoreduced before storage. *Transfusion* **44**, 1361-1366.
- Austin C. E., Faussner A., Robinson H. E., Chakravarty S., Kyle D. J., Bathon J. M. & Proud D. (1997) Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. *J Biol Chem* **272**, 11420-11425.
- Bachvarov D. R., Houle S., Bachvarova M., Bouthillier J., Adam A. & Marceau F. (2001) Bradykinin B-2 receptor endocytosis, recycling, and down-regulation assessed using green fluorescent protein conjugates. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **297**, 19-26.
- Baglin T., Barrowcliffe T. W., Cohen A. & Greaves M. (2006) Guidelines on the use and monitoring of heparin. *Br J Haematol* **133**, 19-34.
- Banz Y., Gajanayake T., Matozan K., Yang Z. & Rieben R. (2009) Dextran sulfate modulates MAP kinase signaling and reduces endothelial injury in a rat aortic clamping model. *J Vasc Surg* **50**, 161-170.
- Barker P. E., Shipp M. A., D'adamio L., Masteller E. L. & Reinherz E. L. (1989) The common acute lymphoblastic leukemia antigen gene maps to chromosomal region 3 (q21-q27). *J Immunol* **142**, 283-287.

- Barrowcliffe T. W. (1995) Low molecular weight heparin(s). *Br J Haematol* **90**, 1-7.
- Basic-Jukic N. & Kes P. (2004) Severe anaphylactic reaction in a haemodialysis patient after administration of reviparin. *Nephrol Dial Transplant* **19**, 1021-1022.
- Bawolak M. T., Gera L., Morissette G., Stewart J. M. & Marceau F. (2007) B-9972 (D-Arg-[Hyp3,Igl5,Oic7,Igl8]-bradykinin) is an inactivation-resistant agonist of the bradykinin B2 receptor derived from the peptide antagonist B-9430 (D-Arg-[Hyp3,Igl5,D-Igl7,Oic8]-bradykinin): pharmacologic profile and effective induction of receptor degradation. *J Pharmacol Exp Ther* **323**, 534-546.
- Bazan J. F., Weaver L. H., Roderick S. L., Huber R. & Matthews B. W. (1994) Sequence and structure comparison suggest that methionine aminopeptidase, prolidase, aminopeptidase P, and creatinase share a common fold. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2473-2477.
- Beaubien G., Rosinski-Chupin I., Mattei M. G., Mbikay M., Chretien M. & Seidah N. G. (1991) Gene structure and chromosomal localization of plasma kallikrein. *Biochemistry* **30**, 1628-1635.
- Berkun Y., Haviv Y. S., Schwartz L. B. & Shalit M. (2004) Heparin-induced recurrent anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* **34**, 1916-1918.
- Bhoola K. D., Figueroa C. D. & Worthy K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* **44**, 1-80.
- Blais C., Jr., Couture R., Drapeau G., Colman R. W. & Adam A. (1997a) Involvement of endogenous kinins in the pathogenesis of peptidoglycan-induced arthritis in the Lewis rat. *Arthritis Rheum* **40**, 1327-1333.
- Blais C., Jr., Drapeau G., Raymond P., Lamontagne D., Gervais N., Venneman I. & Adam A. (1997b) Contribution of angiotensin-converting enzyme to the cardiac metabolism of bradykinin: an interspecies study. *Am J Physiol* **273**, H2263-2271.
- Blais C., Jr., Marc-Aurele J., Simmons W. H., Loute G., Thibault P., Skidgel R. A. & Adam A. (1999a) Des-Arg9-bradykinin metabolism in patients who presented hypersensitivity reactions during hemodialysis: role of serum ACE and aminopeptidase P. *Peptides* **20**, 421-430.
- Blais C., Jr., Marceau F., Rouleau J. L. & Adam A. (2000) The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides* **21**, 1903-1940.
- Blais C., Jr., Rouleau J. L., Brown N. J., Lepage Y., Spence D., Munoz C., Friborg J., Geadah D., Gervais N. & Adam A. (1999b) Serum metabolism of bradykinin and des-Arg9-bradykinin in patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema. *Immunopharmacology* **43**, 293-302.
- Blossom D. B., Kallen A. J., Patel P. R., Elward A., Robinson L., Gao G., Langer R., Perkins K. M., Jaeger J. L., Kurkjian K. M., Jones M., Schillie S. F., Shehab N., Ketterer D., Venkataraman G., Kishimoto T. K., Shriver Z., McMahon A. W., Austen K. F., Kozlowski S., Srinivasan A., Turabelidze G., Gould C. V., Arduino M. J. & Sasisekharan R. (2008) Outbreak of



- adverse reactions associated with contaminated heparin. *N Engl J Med* **359**, 2674-2684.
- Bottio T., Pittarello G., Bonato R., Fagiolo U. & Gerosa G. (2003) Life-threatening anaphylactic shock caused by porcine heparin intravenous infusion during mitral valve repair. *J Thorac Cardiovasc Surg* **126**, 1194-1195.
- Bright R. A., Torrence M. E., Daley W. R. & McClellan W. M. (1999) Preliminary survey of the occurrence of anaphylactoid reactions during haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* **14**, 799-800.
- Capila I. & Linhardt R. J. (2002) Heparin-protein interactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **41**, 391-412.
- Carranza Y. E., Anderson D. & Doctor V. (2008a) Effect of oversulfated chondroitin-6-sulfate or oversulfated fucoidan in the activation of glutamic plasminogen by tissue plasminogen activator: role of lysine and cyanogen bromide-fibrinogen. *Blood Coagul Fibrinolysis* **19**, 60-65.
- Carranza Y. E., Durand-Rougey C. & Doctor V. (2008b) Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of chondroitin-4-sulfate. *Blood Coagul Fibrinolysis* **19**, 483-487.
- Casu B. (1985) Structure and biological activity of heparin. *Adv Carbohydr Chem Biochem* **43**, 51-134.
- Cayla C., Merino V. F., Cabrini D. A., Silva J. A., Jr., Pesquero J. B. & Bader M. (2002) Structure of the mammalian kinin receptor gene locus. *Int Immunopharmacol* **2**, 1721-1727.
- Cdc (2008) Acute allergic-type reactions among patients undergoing hemodialysis--multiple states, 2007-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **57**, 124-125.
- Chanard J. (2008) [Anaphylaxis-like reactions in haemodialysis]. *Nephrol Ther* **4**, 301-305.
- Chatellier V. (2009) Bilan et perspectives pour les productions agricoles dans le contexte de la mondialisation et de la PAC. *Association de Gestion et de Comptabilité, Agriculture, Artisanat et commerce*.
- Chong B. H. & Ismail F. (1989) The mechanism of heparin-induced platelet aggregation. *Eur J Haematol* **43**, 245-251.
- Chung D. W., Fujikawa K., McMullen B. A. & Davie E. W. (1986) Human plasma prekallikrein, a zymogen to a serine protease that contains four tandem repeats. *Biochemistry* **25**, 2410-2417.
- Clements J., Hooper J., Dong Y. & Harvey T. (2001) The expanded human kallikrein (KLK) gene family: genomic organisation, tissue-specific expression and potential functions. *Biol Chem* **382**, 5-14.
- Cochrane C. G. & Griffin J. H. (1982) The biochemistry and pathophysiology of the contact system of plasma. *Adv Immunol* **33**, 241-306.
- Cohen S. G. & Zelaya-Quesada M. (2002) Portier, Richet, and the discovery of anaphylaxis: a centennial. *J Allergy Clin Immunol* **110**, 331-336.
- Colman R. W., Pixley R. A., Najamunnisa S., Yan W., Wang J., Mazar A. & McCrae K. R. (1997) Binding of high molecular weight kininogen to

- human endothelial cells is mediated via a site within domains 2 and 3 of the urokinase receptor. *J Clin Invest* **100**, 1481-1487.
- Colman R. W. & Schmaier A. H. (1997) Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* **90**, 3819-3843.
- Cottrell G. S., Hooper N. M. & Turner A. J. (2000) Cloning, expression, and characterization of human cytosolic aminopeptidase P: a single manganese(II)-dependent enzyme. *Biochemistry* **39**, 15121-15128.
- Couture R., Harrisson M., Vianna R. M. & Cloutier F. (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* **429**, 161-176.
- Cruwys S. C., Garrett N. E., Perkins M. N., Blake D. R. & Kidd B. L. (1994) The role of bradykinin B1 receptors in the maintenance of intra-articular plasma extravasation in chronic antigen-induced arthritis. *Br J Pharmacol* **113**, 940-944.
- Cyr M., Hume H. A., Champagne M., Sweeney J. D., Blais C., Jr., Gervais N. & Adam A. (1999) Anomaly of the des-Arg<sup>9</sup>-bradykinin metabolism associated with severe hypotensive reactions during blood transfusions: a preliminary study. *Transfusion* **39**, 1084-1088.
- Daugirdas J. T. & Ing T. S. (1988) First-use reactions during hemodialysis: a definition of subtypes. *Kidney Int Suppl* **24**, S37-43.
- Davi G. & Patrono C. (2007) Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* **357**, 2482-2494.
- Davie E. W. & Ratnoff O. D. (1964) Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science* **145**, 1310-1312.
- Day A. A., Ramis C. I., Fisher L. W., Gehron-Robey P., Termine J. D. & Young M. F. (1986) Characterization of bone PG II cDNA and its relationship to PG II mRNA from other connective tissues. *Nucleic Acids Res* **14**, 9861-9876.
- Decarie A., Adam A. & Couture R. (1996a) Effects of captopril and Icatibant on bradykinin (BK) and des [Arg<sup>9</sup>] BK in carrageenan-induced edema. *Peptides* **17**, 1009-1015.
- Decarie A., Drapeau G., Closset J., Couture R. & Adam A. (1994) Development of digoxigenin-labeled peptide: application to chemiluminoenzyme immunoassay of bradykinin in inflamed tissues. *Peptides* **15**, 511-518.
- Decarie A., Raymond P., Gervais N., Couture R. & Adam A. (1996b) Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg<sup>9</sup>]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* **271**, H1340-1347.
- Dela Cadena R. A. & Colman R. W. (1991) Structure and functions of human kininogens. *Trends Pharmacol Sci* **12**, 272-275.
- Desai U. R., Petitou M., Bjork I. & Olson S. T. (1998) Mechanism of heparin activation of antithrombin. Role of individual residues of the pentasaccharide activating sequence in the recognition of native and activated states of antithrombin. *J Biol Chem* **273**, 7478-7487.
- Desormeaux A., Moreau M. E., Lepage Y., Chanard J. & Adam A. (2008) The effect of electronegativity and angiotensin-converting enzyme inhibition on

- the kinin-forming capacity of polyacrylonitrile dialysis membranes. *Biomaterials* **29**, 1139-1146.
- Dobrovolsky A. B. & Titaeva E. V. (2002) The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. *Biochemistry (Mosc)* **67**, 99-108.
- Drouin J. N., St-Pierre S. A. & Regoli D. (1979) Receptors for bradykinin and kallidin. *Can J Physiol Pharmacol* **57**, 375-379.
- Duan Q. L., Nikpoor B., Dube M. P., Molinaro G., Meijer I. A., Dion P., Rochefort D., Saint-Onge J., Flury L., Brown N. J., Gainer J. V., Rouleau J. L., Agostoni A., Cugno M., Simon P., Clavel P., Potier J., Wehbe B., Benarbia S., Marc-Aurele J., Chanard J., Foroud T., Adam A. & Rouleau G. A. (2005) A variant in XPNPEP2 is associated with angioedema induced by angiotensin I-converting enzyme inhibitors. *Am J Hum Genet* **77**, 617-626.
- Enerbäck L. (1989) The mast cell system. In: *Heparin : chemical and biological properties, clinical applications* (eds. LANE, D. A. & LINDAHL, U.), pp. xii, 623. CRC Press ; E. Arnold, Boca Raton, Fla. London.
- Erdos E. G. (1990) Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* **15 Suppl 6**, S20-24.
- Erdős E. G. & Skidgel R. A. (1997) Metabolism of bradykinin by peptidases in health and disease. In: *The Kinin System* (ed. FARMER, S. G.), pp. 111-141. Academic Press, San Diego, CA.
- Ersahin C. & Simmons W. H. (1997) Inhibition of both aminopeptidase P and angiotensin-converting enzyme prevents bradykinin degradation in the rat coronary circulation. *J Cardiovasc Pharmacol* **30**, 96-101.
- Esko J. D. & Selleck S. B. (2002) Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem* **71**, 435-471.
- Fabris F., Fussi F., Casonato A., Visentin L., Randi M., Smith M. R. & Girolami A. (1983) Normal and low molecular weight heparins: interaction with human platelets. *Eur J Clin Invest* **13**, 135-139.
- Fareed J., Jeske W., Hoppensteadt D., Clarizio R. & Walenga J. M. (1998) Low-molecular-weight heparins: pharmacologic profile and product differentiation. *Am J Cardiol* **82**, 3L-10L.
- Faussner A., Bathon J. M. & Proud D. (1999) Comparison of the responses of B1 and B2 kinin receptors to agonist stimulation. *Immunopharmacology* **45**, 13-20.
- Fda (2008) Information on Heparin. U.S. Food and Drug Administration.
- Femia A. P., Dolara P., Luceri C., Salvadori M. & Caderni G. (2009) Mucin-depleted foci show strong activation of inflammatory markers in 1,2-dimethylhydrazine-induced carcinogenesis and are promoted by the inflammatory agent sodium dextran sulfate. *Int J Cancer* **125**, 541-547.
- Fiedler F. (1979) Enzymology of glandular kallikrein. In: *Bradykinin, Kallidin and Kallikrein* (ed. ERDÖS, E. G.), pp. 103-161. Springer-Verlag, Berlin.
- Fisher L. W., Termine J. D. & Young M. F. (1989) Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II

- (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* **264**, 4571-4576.
- Fogaca S. E., Melo R. L., Pimenta D. C., Hosoi K., Juliano L. & Juliano M. A. (2004) Differences in substrate and inhibitor sequence specificity of human, mouse and rat tissue kallikreins. *Biochem J* **380**, 775-781.
- Friedman R. L. (2008) Warning Letters. Food and Drug Administration.
- Gafford J. T., Skidgel R. A., Erdos E. G. & Hersh L. B. (1983) Human kidney "enkephalinase", a neutral metalloendopeptidase that cleaves active peptides. *Biochemistry* **22**, 3265-3271.
- Gallagher J. T. (2006) Multiprotein signalling complexes: regional assembly on heparan sulphate. *Biochem Soc Trans* **34**, 438-441.
- Gorp C. V. & Schubert R. (1997) Protein hydrolysate derived from mucosa tissue. *US patent 5607840*.
- Greinacher A. & Warkentin T. E. (2008) The direct thrombin inhibitor hirudin. *Thromb Haemost* **99**, 819-829.
- Guerrini M., Beccati D., Shriver Z., Naggi A., Viswanathan K., Bisio A., Capila I., Lansing J. C., Guglieri S., Fraser B., Al-Hakim A., Gunay N. S., Zhang Z., Robinson L., Buhse L., Nasr M., Woodcock J., Langer R., Venkataraman G., Linhardt R. J., Casu B., Torri G. & Sasisekharan R. (2008) Oversulfated chondroitin sulfate is a contaminant in heparin associated with adverse clinical events. *Nat Biotechnol* **26**, 669-675.
- Gutowski S., Smrcka A., Nowak L., Wu D. G., Simon M. & Sternweis P. C. (1991) Antibodies to the alpha q subfamily of guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunits attenuate activation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by hormones. *J Biol Chem* **266**, 20519-20524.
- Hagaman J. R., Moyer J. S., Bachman E. S., Sibony M., Magyar P. L., Welch J. E., Smithies O., Kregge J. H. & O'Brien D. A. (1998) Angiotensin-converting enzyme and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2552-2557.
- Hasan A. A., Zisman T. & Schmaier A. H. (1998) Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3615-3620.
- Herwald H., Dedio J., Kellner R., Loos M. & Muller-Esterl W. (1996) Isolation and characterization of the kininogen-binding protein p33 from endothelial cells. Identity with the gC1q receptor. *J Biol Chem* **271**, 13040-13047.
- Higashiyama S., Ohkubo I., Ishiguro H., Sasaki M., Matsuda T. & Nakamura R. (1987) Heavy chain of human high molecular weight and low molecular weight kininogens binds calcium ion. *Biochemistry* **26**, 7450-7458.
- Hooper N. M. (1994) Families of zinc metalloproteases. *FEBS Lett* **354**, 1-6.
- Hooper N. M. & Turner A. J. (1988) Ecto-enzymes of the kidney microvillar membrane. Aminopeptidase P is anchored by a glycosyl-phosphatidylinositol moiety. *FEBS Lett* **229**, 340-344.
- Howell W. H. & Holt E. (1918) Two new factors in blood coagulation - heparin and pro-antithrombin. *AJP* **47**, 328-341.
- Hubert C., Houot A. M., Corvol P. & Soubrier F. (1991) Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters

- correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* **266**, 15377-15383.
- Iozzo R. V. (2001) Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *J Clin Invest* **108**, 165-167.
- Jennings L. K. (2009) Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost* **102**, 248-257.
- Jiang Y. P., Muller-Esterl W. & Schmaier A. H. (1992) Domain 3 of kininogens contains a cell-binding site and a site that modifies thrombin activation of platelets. *J Biol Chem* **267**, 3712-3717.
- Jin L., Abrahams J. P., Skinner R., Petitou M., Pike R. N. & Carrell R. W. (1997) The anticoagulant activation of antithrombin by heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14683-14688.
- Joseph K., Ghebrehwet B. & Kaplan A. P. (2001) Activation of the kinin-forming cascade on the surface of endothelial cells. *Biol Chem* **382**, 71-75.
- Joseph K., Ghebrehwet B., Peerschke E. I., Reid K. B. & Kaplan A. P. (1996) 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 (gC1q-R). *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 8552-8557.
- Ju H., Venema V. J., Liang H., Harris M. B., Zou R. & Venema R. C. (2000) Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochem J* **351**, 257-264.
- Kanazawa M., Casley D. J., Sybertz E. J., Haslanger M. F. & Johnston C. I. (1992) Localization and characterization of neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11), the degradative enzyme for atrial natriuretic peptide, in rat kidney using a radioiodinated neutral metalloendopeptidase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* **261**, 1231-1237.
- Kaplan A. P., Joseph K., Shibayama Y., Nakazawa Y., Ghebrehwet B., Reddigari S. & Silverberg M. (1998) Bradykinin formation. Plasma and tissue pathways and cellular interactions. *Clin Rev Allergy Immunol* **16**, 403-429.
- Kaplan A. P., Joseph K., Shibayama Y., Reddigari S. & Ghebrehwet B. (2001) Activation of the plasma kinin forming cascade along cell surfaces. *Int Arch Allergy Immunol* **124**, 339-342.
- Kaplan A. P., Joseph K., Shibayama Y., Reddigari S., Ghebrehwet B. & Silverberg M. (1997) The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation. *Adv Immunol* **66**, 225-272.
- Kaplan A. P., Joseph K. & Silverberg M. (2002) Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J Allergy Clin Immunol* **109**, 195-209.
- Keire D. A., Trehy M. L., Reepmeyer J. C., Kolinski R. E., Ye W., Dunn J., Westenberger B. J. & Buhse L. F. (2009) Analysis of crude heparin by (1)H NMR, capillary electrophoresis, and strong-anion-exchange-HPLC

- for contamination by over sulfated chondroitin sulfate. *J Pharm Biomed Anal*.
- Kellermann J., Lottspeich F., Henschen A. & Muller-Esterl W. (1986) Completion of the primary structure of human high-molecular-mass kininogen. The amino acid sequence of the entire heavy chain and evidence for its evolution by gene triplication. *Eur J Biochem* **154**, 471-478.
- Kemp S. F. & Lockey R. F. (2002) Anaphylaxis: a review of causes and mechanisms. *J Allergy Clin Immunol* **110**, 341-348.
- Kerr M. A. & Kenny A. J. (1974) The purification and specificity of a neutral endopeptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem J* **137**, 477-488.
- Kiefer T. L. & Becker R. C. (2009) Inhibitors of platelet adhesion. *Circulation* **120**, 2488-2495.
- Kimata K., Okayama M., Ooira A. & Suzuki S. (1973) Cytodifferentiation and proteoglycan biosynthesis. *Mol Cell Biochem* **1**, 211-228.
- Kishimoto T. K., Viswanathan K., Ganguly T., Elankumaran S., Smith S., Pelzer K., Lansing J. C., Sriranganathan N., Zhao G., Galcheva-Gargova Z., Al-Hakim A., Bailey G. S., Fraser B., Roy S., Rogers-Cotrone T., Buhse L., Whary M., Fox J., Nasr M., Dal Pan G. J., Shriver Z., Langer R. S., Venkataraman G., Austen K. F., Woodcock J. & Sasisekharan R. (2008) Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system. *N Engl J Med* **358**, 2457-2467.
- Kitamura N., Kitagawa H., Fukushima D., Takagaki Y., Miyata T. & Nakanishi S. (1985) Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J Biol Chem* **260**, 8610-8617.
- Krieter D. H., Grude M., Lemke H. D., Fink E., Bonner G., Scholkens B. A., Schulz E. & Muller G. A. (1998) Anaphylactoid reactions during hemodialysis in sheep are ACE inhibitor dose-dependent and mediated by bradykinin. *Kidney Int* **53**, 1026-1035.
- Kurachi K., Fujikawa K., Schmer G. & Davie E. W. (1976) Inhibition of bovine factor IXa and factor Xbeta by antithrombin III. *Biochemistry* **15**, 373-377.
- Lacour F. & Maheut H. (1992) [AN 69 membrane and conversion enzyme inhibitors: prevention of anaphylactic shock by alkaline rinsing?]. *Nephrologie* **13**, 135-136.
- Lambeir A. M., Durinx C., Scharpe S. & De Meester I. (2003) Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci* **40**, 209-294.
- Lasch J., Moschner S., Sann H., Zellmer S. & Koelsch R. (1998) Aminopeptidase P--a cell-surface antigen of endothelial and lymphoid cells: catalytic and immuno-histotopical evidences. *Biol Chem* **379**, 705-709.
- Laster J. L., Nichols W. K. & Silver D. (1989) Thrombocytopenia associated with heparin-coated catheters in patients with heparin-associated antiplatelet antibodies. *Arch Intern Med* **149**, 2285-2287.
- Leeb-Lundberg L. M., Marceau F., Muller-Esterl W., Pettibone D. J. & Zuraw B. L. (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the

- kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* **57**, 27-77.
- Levieux D. (2008) Sécurité sanitaire des héparines chinoises. IDBiotech.
- Levieux D. & Levieux A. (2001) Immunochemical control of the species origin of intestinal mucosa used for heparin purification. *J Immunoassay Immunochem* **22**, 127-145.
- Liesmaa I., Kuoppala A., Shiota N., Kokkonen J. O., Kostner K., Mayranpaa M., Kovanen P. T. & Lindstedt K. A. (2005) Increased expression of bradykinin type-1 receptors in endothelium of intramyocardial coronary vessels in human failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**, H2317-2322.
- Lin Y., Pixley R. A. & Colman R. W. (2000) Kinetic analysis of the role of zinc in the interaction of domain 5 of high-molecular weight kininogen (HK) with heparin. *Biochemistry* **39**, 5104-5110.
- Lindahl U., Backstrom G., Thunberg L. & Leder I. G. (1980) Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 6551-6555.
- Lindahl U., Li J. P., Kusche-Gullberg M., Salmivirta M., Alaranta S., Veromaa T., Emeis J., Roberts I., Taylor C., Oreste P., Zoppetti G., Naggi A., Torri G. & Casu B. (2005) Generation of "neoheparin" from E. coli K5 capsular polysaccharide. *J Med Chem* **48**, 349-352.
- Linhardt R. J. (2003) 2003 Claude S. Hudson Award address in carbohydrate chemistry. Heparin: structure and activity. *J Med Chem* **46**, 2551-2564.
- Linhardt R. J., Dordick J. S., Deangelis P. L. & Liu J. (2007) Enzymatic synthesis of glycosaminoglycan heparin. *Semin Thromb Hemost* **33**, 453-465.
- Linhardt R. J., Loganathan D., Al-Hakim A., Wang H. M., Walenga J. M., Hoppensteadt D. & Fareed J. (1990a) Oligosaccharide mapping of low molecular weight heparins: structure and activity differences. *J Med Chem* **33**, 1639-1645.
- Linhardt R. J., Rice K. G., Kim Y. S., Lohse D. L., Wang H. M. & Loganathan D. (1988) Mapping and quantification of the major oligosaccharide components of heparin. *Biochem J* **254**, 781-787.
- Linhardt R. J., Turnbull J. E., Wang H. M., Loganathan D. & Gallagher J. T. (1990b) Examination of the substrate specificity of heparin and heparan sulfate lyases. *Biochemistry* **29**, 2611-2617.
- Liu H., Zhang Z. & Linhardt R. J. (2009) Lessons learned from the contamination of heparin. *Nat Prod Rep* **26**, 313-321.
- Lonnemann G. (2000) Chronic inflammation in hemodialysis: the role of contaminated dialysate. *Blood Purif* **18**, 214-223.
- Lubenow N., Eichler P., Lietz T., Farner B. & Greinacher A. (2004) Lepirudin for prophylaxis of thrombosis in patients with acute isolated heparin-induced thrombocytopenia: an analysis of 3 prospective studies. *Blood* **104**, 3072-3077.
- Macfarlane R. G. (1964) An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature* **202**, 498-499.

- Mahabeer R. & Bhoola K. D. (2000) Kallikrein and kinin receptor genes. *Pharmacol Ther* **88**, 77-89.
- Maimone M. M. & Tollefsen D. M. (1990) Structure of a dermatan sulfate hexasaccharide that binds to heparin cofactor II with high affinity. *J Biol Chem* **265**, 18263-18271.
- Mandle R. J., Colman R. W. & Kaplan A. P. (1976) Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 4179-4183.
- Marceau F. (1995) Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology* **30**, 1-26.
- Marceau F., Adam A., Houle S., Bouthillier J., Bachvarova M. & Bachvarov D. R. (2001) Ligand-mediated regulation of kinin receptors in the rabbit. *Biol Chem* **382**, 131-133.
- Margolius H. S. (1996) Kallikreins and kinins. Molecular characteristics and cellular and tissue responses. *Diabetes* **45 Suppl 1**, S14-19.
- Margolius H. S. (1998) Tissue kallikreins structure, regulation, and participation in mammalian physiology and disease. *Clin Rev Allergy Immunol* **16**, 337-349.
- Maruyama T., Toida T., Imanari T., Yu G. & Linhardt R. J. (1998) Conformational changes and anticoagulant activity of chondroitin sulfate following its O-sulfonation. *Carbohydr Res* **306**, 35-43.
- Mathis S. A., Criscimagna N. L. & Leeb-Lundberg L. M. (1996) B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **50**, 128-139.
- McLean J. (1916) The thromboplastic action of cephalin. *AJP* **41**, 250-257.
- McLean J. (1959) The discovery of heparin. *Circulation* **19**, 75-78.
- Meijers J. C., Kanters D. H., Vlooswijk R. A., Van Erp H. E., Hessing M. & Bouma B. N. (1988) Inactivation of human plasma kallikrein and factor XIa by protein C inhibitor. *Biochemistry* **27**, 4231-4237.
- Molinaro G., Carmona A. K., Juliano M. A., Juliano L., Malitskaya E., Yessine M. A., Chagnon M., Lepage Y., Simmons W. H., Boileau G. & Adam A. (2005) Human recombinant membrane-bound aminopeptidase P: production of a soluble form and characterization using novel, internally quenched fluorescent substrates. *Biochem J* **385**, 389-397.
- Molinaro G., Cugno M., Perez M., Lepage Y., Gervais N., Agostoni A. & Adam A. (2002a) Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema is characterized by a slower degradation of des-arginine(9)-bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther* **303**, 232-237.
- Molinaro G., Duan Q. L., Chagnon M., Moreau M. E., Simon P., Clavel P., Lavaud S., Boileau G., Rouleau G. A., Lepage Y., Adam A. & Chanard J. (2006) Kinin-dependent hypersensitivity reactions in hemodialysis: metabolic and genetic factors. *Kidney Int* **70**, 1823-1831.
- Molinaro G., Gervais N. & Adam A. (2002b) Biochemical basis of angioedema associated with recombinant tissue plasminogen activator treatment: an in vitro experimental approach. *Stroke* **33**, 1712-1716.



- Moreau M. E., Garbacki N., Molinaro G., Brown N. J., Marceau F. & Adam A. (2005) The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* **99**, 6-38.
- Moreau M. E., Thibault L., Desormeaux A., Chagnon M., Lemieux R., Robillard P., Marceau F., Colman R. W., Lepage Y., Rivard G. E. & Adam A. (2007) Generation of kinins during preparation and storage of whole blood-derived platelet concentrates. *Transfusion* **47**, 410-420.
- Mori K., Sakamoto W. & Nagasawa S. (1981) Studies on human high molecular weight (HMW) kininogen. III. Cleavage of HMW kininogen by the action of human salivary kallikrein. *J Biochem* **90**, 503-509.
- Motta G., Rojkaer R., Hasan A. A., Cines D. B. & Schmaier A. H. (1998) High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation. *Blood* **91**, 516-528.
- Movat H. Z. (1979) The plasma kallikrein-kinin system and its interrelationship with other components of the blood. In: *Bradykinin, Kallidin and Kallikrein* (ed. ERDÖS, E. G.), pp. 1-89. Springer-Verlag, Berlin.
- Müller-Esterl W., Iwanaga S. & Nakanishi S. (1986) Kininogens revisited. *Trends Biochem Sci* **11**, 336-339.
- Muller F. & Renne T. (2008) Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system. *Curr Opin Hematol* **15**, 516-521.
- Munoz C. M., Cotecchia S. & Leeb-Lundberg L. M. (1993) B2 kinin receptor-mediated internalization of bradykinin in DDT1 MF-2 smooth muscle cells is paralleled by sequestration of the occupied receptors. *Arch Biochem Biophys* **301**, 336-344.
- Munoz C. M. & Leeb-Lundberg L. M. (1992) Receptor-mediated internalization of bradykinin. DDT1 MF-2 smooth muscle cells process internalized bradykinin via multiple degradative pathways. *J Biol Chem* **267**, 303-309.
- Munoz E., Xu D., Avci F., Kemp M., Liu J. & Linhardt R. J. (2006) Enzymatic synthesis of heparin related polysaccharides on sensor chips: rapid screening of heparin-protein interactions. *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 597-602.
- Munoz E. M. & Linhardt R. J. (2004) Heparin-binding domains in vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1549-1557.
- Murray G. D. & Best C. H. (1938) The Use of Heparin in Thrombosis. *Ann Surg* **108**, 163-177.
- Nader H. B. & Dietrich C. P. (1989) Natural occurrence and possible biological role of heparin. In: *Heparin : chemical and biological properties, clinical applications* (eds. LANE, D. A. & LINDAHL, U.), pp. 115-133. CRC Press ; E. Arnold, Boca Raton, Fla. London.
- Neufert C., Becker C. & Neurath M. F. (2007) An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc* **2**, 1998-2004.
- Nishikawa K., Shibayama Y., Kuna P., Calcaterra E., Kaplan A. P. & Reddigari S. R. (1992) Generation of vasoactive peptide bradykinin from human

- umbilical vein endothelium-bound high molecular weight kininogen by plasma kallikrein. *Blood* **80**, 1980-1988.
- Norris L. A. (2003) Blood coagulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **17**, 369-383.
- Nube M. J. & Grooteman M. P. (2001) Impact of contaminated dialysate on long-term haemodialysis-related complications: is it really that important? *Nephrol Dial Transplant* **16**, 1986-1991.
- Okamoto H. & Greenbaum L. M. (1983) Isolation and structure of T-kinin. *Biochem Biophys Res Commun* **112**, 701-708.
- Olson S. T., Bjork I., Sheffer R., Craig P. A., Shore J. D. & Choay J. (1992) Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement. *J Biol Chem* **267**, 12528-12538.
- Otterstad J. E. & Brosstad F. (2003) Results from clinical trials on ST-elevation myocardial infarction in a historic perspective with some pathophysiological aspects. *Scand Cardiovasc J* **37**, 316-323.
- Pacheco B., Malmstrom A. & Maccarana M. (2009) Two dermatan sulfate epimerases form iduronic acid domains in dermatan sulfate. *J Biol Chem* **284**, 9788-9795.
- Pangburn M. K., Atkinson M. A. & Meri S. (1991) Localization of the heparin-binding site on complement factor H. *J Biol Chem* **266**, 16847-16853.
- Pelorosso F. G., Brodsky P. T., Zold C. L. & Rothlin R. P. (2005) Potentiation of des-Arg9-kallidin-induced vasoconstrictor responses by metallopeptidase inhibition in isolated human umbilical artery. *J Pharmacol Exp Ther* **313**, 1355-1360.
- Pervin A., Gallo C., Jandik K. A., Han X. J. & Linhardt R. J. (1995) Preparation and structural characterization of large heparin-derived oligosaccharides. *Glycobiology* **5**, 83-95.
- Pesquero J. B., Araujo R. C., Heppenstall P. A., Stucky C. L., Silva J. A., Jr., Walther T., Oliveira S. M., Pesquero J. L., Paiva A. C., Calixto J. B., Lewin G. R. & Bader M. (2000) Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8140-8145.
- Petitou M., Barzu T., Herault J. P. & Herbert J. M. (1997) A unique trisaccharide sequence in heparin mediates the early step of antithrombin III activation. *Glycobiology* **7**, 323-327.
- Petitou M. & Van Boeckel C. A. (2004) A synthetic antithrombin III binding pentasaccharide is now a drug! What comes next? *Angew Chem Int Ed Engl* **43**, 3118-3133.
- Pike R. N., Buckle A. M., Le Bonniec B. F. & Church F. C. (2005) Control of the coagulation system by serpins. Getting by with a little help from glycosaminoglycans. *FEBS J* **272**, 4842-4851.
- Prechel M. M., Orawski A. T., Maggiora L. L. & Simmons W. H. (1995) Effect of a new aminopeptidase P inhibitor, apstatin, on bradykinin degradation in the rat lung. *J Pharmacol Exp Ther* **275**, 1136-1142.

- Pruneau D., Paquet J. L., Luccarini J. M., Defrene E., Fouchet C., Franck R. M., Loillier B., Robert C., Belichard P., Duclos H., Cremers B. & Dodey P. (1999) Pharmacological profile of LF 16-0687, a new potent non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist. *Immunopharmacology* **43**, 187-194.
- Rawlings N. D. & Barrett A. J. (2000) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **28**, 323-325.
- Raymond P., Drapeau G., Raut R., Audet R., Marceau F., Ong H. & Adam A. (1995) Quantification of des-Arg9-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. *J Immunol Methods* **180**, 247-257.
- Reddigari S. & Kaplan A. P. (1989) Quantification of human high molecular weight kininogen by immunoblotting with a monoclonal anti-light chain antibody. *J Immunol Methods* **119**, 19-25.
- Regoli D. & Barabe J. (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* **32**, 1-46.
- Regoli D., Barabe J. & Park W. K. (1977) Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can J Physiol Pharmacol* **55**, 855-867.
- Regoli D., Marceau F. & Barabe J. (1978) De novo formation of vascular receptors for bradykinin. *Can J Physiol Pharmacol* **56**, 674-677.
- Regoli D., Rhaleb N. E., Drapeau G. & Dion S. (1990) Kinin receptor subtypes. *J Cardiovasc Pharmacol* **15 Suppl 6**, S30-38.
- Robinson H. C., Horner A. A., Hook M., Ogren S. & Lindahl U. (1978) A proteoglycan form of heparin and its degradation to single-chain molecules. *J Biol Chem* **253**, 6687-6693.
- Roden L. (1989) highlights in the history of heparin. In: *Heparin : chemical and biological properties, clinical applications* (eds. LANE, D. A. & LINDAHL, U.), pp. 1-23. CRC Press ; E. Arnold, Boca Raton, Fla. London.
- Rodgers K. D., San Antonio J. D. & Jacenko O. (2008) Heparan sulfate proteoglycans: a GAGgle of skeletal-hematopoietic regulators. *Dev Dyn* **237**, 2622-2642.
- Rosenberg R. D. & Damus P. S. (1973) The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* **248**, 6490-6505.
- Ryan J. W., Berryer P., Chung A. Y. & Sheffy D. H. (1994) Characterization of rat pulmonary vascular aminopeptidase P in vivo: role in the inactivation of bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther* **269**, 941-947.
- Ryan J. W., Papapetropoulos A., Ju H., Denslow N. D., Antonov A., Virmani R., Kolodgie F. D., Gerrity R. G. & Catravas J. D. (1996) Aminopeptidase P is disposed on human endothelial cells. *Immunopharmacology* **32**, 149-152.
- Sabourin T., Guay K., Houle S., Bouthillier J., Bachvarov D. R., Adam A. & Marceau F. (2001) Absence of ligand-induced regulation of kinin receptor expression in the rabbit. *British Journal of Pharmacology* **133**, 1154-1162.
- Sakamoto W., Satoh F., Gotoh K. & Uehara S. (1987) Ile-Ser-bradykinin (T-kinin) and Met-Ile-Ser-bradykinin (Met-T-kinin) are released from T-kininogen by an acid proteinase of granulomatous tissues in rats. *FEBS Lett* **219**, 437-440.

- Salvesen G., Parkes C., Abrahamson M., Grubb A. & Barrett A. J. (1986) Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *Biochem J* **234**, 429-434.
- Salzman E. W., Rosenberg R. D., Smith M. H., Lindon J. N. & Favreau L. (1980) Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation. *J Clin Invest* **65**, 64-73.
- Schaefer R. M., Schaefer L. & Horl W. H. (1994) Anaphylactoid reactions during hemodialysis. *Clin Nephrol* **42 Suppl 1**, S44-47.
- Schmaier A. H. (2000) Plasma kallikrein/kinin system: a revised hypothesis for its activation and its physiologic contributions. *Curr Opin Hematol* **7**, 261-265.
- Scott C. F. & Colman R. W. (1992) Fibrinogen blocks the autoactivation and thrombin-mediated activation of factor XI on dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 11189-11193.
- Shantsila E., Lip G. Y. & Chong B. H. (2009) Heparin-induced thrombocytopenia. A contemporary clinical approach to diagnosis and management. *Chest* **135**, 1651-1664.
- Shariat-Madar Z., Mahdi F. & Schmaier A. H. (1999) Mapping binding domains of kininogens on endothelial cell cytokeratin 1. *J Biol Chem* **274**, 7137-7145.
- Shetty S., Padijnayayveetil J., Tucker T., Stankowska D. & Idell S. (2008) The fibrinolytic system and the regulation of lung epithelial cell proteolysis, signaling, and cellular viability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **295**, L967-975.
- Sie P., Ofosu F., Fernandez F., Buchanan M. R., Petitou M. & Boneu B. (1986) Respective role of antithrombin III and heparin cofactor II in the in vitro anticoagulant effect of heparin and of various sulphated polysaccharides. *Br J Haematol* **64**, 707-714.
- Sigmaaldrich (2001) Dextran Sulfate - Sigma Prod. Nos. D7037, D4911, D6924, D3257, D8787, D6001, and D8906 - Product Information. Sigma Aldrich.
- Silverberg M., Nicoll J. E. & Kaplan A. P. (1980) The mechanism by which the light chain of cleaved HMW-kininogen augments the activation of prekallikrein, factor XI and Hageman factor. *Thromb Res* **20**, 173-189.
- Silverman G. A., Bird P. I., Carrell R. W., Church F. C., Coughlin P. B., Gettins P. G., Irving J. A., Lomas D. A., Luke C. J., Moyer R. W., Pemberton P. A., Remold-O'donnell E., Salvesen G. S., Travis J. & Whisstock J. C. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* **276**, 33293-33296.
- Simon P., Potier J. & Thebaud H. E. (1996) [Risk factors for acute hypersensitivity reactions in hemodialysis]. *Nephrologie* **17**, 163-170.
- Skidgel R. A. (1988) Basic carboxypeptidases: regulators of peptide hormone activity. *Trends Pharmacol Sci* **9**, 299-304.
- Smith L. A. & Harkness M. (2004) A case of two adverse reactions. *Postgrad Med J* **80**, 484-486.

- Spirig R., Gajanayake T., Korsgren O., Nilsson B. & Rieben R. (2008) Low molecular weight dextran sulfate as complement inhibitor and cytoprotectant in solid organ and islet transplantation. *Mol Immunol* **45**, 4084-4094.
- Sprinkle T. J., Caldwell C. & Ryan J. W. (2000) Cloning, chromosomal sublocalization of the human soluble aminopeptidase P gene (XPNPEP1) to 10q25.3 and conservation of the putative proton shuttle and metal ligand binding sites with XPNPEP2. *Arch Biochem Biophys* **378**, 51-56.
- Sprinkle T. J., Stone A. A., Venema R. C., Denslow N. D., Caldwell C. & Ryan J. W. (1998) Assignment of the membrane-bound human aminopeptidase P gene (XPNPEP2) to chromosome Xq25. *Genomics* **50**, 114-116.
- Tait J. F. & Fujikawa K. (1987) Primary structure requirements for the binding of human high molecular weight kininogen to plasma prekallikrein and factor XI. *J Biol Chem* **262**, 11651-11656.
- Takada Y., Skidgel R. A. & Erdos E. G. (1985) Purification of human urinary prokallikrein. Identification of the site of activation by the metalloproteinase thermolysin. *Biochem J* **232**, 851-858.
- Takagaki Y., Kitamura N. & Nakanishi S. (1985) Cloning and sequence analysis of cDNAs for human high molecular weight and low molecular weight prekininogens. Primary structures of two human prekininogens. *J Biol Chem* **260**, 8601-8609.
- Takahashi S., Irie A., Katayama Y., Ito K. & Miyake Y. (1986) N-terminal amino acid sequence of human urinary prokallikrein. *J Biochem* **99**, 989-992.
- Tan F., Chan S. J., Steiner D. F., Schilling J. W. & Skidgel R. A. (1989) Molecular cloning and sequencing of the cDNA for human membrane-bound carboxypeptidase M. Comparison with carboxypeptidases A, B, H, and N. *J Biol Chem* **264**, 13165-13170.
- Tan F., Weerasinghe D. K., Skidgel R. A., Tamei H., Kaul R. K., Roninson I. B., Schilling J. W. & Erdos E. G. (1990) The deduced protein sequence of the human carboxypeptidase N high molecular weight subunit reveals the presence of leucine-rich tandem repeats. *J Biol Chem* **265**, 13-19.
- Thompson R. E., Mandle R., Jr. & Kaplan A. P. (1977) Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J Clin Invest* **60**, 1376-1380.
- Toida T., Yoshida H., Toyoda H., Koshiishi I., Imanari T., Hileman R. E., Fromm J. R. & Linhardt R. J. (1997) Structural differences and the presence of unsubstituted amino groups in heparan sulphates from different tissues and species. *Biochem J* **322 ( Pt 2)**, 499-506.
- Tollefsen D. M., Majerus D. W. & Blank M. K. (1982) Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J Biol Chem* **257**, 2162-2169.
- Toschi V. & Lettino M. (2007) Fondaparinux: pharmacology and clinical experience in cardiovascular medicine. *Mini Rev Med Chem* **7**, 383-387.
- Trehy M. L., Reepmeyer J. C., Kolinski R. E., Westenberger B. J. & Buhse L. F. (2009) Analysis of heparin sodium by SAX/HPLC for contaminants and impurities. *J Pharm Biomed Anal* **49**, 670-673.

- Trowbridge J. M. & Gallo R. L. (2002) Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology* **12**, 117R-125R.
- Turner A. J. & Hooper N. M. (2002) The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 177-183.
- Tyrell D. J., Kilfeather S. & Page C. P. (1995) Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. *Trends Pharmacol Sci* **16**, 198-204.
- Van Deerlin V. M. & Tollefsen D. M. (1991) The N-terminal acidic domain of heparin cofactor II mediates the inhibition of alpha-thrombin in the presence of glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **266**, 20223-20231.
- Van Der Niepen P. & Verbeelen D. L. (1995) Anaphylactoid reactions during haemodialysis in sheep are mediated by bradykinin and can be prevented by bradykinin receptor antagonist. *Nephrol Dial Transplant* **10**, 2156-2157.
- Varga-Szabo D., Pleines I. & Nieswandt B. (2008) Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**, 403-412.
- Vavrek R. J. & Stewart J. M. (1985) Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides* **6**, 161-164.
- Venema R. C., Ju H., Zou R., Venema V. J. & Ryan J. W. (1997) Cloning and tissue distribution of human membrane-bound aminopeptidase P. *Biochim Biophys Acta* **1354**, 45-48.
- Verresen L., Fink E., Lemke H. D. & Vanrenterghem Y. (1994) Bradykinin is a mediator of anaphylactoid reactions during hemodialysis with AN69 membranes. *Kidney Int* **45**, 1497-1503.
- Verresen L., Waer M., Vanrenterghem Y. & Michielsen P. (1990) Angiotensin-converting-enzyme inhibitors and anaphylactoid reactions to high-flux membrane dialysis. *Lancet* **336**, 1360-1362.
- Verresen L., Waer M., Vanrenterghem Y. & Michielsen P. (1991) Anaphylactoid reactions, haemodialysis, and ACE inhibitors. *Lancet* **337**, 1294.
- Villax G. (2008) Business of Counterfeit Heparin and its Implications. *EFCCG*.
- Vogel R., Assfalg-Machleidt I., Esterl A., Machleidt W. & Muller-Esterl W. (1988) Proteinase-sensitive regions in the heavy chain of low molecular weight kininogen map to the inter-domain junctions. *J Biol Chem* **263**, 12661-12668.
- Warda M., Mao W., Toida T. & Linhardt R. J. (2003) Turkey intestine as a commercial source of heparin? Comparative structural studies of intestinal avian and mammalian glycosaminoglycans. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **134**, 189-197.
- Wardrop D. & Keeling D. (2008) The story of the discovery of heparin and warfarin. *Br J Haematol* **141**, 757-763.
- Warkentin T. E., Chong B. H. & Greinacher A. (1998) Heparin-induced thrombocytopenia: towards consensus. *Thromb Haemost* **79**, 1-7.
- Wilce M. C., Bond C. S., Dixon N. E., Freeman H. C., Guss J. M., Lilley P. E. & Wilce J. A. (1998) Structure and mechanism of a proline-specific aminopeptidase from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3472-3477.
- Wuillemin W. A., Eldering E., Citarella F., De Ruig C. P., Ten Cate H. & Hack C. E. (1996) Modulation of contact system proteases by glycosaminoglycans.

- Selective enhancement of the inhibition of factor XIa. *J Biol Chem* **271**, 12913-12918.
- Wuillemin W. A., Te Velthuis H., Lubbers Y. T., De Ruig C. P., Eldering E. & Hack C. E. (1997) Potentiation of C1 inhibitor by glycosaminoglycans: dextran sulfate species are effective inhibitors of in vitro complement activation in plasma. *J Immunol* **159**, 1953-1960.
- Yamaguchi Y. (2000) Leticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* **57**, 276-289.
- Zeerleder S., Mauron T., Lammle B. & Wuillemin W. A. (2002) Effect of low-molecular weight dextran sulfate on coagulation and platelet function tests. *Thromb Res* **105**, 441-446.
- Zhang Z., Mccallum S. A., Xie J., Nieto L., Corzana F., Jimenez-Barbero J., Chen M., Liu J. & Linhardt R. J. (2008) Solution structures of chemoenzymatically synthesized heparin and its precursors. *J Am Chem Soc* **130**, 12998-13007.
- Zhao Y., Qiu Q., Mahdi F., Shariat-Madar Z., Rojkjaer R. & Schmaier A. H. (2001) Assembly and activation of HK-PK complex on endothelial cells results in bradykinin liberation and NO formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H1821-1829.