

Université de Montréal

Rôle des médiateurs lipidiques dans la réaction inflammatoire chez le rat

Par

Caroline Bélanger

Faculté de pharmacie

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

Juillet 2006

© Caroline Bélanger, 2006



dV

705

US2

2006

10.1

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle des médiateurs lipidiques dans la réaction inflammatoire chez le rat

Présentée par

Caroline Bélanger

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Daniel Lévesque
Président-rapporteur

Dr. Sylvie Marleau
Directeur de recherche

Dr. Pierre Borgeat
Codirecteur de recherche

Dr. Philippe Tessier
Membre externe du jury

RÉSUMÉ

Le leucotriène B₄ (LTB₄) et le facteur d'activation plaquettaire (PAF) permettent de réguler la migration des neutrophiles polymorphonucléaires (PMNs) et l'extravasation plasmatique au site inflammatoire. Pour déterminer leurs contributions respectives dans la régulation de la migration des PMNs au foyer inflammatoire, nous avons étudié le rôle du PAF et du LTB₄ et leur effet potentiellement coopératif avec des antagonistes sélectifs de ces deux médiateurs lipidiques dans un modèle d'inflammation dermique chez le rat. Les résultats montrent un effet inhibiteur additif des antagonistes du LTB₄ et du PAF, lorsque utilisés de façon concomitante, sur la migration des neutrophiles induite par le PAF, le LTB₄, ainsi que sur des médiateurs non-chimiquement apparentés comme le C5_{adesarg} et le facteur nécrosant des tumeurs (TNF- α), tout comme l'extravasation plasmatique induite par le leucotriène D₄, ce qui suggère un rôle régulateur des récepteurs du LTB₄ et du PAF dans la migration des PMNs au foyer inflammatoire.

Nous avons aussi étudié le rôle de ces médiateurs dans la régulation du trafic des PMNs en réponse à une inflammation pulmonaire consécutive à l'injection intraveineuse de billes de Séphadex. Les résultats appuient l'hypothèse selon laquelle le PAF et le LTB₄ jouent un rôle important dans l'accumulation des PMNs au foyer inflammatoire. En effet, seule l'administration concomitante des antagonistes des récepteurs du LTB₄ et du PAF a réduit de façon significative la migration des PMNs aux poumons.

Nos résultats ont contribué à élucider le rôle du LTB₄ et du PAF dans la régulation de l'extravasation des PMNs et de plasma au foyer inflammatoire.

Mots clés : inflammation dermique, inflammation pulmonaire, LTB₄, myéloperoxydase, neutrophiles polymorphonucléaires, oedème, PAF, rats

SUMMARY

Leukotriene B₄ (LTB₄) and platelet activating factor (PAF) can regulate the trafficking of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and plasma extravasation at inflammatory sites. To delineate the role of lipid mediators in regulating neutrophil extravasation, we studied the effect of PAF and/or LTB₄ selective antagonists in dermal inflammation induced by a variety of agonists. The results show that there is an additive inhibitory effect when the two antagonists are used concomitantly on PMNs dermal accumulation induced by PAF, LTB₄, ZAP and TNF- α as well as on plasma extravasation induced by LTD₄. These results support a regulatory role for PAF and LTB₄ in regulating PMNs trafficking at inflammatory sites.

Next, we studied the regulatory role of lipid mediators in regulating PMNs trafficking in response to pulmonary inflammation induced by intravenous injection of Sephadex beads. The results show that a single administration of the drugs does not prevent PMNs accumulation whereas the administration of the two antagonists of PAF and LTB₄ concomitantly reduced significantly PMNs migration to the lung.

Our results contributed to elucidate the role of PAF and LTB₄ in the regulation of PMNs migration and the oedema formation at inflammatory sites.

Key words: dermal inflammation, pulmonary inflammation, LTB₄, myeloperoxidase, oedema, PAF, polymorphonuclear neutrophils, rats

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iv
SUMMARY	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xii
DÉDICACE	xv
REMERCIEMENTS	xvi
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1. Réponse inflammatoire.....	2
1.1. Généralités	2
1.2. Rôles des neutrophiles dans la réponse inflammatoire.....	4
1.2.1. Description générale du neutrophile	4
1.2.1.1. La maturation du neutrophile	7
1.2.1.2. Rôles des neutrophiles dans la réaction inflammatoire	8
1.2.1.2.1. Chimiotaxie.....	8
1.2.1.2.2. Phagocytose.....	12
1.3. Médiateurs de l'inflammation.....	13
1.3.1. Médiateurs lipidiques	13
1.3.1.1. Les leucotriènes	14
1.3.1.1.1. La biosynthèse des leucotriènes	14
1.3.1.1.2. Activités biologiques des leucotriènes.....	16
1.3.1.1.3. Antagonistes sélectifs des récepteurs du leucotriène B₄	19
1.3.1.2. Les lipoxines.....	23
1.3.1.3. Le facteur d'activation plaquettaire (PAF)	24
1.3.1.3.1. Biosynthèse du PAF	25
1.3.1.3.2. Activité biologique du PAF	26
1.3.1.3.3. Antagonistes sélectifs des récepteurs du PAF.....	28
1.3.1.4. Les prostaglandines dans la réponse inflammatoire.....	30

1.3.2. Cytokines et chimiokines	31
1.3.3. Protéines du complément	33
1.3.4. Métabolites réactifs de l'oxygène.....	34
1.4. Molécules d'adhésion jouant un rôle dans la migration extravasculaire des leucocytes	35
2. Objectifs de l'étude	40
CHAPITRE II	43
COOPERATION OF LEUKOTRIENE B ₄ AND PLATELET-ACTIVATING FACTOR IN THE REGULATION OF NEUTROPHIL TRAFFICKING TO DERMAL AND PULMONARY INFLAMMATORY SITES IN RATS.....	44
1. ABSTRACT	45
2. INTRODUCTION.....	46
3. MATERIALS AND METHODS	48
3.1. Animals	48
3.2. Reagents	48
3.3. Experimental protocols.....	49
3.3.1. Dermal inflammation.....	49
3.4. Analytical methods.....	50
3.4.1 MPO assay	50
3.4.2 Evans blue assay	50
3.5. Statistical Analysis	51
4. RESULTS	52
4.1. Effect of SR-27417 and CP-105,696 on neutrophil accumulation elicited by soluble agonists of inflammation in rat skin	52
4.2. Effect of SR-27417 and CP-105,696 on local oedema elicited by LTD ₄ in rat skin.....	52
4.3. Cooperative role of LTB ₄ and PAF on PMN accumulation in lung inflammation.....	53
5. DISCUSSION	54
7. REFERENCES.....	58

9. LEGEND TO FIGURES	62
CHAPITRE III.....	68
3. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	69
3.1. Problématique	69
3.2. Considérations méthodologiques	70
3.3. Rôle des médiateurs lipidiques dans la réaction inflammatoire chez le rat... 73	73
3.4. Perspectives futures	76
3.5. Conclusion.....	77

LISTE DES TABLEAUX**CHAPITRE I : INTRODUCTION**

Tableau 1.	Composition des granules dans les neutrophiles humains	3
Tableau 2.	Médiateurs jouant un rôle dans l'activation des neutrophiles et des cellules endothéliales	10
Tableau 3.	Activité biologique des différents leucotriènes	20
Tableau 4.	Famille des récepteurs des cytokines et leurs ligands	32

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Figure 1.	Représentation schématique du recrutement des neutrophiles au foyer infectieux.....	4
Figure 2.	Représentation schématique d'un polymorphonucléaire neutrophile coloré au Giemsa-Wright.....	5
Figure 3.	Représentation schématique du développement des leucocytes et des plaquettes à partir de cellules souches pluripotentes.....	9
Figure 4.	Représentation schématique des fonctions du neutrophile en réponse à un stimulus inflammatoire.....	11
Figure 5.	Représentation schématique de la biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes.....	17
Figure 6.	Structure chimique du CP-105,696.....	21
Figure 7.	Représentation schématique du facteur d'activation plaquettaire.....	25
Figure 8.	Représentation schématique des deux voies de la biosynthèse du facteur d'activation plaquettaire.....	27
Figure 9.	Représentation schématique du SR-27417.....	29
Figure 10.	Hypothèse de recherche.....	42

**CHAPITRE II : LEUKOTRIENE B₄ AND PLATELET-ACTIVATING FACTOR
COOPERATE IN DERMAL AND PULMONARY INFLAMMATION IN RATS**

- Figure 1.** Inhibition dose-dépendante de l'accumulation de PMNs dans le derme par A) le CP-105,696 après l'injection locale de LTB₄ (500 pmol/site) et B) le SR-27417 après l'injection locale du PAF (1.9 nmol/site). Effet de l'administration orale de CP-105,696 (3 mg/kg) et/ou de SR-27417 (0.3 mg/kg) sur l'accumulation dermique de neutrophiles induite par l'injection locale de C) LTB₄ et D) PAF.....63
- Figure 2.** Effet de l'administration orale de CP-105,696 (3 mg/kg) et/ou de SR-27417 (0.3 mg/kg) sur l'accumulation de neutrophiles induite par l'injection locale de A) ZAP (3 %/site) et B) TNF- α (10 pmol/site).....65
- Figure 3.** Effet de l'administration orale de CP-105,696 (10 mg/kg) et/ou de SR-27417 (0.3 mg/kg) sur la formation d'oedème induite par l'injection locale de LTD₄ (500 pmol/site).....67
- Figure 4.** Effet de l'administration orale de CP-105,696 (30 mg/kg) et/ou de SR-27417 (0.3 mg/kg) sur la migration A) des neutrophiles aux poumons et sur B) le compte différentiel des cellules sanguines lors d'une inflammation pulmonaire induite par l'injection intraveineuse de billes de Séphadex.....69

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

5-HPETE :	acide 5-hydroxyperoxy-6,8,11,14-éicosatétraénoïque
5-LO :	5-lipoxygénase
AA :	acide arachidonique
ADAM-8 :	<i>a disintegrin and metalloprotease domain 8</i>
BLT :	récepteur du LTB ₄
BPI :	protéine bactéricide augmentant la perméabilité
C5a :	protéine du complément 5a
CAMs :	molécules d'adhérence cellulaire
CD :	<i>cluster of differentiation</i>
CI ₅₀ :	concentration inhibitrice à 50%
CMC :	carboxyméthylcellulose
COX :	cyclooxygénase
cPLA ₂ :	phospholipase A ₂ cytosolique
CysLTs :	cystéinyl leucotriènes
DI ₅₀ :	dose inhibitrice à 50 %
FLAP :	<i>5-lipoxygenase activating protein</i>
FMLP :	N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
G-CSF :	facteur de croissance des polynucléaires
GM-CSF :	facteur de croissance des polynucléaires et des macrophages
hCAP-18 :	peptide humain antimicrobien du groupe cathélicidine-18
H ₂ O ₂ :	peroxyde d'hydrogène
HOCl :	acide hypochloridrique

ICAMs :	molécule d'adhérence intercellulaire
IL :	interleukine
INF- γ :	interféron- γ
Ki :	constante d'inhibition
LAMP-2 :	protéine membranaire lysosomale-2
LPS :	lipopolysaccharide bactérien
LT :	leucotriène
LX :	lipoxine
MAC-1 :	<i>macrophage antigen-1</i>
MCP-1 :	protéine chimioattractante monocytaire-1
M-CSF :	facteur de croissance des macrophages
MIP-2 :	protéine inflammatoire du macrophage-2
MPO :	myéloperoxydase
NAP :	facteur activant les neutrophiles
O ₂ ⁻ :	anion superoxyde
PAF :	facteur d'activation plaquettaire
PAFR :	récepteur du PAF
PG :	prostaglandine
PMN :	neutrophile polymorphonucléaire
ROS :	métabolites réactifs de l'oxygène
RANTES :	<i>regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
RNS :	métabolites réactifs de l'azote
SGP28 :	<i>specific granule protein of 28 kDa</i>
SOD :	superoxyde dismutase

TMB :	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TNF- α :	facteur nécrosant des tumeurs- α
VCAM :	molécule d'adhésion cellulaire vasculaire
ZAP :	plasma activé par le zymosan

DÉDICACE

J'aimerais dédier ce mémoire à ma famille pour leur amour, leur aide et leur confiance.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier, sans qui ce travail n'aurait pu être accompli, une femme de grande valeur et de bonté, ma directrice Dr Sylvie Marleau. L'encadrement tout au long de ce travail de maîtrise et son aide précieuse m'ont permis d'arriver au terme de ce périple à la fois long, périlleux, mais aussi plein de surprise et de joie. Elle m'a permis d'acquérir les notions de base en recherche et de développer mon sens critique pour la poursuite de cette carrière scientifique.

De plus j'aimerais remercier mon co-directeur, Dr Pierre Borgeat, une personne d'une grande rigueur intellectuelle qui m'a permis d'explorer un autre aspect de la recherche et de développer en moi une passion pour celle-ci.

Je tiens également à remercier les étudiants du laboratoire de l'Université de Montréal ; Mulumba Mukandila, Diala Harb et Leila Hamdan pour toute l'aide qu'ils ont pu m'apporter et les techniciennes en santé animale; Eve-Marie Charbonneau, Kim Lévesque et Roxane Grégoire-Taillefer qui m'ont tout appris concernant les petits rongeurs.

Un merci très spécial à ma deuxième famille à Ribeirão Preto, Brésil, pour la formidable expérience que j'ai pu acquérir tant sur le plan social que dans le laboratoire de l'Université de Sao Paulo : Dr Lúcia H. Faccioli, Dr Célio L. Silva, Alexandra I. Medeiros, Adriana Secatto, Carlos A. Sorgi, Helena Faccioli, Diego Bergamin et Márcio Benedini. Je ne vous oublierai jamais ! «Muito obrigada por tudo ! »

Merci à toute ma famille ainsi qu'à mes amis du Baccalauréat de biochimie.

«Science sans conscience n'est que ruine de l'âme.»

François Rabelais

«C'est en revenant à un endroit où rien n'a bougé qu'on réalise le mieux qu'on a changé»

Nelson Mandela

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

1. Réponse inflammatoire

1.1. Généralités

La réponse inflammatoire est un processus permettant la destruction mais aussi la réparation tissulaire (Borregaard et al., 2005). Ce processus, faisant appel à l'immunité innée, implique les mécanismes de défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Les cellules épithéliales de la peau et des muqueuses créent une barrière physique entre l'intérieur sensible aux invasions et l'extérieur. Lorsqu'il y a un bris dans ces barrières, les neutrophiles polymorphonucléaires (PMNs pour *polymorphonuclear neutrophils*), premiers leucocytes arrivés sur les lieux, permettent de limiter les dégâts et de vaincre, sinon d'atténuer l'infection par la dégranulation des granules azurophiles contenant la myéloperoxydase et autres protéines antimicrobiennes (Tableau 1) (Scott et al., 2004). Les PMNs seront ensuite remplacés par les macrophages, les lymphocytes et les fibroblastes pour permettre la récupération du tissu atteint.

Les PMNs sont synthétisés par la moelle osseuse et s'y développent jusqu'à maturité (Metcalf, 1993). Chez l'individu sain, les PMNs circulants dans le sang sont normalement non actifs mais peuvent être rapidement activés et recrutés au site inflammatoire ce qui impliquera leur adhérence aux cellules endothéliales et leur migration jusqu'au foyer inflammatoire par chimiotaxie (Figure 1) (Borregaard et al., 2005). Ainsi, lorsque l'inflammation est causée par un agent pathogène, l'inflammation est généralement contenue localement et la réponse inflammatoire permet de circonscrire le problème en éliminant l'agent pathogène (Cronstein and Weissmann, 1993). Cependant, lorsque l'inflammation est la conséquence d'une pathologie chronique telle l'arthrite rhumatoïde

Tableau 1. Composition des granules dans les PMNs humains, traduit de Moraes et al., 2006. Abréviations : ADAM-8, *α disintegrin and metalloprotease domain 8*; BPI, protéine bactéricide augmentant la perméabilité; CD, *cluster of differentiation*; fMLP, N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine; hCAP-18, peptide humain antimicrobien du groupe cathélicidine-18; LAMP-2, protéine membranaire lysosomale-2; SGP28, *specific granule protein of 28 kDa*; TNF, facteur nécrasant des tumeurs.

Granules	Azurophiles (primaires)	Spécifiques (secondaires)	Gélatinases (tertiaires)	Sécrétoires
Membrane	CD63, CD68	CD11b, CD15, CD18, CD66a, CD66b. Sous-unité α de la protéine G, cytochrome b ₅₅₈ , récepteur du TNF, thrombospondine, vitronectine, laminine	CD11b, CD18, récepteur fMLP, Cytochrome b ₅₅₈ , calnexine, ADAM-8, stomatine, LAMP-2, récepteur de la laminine	CD10, CD11b, CD13, CD16, CD35 (CRI), CD45, phosphatase alcaline cytochrome b ₅₅₈ , récepteur fMLP.
Protéinases	élastase, cathepsine G, protéinase 3, estérase N, collagénase	collagénase, gélatinase	gélatinase	
Enzymes microbiennes	myéloperoxydase, lysozyme, azurocidine, neuraminidase	lysozyme, neuraminidase	myéloperoxydase, lysozyme	
Hydrolases	N-acétyl-β-glucosaminidase, cathepsine B et D, β-galactosidase, β-glucuronidase, α-mannosidase			
Inhibiteurs	α-1-Antitrypsine, HBP (heparin binding protein)	apolactoferrine, protéine de liaison à vitamine B ₁₂ , inhibiteur de la protéine kinase C, histaminase, héparinase	lactoferrine	
Autres	défensines, BPI, acide mucopolysaccharidiques	activateur de plasminogène, hCAP-18, SGP28, β ₂ -microglobuline,	acétyltransférase	albumine, tétranectine

(Abramson et al., 1983), les maladies inflammatoires du côlon (Lampinen et al., 2005) ou encore l'asthme allergique (Poynter et al., 2006), la réponse inflammatoire est susceptible de produire des effets indésirables liés à l'accumulation des leucocytes et l'extravasation plasmatique, avec pour résultat l'apparition de douleur et la perte de fonction (Cronstein and Weissmann, 1993). Ces effets indésirables sont souvent la conséquence de la libération locale de médiateurs de l'inflammation, la génération de métabolites réactifs de l'oxygène et la libération du contenu des granules des PMNs.

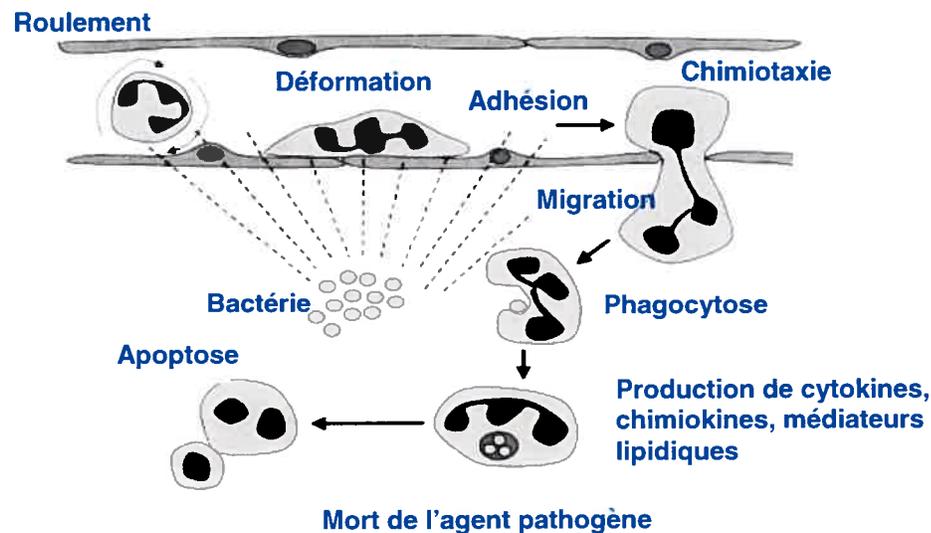


Figure 1. Représentation schématique du recrutement des PMNs au foyer infectieux, traduit et modifié de van Eaden et al., 1999.

1.2. Rôles des neutrophiles dans la réponse inflammatoire

1.2.1. Description générale du neutrophile

Les PMNs, aussi appelés simplement neutrophiles sont des cellules présentant un diamètre de 10 à 12 μm qui possèdent un noyau multilobé dont la chromatine, qui est

grossière et condensée, se situe en bordure de la membrane nucléaire (Figure 2) (Smith, 1994). Les PMNs sont essentiels dans la réponse inflammatoire innée mais jouent aussi un rôle dans l'induction des dommages tissulaires dans plusieurs pathologies.



Figure 2. Représentation schématique d'un PMNs neutrophile coloré au Giemsa-Wright, tirée de (Roitt et al., 2002a).

Dans des conditions normales, les PMNs constituent de 50 à 70% des leucocytes chez l'homme, tandis que chez le rat, les neutrophiles ne constituent que 25 à 30% des leucocytes totaux circulants (Smith, 1994). Cependant même dans cette proportion, le neutrophile chez le rat joue un rôle essentiel dans la défense contre les pathogènes.

Une fois libérés de la moelle osseuse, les PMNs circulent dans les vaisseaux sanguins pour une période de 4 à 10 heures avant d'être marginés et d'entrer dans le pool tissulaire où ils survivent de 1 à 2 jours (MacNee and Selby, 1990). Les neutrophiles sénescents vont être éliminés par les macrophages tissulaires, principalement au niveau hépatique et rénal. Chez les humains, le pool de PMNs marginés est égal ou supérieur au pool circulant et les deux pools s'échangent de façon dynamique à un taux de 1,5 % par

seconde pour combler les besoins de l'organisme (Kuebler, 2005). Chez d'autres espèces animales tel le lapin, les pools de neutrophiles circulants et marginés sont trouvés dans des proportions similaires (Suwa et al., 2000). La margination est un phénomène permettant l'adhésion lâche des neutrophiles à la paroi des cellules endothéliales. Il a été démontré chez les humains que les neutrophiles marginés, lorsque recrutés pour combattre une infection, possèdent une capacité accrue de phagocytose de 32% (Steele et al., 1987).

Les neutrophiles contiennent 4 types de granules intracellulaires : azurophiles, spécifiques, gélatinases et des vésicules de sécrétion (Tableau 1) (Morales et al., 2006; Borregaard et al., 1983). Les granules azurophiles contiennent de l'élastase, des défensines, de la myéloperoxydase, des enzymes protéolytiques et saccharolytiques capables de digérer les protéines et oligosaccharides microbiens. La lactoferrine prive le microorganisme de ses nutriments essentiels tandis que le lysozyme et la collagénase détruisent l'enveloppe de l'agent pathogène. L'élastase présente aussi des propriétés antimicrobiennes. Les défensines sont de petits peptides cationiques hautement conservés et riches en résidus cystéine, ce qui leur permet d'induire des pores dans la membrane des cellules bactériennes et ainsi les détruire. Ces protéines constituent de 30 à 50 % des granules azurophiles.

La population de neutrophiles est très hétérogène (van Eaden et al., 1999; Guthrie et al., 1984a; Condliffe.A.M. et al., 1998). En effet, le neutrophile est majoritairement en phase inactive (dormante) mais il peut aussi être, en proportion plus faible, en phase active, d'amorçage ou de sénescence. L'amorçage des neutrophiles, processus appelé *priming* en anglais, se définit comme étant la diminution réversible du seuil de réactivité cellulaire occasionnée par l'exposition des neutrophiles à des concentrations sous-activatrices de molécules proinflammatoires, contrairement à l'activation des neutrophiles qui se traduit par le déclenchement immédiat de leur réponse (Pabst, 1994). Ainsi, la réponse des

neutrophiles amorcés à une stimulation subséquente par un agoniste soluble sera amplifiée. Les agonistes pouvant induire l'amorçage des neutrophiles sont les lipopolysaccharides (LPS) bactériens (Cohn and Morse, 1960), les peptidoglycanes (Riveau et al., 1991), le peptide N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (fMLP) (Lew, 1989), le facteur nécrosant des tumeurs- α (TNF- α), l'interleukine (IL)-8 (Daniels et al., 1992) et le leucotriène (LT) B₄ (McDonald et al., 1993). Les brûlures, le stress et l'activité physique sont aussi des conditions associées à l'amorçage des neutrophiles (Bjerknes et al., 1990). Lors de l'amorçage, la forme sphérique des neutrophiles à l'état de dormance se modifie pour présenter un gonflement unilatéral lorsqu'ils sont amorcés. Ce changement permet un plus grand pouvoir d'agrégation et d'adhésion aux cellules endothéliales (Pabst, 1994).

Le neutrophile synthétise et sécrète des cytokines, des chimiokines, des hormones et des facteurs lipidiques lorsqu'il est activé par le système immunitaire (Smith, 1994). Ces médiateurs peuvent voir leurs actions amplifiées par une activité autocrine et paracrine des cellules impliquées. De nombreux médiateurs ont la capacité de moduler l'activité des neutrophiles tant *in vivo* que *in vitro* (Figure 3). Parmi les facteurs relâchés par les PMNs activés, on trouve la prostaglandine (PG) E₂, le TNF- α , le facteur d'activation plaquettaire (PAF), le LTB₄, le facteur de croissance des polynucléaires et des macrophages (GM-CSF), l'IL-1, -2 et -8, mais cette liste est en constante évolution.

1.2.1.1. La maturation du neutrophile

Les neutrophiles issus de la moelle osseuse sont relâchés dans la circulation sanguine à un rythme de 10¹¹ cellules par jour (Metcalf, 1993; Hoffbrand and Petit, 1987). Ce processus est principalement régulé par deux facteurs de croissance, le facteur de croissance des polynucléaires (G-CSF) et le GM-CSF qui sont sécrétés par les monocytes et

les fibroblastes et qui stimulent la prolifération et la différenciation des cellules précurseurs appelées myéloblastes. L'interleukine-6 (IL-6) aurait des activités similaires au G-CSF. La maturation des granulocytes dépend de l'action des facteurs de croissance mais aussi des interleukines, l'IL-1, -3, -4, -5, -6 et -7 (Metcalf, 1989). Ainsi, ces deux facteurs de croissance, G-CSF et GM-CSF, favorisent la granulopoïèse, incluant les neutrophiles, les éosinophiles, les basophiles et les macrophages. La figure 4 schématise la formation des leucocytes et des plaquettes à partir des cellules souches de la moelle osseuse. La période de différenciation et de maturation prend généralement entre 12 à 14 jours mais peut être réduite à de 3 à 4 jours en présence de certains facteurs, par exemple lors d'une infection bactérienne (Pabst, 1994).

1.2.1.2. Rôles des neutrophiles dans la réaction inflammatoire

Les mécanismes de signalisation intracellulaire du neutrophile permettent leur chimiotaxie, l'assemblage de la F-actine, l'adhésion, l'agrégation, la dégranulation, la phagocytose et aussi la production de métabolites réactifs de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) (van Eaden et al., 1999).

1.2.1.2.1. Chimiotaxie

L'activation du neutrophile en réponse à un gradient chimiotactique permet de le diriger au site inflammatoire. Plusieurs médiateurs permettent l'activation des neutrophiles dont l'IL-8 (Kunkel et al., 1991), le LTB₄ (Ford-Hutchinson et al., 1980; Palmblad et al., 1981), le PAF (Miyagawa et al., 1990), le fragment activé du complément 5a (C5a)

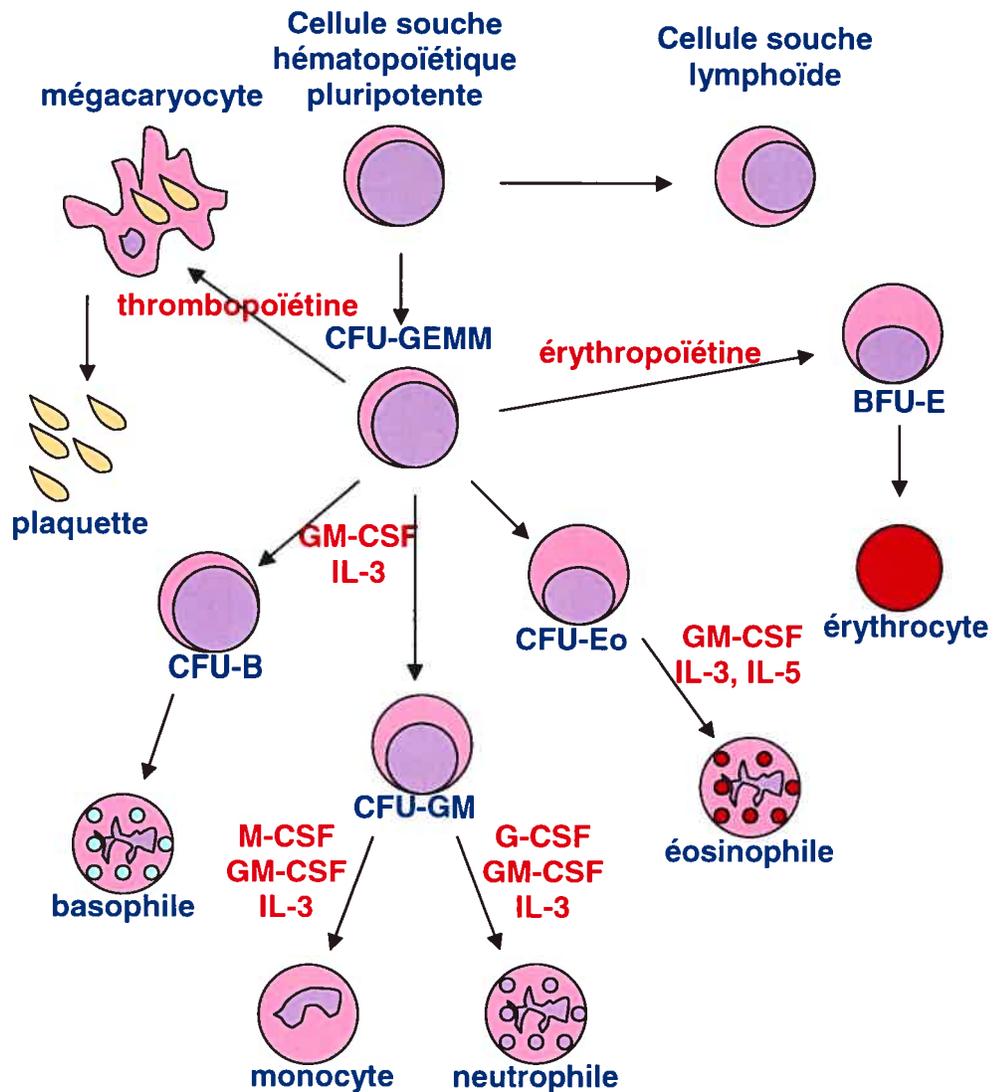


Figure 3. Représentation schématique du développement des leucocytes et des plaquettes à partir de cellules souches pluripotentes, modifié de (Roitt et al., 2002a). Abréviations : BFU-E, unité de formation de l'érythrocyte; CFU, unité de formation de colonie; CFU-GEMM, CFU se différenciant en granulocytes, érythrocytes, monocytes ou mégacaryocytes; CFU-B, CFU se différenciant en basophile; CFU-Eo, CFU se différenciant en éosinophile; CFU-GM, CFU se différenciant en granulocyte et en monocyte; G-CSF, le facteur de croissance des polynucléaires; GM-CSF, le facteur de croissance des polynucléaires et des macrophages; M-CSF, facteur de croissance des macrophages; IL-3, interleukine-3; IL-5, interleukine-5.

(Till and Ward, 1986), le facteur activant les neutrophiles (NAP), l'IL-1 (Bevilacqua et al., 1985; Galea-Lauri et al., 1993), le TNF- α (Galea-Lauri et al., 1993) et le fMLP (Liang et al., 2001).

Tableau 2. Médiateurs jouant un rôle dans l'activation des neutrophiles et des cellules endothéliales, traduit de (Albelda et al., 1994).

Agents activateurs	Cellules cibles	
	Neutrophiles	Cellules endothéliales
Cytokines	TNF- α IL-1	TNF- α , IL-1 IL-4, INF- γ
Chimiokines	IL-8 MIP-2	
Lipides	LTB ₄ PAF	
Autres	C5a fMLP	Thrombine, Histamine H ₂ O ₂ , Bradykinine, LTC ₄

L'augmentation de calcium intracellulaire et l'assemblage de F-actine se produisent rapidement à des concentrations faibles d'agoniste (10^{-9} M) tandis que la dégranulation et le relâchement de ROS ont lieu à des concentrations plus élevées d'agoniste (10^{-8} à 10^{-6} M), et se déroulent de façon plus tardive (Figure 4) (van Eaden et al., 1999).

L'actine, une protéine de 43 kDa, est la composante majeure des neutrophiles (van Eaden et al., 1999). L'actine possède deux états, le premier est globulaire monomérique (G-actine) et l'autre est sous forme de polymère filamenteux (F-actine). Lorsque le PMN est activé, la forme G-actine se polymérise en F-actine, et ce changement de conformation aide à l'adhérence et à la déformation des neutrophiles permettant la transmigration à travers l'endothélium.

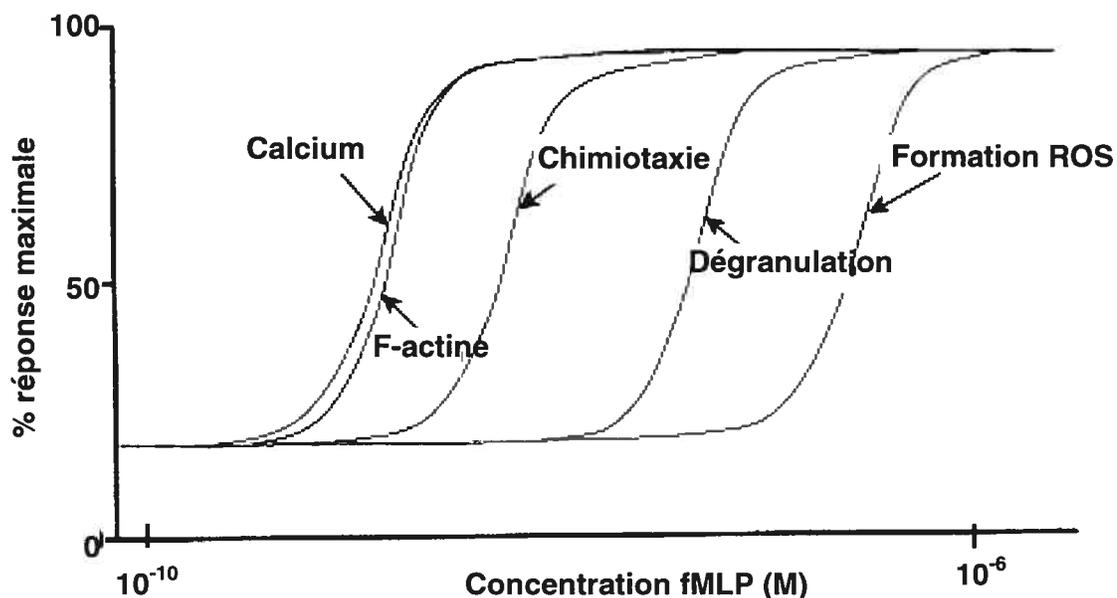


Figure 4. Représentation schématique des fonctions du neutrophile en réponse à un stimulus inflammatoire, tirée de (van Eaden et al., 1999).

L'activation des MAP kinases (MAPK, pour protéines kinases activées par des facteurs mitogènes) ERK, JNK et p38 survient rapidement après l'activation du neutrophile (Wallach et al., 1999). Ces molécules de signalisation sont surtout connues pour leur effet activateur de facteurs de transcription et de l'expression génique, principalement de l'expression des gènes reliés à l'inflammation. JNK et p38 joueraient aussi un rôle dans la régulation de l'expression de la sélectine-E, une molécule d'adhérence propre aux cellules endothéliales (Read et al., 1997). La voie p38 MAPK est essentielle pour la chimiotaxie et la migration des neutrophiles au foyer inflammatoire par l'induction de l'expression de cytokines et molécules d'adhérence (Cara et al., 2001). Les MAPKs sont des sérine/thréonine kinases qui possèdent un motif Thr-X-Tyr conservé dans la boucle d'activation du sous-domaine kinase VIII. La MAPK est phosphorylée par une kinase à

double spécificité (thréonine/tyrosine), la MAPK-kinase (MKK ou MEK pour MAPK/ERK-kinases). Les MKKs sont phosphorylées par les MAPK-kinase-kinase (MAP3K). Les MAPK peuvent être activées par divers agonistes se liant à des récepteurs à activité tyrosine kinase ou à des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines-G. La MAPK p38 est activée par deux MKKs, soit les MKK3 et MKK6. La MKK6 active toutes les isoformes de p38 tandis que la MKK3 active les isoformes α , γ et δ . La MKK4, qui active la voie de JNK, active l'isoforme α de p38.

L'activation des neutrophiles entraîne aussi la stimulation du complexe de transcription NF- κ B (Wallach et al., 1999). Ces protéines appartiennent à la famille NF- κ B/Rel car elles se lient à un domaine d'homologie Rel de l'ADN (Chen and Ghosh, 1999). Ce domaine est aussi requis pour permettre l'homo- ou l'hétérodimérisation des protéines de la famille des NF- κ B. Le complexe NF- κ B est composé de deux sous-unités, p65 et p50 (Finco and Baldwin, 1995). Son activation est régulée par un inhibiteur cytoplasmique, I κ B. La liaison des agonistes inflammatoires, par exemple le TNF- α , à son récepteur, induit la phosphorylation d'I κ B par sa kinase IKK (I κ B kinase), ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome. NF- κ B est ensuite transloquée au noyau pour augmenter l'expression de gènes inflammatoires et immuns.

1.2.1.2.2. Phagocytose

Tout comme le macrophage, le neutrophile est un phagocyte très efficace (Faurischou and Borregaard, 2003). Il présente à sa membrane plasmique des récepteurs de la famille de l'opsonine tel que des immunoglobulines de type G et le fragment C3b qui reconnaissent directement la particule bactérienne. L'agent pathogène est, par la suite, internalisé par invagination de la membrane plasmique du neutrophile (Klebanoff, 1992).

Les granules azurophiles cytosoliques fusionnent avec les membranes plasmiques invaginées pour former un phagolysosome dans lequel ils peuvent relâcher les enzymes protéolytiques et pro-oxydantes dont la MPO, l'élastase, les défensines, les lysosymes et l'azurocidine, servant à détruire le micro-organisme (Faurischou and Borregaard, 2003). La destruction complète des agents pathogènes s'achève lors de la fusion des granules azurophiles avec les phagosomes. Par contre, lorsque l'agent pathogène est beaucoup plus gros que la taille du neutrophile, il ne peut y avoir formation d'un phagosome donc le contenu des granules cytosoliques est déversé directement dans le milieu extracellulaire.

1.3. Médiateurs de l'inflammation

Les médiateurs chimiotactiques des leucocytes peuvent être libérés localement ou encore être attachés à la surface endothéliale. Par exemple, les cytokines TNF- α et IL-1 β (Cybulsky et al., 1988), les chimiokines IL-8 (Sheron and Williams, 1992) et NAP-2 (Wirthmueller et al., 1991), et les médiateurs lipidiques, LTB₄ (Borgeat and Naccache, 1990) et PAF (Camussi et al., 1990) sont libérés localement. À l'opposé, l'IL-8 (Rot, 1992), le PAF (Chao and Olson, 1993), le MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) (Leonard and Yoshimura, 1990) et le RANTES (*regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*) (Weber, 2005) peuvent aussi être sécrétés et retenus à la surface endothéliale par leur liaison aux protéoglycans.

1.3.1. Médiateurs lipidiques

Cette catégorie de médiateurs regroupe les leucotriènes (LTs), les cystéines leucotriènes (CystLTs), les lipoxines (LX), le PAF et les prostaglandines (PGs) (Louis et al., 2005).

1.3.1.1. Les leucotriènes

1.3.1.1.1. La biosynthèse des leucotriènes

Le terme leucotriène origine du mot leucocyte, la cellule d'origine, et de triène, une caractéristique structurale (Sirois and Borgeat, 1984a). Les leucotriènes sont des acides gras insaturés de 20 carbones, présentant 4 doubles liaisons dont 3 constituent le triène conjugué et de 2 substituants polaires dont une fonction hydroxyle en C₅ et une fonction hydroxyle ou cystéinyle en C₆ ou C₁₂.

Le LTB₄ est produit par les PMNs (Borgeat and Samuelsson, 1979), les macrophages et les monocytes (Doig and Ford-Hutchinson, 1980), les basophiles (Peters et al., 1981) et les mastocytes (Mencia-Huberta et al., 1983) tandis que les leucotriènes C₄, D₄ et E₄ sont produits majoritairement par les éosinophiles (Jorg et al., 1982; Sirois and Borgeat, 1984b), les basophiles, les mastocytes et les macrophages (Borgeat, 1989).

Les leucotriènes A₄, B₄, C₄, D₄ et E₄ sont générés par la voie de la 5-lipoxygénase (5-LO) (Figure 5) (Borgeat et al., 1985a; Borgeat, 1989). La 5-LO, une enzyme soluble monomérique de 78 kDa (Dixon et al., 1990; Matsumoto et al., 1988) dont l'activité dépend de l'augmentation du calcium intracellulaire et de l'ATP, catalyse 2 étapes importantes de la synthèse des leucotriènes. La première étape a lieu à la membrane périnucléaire (Peters-Golden et al., 1996). La phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂) est relocalisée du cytosol à l'enveloppe nucléaire où elle hydrolyse des phospholipides présentant l'acide arachidonique (AA) en position sn-2. Ceci permet le relâchement d'AA pouvant être converti par la 5-LO en LTA₄ dans les cellules qui possèdent cette enzyme.

Il existe un réservoir de 5-LO dans le cytoplasme chez les neutrophiles circulants non activés (Peters-Golden, 1998). Après sa translocation, la 5-LO est localisée avec une protéine essentielle à son activité, appelée FLAP (*5-lipoxygenase activating protein*) (Young et al., 1993), une protéine hydrophobique de 17 kDa située majoritairement au niveau de l'enveloppe nucléaire. Les FLAPs humain et du rat démontrent une homologie de 92 % (Dixon et al., 1990). La FLAP possède un domaine SH3 (Src Homology 3) qui reconnaît les motifs riches en proline, permettant ainsi une interaction avec les protéines du cytosquelette (Peters-Golden, 1998). La 5-LO et la FLAP sont retrouvées dans toutes les cellules produisant les leucotriènes (Reid et al., 1990). L'AA libre lie la FLAP qui le présente à la 5-LO où une réaction d'oxygénation a lieu (Woods et al., 1993). La 5-LO insère une molécule d'oxygène au niveau du C₅ de l'AA pour former un intermédiaire, l'acide 5-hydroperoxy-6,8,11,14-éicosatétraénoïque (5-HPETE) (Ueda et al., 1986). Cette même enzyme catalyse la déshydratation du 5-HPETE pour former un époxyde instable, le LTA₄ (Shimizu et al., 1986). La 5-LO participe aussi à la biosynthèse des lipoxines, un autre groupe de médiateurs lipidiques dérivés de l'AA jouant principalement un rôle dans la phase de résolution de la réaction inflammatoire (Serhan, 2005). Le LTA₄ est un intermédiaire instable permettant de produire des dérivés bioactifs, soit le LTB₄ et le LTC₄ (Borgeat and Sirois, 1980). Le LTA₄ possède une demi-vie inférieure à 5 minutes à un pH 7,4 et à 37°C, il est très labile en milieu acide et est stabilisé en milieu alcalin. Le LTA₄ est produit par toutes les cellules possédant la 5-LO.

Le LTA₄ libéré par les neutrophiles peut être transformé en LTB₄ ou en LTC₄ par des cellules ne possédant pas la 5-LO mais exprimant la LTA₄ hydrolase et/ou la LTC₄ synthase par un mécanisme de métabolisme transcellulaire (Radmark et al., 1980; Nicholson et al., 1992). La LTA₄ hydrolase est présente dans le plasma humain, les

érythrocytes, les cellules inflammatoires, dans le lavage broncho-alvéolaire et dans les cellules épithéliales des poumons (Chung, 1995). La LTC₄ synthase est une enzyme de 18 kDa ayant une importante homologie avec la FLAP. Cette enzyme a été identifiée dans les mastocytes, les éosinophiles, les plaquettes mais aussi les cellules endothéliales (Chung, 1995). Le MK-886, un inhibiteur de la FLAP, inhibe aussi l'activité de la LTC₄ synthase (Sala et al., 1997). Par la suite, le LTC₄ est converti en LTD₄ à l'aide d'une γ -glutamyl transférase et le LTD₄ est converti en LTE₄ par la cystéinyglycine dipeptidase.

1.3.1.1.2. Activités biologiques des leucotriènes

Le LTB₄ est un des médiateurs lipidiques chimiotactiques les plus puissants produits par les cellules immunitaires (Palmer et al., 1980). Le LTB₄, à une concentration de 100 nM, induit une réponse chimiotactique maximale chez les neutrophiles humains (Kreisle et al., 2006). Ce médiateur soluble permet l'adhérence, l'agrégation (Hoover et al., 1984), l'extravasation (Palmer et al., 1980), la génération d'anion superoxide, la sécrétion du PAF et d'IL-8, la dégranulation des leucocytes, l'accumulation des neutrophiles dans les tissus inflammés (Peters-Golden et al., 2004) et la phagocytose des agents pathogènes (Sirois and Borgeat, 1984b; Hamel and Ford-Hutchinson, 1983).

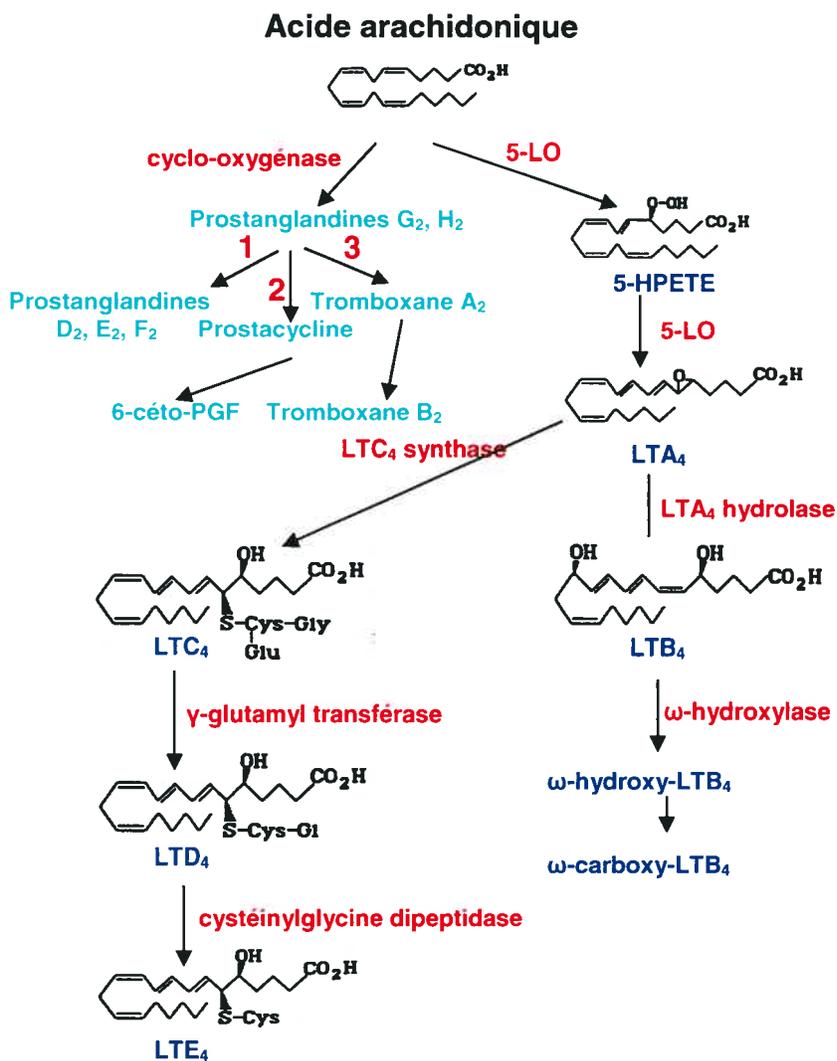


Figure 5. Représentation schématique de la biosynthèse des prostaglandines et des leucotriènes, modifié de (Borgeat et al., 1985b; Sirois and Borgeat, 1984a; Maclouf et al., 1984). 1, isomérase; 2, prostacycline synthétase; 3, thromboxane synthétase. Abréviations : LTA₄, acide 5(S),12(R)-dihydroxy-6,8,10-trans-trans-trans-14(cis)-éicosatétraénoïque; LTB₄, acide 5(S),12(R)-dihydroxy-6,8,10-trans-trans-cis-14-cis-éicosatétraénoïque; LTC₄, acide 5(s)-hydroxy-6(R)-S-glutathionyl-7,9-trans-11,14-cis-éicosatétraénoïque; LTD₄, acide 5-(S)-hydroxy-6-(R)-S-cystéinylglycine-7,9-trans-11,14-cis-éicosatétraénoïque; LTE₄, acide 5-(S)-hydroxy-6-(R)-S-cystéinyl-7,9-trans-11,14-cis-éicosatétraénoïque.

On connaît deux récepteurs du LTB₄, le BLT1 et le BLT2, appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et un récepteur nucléaire, le PPAR α (*peroxisome proliferator activator receptor α*), jouant un rôle dans son catabolisme (Yokomizo et al., 1997; Yokomizo et al., 2000a; Subbarao et al., 2004). Les récepteurs BLT1 et BLT2 présentent 42,5 % d'homologie et sont exprimés majoritairement par les leucocytes périphériques mais peuvent être aussi exprimés dans le thymus et le foie humain (Serhan and Prescott, 2000; Yokomizo et al., 2000b). Le rat possède un récepteur BLT1 de 351 acides aminés et ayant une homologie de 80.2, 93.2 et 71.6 % avec le récepteur BLT1 de l'humain, de la souris et du cobaye, respectivement (Toda et al., 1999). Le récepteur BLT1 du rat transfecté dans les cellules embryonnaires du rein possède une constante de dissociation (Kd) de 0.68 nM pour sa liaison au LTB₄. Le récepteur BLT1 de l'humain et de la souris présentent une homologie de 92.7 % tandis que le récepteur BLT2 présente une homologie de 78.6 % entre les récepteurs humain et murin (Izumi et al., 2002). Le récepteur BLT2 possède chez les neutrophiles humains une affinité relativement faible pour le ligand (Kd de 23 nM) tandis que le récepteur BLT1, un récepteur de 43 kDa, possède une très forte affinité envers son ligand (Kd de 0.1 nM) et est exprimé majoritairement à la membrane plasmique des neutrophiles activés (Goldman and Goetzl, 1984). Ces deux récepteurs semblent avoir un mode d'activation similaire mais le rôle du récepteur BLT2 n'est pas encore clairement élucidé. Le PPAR α lie le LTB₄ au niveau nucléaire et conduit à son catabolisme par β -oxydation, ce qui confère à ce récepteur des propriétés anti-inflammatoires (Subbarao et al., 2004).

Les CysLTs augmentent la perméabilité vasculaire (Goetzl et al., 1984), la vasoconstriction (Sirois and Borgeat, 1984a), la contraction des muscles lisses (Borgeat and

Sirois, 1980), la sécrétion de mucus (Goetzl et al., 1984) et participent à la réaction anaphylactique (Monaco et al., 2005; Borgeat and Sirois, 1980).

Les CysLTs se lient à deux récepteurs couplés aux protéines G appelés CysLT₁ et CysLT₂ (Kanaoka and Boyce, 2004). Ces deux récepteurs sont hautement divergents dans leur séquence en acides aminés avec seulement 38 % d'homologie. Le récepteur CysLT₁ lie préférentiellement le LTD₄, mais peut lier avec une affinité plus faible le LTC₄ et le LTE₄, tandis que le récepteur CysLT₂ lie préférentiellement le LTC₄ et le LTD₄ mais peut lier le LTE₄ avec une affinité beaucoup plus faible (Kanaoka and Boyce, 2004; Heise et al., 2000). Ces deux récepteurs sont exprimés par les mêmes types cellulaires, soit les monocytes, les macrophages, les cellules endothéliales et les fibroblastes.

Dans les conditions normales, le niveau plasmatique de leucotriènes est inférieur à 1 pg/ml (Huang et al., 2004). Lorsque les cellules sont activées, par exemple en réponse aux ions calciques, le neutrophile peut produire 50 ng de LTB₄/10⁶ cellules tandis que les éosinophiles peuvent produire de 25 à 50 ng de CystLTs/10⁶ cellules (Weller et al., 2006).

1.3.1.1.3. Antagonistes sélectifs des récepteurs du leucotriène B₄

Le CP-105,696, l'acide carboxylique (+)-1-(3S,4R)-[3-(4-phenylbenzyl)-4-hydroxychroman-7-yl]cyclopentane, est un antagoniste sélectif du récepteur BLT1 (Griffiths et al., 1995). Il possède une grande affinité pour les récepteurs BLT1 et possède un CI₅₀ de 3,7 nM pour l'inhibition de la liaison du LTB₄ au récepteur dans des homogénats membranaires et de 2.1 nM chez les neutrophiles humains. Dans les neutrophiles humains, la concentration requise pour inhiber la réponse chimiotactique du LTB₄ est de 5.2 nM tandis que la stimulation de l'expression des molécules d'adhésion est inhibée de 50 % à

Tableau 3. Activité biologique des différents leucotriènes, tiré de (Sirois and Borgeat, 1984a).

	LTB ₄	LTC ₄	LTD ₄
Est un facteur chimiotactique puissant pour les neutrophiles et monocytes <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	+		
Provoque les phénomènes de margination des neutrophiles, de leucopénie et d'agrégation <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	+		
Stimule la sécrétion de lysozyme et de β-glucuronidase par les PMNs <i>in vitro</i>	+		
Stimule l'influx des ions calcium dans les PMNs	+		
Induit la transformation des lymphocytes en cellules suppressives et en cellules cytotoxiques	+		
Stimule la libération de prostaglandines et de thromboxanes par le poumon	+	+	+
Stimule la synthèse de prostaglandines et de thromboxanes dans les macrophages péritonéaux de rat		+	+
Augmente la perméabilité vasculaire	+	+	+
Produit la vasoconstriction de la microcirculation et des coronaires		+	+
Produit un effet biphasique (hypertension-hypotension) sur la pression artérielle	+	+	+
Induit des modifications de fréquence et de rythme cardiaque	+	+	+
Est un agent myotrope positif puissant du parenchyme pulmonaire	+	+	+
Est un agent myotrope positif puissant des bronches et de la trachée		+	+
Excite les cellules de Purkinje (cervelet de rat)		+	

une concentration de 430 nM. Lorsque le CP-105,696 est administré par voie intraveineuse, il a une demi-vie de 33 heures chez l'homme. Cette molécule peut être administrée selon un régime posologique d'une dose par jour par voie orale puisque plus de 50 % de la dose administrée est absorbée. Lorsque administré quotidiennement chez la souris, le CP-105,696 inhibe le développement et la progression de l'arthrite rhumatoïde induite par le collagène et réduit l'influx de neutrophiles au niveau de l'articulation. De plus, l'administration orale inhibe l'accumulation de neutrophiles en réponse à l'injection intradermique de LTB₄ avec un DI₅₀ de 4.2 mg/kg. La sélectivité du CP-105,696 envers les récepteurs BLT1 a été démontrée *in vitro* et il a été rapporté que la réponse à l'IL-1 n'était pas inhibée *in vivo* dans un modèle de migration des neutrophiles induite par l'IL-1. *In vitro*, l'incubation de neutrophiles avec une concentration de 10 µM de CP-105,696 n'inhibe pas la chimiotaxie des neutrophiles en réponse au C5a, au PAF ou à l'IL-8 (Huang et al., 2004).

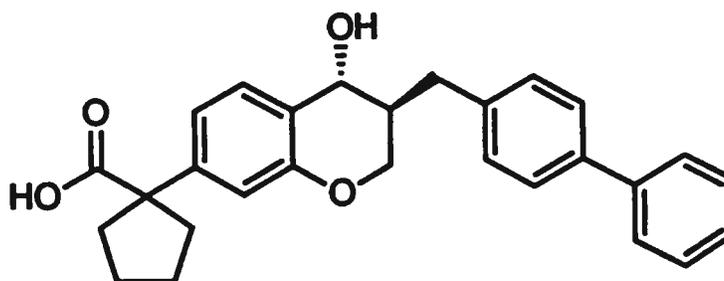


Figure 6. Structure chimique du CP-105,696, tirée de (Griffiths et al., 1995).

Chez le rat, le CP-105,696 administré par la voie sous-cutanée inhibe de façon dépendante de la dose (0.03 à 3 mg/kg) la perméabilité vasculaire et l'accumulation de neutrophiles au niveau de l'intestin, du mésentère et des poumons après une ischémie-reperfusion de l'artère mésentérique supérieure (Souza et al., 2000).

D'autres antagonistes des récepteurs BLT1 ont été synthétisés, mais peu d'entre eux ont été disponibles pour des études *in vivo*, soit en raison de leur faible sélectivité, biodisponibilité ou encore de la non-disponibilité commerciale.

En 1989, deux antagonistes des récepteurs du BLT1 ont été découverts soit le SC-41930 et le ONO-4057 (Ding et al., 2005). Ces deux antagonistes déplacent la liaison du LTB₄ au récepteur dans des homogénats membranaires, inhibent l'agrégation, la chimiotaxie et la dégranulation des neutrophiles induite par le LTB₄.

Par la suite, deux autres inhibiteurs des récepteurs BLT1 ont été caractérisés, soit l'acide benzophénone dicarboxylique (LY223982) et l'hydroxyacétophénone (LY255283) (Ding et al., 2005). Ces deux antagonistes bloquent le récepteur BLT1 à des concentrations nanomolaires dans les expériences *in vitro*, mais sont faiblement biodisponibles par voie orale. Le LY293111, dérivé du LY255283, a été mis au point et possède un taux d'absorption beaucoup plus élevé et est en étude clinique de phase II (Ding et al., 2005). En dépit de sa faible biodisponibilité, l'administration orale du LY255283 a des effets similaires au CP-105,696 chez un modèle d'ischémie-reperfusion de l'artère mésentérique supérieure chez le rat (Souza et al., 2000). Il inhibe l'augmentation de la perméabilité vasculaire à une concentration de 3 mg/kg. Le LY293111, qui est aussi un agoniste du PPAR γ , est très stable oralement et possède des effets anti-cancéreux au niveau du pancréas humain en inhibant la croissance des cellules cancéreuses pancréatiques et en induisant leur apoptose cellulaire autant *in vitro* que *in vivo* (Ding et al., 2005). Chez le rat, le LY293111 possède une faible affinité envers le récepteur BLT1 avec un Ki de 10 nM tandis que chez l'humain la constante de dissociation est de 5.5 nM (Birke et al., 2001).

Plus récemment, le BIIL 284 a été synthétisé. Cette molécule est une prodrogue et présente une faible affinité de liaison pour le récepteur du LTB₄ (Birke et al., 2001). Par contre, il est biotransformé en deux métabolites actifs, le BIIL 260 et le BIIL 315, ce dernier étant une forme glycosylée du BIIL 260. Ces deux métabolites actifs ont une très haute affinité pour le récepteur BLT1 chez le neutrophile humain, avec des K_i de 1.7 et de 1.9 nM pour le BIIL 260 et le BIIL 315, respectivement. La liaison est saturable, réversible et compétitive. Les deux métabolites actifs inhibent la mobilisation des ions calcium avec un CI₅₀ de 0.82 et de 0.75 nM pour le BIIL 260 et le BIIL 315, respectivement. Le BIIL 284, administré par voie orale, inhibe l'inflammation en réponse à l'injection de LTB₄ dans l'oreille de souris avec une DI₅₀ de 0.008 mg/kg. Chez le cobaye, le BIIL 284 inhibe la chimiotaxie induite par le LTB₄ avec un DI₅₀ de 0.03 mg/kg. Chez le rat, le BIIL 284, le BIIL 260 et le BIIL 315 ont des K_i de 960, 6.0 et de 1.4 nM, respectivement. Le récepteur du LTB₄ est complètement bloqué 24 heures après l'administration d'une dose de 0.3 mg/kg de BIIL 284 par voie orale chez le singe, montrant une très longue durée d'action *in vivo*.

1.3.1.2. Les lipoxines

Les lipoxines A₄ (LXA₄) (acide 5,6,15L-trihydroxy-7,9,11,13-icosatétraénoïque) et B₄ (LXB₄) (acide 5D,14D,15L-trihydroxy-6,8,10,12-icosatétraénoïque), sont des médiateurs lipidiques de l'inflammation produits par la voie de synthèse des 15- et 5-LO ou par les voies des 5- et 12-LO (Serhan et al., 1984; Serhan, 2005). La structure des lipoxines est conservée à travers les espèces, du poisson jusqu'à l'humain (Serhan, 2005).

Dans les conditions inflammatoires, le LTA₄, la molécule clé de la formation des leucotriènes et des lipoxines (Brink et al., 2003). Les lipoxines régulent les fonctions

cellulaires en inhibant la migration de PMN activés au niveau de la peau, des poumons et des reins, et en augmentant la phagocytose des leucocytes (Brink et al., 2003). Les lipoxines régulent aussi négativement l'expression de certaines cytokines et chimiokines, tel que l'IL-8, de l'IL-1 et le TNF- α (Serhan, 2005). La réponse biologique aux lipoxines de synthèse inclut la vasodilatation (Fierro and Serhan, 2001), une réduction de l'infiltration des neutrophiles au site inflammatoire et le début de la phase de résolution en permettant de stimuler la chimiotaxie et l'adhérence des monocytes (Chiang et al., 2005; Fierro and Serhan, 2001). La LXA₄ compétitionne pour le récepteur CysLT₁ sur les cellules endothéliales vasculaires humaines et inhibe la liaison du LTC₄ et LTD₄, inhibant ainsi leur action (Brink et al., 2003).

1.3.1.3. Le facteur d'activation plaquettaire (PAF)

Le PAF (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) fait partie de la famille des esters phosphorylcholine (Figure 7) (Johnson, 1999). Le PAF est un important médiateur pro-inflammatoire qui peut agir de manière autocrine et paracrine. Il est synthétisé et libéré par les cellules endothéliales (Camussi et al., 1983a), les plaquettes (Chignard et al., 1979), les neutrophiles (Sisson et al., 1987; Lynch et al., 1979), les macrophages et les monocytes (Mencia-Huberta and Benveniste, 1979; Camussi et al., 1983b), les éosinophiles et les mastocytes (Borgeat et al., 1985b). Le Kd du PAF envers son récepteur est de 10^{-10} à 10^{-9} M selon le type cellulaire (Prescott et al., 1990).

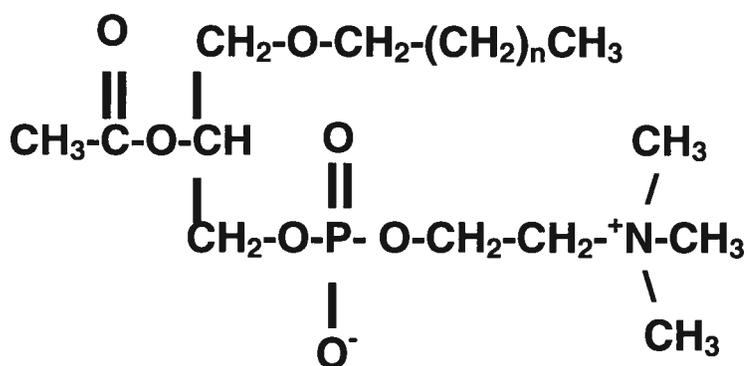


Figure 7. Représentation schématique du facteur d'activation plaquettaire, modifié de (Prescott et al., 1990) où $n=14-16$.

1.3.1.3.1. Biosynthèse du PAF

Le PAF est synthétisé à partir d'un précurseur inactif appelé lyso-PAF (Johnson, 1999). Il est synthétisé par deux voies, la première voie *de novo* est constitutive et la deuxième voie est inductible en réponse à une stimulation spécifique (Figure 8). La voie inductible de remodelage est activée durant l'inflammation tandis que la voie *de novo* synthétise le PAF nécessaire pour les fonctions physiologiques de base (Snyder et al., 1996).

La synthèse *de novo* du PAF s'effectue selon 2 voies enzymatiques distinctes (Woodard et al., 1987). Elle peut se faire par l'acétylation de 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine par l'acétyltransférase alkylglycérophosphate ou encore, par le transfert de la base phosphocholine au groupement 1-alkyl-2-acétyl-sn-glycerol par l'enzyme phosphotransférase choline à l'aide de CDP-choline (cytidine-5-diphosphate choline).

La deuxième voie de synthèse via le remodelage des phospholipides membranaires est activée après une stimulation inflammatoire (Johnson, 1999). L'activation de la PLA₂ cytosolique permet de catalyser l'hydrolyse de résidus d'acide gras en position sn-2 à partir d'un alkyl choline phosphoglycéride en formant un intermédiaire, le 1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine ou lyso-PAF et des acides gras libres (Prescott et al., 1990). Cette étape est suivie de l'acétylation du lyso-PAF par l'acétyltransférase pour former le PAF. La stimulation de la synthèse de PAF est étroitement liée au relâchement de l'AA (Prescott et al., 1990). Lorsque le PAF n'est plus nécessaire à la réponse inflammatoire, il est dégradé à l'aide d'une acétylhydrolase hautement spécifique pour les phospholipides avec une courte chaîne d'acide gras en position sn-2.

1.3.1.3.2. Activité biologique du PAF

Le PAF permet d'activer une variété de cellules à relâcher d'autres médiateurs inflammatoires tel que le TNF- α (Camussi et al., 1987) et l'IL-1 β (Bussolino et al., 1986) qui, par la suite, vont stimuler la production de PAF, de GM-CSF et d'IL-6 (Borgeat et al., 1985b). Aussi, la synthèse de PAF est étroitement liée à la production de LTB₄ et de 5-HPETE par les neutrophiles adhérents (Sisson et al. 1987) car le PAF augmente la biosynthèse de LTB₄ (McDonald et al., 1994; Borgeat et al., 1985b). La thrombine produite par les plaquettes permet d'augmenter l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales en stimulant la synthèse et l'expression de PAF à la surface des cellules endothéliales (Johnson, 1999). Le PAF augmente la chimiotaxie et l'adhésion des neutrophiles et ceci

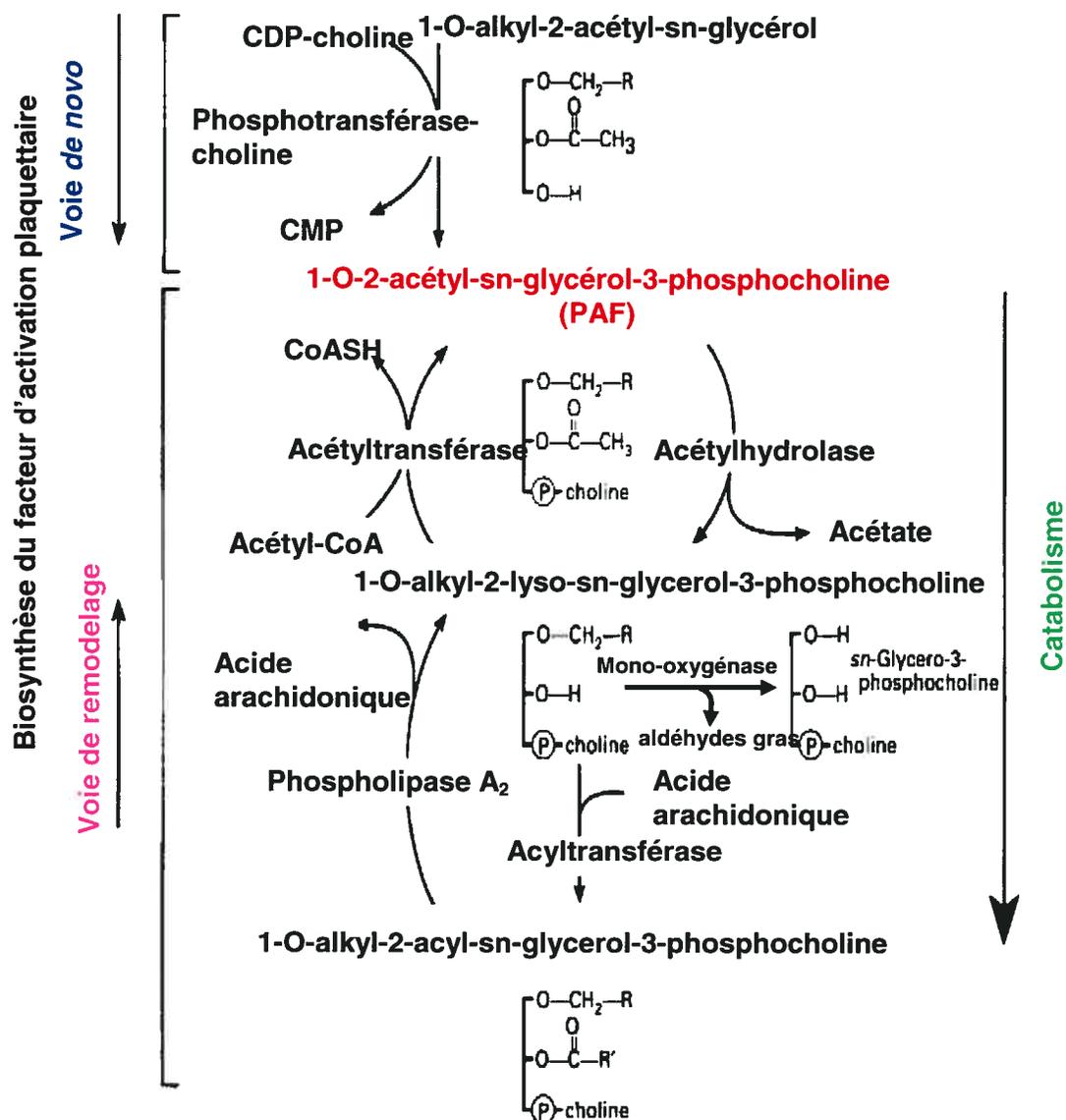


Figure 8. Représentation schématique des deux voies de la biosynthèse du facteur d'activation plaquettaire, tirée de (Chao and Olson, 1993). Abréviations : CDP-choline, cytidine-5-diphosphate choline; CMP, 5'-monophosphate; CoAS, coenzyme A réduit. $\text{R}=\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, où $n=14-16$ et $\text{R}'=\text{CH}_3$.

entraîne le relâchement d'anion superoxide par les leucocytes (Guthrie et al., 1984b), l'agrégation et la dégranulation des plaquettes (Benveniste et al., 1972), ainsi que la dégranulation et la sécrétion des élastases des neutrophiles (Fittschen et al., 1985). Le PAF augmente aussi la perméabilité vasculaire (Humphrey et al., 1982) et le relâchement d'histamine (Benveniste et al., 1972).

Le récepteur du facteur d'activation plaquettaire (PAFR), un récepteur à 7 passages transmembranaire couplé aux protéines G, peut lier le PAF sous une conformation de haute affinité et une conformation de plus faible affinité avec des K_d de 0.2 et 500 nM, respectivement, chez les neutrophiles humains (Chao and Olson, 1993). Le PAFR est retrouvé à la membrane plasmique des cellules musculaires lisses, des neutrophiles, des macrophages, des monocytes, des éosinophiles, des cellules de Kupffer, des cellules épithéliales et chez les plaquettes. Les PAFR du rat et de la souris lient le PAF avec une haute affinité. Le récepteur du PAF est constitué de 342 acides aminés et a une masse moléculaire de 38 kDa chez le rat.

1.3.1.3.3. Antagonistes sélectifs des récepteurs du PAF

Plusieurs antagonistes sélectifs des récepteurs du PAF ont été synthétisés et certains ont fait l'objet d'études cliniques mais aucun n'a été commercialisé à ce jour. Ces molécules sont toutefois utilisées dans différents modèles expérimentaux et quelques unes de ces molécules seront décrites ci-dessous.

Le SR-27417, N-(2-diméthylamino éthyl)-N-(3-pyridinyl méthyl) [4-(2,4,6-triisopropyl phényl) thiazol-2-yl] amine, est le premier membre de la série des nouveaux antagonistes sélectifs du PAFR (Herbert et al., 1996; Casals-Stenzel, 1987). Il est

des membres inférieurs. Chez le rat, cette molécule présente une inhibition maximale à une dose de 1 mg/kg.

Le WEB-2086, un thienotriazolodiazepine, est un antagoniste des récepteurs du PAF, actif autant *in vitro* que *in vivo* (Casals-Stenzel et al., 1987). Il inhibe l'agrégation des plaquettes et des neutrophiles avec un CI_{50} de 0.17 et de 0.36 μ M, respectivement. Il est actif chez différentes espèces dont le cobaye, le rat et le lapin. Chez le rat mâle Wistar, le WEB-2086 peut inhiber les effets hypotenseurs induits par l'administration intraveineuse de PAF avec un DI_{50} de 0.052 mg/kg bien que ces résultats n'aient pas été reproduits chez les rats mâles Sprague-Dawley.

1.3.1.4. Les prostaglandines dans la réponse inflammatoire

Les prostaglandines sont formées par la conversion de l'AA via la cyclo-oxygénase (COX), aussi appelée prostaglandine synthase (Figure 5) (Serhan and Levy, 2003). La COX-1 est responsable de la synthèse basale et constitutive des PGs tandis que la COX-2, une enzyme inductible, génère des PGs en réponse à l'inflammation (Smith et al., 2000). Ces deux enzymes permettent l'insertion de molécules d'oxygène en C11 et C15 de l'AA formant la prostaglandine G_2 . La PGG_2 peut être réduite en PGH_2 , qui à l'aide de la prostaglandine synthase produira les PGD_2 , PGE_2 et PGF_2 . Les prostaglandines, tel que le PGE_2 , sont en partie responsables des 4 symptômes généralement associés à l'inflammation: rougeur, chaleur, œdème et douleur (Cronstein and Weissmann, 1993). La chaleur et la rougeur sont la conséquence de la vasodilatation sanguine (Williams and Peck, 1977) et de l'augmentation du débit sanguin (Serhan and Levy, 2003) au site inflammatoire. Le PGE_2 favorise ainsi l'extravasation plasmatique créant ainsi l'œdème et provoquant une pression dans les tissus, d'où la douleur ressentie (Raud et al., 1988). La

PGE₂ agit en synergie avec d'autres médiateurs de l'inflammation tel que TNF- α et LTB₄ pour augmenter la chimiotaxie des neutrophiles lors de l'inflammation (Desouza et al., 2005).

1.3.2. Cytokines et chimiokines

Les cytokines et les chimiokines jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire. Elles sont sécrétées par une variété de cellules et permettent d'activer de nombreuses fonctions biologiques. Elles agissent principalement par voie autocrine ou paracrine. Les cytokines peuvent être classifiées par leurs familles de récepteurs spécifiques (Tableau 4). Dans ce chapitre, nous décrirons plus en détails certaines cytokines et chimiokines utilisées lors de nos études.

Tableau 4. Famille des récepteurs des cytokines et leurs ligands, modifié de (Metcalf, 1993).

Type de récepteur	Membres
Superfamille des récepteurs de type I (Récepteurs hématopoïétiques)	IL-2R, IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-9R, IL-13R, IL-15R, G-CSF, GM-CSF
Superfamille des récepteurs de type II (Superfamille des immunoglobulines-like)	IL-1R, IL-6R, M-CSF
Superfamille des récepteurs de type III (Récepteur de la famille TNF)	TNF- α , TNF- β , CD40, CD27, Fas/CD95, DR4, DR5
Superfamille des récepteurs de type IV (Récepteurs des chimiokines, 7 domaines transmembranaires)	IL-8R, MCP-1R, MIP-1 α R

Les cytokines et chimiokines sont des molécules d'immunorégulation, elles sont très puissantes et ont souvent des activités redondantes (Hopkins, 2003). Les cytokines sont des molécules de communication entre les lymphocytes, les phagocytes et les autres cellules de l'organisme. Certaines cytokines sont principalement pro-inflammatoires tandis que d'autres sont anti-inflammatoires. Les interleukines forment un vaste groupe de cytokines, elles ont de multiples fonctions dont le contrôle de la différenciation et de la prolifération des cellules (Roitt et al., 2002b). Plusieurs types cellulaires, dont le neutrophile, monocyte, macrophage, lymphocyte, fibroblaste et les plaquettes relâchent une grande quantité d'interleukines, permettant ainsi d'augmenter l'expression des molécules d'adhésion jouant un rôle dans la réponse inflammatoire (Scott et al., 2004). Parmi les cytokines, on retrouve aussi les TNF- α et - β , qui jouent un rôle important dans les réponses inflammatoires (Roitt et al., 2002b). L'IL-1, l'IL-6, et le TNF- α activent, entre autres, la NADPH oxydase des leucocytes. Le TNF- α permet d'induire la production de HOCl tandis que l'IL-1 β permet le relâchement de MPO.

Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques qui permettent de diriger les cellules de la circulation sanguine vers les tissus (Gozal et al., 1998) Les chimiokines forment un groupe d'au moins 40 cytokines de petites tailles jouant un rôle dans la migration sélective, l'activation et le chimiotactisme des cellules. Elles permettent non seulement de déterminer le type de cellules qui doit traverser l'endothélium mais l'endroit où elles doivent se rendre dans les tissus. La plupart des chimiokines ont deux sites de fixation, l'un étant leur récepteur spécifique et l'autre leur permettant de se lier aux hydrates de carbone des protéoglycanes. Ceci permet aux chimiokines de rester attachées à la surface luminale de l'endothélium et d'être prêtes à stimuler les leucocytes ralentis par les sélectines lors du processus de migration cellulaire. Les chimiokines se répartissent en

quatre familles qui se distinguent par la distance séparant deux résidus cystéine conservés (Smith, 1994). Les chimiokines α ont une séquence CXC et les chimiokines β ont une séquence CC. Toutes les chimiokines agissent par la stimulation de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. La plupart des chimiokines interagissent avec plusieurs récepteurs. Ainsi, les récepteurs pour les chimiokines CXC sont appelés CXCR1, CXCR2, etc. et ceux pour les chimiokines CC sont appelés CCR1, CCR2, etc.

L'IL-8 est une chimiokine pro-inflammatoire ayant des propriétés chimiotactiques pour le neutrophile (Hechtman et al., 1991). L'IL-8 est un des premiers stimuli à entraîner les réponses inflammatoires. Elle possède une forte activité chimioattractante mais agit aussi en synergie avec l'interféron- γ , le TNF- α , le GM-CSF et le G-CSF pour augmenter la production de dérivés ROS (Smith, 1994). L'injection intraveineuse d'IL-8 diminue de façon transitoire le nombre de neutrophiles circulants en causant la séquestration de ceux-ci dans la microvasculature pulmonaire, principalement (Zwahlen et al., 1993). L'IL-8 et l'IL-6 sont synthétisés en réponse au TNF- α (Sheron and Williams, 1992).

1.3.3. Protéines du complément

Le système du complément comprend environ 30 protéines représentant 10% de l'ensemble des protéines sériques (Roitt et al., 2002b). Les protéines du complément permettent la phagocytose, contrôlent l'inflammation et interagissent avec les anticorps dans la défense immunitaire. L'activation du complément se déroule en cascade. L'étape centrale de l'activation du complément est le clivage du C3 en deux fragments, le C3a et le C3b. Le C3a active les phagocytes et les mastocytes tandis que le C3b peut s'attacher de manière non-covalente aux structures environnantes. Le C3b permet aussi d'activer les

fragments C5 à C9. L'activation des voies dites classique, des lectines et alternative mène au même résultat, soit l'opsonisation des agents pathogènes en vue de leur capture et de leur destruction par les phagocytes, l'attraction des phagocytes aux sites de l'inflammation, l'augmentation du flux sanguin, l'augmentation de la perméabilité post-capillaire aux protéines plasmatiques et la libération des médiateurs de l'inflammation par les mastocytes.

L'une des molécules les plus actives du système du complément est le C5a (Roitt et al., 2002b). Par contre, le C5a a une demi-vie très courte dans le sérum. Il est rapidement inactivé par la carboxypeptidase N, qui enlève le résidu arginine N-terminal. La molécule C5_{adesArg} qui en résulte est un médiateur moins puissant mais de demi-vie plus longue.

1.3.4. Métabolites réactifs de l'oxygène

Le relâchement de ROS via la voie NADPH oxydase est une autre activité antimicrobienne du neutrophile (Smith, 1994; Babior, 1992). Les ROS sont produits lors de l'activation et la phagocytose par les neutrophiles. L'anion superoxide (O_2^-) est formé par la réduction de la molécule d'oxygène par la voie de la NADPH oxydase. Ce processus est catalysé par la formation du complexe NADPH oxydase membranaire avec le cytochrome b₅₅₈. Ce cytochrome est le dernier accepteur d'électrons.

Le système de la NADPH oxydase est dissocié dans les neutrophiles inactifs, les composantes étant soit sur la membrane ou dans les granules cytosoliques, et ne pouvant donc pas interagir entre (Babior, 1992). Lors de l'activation, les composantes cytosoliques sont déplacées vers la membrane plasmique et permettent ainsi d'activer le système d'oxydation.

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est formé par la dismutation de O_2^- par l'activité catalytique de la superoxide dismutase (SOD) (Babior, 1992). L'acide hypochloreux (HOCl) est formé par la réaction de l' H_2O_2 avec les ions chlorures présents. De 30 à 70 % du H_2O_2 est converti en HOCl (Smith, 1994), qui peut réagir avec des composés azotés pour former toute une gamme d'amines chlorées (Weiss, 1989).

Les ROS, en plus d'augmenter la phagocytose, permettent la margination des neutrophiles en augmentant l'expression des molécules d'adhérence (Babior, 1992). Le LTB_4 , le PAF et l'IL-8 produits par les leucocytes stimulent la production de ROS (Smith, 1994). Aussi, l' O_2^- peut réagir avec le monoxyde d'azote (NO) afin de produire le peroxynitrite ($ONOO^-$) ou encore avec le H_2O_2 pour former un radical hydroxy (Huie and Padmaja, 1993).

Les RNS, métabolites réactifs de l'azote, sont aussi produits par les neutrophiles par la voie de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) (Smith, 1994). Les RNS permettent de faciliter la migration des neutrophiles aux sites inflammatoires car ils induisent la vasodilatation au niveau des veinules post-capillaire. Les RNS facilitent la relaxation des muscles lisses vasculaires tandis que les ROS initient la vasoconstriction.

1.4. Molécules d'adhésion jouant un rôle dans la migration extravasculaire des leucocytes

En plus du gradient chimiotactique induit par des agonistes, trois classes de molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) dont le rôle est séquentiel dans la majorité des circonstances, sont essentielles au processus de migration des neutrophiles au foyer inflammatoire: dans un premier temps, les sélectines et leurs ligands, les sialomucines,

permettent l'adhésion lâche des leucocytes à la surface endothéliales et, par la suite, les intégrines et les membres de la superfamille des immunoglobulines interviennent (Cronstein and Weissmann, 1993).

Les CAMs sont des protéines membranaires fournissant à la cellule le moyen d'interagir avec d'autres cellules de son environnement (Roitt et al., 2002a). Plusieurs des CAMs traversent la membrane et sont liées au cytosquelette. Ceci permet à la cellule d'exercer une traction sur d'autres cellules ou de prendre appui pour se déplacer sur la matrice extracellulaire. Bien que l'affinité de liaison de chaque CAMs pour son ligand soit faible, la participation de plusieurs CAMs permet une interaction cumulative plus forte. Les cellules peuvent aussi moduler la densité des CAMs à leur surface, ce qui modifie leur avidité envers leurs ligands. Certaines CAMs peuvent se retrouver dans des vésicules sous forme de réserve et peuvent être mobilisées à la surface cellulaire en quelques minutes ou encore être synthétisées et transportées à la surface cellulaire en quelques heures.

Les médiateurs pro-inflammatoires sécrétés localement ont pour effet d'activer les neutrophiles circulants ainsi que les cellules endothéliales à proximité du site d'inflammation (Brown, 1997). Le nombre de cellules qui roulent augmente rapidement avec la réponse inflammatoire. Ainsi, les trois membres des sélectines, incluant la sélectine-L, -P et -E, sont des glycoprotéines transmembranaires, comportant un domaine extracellulaire homologue à ceux que l'on retrouve dans les protéines régulatrices du complément et un domaine semblable au facteur de croissance de l'épiderme (EGF) (Klintman et al., 2002). Le domaine N-terminal, comme les lectines, se lie aux résidus hydrocarbonés, d'où le nom de sélectine. La sélectine-L est exprimée de façon constitutive à la surface des neutrophiles et sa liaison avec la PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), appartenant à la famille des sialomucines permet d'activer le neutrophile (Brown, 1997;

McEver and Cummings, 1997). La protéolyse et le relargage des sélectines-L dans le milieu extracellulaire est un marqueur de l'activation des PMNs. La sélectine-P et la sélectine-E sont exprimées de façon transitoire par les cellules endothéliales activées de 15 minutes à 6 heures après le début de la réponse inflammatoire. La sélectine-P est aussi retrouvée à la surface des plaquettes activées (Klintman et al., 2002). Elle est exprimée quelques secondes après la stimulation des plaquettes et quelques minutes après la stimulation des cellules endothéliales par des stimuli tels que l'histamine, la thrombine, la bradykinine, le LTC₄, et les radicaux libres. La sélectine-P est emmagasinée dans les granules α des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade de l'endothélium. La sélectine-E est retrouvée seulement à la surface de l'endothélium activé, après stimulation par des cytokines dont l'IL-1 α et β , le TNF- α et les tachykinines dont la substance P (Klintman et al., 2002; Luscinskas et al., 1991). Dans les foyers inflammatoires, la sélectine-E et la sélectine-P, qui sont induites sur l'endothélium activé, se lient à l'épitope sialyl Lewis-X (CD15) des sialomucines, présent sur de nombreux leucocytes (Roitt et al., 2002a). Lorsque les sélectines se lient à leurs ligands, les leucocytes circulants dans les veinules sont ralentis, leur permettant d'intégrer les signaux provenant de l'endothélium et de s'activer. Par contre, si les signaux reçus ne dépassent pas le seuil nécessaire à leur activation, les leucocytes se détachent de l'endothélium et retournent à la circulation veineuse.

Les intégrines, jouant un rôle dans l'étape subséquente d'adhésion ferme, sont définies par une sous-unité commune appelée chaîne β (Peters-Golden et al., 2004; Luscinskas et al., 1991). Elles sont exprimées, pour la plupart, de façon constitutive à la surface des leucocytes, mais activées lors de leur stimulation. Chaque chaîne β peut s'associer à différentes chaînes α , mais selon un nombre déterminé de combinaisons

possibles. De manière générale, les intégrines β_1 jouent un rôle dans la liaison des cellules à la matrice extracellulaire, tandis que les intégrines β_2 jouent un rôle dans l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales et aux cellules immunitaires. Les intégrines β_3 jouent un rôle dans les interactions des plaquettes et des neutrophiles au niveau du foyer inflammatoire.

Les CAMs endothéliales qui interagissent avec les intégrines comprennent ICAM-1 et -2 (molécule d'adhérence intercellulaire-1 et -2), VCAM-1 (molécule d'adhérence cellulaire vasculaire-1) et MAdCAM-1 (*mucosal addressin cell adhesion molecule*) (Roitt et al., 2002a). ICAM et VCAM permettent l'adhérence, l'arrêt et la transmigration des leucocytes. PECAM-1, une protéine des jonctions intercellulaires endothéliales appartenant à la famille des immunoglobulines participe aussi à la diapédèse leucocytaire.

Ces molécules sont inductibles ou exprimées sur les endothéliums vasculaires. ICAM-1 et VCAM-1 sont induites par des cytokines inflammatoires telles que le TNF- α et l'interféron- γ tandis que ICAM-2 est exprimé faiblement mais de façon constitutive. ICAM-1 et -2 interagissent avec LFA-1 (antigène fonctionnel des leucocytes), exprimé par la plupart des leucocytes, et ICAM-1 peut aussi lier MAC-1 (*macrophage antigen-1*) (Iigo et al., 1997), exprimé sur les neutrophiles et les phagocytes mononucléés. De plus, les agonistes solubles, LTB₄, C5a et le fMLP, permettent d'augmenter l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales (Klintman et al., 2002; Luscinskas et al., 1991). VCAM-1 se lie au VLA-4 (antigène de phase tardive) ($\alpha_4\beta_1$), exprimé par les lymphocytes et les macrophages et au LPAM-1 (*integrin $\alpha_4\beta_7$ - ligand binding*), exprimé par les lymphocytes T.

La transmigration est aussi régulée par les jonctions serrées (*zonula occludens*) des cellules endothéliales (Burns et al., 1997). En effet, elles régulent la perméabilité macromoléculaire. Ces jonctions sont discontinues au point de contact entre trois cellules de l'endothélium vasculaire. La transmigration a lieu plus souvent à ces endroits qu'aux autres. Les JAMs (*junctional adhesion molecules*) appartenant à la famille des immunoglobulines sont exprimées par les plaquettes et les leucocytes et sont présentes aux points de contact cellule-cellule. Les JAMs s'associent principalement avec LFA-1 et MAC-1.

2. Objectifs de l'étude

Les médiateurs lipidiques comme le LTB₄ et le PAF jouent un rôle important dans la régulation de l'accumulation extravasculaire des neutrophiles et de l'extravasation plasmatique à l'interface sang-cellules endothéliales (Figure 10). L'objectif de cette étude est d'évaluer le rôle de ces médiateurs et leur effet collectif sur la régulation de l'extravasation des PMNs. Nous avons soulevé l'hypothèse que les médiateurs lipidiques, particulièrement le PAF et le LTB₄ agissent de manière concertée pour réguler la migration et l'extravasation des PMNs au site inflammatoire, et ce, indépendamment de la nature chimique du stimulus qui active le PMN dans le contexte de la réponse inflammatoire. Dans ce but, nous étudierons l'effet d'antagonistes sélectifs des récepteurs du LTB₄, un récepteur à 7 passages transmembranaires appelé BLT1, ainsi que d'antagonistes sélectifs des récepteurs du PAF, appartenant à la même superfamille de récepteurs, dans un modèle d'inflammation dermique induite par l'injection intradermique d'agonistes solubles et dans un modèle d'inflammation pulmonaire induite par l'injection intraveineuse de billes de Séphadex chez le rat.

Le CP-105,696, un antagoniste sélectif du BLT1, et le SR-27417, un antagoniste sélectif du PAFR, ont été administrés seuls ou de façon concomitante chez le rat. Nous avons choisi ces deux antagonistes car le CP-105,696 possède une longue demi-vie et il est pratiquement le seul antagoniste sélectif du BLT1 qui a un effet dans le modèle expérimental utilisé tandis que le SR-27417 a une plus courte demi-vie mais est très puissant comparativement aux autres molécules disponibles.

Brièvement, des rats mâles Sprague-Dawley ont été injectés quotidiennement avec un facteur stimulant la maturation des granulocytes, le r-met-HuG-CSF (*Recombinant*

granulocyte colony-stimulating factor), à une dose de 5 µg/kg pour une période de 9 à 11 jours avant de débiter le protocole expérimental afin d'augmenter le nombre de PMNs circulants. Les drogues ont été dissoutes dans le véhicule approprié et administrées oralement par gavage à des temps spécifiques avant l'injection i.d. des agonistes. Les agonistes solubles étudiés dans le modèle de l'inflammation dermique sont le LTB₄, le LTC₄, le PAF, le plasma activé par le zymosan (ZAP) et le TNF-α. L'accumulation des PMNs aux sites inflammatoires a été quantifiée après une période de 2 et 4 heures dans les modèles d'inflammations dermique et pulmonaire, respectivement. Le nombre de PMNs a été évalué par le dosage enzymatique de la MPO et l'œdème a été mesuré par le dosage colorimétrique du bleu d'Evans dans les biopsies ou le tissu.

Le modèle d'inflammation cutané nous a permis de révéler un effet additif des médiateurs lipidiques dans la régulation de l'accumulation dermique des neutrophiles induite par des agonistes de nature chimique différente de celle des médiateurs lipidiques, dont le TNF-α et le C5_{adesarg} (généralisé dans le ZAP) et dans l'accumulation tissulaire après l'injection intraveineuse de billes de Séphadex qui se loge au niveau des capillaires pulmonaires (Maghni et al., 1993).

Nos résultats contribuent à élucider le rôle des médiateurs lipidiques dans la régulation de la migration des leucocytes polynucléés et la formation d'œdème au foyer inflammatoire dans différents contextes d'inflammation aiguë.

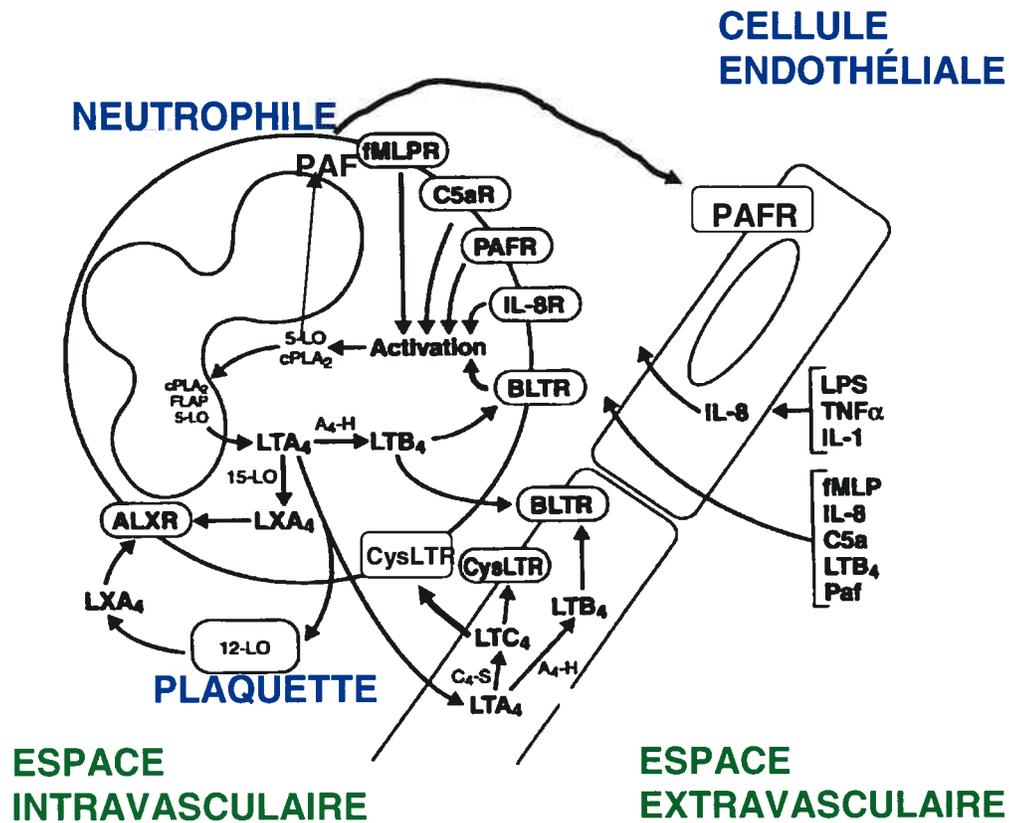


Figure 10. Hypothèse de recherche, modifié de (Marleau et al., 1999). Abréviations : 5-LO, 5-lipoxygénase; 12-LO, 12-lipoxygénase; 15-LO, 15-lipoxygénase; A₄-H, LTA₄ hydrolase; ALXR, récepteur de LXA₄; BLTR, récepteur du leucotriène B₄; C₄-S, LTC₄ synthase; C5a, fragment activé du complément 5a; C5aR, récepteur du C5a; cPLA₂, phospholipase A₂ cytosolique; CysLTR, récepteur des cystéinyls leucotriènes; FLAP, 5-lipoxygenase activating protein; fMLP, peptide N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine; fMLPR, récepteur du fMLP; IL-1, interleukine-1; IL-8, interleukine-8; IL-8R, récepteur de l'IL-8; LTA₄, leucotriène A₄; LTB₄, leucotriène B₄; LTC₄, leucotriène C₄; LPS, lipopolysaccharide; LXA₄, lipoxine A₄; PAF, facteur d'activation plaquettaire; PAFR, récepteur du PAF; TNF- α , facteur nécrosant des tumeurs- α .

CHAPITRE II

**COOPERATION OF LEUKOTRIENE B₄ AND PLATELET-
ACTIVATING FACTOR IN THE REGULATION OF
NEUTROPHIL TRAFFICKING TO DERMAL AND
PULMONARY INFLAMMATORY SITES IN RATS**

**COOPERATION OF LEUKOTRIENE B₄ AND PLATELET-ACTIVATING
FACTOR IN THE REGULATION OF NEUTROPHIL TRAFFICKING TO
DERMAL AND PULMONARY INFLAMMATORY SITES IN RATS**

Caroline Bélanger*, Pierre Borgeat[†] and Sylvie Marleau*

*Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Québec, Canada, [†]Centre de recherche en Rhumatologie et Immunologie, Centre de recherche du CHUQ (CHUL), Sainte-Foy, Québec, Canada.

Keywords : LTB₄, PAF, PMNs, inflammation, lung, skin

Correspondence:

Sylvie Marleau, PhD,

or

Pierre Borgeat, PhD,

Faculty of Pharmacy,

Centre de recherche en Rhumatologie et

Université de Montréal,

Immunologie (CRRI),

P.O. Box 6128 Succ. Centre-ville,

2705, boul. Laurier, local T1-49,

Montreal, Canada, H3C 3J7

Sainte-Foy, Canada, G1V 4G2

██

██

Phone: 514-343-7110

418-656-4141 # 4-6166

FAX: 514-343-2102

418-654-2765

Running title : ROLE OF LTB₄ AND PAF IN NEUTROPHIL TRAFFICKING

Article en préparation

1. ABSTRACT

The inflammatory response is characterized by the influx of polymorphonuclear neutrophil (PMNs) in the first hours following injury. Leukotriene B₄ (LTB₄) and platelet activating factor (PAF) are potent chemotactic mediators that regulate PMNs trafficking and plasma extravasation at the inflammatory site. To delineate the relative contribution of lipid mediators to PMN chemotaxis elicited by different inflammatory stimuli, we used selective and potent PAF (SR-27417) and LTB₄ (CP-105,696) receptor antagonists pre-treatment in rat inflammation bioassays. In dermal inflammation, rats pretreated with SR-27417 and CP-105,696 show a reduced accumulation of PMNs compared to single drug administration, by 75 % in sites injected with PAF, by 82% in these injected with LTB₄, compared to 30-45 % inhibition with either SR-27417 or CP-105,696 alone. Furthermore, the concomitant administration of the drugs inhibited PMNs accumulation as well as plasma extravasation to chemically unrelated inflammatory agonists. Similar observations were made in pretreated rats subjected to Sephadex bead-induced lung inflammation, inasmuch as only the concomitant administration of the drugs was able to reduce the accumulation of PMNs by 63 %. These results strongly support a cooperative role of LTB₄ and PAF in regulating PMNs trafficking to sites of inflammation.

2. INTRODUCTION

Polymorphonuclear neutrophil (PMNs) contribute to host defence by releasing reactive oxygen species, chemotactic molecules including cytokines, chemokines and lipid mediators which amplify the inflammatory response (Roitt et al., 2002a). However, PMNs are known to contribute to the pathogenesis of chronic inflammatory diseases and relapse, and are thought to be responsible for tissue damage (Abramson et al., 1983; Poynter et al., 2006). Among pro-inflammatory lipid mediators, leukotriene B₄ (LTB₄) is the most potent chemoattractant produced by PMNs and acts mainly in a paracrine and autocrine manner (Palmer et al., 1980; McDonald et al., 1994). Previous studies supported an important role for LTB₄ in mediating PMN trafficking to inflammatory sites in response to a variety of soluble agonists (Marleau et al., 1999; McDonald et al., 1991). In a similar manner, platelet-activating factor (PAF), also produced by neutrophils, stimulates neutrophil responses including LTB₄ biosynthesis (McDonald et al., 1994; McColl et al., 1991). Both LTB₄ (Chen et al., 2006; Kim et al., 2006) and PAF (Palacios et al., 1999) were shown to play an important role in chronic murine arthritis using either genetically deficient (5-LO^{-/-}, BLT1^{-/-}) or pharmacologic receptor antagonist models. Yet, to our knowledge, the possibility for a cooperative roles of these mediators in regulating PMNs extravasation in vivo has not been explored.

In vitro studies supported a close interrelation between LTB₄- and PAF- stimulated functions of PMNs. For instance, BLT1 signalling was shown to be involved in PAF-mediated PMN dégranulation and chemotaxis (Gaudreault et al., 2005), and newly synthesized PAF and LTB₄ can enhance LT synthesis in PMNs (McDonald et al., 1994).

PAF-mediated calcium mobilization was also shown to be partially desensitized by LTB₄ (Tomhave et al., 1994).

In the present study, we have used a pharmacological approach to test the potentially cooperative effect of LTB₄ and PAF in regulating PMN and plasma extravasation to dermal and pulmonary inflammatory sites in rats. Our results show that concomitant blockade of BLT1 and PAF receptors enhances the inhibitory effect of single drug administration in an additive or synergistic manner. These results strongly support a co-operative role of LTB₄ and PAF in regulating PMN trafficking to sites of inflammation.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Animals

Male Sprague-Dawley rats (100-150 g) were purchased from Charles River (St-Constant, Québec, Canada). Rats were injected daily with recombinant methionyl human granulocyte colony-stimulating factor (r-met-HuG-CSF) (5 µg/kg) for 9 to 11 days before experimentation to increase the number of circulating PMNs. All experimental protocols were performed in accordance with the Canadian Council for Animal Care guidelines and approved by the institutional animal care and use committee.

3.2. Reagents

r-met-HuG-CSF (filgastrim) was obtained from Amgen Canada Inc. (Mississauga, Ontario, Canada). (+)-1-(3S,4R)- [3-(4-phenyl-benzyl)-4-hydroxy-chroman-7-yl]-cyclopentane carboxylic acid (CP-105,696) was kindly provided by Dr. D.W. Owens from Pfizer (Groton, CT) and N-(2-dimethylamino-ethyl)-N-(3-pyridinylmethyl)[4-(2,4,6-triisopropyl-phenyl)thiazol-2-yl]amine (SR-27417) by Dr. J.-M. Herbert from Sanofi-Aventis (Toulouse, France). BSA (very low endotoxin), dimethyl sulphoxide, hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), hydrogen peroxide (H₂O₂), platelet-activating factor (PAF), prostaglandin E₂ (PGE₂), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) were purchased from Sigma-Aldrich Compagny (St-Louis, MO). Modified HBSS and HEPES buffer were from Gibco Life Technologies (Grand Island, NY). Tumor necrosis factor-α (TNF-α) were purchased from PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). Sephadex beads (G50 superfine) were obtained from Pharmacia & Upjohn (Uppsala, Sweden). Ketamine (Ketalar[®]) and xylazine (Rompun[®]) were obtained from CDMV Inc. (St-Hyacinthe, Québec, Canada). Pentobarbital (Euthansol) was purchased from Schering Canada Inc

(Pointe-Claire, Québec, Canada). All solutions for parental administration were purchased from Baxter Corporation Laboratories (Toronto, Ontario, Canada).

3.3. Experimental protocols

3.3.1. Dermal inflammation

Rats were pretreated orally with SR-27417 (0.3 mg/kg in sterile water), and/or CP-105,696 (3 mg/kg in 0.5 % carboxymethylcellulose), 2 and 16 hours before the intradermal (i.d.) injections of soluble agonists, respectively. The day of the experiment, anesthesia was induced by an i.p. injection (0.1 ml/100 g) of ketamine (70 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) (90:10), and the rats were placed on heating pads. The agonists under investigation included LTB₄ (500 pmol/site), PAF (1.9 nmol/site), TNF- α (10 pmol/site) and 3 % zymosan-activated plasma (ZAP), injected in 50 μ l HBSS containing 0.1% BSA and PGE₂ (250 pmol/50 μ l). Agonists were injected in duplicates on shaved dorsal skin, up to 16 sites per rat. PMNs accumulated to inflammatory sites for a period of 2 hours. Thirty minutes before sacrifice, rats were injected i.v. with Evans blue (100 mg/kg) in 0.9% NaCl through the subclavian vein to assess vascular permeability in response to i.d. injections of agonists. Before sacrifice, one ml blood sample was obtained from anesthetised rats to determine total and differential circulating leukocyte counts, the blood was centrifuged and the plasma extracted for Evans blue quantification. The rats were killed with an overdose of pentobarbital, skin biopsies were punched out, weighted and frozen at -80°C until assayed for myeloperoxidase (MPO) activity.

3.3.2. Pulmonary Inflammation

Pulmonary inflammation was elicited by injecting i.v. 15 mg/kg Sephadex beads through the subclavian vein of anesthetised rats. Four hours later, one ml of blood was

taken from the thoracic aorta for total and differential counts. Rats were killed with an overdose of pentobarbital and the heart and lungs flushed with a solution of 0.9 % NaCl containing 10 mM EDTA and harvested en bloc. Lungs were dissected, weighted and frozen at -80°C until assayed for MPO.

3.4. Analytical methods

3.4.1 MPO assay

The assays for MPO in skin and lung were done as described previously (Tremblay et al., 2000); (Goldblum et al., 1985). Briefly, skin biopsies and lung were homogenized in 1 ml of 100 mM acetate buffer, pH 6.0, containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) and 20 mM EDTA. The homogenates were subjected to three freeze-thaw cycles and then centrifuged at 2000 g at room temperature for 10 minutes. The supernatants were filtered on 0.2 µm Filtropur. Lung supernatants were incubated 2 hours at 65 °C. MPO, liberated from PMN granules, was assayed by incubating the cells with 3.2 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and 1.0 mM hydrogen peroxide for 5 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 100 µl of 0.2 M sodium acetate (pH 3.0). MPO standards were prepared using isolated rat blood PMN after i.p. casein injection diluted in PBS/1 % HTAB. PMNs numbers were calculated from the standard curve and expressed as the number of PMNs per skin site or g of tissue.

3.4.2 Evans blue assay

Evans blue was extracted with dimethyl formamide at room temperature for 48 h and quantified by measuring supernatant absorbance at 630 nm (Reutershan et al., 2006). Evans blue concentrations were determined using a standard curve of Evans blue. Plasma extravasation was calculated as $\mu\text{l} = \mu\text{g Evans blue/site}/(\mu\text{g Evans blue}/\mu\text{l of plasma})$.

3.5. Statistical Analysis

All results are expressed as mean \pm SEM, and statistical comparisons were performed by a one-way ANOVA followed by pair-wise multiple comparisons using the Student-Newman-Keuls methods using GraphPad Prism Version 4.0 (San Diego, CA). Difference was considered significant at $p < 0.05$.

4. RESULTS

4.1. Effect of SR-27417 and CP-105,696 on neutrophil accumulation elicited by soluble agonists of inflammation in rat skin

In a first series of experiments, we assessed the dose-dependent inhibitory effect of CP-105,696 on LTB₄-elicited PMNs accumulation in skin (**Fig. 1A**) and of SR-27417 on PAF-elicited dermal PMNs influx (**Fig. 1B**). To determine the potentially cooperative action of the lipid mediators, suboptimal doses of CP-105,696 (3 mg/kg) and of SR-27417 (0.3 mg/kg) were selected to provide a partial inhibition of PMNs migration by both antagonists. We show that 3 mg/kg of CP-105,696 administered 16 hours before injecting 500 pmol of LTB₄ i.d. inhibited PMNs accumulation by 69 % ($p < 0.001$) (**Fig. 1C**) whereas 0.3 mg/kg of SR-27417, administered 2 hours before injecting 1.9 nmol of PAF i.d., reduced PMN migration by 43 % (**Fig. 1D**). Interestingly, SR-27417 also partially inhibited (37 %, $p < 0.05$) PMN accumulation elicited by LTB₄ (**Fig. 1C**). In both LTB₄- and PAF- elicited dermal inflammation, the concomitant administration of the selective BLT1 and PAF receptor antagonists showed an additive effect with 82 and 75 % inhibition ($p < 0.001$) of PMN accumulation, respectively (**Fig. 1C and 1D**).

We also tested whether CP-105,696 and/or SR-27417 could inhibit PMN accumulation elicited by chemically unrelated soluble agonists such as ZAP, a source of C5_{adesarg} (Skubitz and Craddock, 1981), and TNF- α . Whereas single drug administration did not significantly block PMN migration, the concomitant drug regimen inhibited ZAP- (**Fig. 2A**) and TNF- α (**Fig. 2B**)-chemotactic responses by 72 and 68 % ($p < 0.05$), respectively.

4.2. Effect of SR-27417 and CP-105,696 on local oedema elicited by LTD₄ in rat skin

Pretreatment of the rats with either SR-27417 or CP-105,696 did not significantly reduce plasma extravasation at dermal skin sites elicited by 500 pmol of LTD₄. However,

local oedema was reduced by 45 % ($p < 0.01$) by the co-administration of the drugs. (**Fig. 3**).

4.3. Cooperative role of LTB₄ and PAF on PMN accumulation in lung inflammation

To elucidate the potentially cooperative role of LTB₄ and PAF in regulating PMN recruitment to inflamed lungs, rats were pretreated with SR-27417 and/or CP-105,696 followed by the i.v. injection of Sephadex beads. The results show that either drug, administered alone, did not prevent lung neutrophilia ($1.8 \pm 0.5 \times 10^5$ PMN/g in controls w/o Sephadex) whereas the concomitant administration of the drugs reduced lung neutrophilia by 63 % ($p < 0.05$) (**Fig. 4 A**). Also, the blood neutrophilia can be reduced by the concomitant administration of the drugs by 66 % ($p < 0.05$) (**Fig. 4B**)

5. DISCUSSION

Our results support a cooperative role for the lipid mediators PAF and LTB₄ in the regulation of PMN trafficking to inflammatory sites. On the one hand, PMNs influx to dorsal skin sites injected locally with either LTB₄ or PAF was inhibited dose-dependently by their respective receptor antagonists (**Fig. 1A and 1B**). Interestingly, LTB₄-elicited dermal PMNs accumulation was partially blocked by the PAF-receptor antagonist SR-27417. A similar tendency was observed for PAF-elicited dermal PMN accumulation in rat dorsal skin (**Fig.1D**). Such effects of selective receptor antagonists or of inhibitors of leukotriene biosynthesis have been reported in different experimental settings. For instance, the selective PAF receptor antagonist Y-24180 inhibited the increase in intracellular calcium elicited by LTB₄, possibly through blockade of endogenous PAF action (Komatsu and Amano, 1997). Interaction between LTB₄ and PAF biosynthesis pathways have also been reported (Moilanen et al., 1993; McDonald et al., 1994), and the underlying mechanism identified as a reduced availability of arachidonic acid following either LTB₄ or PAF receptor blockade (McDonald et al., 1994). These studies underscored an autocrine role for endogenous LTB₄ and PAF generation on LT biosynthesis. Our results further show an additive effect of LTB₄ and PAF receptor blockade on PMNs recruitment elicited by either of the lipid mediator. Moreover, our results clearly show that in the rat skin bioassay model, only the concomitant administration of the antagonists, as opposed to single drug administration, was able to significantly reduce PMNs influx in response to chemically unrelated chemoattractants such as C5_{adesarg} and TNF- α (**Fig. 2**).

A role for either LTB₄ or PAF in regulating PMN extravasation in inflammatory models or in response to specific soluble agonists has been reported. We have previously shown that 5-LO inhibition reduced PMN migration to dermal inflammatory sites elicited by fMLP, C5a, IL-8, LPS and TNF- α in rabbits (Marleau et al., 1999). 5-LO inhibition also

supported a role for LTB₄ in murine immune-complex pneumonitis (Tavares de Lima et al., 1998). In other studies, a role for PAF in mediating oedema formation in the reverse passive Arthus reaction was proposed (Rossi et al., 1992) as well as in mediating the hypotensive effect of zymosan (Damas et al., 1993). In vitro, LT synthesis in response to fMLP or C5a was blocked by BLT1 receptor antagonists, and to a lesser degree by PAF receptor antagonists (McDonald et al., 1994).

Nevertheless, evidence for a cooperative role of the two lipid mediators, LTB₄ and PAF, in regulating PMN trafficking and plasma extravasation at inflammatory sites is still scarce. Our results show that the regulatory effect of LTB₄ and PAF on PMN migration (**Fig. 1 and 2**) and plasma extravasation (**Fig. 3**) are additive. Indeed, the dermal accumulation of PMNs induced by the intradermal injection of LTB₄ was inhibited by 69 % ($p < 0.001$) by CP-105,696 pretreatment at a dose of 3 mg/kg and by 37 % ($p < 0.05$) with the selective PAF receptor antagonist at the dose used (0.3 mg/kg) (**Fig. 1C**). When the two drugs were administered together, PMN numbers were inhibited by 82 % ($p < 0.001$). A similar tendency was observed upon the local injection of PAF (**Fig. 1D**). Furthermore, only the concomitant administration of the two receptor antagonists inhibited the migration elicited by ZAP- and TNF- α by 73 % ($p < 0.05$) and 68 % ($p < 0.05$), respectively (**Fig. 2**).

To assess the cooperative role of LTB₄ and PAF in a pathological model of inflammation, we induced pulmonary inflammation by intravenous injection of Sephadex beads. This inflammatory model is known to involve a variety of mediators including cytokines, chemokines and lipid mediators (Maghni et al., 1993; Maghni et al., 1992). The total accumulation of neutrophils in the lung was 3.8×10^5 PMN/g lung.

Our results show that lung neutrophilia was reduced by 63 % ($p < 0.05$) with the concomitant administration of the drugs. Neither the PAF receptor antagonist, nor the BLT1 receptor antagonist were able to prevent PMNs influx to the lungs. This effect was

associated with a 66 % ($p < 0.05$) reduction in blood neutrophilia, suggesting that it may account for the reduced PMNs trafficking to the lungs.

In summary, our results support a cooperative role for LTB₄ and PAF in regulating PMN migration and plasma extravasation to inflammatory sites. This concerted action may represent as a novel therapeutic avenue in inflammatory diseases.

6. ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Canadian Institutes for Health Research. We are grateful to Eve-Marie Charbonneau for expert technical assistance.

7. REFERENCES

1. Abramson,S., Edelson,H., Kaplan,H., Given,W. and Wiessmann,G., 1983. The neutrophil in rheumatoid arthritis: its role and the inhibition of its activation by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Semin. Arthritis Rheum.* 13, 148.
2. Chen,M., Lam,B.K., Kanaoka,Y., Nigrovic,P.A., Audoly,L.P., Austen,K.F. and Lee,D.M., 2006. Neutrophils-derived leukotriene B₄ is required for inflammatory arthritis. *J. Exp. Med.* 203, 837.
3. Damas,J., Remacle-Volon,G. and Bourdon,V., 1993. Platelet-activating factor and the vascular effects of zymosan in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 231, 231.
4. Gaudreault,E., Stankova,J. and Rola-Pleszczynski,M., 2005. Involvement of leukotriene B₄ receptor 1 signaling in platelet-activating factor-mediated neutrophil degranulation and chemotaxis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 75, 25.
5. Goldblum,S.E., Wu,K.-M. and Jay,M., 1985. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J. Appl. Physiol.* 59, 1978.
6. Kim,N.D., Chou,R.C., Seung,E., Tager,A.M. and Luster,A.D., 2006. A unique requirement for the leukotriene B₄ receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J. Exp. Med.* 4, 829.
7. Komatsu,H. and Amano,M., 1997. Inhibition of leukotriene B₄-induced increase in intracellular calcium ion level of human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes by Y-24180, an antagonist of platelet-activating factor receptor. *Int. J. Immunopharmacol.* 19, 661.

8. Maghni,K., Blanchette,F. and Sirois,P., 1993. Induction of lung eosinophilia and neutrophilia in guinea pigs following injection of sephadex beads. *Inflammation* 17, 537.
9. Maghni,K., Lanoue,C., Cloutier,S., Cristol,J.P., Cadieux,A. and Sirois,P., 1992. Sephadex-induced bronchial hyperreactivity and airway eosinophilia. *Pharmacologist* 34, 358.
10. Marleau,S., Fruteau de Lacos,B., Sanchez,A.B., Poubelle,P.E. and Borgeat,P., 1999. Role of 5-lipoxygenase products in the local accumulation of neutrophils in dermal inflammation in the rabbit. *J. Immunol.* 163, 3349.
11. McColl,S.R., Krump,E., Naccache,P.H., Braquet,P., Braquet,M. and Borgeat,P., 1991. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances the synthesis of leukotriene B₄ by human neutrophils in response to platelet-activating factor. Enhancement of both arachidonic acid availability and 5-lipoxygenase activation. *J. Immunol.* 146, 1204.
12. McDonald,P.P., McColl,S.R., Braquet,P. and Borgeat,P., 1994. Autocrine enhancement of leukotriene synthesis by endogenous leukotriene B₄ and platelet-activating factor in human neutrophils. *Br. J. Pharmacol.* 111, 852.
13. McDonald,P.P., McColl,S.R., Naccache,P.H. and Borgeat,P., 1991. Characterization of the human neutrophil 5-lipoxygenase activation induced by natural agonists. *Biochem. J.*

14. Moilanen,E., Kirkkola,A.L., Kankaanranta,H., Nieminen,M.M. and Vapaatalo,H., 1993. Interactions between synthesis of platelet-activating factor and leukotriene B₄ in isolated human polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 17, 705.
15. Palacios,I., Miguélez,R., Sánchez-Pernaute,O., Gutierrez,S., Egido,J. and Herrero-Beaumont,G., 1999. A platelet activating factor receptor antagonist prevents the development of chronic arthritis in mice. *J. Rheumatol.* 26, 1080.
16. Palmer,R.M., Stepney,R.J., Higgs,G.A. and Eakins,K.E., 1980. Chemokinetic activity of arachidonic and lipoxygenase products on leukocytes of different species. *Prostaglandins* 20, 411.
17. Poynter,M.E., Persinger,R.L., Irvin,C.G., Butnor,K.J., van Hirtum,H., Blay,W., Heintz,N.H., Robbins,J., Hemenway,D., Taatjes,D.J. and Janssen-Heininger,Y., 2006. Nitrogen dioxide enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L144-L152.
18. Reutershan,J., Morris,M.A., Burcin,T.L., Smith,D.F., Chang,D., Saprito,M.S. and Ley,K., 2006. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J. Clin. Invest.* 116, 695.
19. Roitt,I., Brostoff,J. and Male,D., 2002. Cellules, tissus et organes du système immunitaire. In: *Immunologie. Bruxelles, Belgique*], pp. 15-45.
20. Rossi,A.G., Norman,K.E., Donigi-Gale,D., Shoupe,T.S., Edwards,R. and Williams,T.J., 1992. The role of complement, platelet-activating factor and leukotriene B₄ in a reversed passive Arthus reaction. *Br. J. Pharmacol.* 107, 44.

21. Skubitz, K.M. and Craddock, P.R., 1981. Reversal of hemodialysis granulocytopenia and pulmonary leukostasis : a clinical manifestation of selective down-regulation of granulocyte responses to C5a_{desarg}. *J. Clin. Invest* 67, 1383.
22. Tavares de Lima, W., Steil, A.A., Russo, M., Starobinas, N., Teixeira, C.F.P. and Jancar, S., 1998. Lipid mediators, tumor necrosis factor and nitric oxide and their interactions in immune-complex-induced lung injury. *Eur. J. Pharmacol.* 358, 69.
23. Tomhave, E.D., Richardson, R.M., Didsbury, J.R., Menard, L., Snyderman, R. and Ali, H., 1994. Cross-desensitization of receptors for peptide chemoattractants. Characterization of a new form of leukocyte regulation. *J. Immunol.* 153, 3267.
24. Tremblay, P.-B., Macari, D.M.T., Martel, D., du Souich, P., Barja-Fidalgo, C. and Marleau, S., 2000. Hypoxemia modifies circulating and exudate neutrophil number and functional responses in carrageenin-induced pleurisy in the rat. *J. Leukoc. Biol.* 67, 785.

9. LEGEND TO FIGURES

Figure 1

Inhibition of LTB₄ (500 pmol/site)- and PAF (1.9 nmol/site)- induced dermal accumulation using selective PAF and BLT1 receptor antagonists. Rats were pretreated orally 2 (SR-27417) and 16 (CP-105,696) hours before the i.d. injection of soluble agonists (50 µl/site) at duplicate sites on dorsal skin. After a 2-hour period of accumulation, the rat was killed and skin biopsies were punched out. (A) Dose-dependent inhibition of LTB₄-elicited PMN accumulation by CP-105,696 (1-30 mg/kg). (B) Dose-dependent inhibition of PAF-elicited PMN accumulation by SR-27417 (0.1-1 mg/kg). (C) Effect of a single or combined administration of SR-27417 (0.3 mg/kg) and CP-105,696 (3 mg/kg) on LTB₄-induced PMN migration. (D) Effect of a single or combined drug administration on PAF-induced PMN migration. Values obtained for sites injected with HBSS/BSA 0.1% are subtracted (0.985×10^5 PMN/site). Data are the mean \pm SEM of 24 sites obtained from 12 rats. *, P < 0.05; ***, P < 0.001 compared to vehicle; #, P < 0.05 compared to SR-27417.

Figure 1

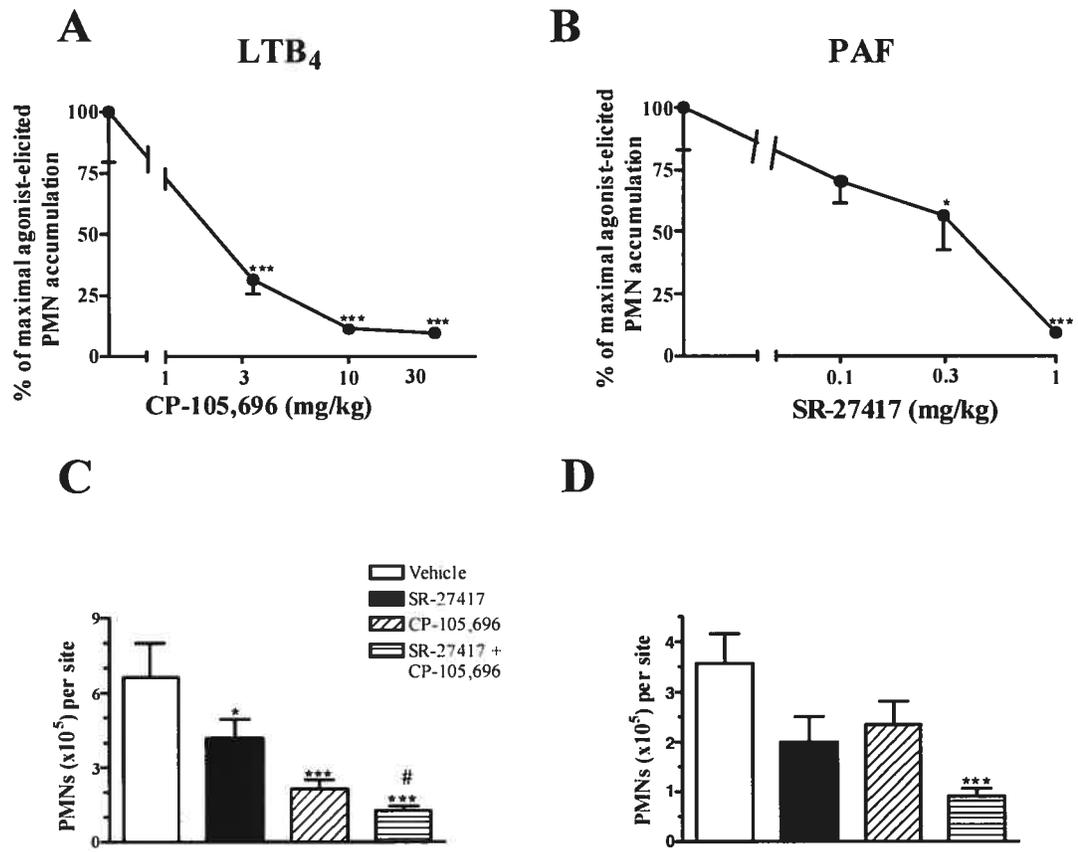


Figure 2

Inhibition of ZAP (3 %/site)- and TNF- α (10 pmol/site)-elicited PMN accumulation to dermal inflammatory sites by pre-treatment with PAF and BLT1 receptor antagonists. Effect of a single or combined administration of SR-27417 (0.3 mg/kg) and CP-105,696 (3 mg/kg) on (A) ZAP- and (B) TNF- α -induced PMN migration. Values obtained for sites injected with HBSS/BSA 0.1% are subtracted (0.985×10^5 PMN/site). Data are the mean \pm SEM of 24 sites obtained from 12 rats. *, P < 0.05; compared to vehicle and #, P < 0.05 compared to SR-27417.

Figure 2

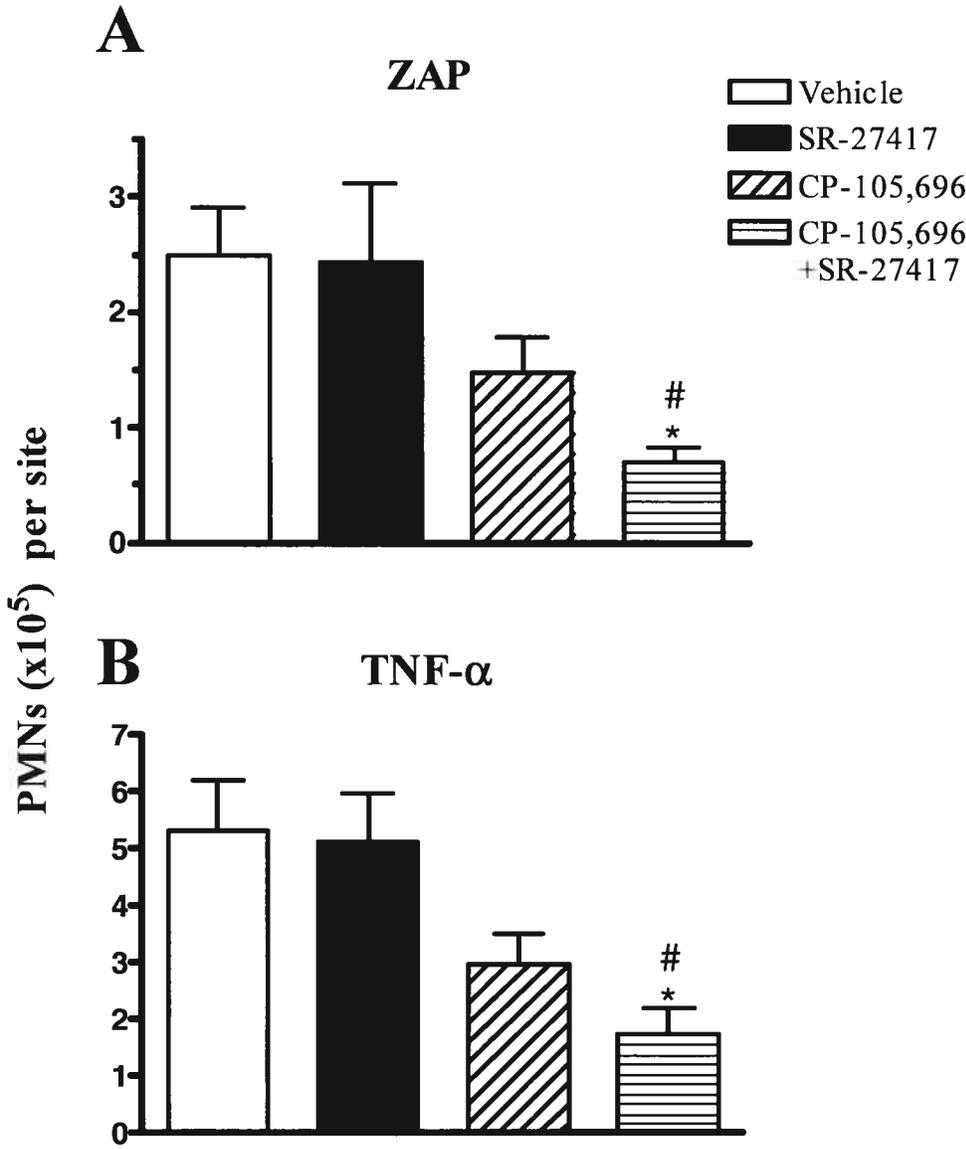


Figure 3 :

SR-27417 and CP-105,696 co-administration inhibits soluble agonist-induced local oedema. Rats were pretreated orally with SR-27417 and/or CP-105,696 as indicated in figure 1. Thirty minute before sacrifice, rats were injected i.v. with Evans blue (100 mg/kg) solution in sterile 0.9 % NaCl in the jugular vein 5 minutes before the i.d. injections. After a 30-minute period of accumulation, rats were killed and skin biopsies were punched out. Effect of a single or combined administration of SR-27417 (0.3 mg/kg) and CP-105,696 (10 mg/kg) on LTD₄ (500 pmol/site) -elicited oedema formation. Values obtained for sites injected with HBSS/BSA 0.1% are subtracted (16 µL). Data are the mean ± SEM of 24 sites obtained from 12 rats. *, P < 0.05; compared to vehicle.

Figure 3 :

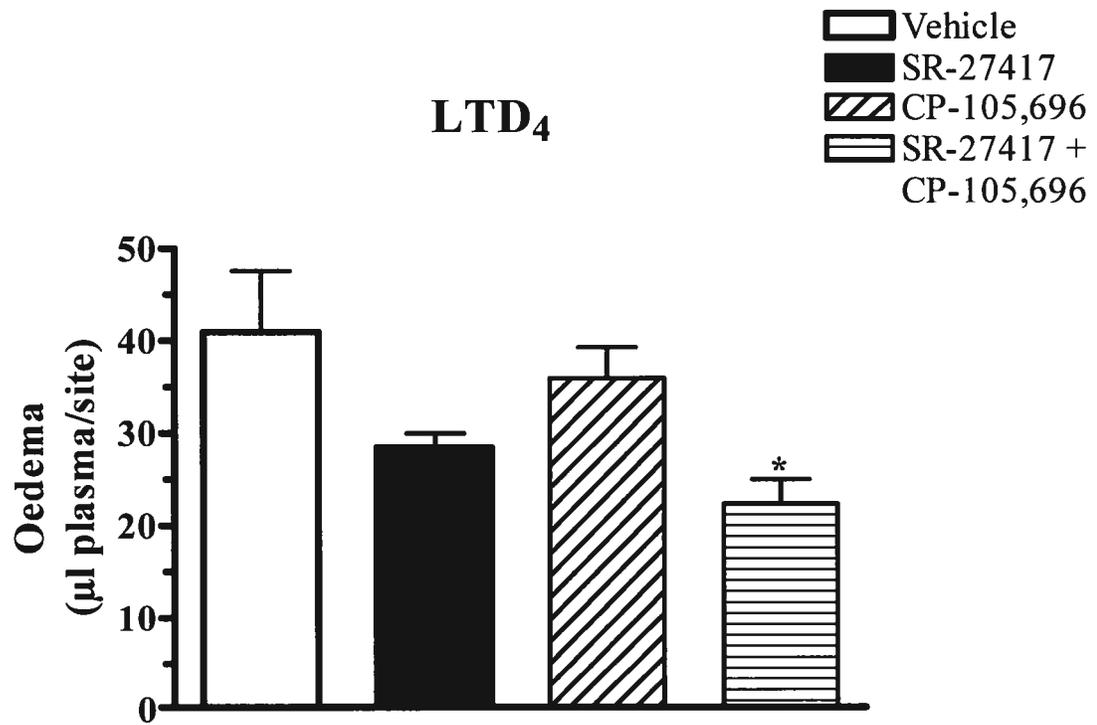
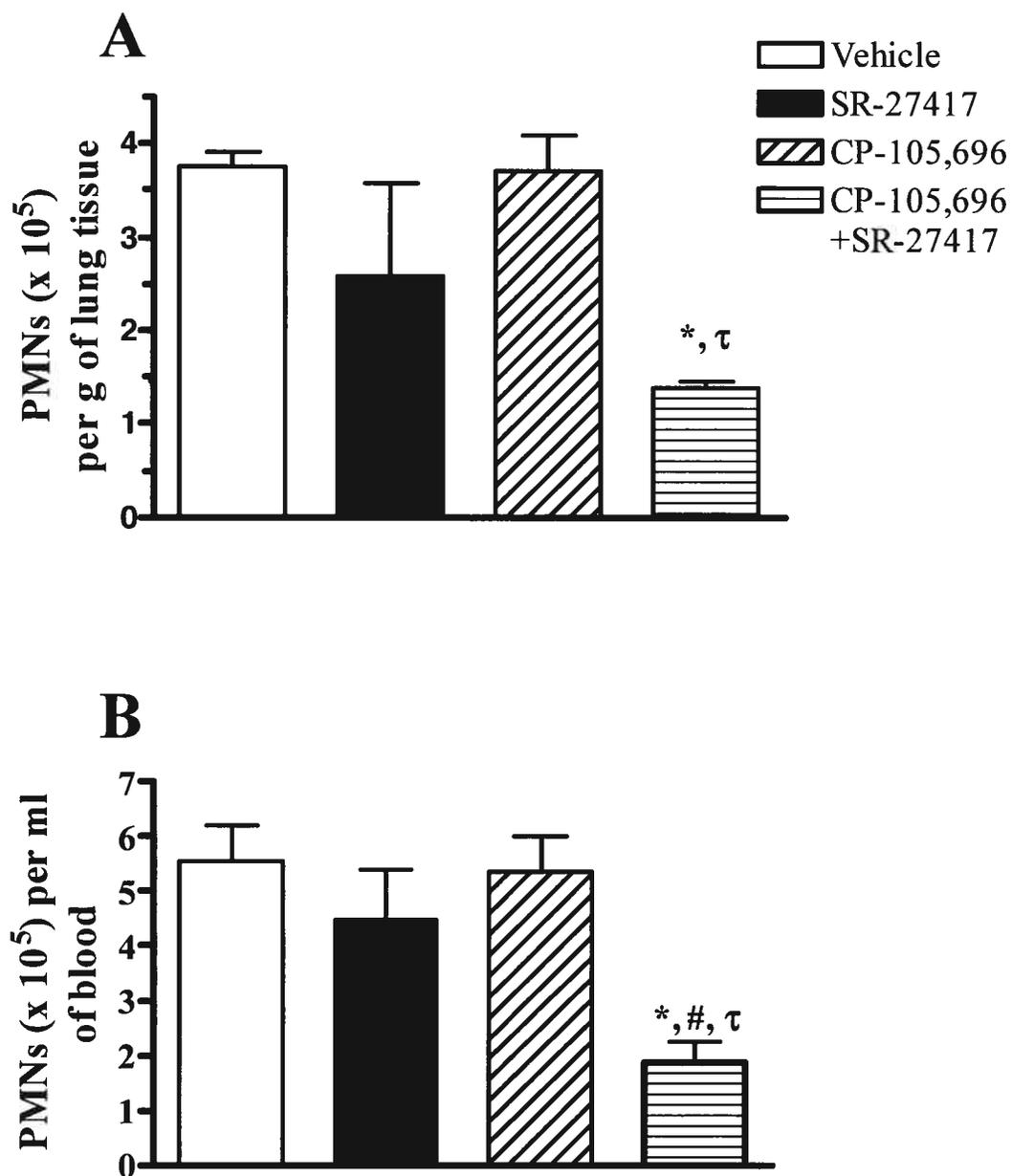


Figure 4 :

SR-27417 and CP-105,696 co-administration inhibit pulmonary inflammation elicited by i.v. Sephadex beads administration. Rats were pre-treated orally 2 (SR-27417) and 16 (CP-105,696) hours before the administration of Sephadex beads (15 mg/kg dissolved in 0.9 % NaCl) through the subclavian vein. Four hours later, the rats were sacrificed, the heart and lungs flushed with 0.9 % NaCl/EDTA 10 mM and harvested en bloc. Effect of a single or combined administration of SR-27417 (0.3 mg/kg) and CP-105,696 (30 mg/kg) on (A) PMNs numbers in the lungs and (B) blood PMNs. Values were subtracted from rats injected i.v. with vehicle (0.9 % NaCl). Data are the mean \pm SEM of 4-6 rats. *, $P < 0.05$ compared to vehicle with Sephadex, #, $P < 0.05$ compared to SR-27417, τ , $P < 0.05$ compared to CP-105,696.

Figure 4 :



CHAPITRE III
DISCUSSION GÉNÉRALE

3. DISCUSSION GÉNÉRALE

3.1. Problématique

La réponse inflammatoire est régulée par plusieurs facteurs chimiotactiques qui permettent aux PMNs d'arriver au foyer infectieux et d'agir pour détruire les agents pathogènes (Cronstein and Weissmann, 1993). Ces facteurs sont principalement les chimiokines, les cytokines, les fragments dérivés du complément et les médiateurs lipidiques. Par contre, lorsque l'inflammation est la conséquence de pathologies chroniques telles l'arthrite rhumatoïde (Abramson et al., 1983), les maladies inflammatoires du côlon (Lampinen et al., 2005) ou encore l'asthme allergique (Poynter et al., 2006), la réponse inflammatoire est susceptible de produire des effets indésirables liés à l'accumulation de leucocytes et la formation d'œdème, dont la douleur et la perte de fonction (Cronstein and Weissmann, 1993). Ces effets indésirables sont souvent la conséquence de la libération de médiateurs de l'inflammation, la génération de ROS et la libération du contenu des granules des neutrophiles. Les médiateurs lipidiques, tels que le LTB₄ et le PAF, jouent un rôle clé dans la migration et dans l'extravasation des neutrophiles à l'interface sang-cellules endothéliales (Marleau et al., 1999).

Dans cette étude, nous avons évalué l'hypothèse que les médiateurs lipidiques, particulièrement le PAF et le LTB₄ agissent de manière concertée pour réguler la migration et l'extravasation des PMNs au site inflammatoire, et ce, indépendamment de la nature chimique du stimulus qui active le PMN dans le contexte de la réponse inflammatoire. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé une approche pharmacologique visant à bloquer l'activité des récepteurs du LTB₄ et/ou du PAF à l'aide d'antagonistes sélectifs pour ces récepteurs. Selon notre hypothèse de travail, le blocage simultané de ces deux

récepteurs aura un effet inhibiteur additif ou synergique sur la migration des PMNs au foyer inflammatoire. Différents modèles expérimentaux ont été utilisés pour vérifier cette hypothèse, nous permettant de confirmer un effet coopératif du PAF et du LTB₄ dans la migration des neutrophiles.

3.2. Considérations méthodologiques

Nos protocoles expérimentaux ont été réalisés chez des rats mâles Sprague-Dawley. Parmi les avantages de ce modèle, nous avons pu tester plusieurs stimuli inflammatoires chez le même animal dans le bioessai de l'inflammation dermique. En effet, on peut administrer jusqu'à douze injections intradermiques sur le dos du rat. Il en résulte donc une réduction du nombre d'animaux requis. Les rats sont aussi nettement moins coûteux que plusieurs autres espèces dont le lapin et le cochon d'Inde. Enfin, l'antagoniste des récepteurs BLT1 utilisé dans nos études, le CP-105,696 est inactif chez le lapin (Showell et al., 1995), ce qui limite son utilisation aux petits rongeurs.

Parmi les limites du modèle, notons que les neutrophiles circulants ne constituent que 25 à 30% des leucocytes totaux chez le rat (Smith, 1994). Afin d'augmenter la neutrophilie sanguine, nous avons injecté, sur une période de 9 à 11 jours avant le protocole expérimental, une dose de 5 µg/kg de r-met-HuG-CSF (filgastrim).

Chez le rat, les agonistes chimiotactiques, et en particulier le LTB₄ sont peu puissants comparativement à leur effet chez d'autres espèces (Ford-Hutchinson, 1990). Une façon de palier cet inconvénient a été d'injecter, simultanément avec les agonistes pro-inflammatoires, de la prostaglandine E₂ pour son effet vasodilatateur (Raud et al., 1988).

Chez le rat, l'antagoniste sélectif des récepteurs du LTB₄ (CP-105,696) a une longue demi-vie de 16-18 heures (Showell et al., 1995) et une biodisponibilité élevée considérant que plus de 50 % de la dose administrée est absorbée (Griffiths et al., 1995). À l'opposé, l'antagoniste sélectif des récepteurs du PAF, le SR-27417, possède une demi-vie relativement courte d'environ 4 heures mais est plus puissant comparativement à d'autres antagonistes dont le WEB2086 et le UK-74,505 (Herbert et al., 1996; Herbert et al., 1991a).

Les drogues ont été données par voie orale (gavage), un mode d'administration non invasif comparativement à l'administration intraveineuse. Le SR-27417 a été dissout dans l'eau stérile et le CP-105,696 dans du carboxyméthylcellulose sodique 0.5 %, deux véhicules inoffensifs pour l'hôte. La dose optimale des deux drogues a été choisie selon nos expériences préliminaires, de façon à inhiber environ 50 % de la migration des PMNs induite par l'injection intradermique de LTB₄ par le CP-105,696, de même pour l'injection intradermique de PAF par le SR-27417. Une dose de 3 mg/kg dans du CMC 0.5 % pour le CP-105,696 et une dose de 0.3 mg/kg, dissoute dans de l'eau dans le cas du SR-27417 ont donc été administrées.

La période d'accumulation des neutrophiles dans les sites de peau a été fixée à 2 heures suivant l'injection des agonistes, dû au fait que plus de 70 % des neutrophiles y ont migré pendant cette période (Marleau et al., non publié; Borregaard et al., 2005). Ils seront ensuite remplacés par les macrophages, les lymphocytes et les fibroblastes permettant la réparation du tissu atteint. Les agonistes étudiés incluent le LTB₄ (500 pmol/site), le PAF (1.9 nmol/site), le TNF- α (10 pmol/site) et le ZAP (3 %/site). Le nombre de PMNs par biopsie a été estimé par la mesure de la MPO libérée par les granules azurophiles, utilisée comme marqueur de la migration des PMNs au site inflammatoire (Borregaard et al., 1983).

La formation d'œdème par l'injection locale de LTD₄ (500 pmol/site) a été mesurée par l'essai du bleu d'Evans. Le LTD₄ a été choisi comme agoniste car il permet d'augmenter la perméabilité vasculaire (Goetzl et al., 1984). Le bleu d'Evans, injecté par voie intraveineuse se lie à l'albumine et suit donc les protéines plasmatiques lors de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, ce qui résulte en une coloration bleue du site inflammé (Takano et al., 1998). Le bleu d'Evans est extrait des sites dermiques à l'aide du DMF et quantifié en mesurant l'absorbance de l'extrait à 630 nm. Nous avons utilisé cette méthode pour quantifier la quantité de plasma extravasculaire en réponse à l'injection intradermique locale de LTD₄ pour une période de 30 minutes suivant l'injection intraveineuse du bleu d'Evans et l'injection intradermique de l'agoniste.

Le modèle d'inflammation pulmonaire induit par l'injection de billes de Séphadex a été utilisé pour confirmer le rôle du LTB₄ et du PAF dans un contexte inflammatoire où plusieurs médiateurs entrent en jeu. Chez le rat, l'injection intraveineuse de billes de Séphadex conduit à leur accumulation dans les microvaisseaux pulmonaire (Sorden et al., 1990). Les cellules inflammatoires, principalement les neutrophiles, les éosinophiles et en proportion plus faible les macrophages, migrent aux poumons pour dégrader partiellement les billes de Séphadex (Maghni et al., 1993; Maghni et al., 1996). Aussi, ce modèle expérimental active la libération de thromboxane A₂, d'IL-5, d'IL-3, de leucotriènes et de PAF. Ce protocole expérimental est facile à exécuter et ne demande que quelques heures pour induire une accumulation appréciable de neutrophiles au niveau des poumons. L'essai de MPO a aussi été utilisé pour doser les neutrophiles dans les poumons suivant l'injection intraveineuse de billes de Séphadex G-50. La grosseur des billes ainsi que le temps optimal pour induire la migration des PMNs pulmonaires ont été déterminés dans des expériences préliminaires (Bélanger et al., non publié).

3.3. Rôle des médiateurs lipidiques dans la réaction inflammatoire chez le rat

Pour déterminer le rôle des médiateurs lipidiques, principalement du LTB_4 et du PAF, nous avons utilisé le CP-105,696 et le SR-27417, des antagonistes sélectifs des récepteurs BLT1 et du PAF, respectivement. Lors de l'inflammation dermique, la migration des PMNs induite par l'injection intradermique de LTB_4 (500 pmol/site) a permis la migration de 6.7×10^5 PMNs/site (**Fig. 1A**). La première série d'expériences avait pour but de déterminer la dose permettant d'inhiber la migration des PMNs stimulée par chacun des agonistes, LTB_4 et PAF, d'environ 50 % par leur antagoniste sélectif respectif. Une courbe dose-inhibition de la migration des PMNs induite par le LTB_4 a été effectuée avec le CP-105,696, l'antagoniste sélectif du BLT1. La migration des PMNs induite par le LTB_4 lorsque les rats sont prétraités avec du CP-105,696 à des doses de 3, 10 et 30 mg/kg est inhibée significativement de 69 % ($p < 0.001$), 89 % ($p < 0.001$) et 90 % ($p < 0.001$), respectivement. Une dose de 3 mg/kg a été utilisée pour les études subséquentes car nos résultats avec une dose inférieure à 3 mg/kg de CP-105,696 ont été peu reproductibles. La migration induite par l'injection intradermique de PAF (1.9 nmol/site) a permis une accumulation dermique de 3.5×10^5 PMNs par biopsie (**Fig. 1B**). De la même façon, une courbe dose-inhibition de la migration des PMNs induite par le PAF a été effectuée pour le SR-27417, l'antagoniste sélectif du PAFR. L'utilisation de doses de SR-27417 de 0.1, 0.3 et 1 mg/kg a permis l'inhibition de la migration des PMNs de 29 %, 43 % ($p < 0.05$) et 90 % ($p < 0.001$), respectivement. Ainsi, une dose de 0.3 mg/kg a été retenue pour la suite des expérimentations. Nous avons observé que l'accumulation de PMNs induit par le LTB_4 est partiellement bloquée par le SR-27417, l'antagoniste sélectif du récepteur_PAF (**Fig. 1C**). De la même manière, l'accumulation de PMNs induite par le PAF peut être partiellement

réduite par l'antagoniste sélectif du BLT1 (**Fig. 1D**). Dans d'autres expériences, des antagonistes sélectifs des récepteurs des LTs et du PAF ou encore le blocage de la biosynthèse des LTs ont montré des effets similaires. Par exemple, l'antagoniste sélectif du PAFR, le Y-24180, inhibe l'augmentation de calcium intracellulaire induite par le LTB₄ possiblement en bloquant l'action du PAF endogène (Komatsu and Amano, 1997). Une interaction entre la biosynthèse du LTB₄ et du PAF par le neutrophile a aussi été rapportée (Moilanen et al., 1993; McDonald et al., 1994), et le mécanisme sous-jacent attribué à la réduction de la disponibilité de l'acide arachidonique lorsque l'on bloque les récepteurs du PAF ou du LTB₄ (McDonald et al., 1994). Ces études montrent un effet autocrine du LTB₄ et du PAF sur la synthèse des LTs. Nos résultats montrent aussi un effet inhibiteur additif sur le recrutement des PMNs lorsque les récepteurs du PAF et du LTB₄ sont bloqués. Aussi, nos résultats montrent clairement que dans le modèle d'inflammation dermique chez le rat, seulement l'administration concomitante des antagonistes des récepteurs permet de réduire de façon significative la migration des PMNs en réponse au C5_{adesarg} et au TNF- α (**Fig. 2**).

Un rôle pour le LTB₄ ou pour le PAF a aussi été rapporté dans différents modèles inflammatoires ou en réponse à des agonistes solubles spécifiques. Par exemple, nous avons précédemment montré que l'inhibition de la 5-LO réduit la migration des PMNs aux sites inflammatoires chez le lapin induite par le fMLP, le C5a, l'IL-8, le LPS et le TNF- α (Marleau et al., 1999). Dans d'autres études, le rôle du PAF dans la formation d'œdème dans la réaction passive d'Arthus a été proposé (Rossi et al., 1992), ainsi que dans la médiation des effets hypotenseurs du zymosan (Damas et al., 1993). *In vitro*, la biosynthèse des LTs en réponse au fMLP ou au C5a est bloquée par l'antagoniste des récepteurs du LTB₄ et à un degré moindre par l'antagoniste des récepteurs du PAF (McDonald et al.,

1994). Ainsi, un rôle coopératif entre le LTB₄ et le PAF dans la migration des PMNs et dans l'extravasation plasmatique est à envisager. Nos résultats montrent un effet additif du LTB₄ et du PAF sur la migration des PMNs (**Fig.1 et 2**) et sur l'extravasation plasmatique (**Fig. 3**).

La migration induite par l'injection intradermique de LTB₄ a été inhibée de 69 % ($p < 0.001$), par l'utilisation du CP-105,696 à une dose de 3 mg/kg et de 37 % ($p < 0.05$), par l'utilisation du SR-27417, un inhibiteur du récepteur du PAF, à une dose de 0.3 mg/kg (**Figure 1C**). De plus, l'utilisation des deux drogues simultanément a permis de réduire la migration des PMN de 82 % ($p < 0.001$). Le même phénomène a été remarqué lors de l'inflammation locale induite par l'injection intradermique du PAF (**Figure 1D**). De plus, l'administration concomitante des deux antagonistes des récepteurs du LTB₄ et du PAF a permis d'inhiber significativement la migration des PMNs induite par le ZAP- et le TNF- α par 73 % ($p < 0.05$) et 68 % ($p < 0.05$), respectivement (**Fig. 2**).

Un autre modèle inflammatoire a été utilisé pour permettre de confirmer les résultats obtenus précédemment sur le rôle coopérative du LTB₄ et du PAF dans la régulation du trafic des PMNs. L'inflammation pulmonaire induite par l'injection de billes de Séphadex a permis d'étudier un modèle inflammatoire qui nécessite la participation de plusieurs cytokines, chimiokines et médiateurs lipidiques (Maghni et al., 1993; Maghni et al., 1992). La migration totale des neutrophiles dans les poumons a été de 3.8×10^5 PMNs/g de poumons (**Fig. 4**). L'administration de l'un des deux antagonistes ne permet pas d'inhiber significativement la migration au foyer inflammatoire tandis que l'utilisation concomitante du CP-105,696 et de SR-27417 a permis de réduire de 63 % ($p < 0.05$) la migration des neutrophiles au poumons. Le CP-105,696 a été utilisé à une dose plus élevée

(30 mg/kg) car une dose inférieure ne permettait pas de réduire la migration des PMNs aux poumons (Bélanger et coll., non publié). De façon parallèle à la neutrophilie pulmonaire, la neutrophilie sanguine a été réduite par l'administration concomitante des deux drogues, passant de 5.6×10^5 PMN/ml à 1.9×10^5 PMN/ml, une réduction de 66 % ($p < 0.05$). Ainsi, le modèle inflammatoire pulmonaire confirme les résultats obtenus avec le modèle d'inflammation dermique. Le LTB_4 et le PAF agissent de concert lors de processus inflammatoire.

3.4. Perspectives futures

Nos résultats ont permis de clarifier et de mettre en évidence un effet coopératif des médiateurs lipidiques, particulièrement du PAF et du LTB_4 , dans la migration extravasculaire des PMNs au foyer inflammatoire et dans la formation d'œdème. Des études complémentaires seront utiles pour clarifier ce rôle. D'une part, l'utilisation d'un autre modèle animal, tel le lapin, pourra être envisagé avec d'autres antagonistes des récepteurs BLT1 et PAF. Des souris génétiquement déficientes en l'un et/ou l'autre de ces récepteurs pourraient aussi être fort utiles. Enfin, des modèles plus complexes, par exemple l'induction de l'arthrite rhumatoïde par l'injection de collagène ou encore un modèle chronique d'athérosclérose, faisant intervenir plusieurs médiateurs de l'inflammation, pourraient être envisagés. Le dosage plasmatique des médiateurs de l'inflammation ainsi que des cytokines et chimiokines pourrait permettre de vérifier leur modulation en réponse aux antagonistes des récepteurs du LTB_4 et du PAF. Aussi, un inhibiteur du LTD_4 pourrait être utilisé permettant de voir si l'inhibition de ces trois récepteurs provoque une inhibition encore plus importante de la migration des neutrophiles dans un contexte d'inflammation provoquée par plusieurs médiateurs.

3.5. Conclusion

Pour conclure, cette étude apporte de nouvelles informations en regard du rôle des médiateurs lipidiques dans la régulation de la migration des PMNs lors de la réponse inflammatoire.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abramson,S., Edelson,H., Kaplan,H., Given,W. and Wiessmann,G., 1983. The neutrophil in rheumatoid arthritis: its role and the inhibition of its activation by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Semin. Arthritis Rheum.* 13, 148.
2. Albelda,S.M., Smith,C.W. and Ward,P.A., 1994. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8, 504.
3. Babior,B.M., 1992. The respiratory burst oxidase. *Adv. Enzymol.* 65, 49.
4. Benveniste,J., Henson,P.M. and Cochrane,C.G., 1972. Leucocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and a platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 6.
5. Bevilacqua,M.P., Pober,J.S., Wheeler,M.E., Cotran,R.S. and Gimbrone,M.A.J., 1985. Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am J Pathol* 121, 394.
6. Birke,F.W., Meade,C.J., Anderskewitz,R., Speck,G.A. and Jennewein,H.-M., 2001. In vitro and in vivo pharmacological characterization of BIIL 284, a novel and potent leukotriene B₄ receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 458.
7. Bjercknes,R., Vindenes,H. and Laerum,O.D., 1990. Altered neutrophil functions in patients with large burns. *Blood Cell* 16, 143.

8. Borgeat,P., 1989. Biochemistry of the lipoxygenase pathways in neutrophils. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67, 936.
9. Borgeat,P. and Naccache,P.H., 1990. Biosynthesis and biological activity of leukotriene B4. *Clin. Biochem.* 23, 459.
10. Borgeat,P., Nadeau,M., Salari,H., Poubelle,P. and Fruteau de Laclos,B., 1985a. Leukotrienes: biosynthesis, metabolism, and analysis. *Adv. Lipid Res.* 21, 47.
11. Borgeat,P., Picard,S., Poubelle,P., Sirois,P., Rola-Pleszczynski,M. and Braquet,P., 1985b. Leucotriènes et inflammation. *Union Med. Can.* 114, 611.
12. Borgeat,P. and Samuelsson,B., 1979. Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Formation of a novel dihydroxyeicosatetraenoic acid. *J. Biol. Chem.* 254, 2642.
13. Borgeat,P. and Sirois,P., 1980. Les leucotriènes: la conclusion de 40 ans de recherches sur les médiateurs de l'anaphylaxie. *Union Med. Can.* 109, 557.
14. Borregaard,N., Lollike,K., Kjeldsen,L., Sengelov,H., Bastholm,L., Nielson,M.H. and Bainton,D.F., 1983. Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur. J. Haematol.* 51, 187.
15. Borregaard,N., Theilgaard-Mönch,K., Cowland,J.B., Stahle,M. and Sorensen,O.E., 2005. Neutrophils and keratinocytes in innate immunity-cooperative actions to provide antimicrobial defense at the right time and place. *J. Leukoc. Biol.* 77, 439.

16. Brink,C., Dahlen,S.-E., Drazen,J., Evans,J.F., Hay,D.W.P., Nicosia,S., Serhan,C., Shimizu,T. and Yokomizo,T., 2003. International union of pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacol. Rev.* 55, 195.
17. Brown,E., 1997. Neutrophil adhesion and the therapy of inflammation. *Sem. Hematol.* 34, 319.
18. Burns,A.R., Walker,D.C., Brown,E.S., Thurmon,L.T., Bowden,R.A., Keese,C.R., Simon,S.I., Entman,M.L. and Smith,C.W., 1997. Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *J. Immunol.* 159, 2893.
19. Bussolino,F., Breviario,F., Tetta,C., Aglietta,M., Mantovani,A. and Dejana,E., 1986. Interleukin 1 stimulates platelet-activating factor production in cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 77, 2027.
20. Camussi,G., Aglietta,M., Malavasi,F., Tetta,C., Piacibello,W., Sanavio,F. and Bussolino,F., 1983a. The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture. *J. Immunol.* 131, 2397.
21. Camussi,G., Bussolino,F., Salvidio,G. and Baglioni,C., 1987. Tumor necrosis factor/catchetin stimulates peritoneal macrophages, polymorphonuclear neutrophils, and vascular endothelial cells to synthesize and release platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 166, 1390.
22. Camussi,G., Bussolino,F., Tetta,C., Piacibello,W. and Aglietta,B., 1983b. Biosynthesis and release of platelet-activating factor from human monocytes. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 70, 245.

23. Camussi,G., Tetta,C. and Baglioni,C., 1990. The role of platelet-activating factor in inflammation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 57, 331.
24. Cara,D.C., Kaur,J., Forster,M., McCafferty,D.-M. and Kubes,P., 2001. Role of p38 mitogen-activating protein kinase in chemokines-induced emigration and chemotaxis in vivo. *J. Immunol.* 167, 6552.
25. Casals-Stenzel,J., 1987. Protective effect of WEB 2086, a novel antagonist of platelet activating factor, in endotoxin shock. *Eur. J. Pharmacol.* 135, 117.
26. Casals-Stenzel,J., Muacevic,G. and Weber,K.-H., 1987. Pharmacologic actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet activating factor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241, 974.
27. Chao,W. and Olson,M.S., 1993. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J.* 292, 617.
28. Chen,F.E. and Ghosh,G., 1999. Regulation of DNA binding by Rel/NF- κ B transcription factors: structural views. *Oncogene* 10, 129.
29. Chen,M., Lam,B.K., Kanaoka,Y., Nigrovic,P.A., Audoly,L.P., Austen,K.F. and Lee,D.M., 2006. Neutrophils-derived leukotriene B₄ is required for inflammatory arthritis. *J. Exp. Med.* 203, 837.
30. Chiang,N., Arata,M. and Serhan,C.N., 2005. Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. *Prostagl. Leukot. Essent. Fatty Acids* 73, 163.

31. Chignard,M., LeCouedic,J.P., Tencè,M., Vargaftig,B.B. and Benveniste,J., 1979. The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature* 279, 799.
32. Chung,K.F., 1995. Leukotriene receptor antagonists and biosynthesis inhibitors: potential breakthrough in asthma therapy. *Eur. Respir. J.* 8, 1203.
33. Cohn,Z.A. and Morse,S.I., 1960. Functional and metabolic properties of polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* 111, 689.
34. Condliffe.A.M., Hawkins,P.T., Stephens,L.R., Haslett,C. and Chilvers E.R., 1998. Priming of human neutrophil superoxide generation by tumour necrosis factor- α is signalled by enhanced phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate but not inositol 1,4,5-triphosphate accumulation. *FEBS* 439, 147.
35. Cronstein,B.N. and Weissmann,G., 1993. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum.* 36, 147.
36. Cybulsky,M.I., McComb,D.J. and Movat,H.Z., 1988. Neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. Mediator roles of interleukin 1 and tumor necrosis factor α . *J. Immunol.* 140, 3144.
37. Damas,J., Remacle-Volon,G. and Bourdon,V., 1993. Platelet-activating factor and the vascular effects of zymosan in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 231, 231.
38. Daniels,R.H., Finnen,M.J., Hill,M.E. and Lackie,J.M., 1992. Recombinant human monocyte IL-8 primes NADPH-oxidase and phospholipase A2 activation in human neutrophils. *Immunology* 75, 157.

39. Desouza,I.A., Franco-Penteado,C.F., Camargo,E.A., Lima,C.S.P., Teixeira,S.A., Nuscará,M.N., De Nucci,G. and Antunes,E., 2005. Inflammatory mechanisms underlying the rat pulmonary neutrophil influx induced by airway exposure to staphylococcal enterotoxin type A. *Br. J. Pharmacol.* 146, 781.
40. Ding,X.-Z., Talamonti,M.S., Bell Jr,R.H. and Adrian,T.E., 2005. A novel anti-pancreatic cancer agent, LY293111. *Anti-Cancer Drugs* 16, 467.
41. Dixon,R.A.F., Diehl,R.E., Opas,E., Rands,E., Vickers,P.J., Evans,J.F., Gillard,J.W. and Miller,D.K., 1990. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* 343, 282.
42. Doig,M.V. and Ford-Hutchinson,A.W., 1980. The production and characterization of products of the lipoxygenase enzyme system released by rat peritoneal macrophages. *Prostaglandins* 20, 1007.
43. Faurschou,M. and Borregaard,N., 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 5, 1317.
44. Fierro,I.M. and Serhan,C.N., 2001. Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz. J. Medical Biol. Res.* 34, 555.
45. Finco,T.S. and Baldwin,A.S., 1995. Mechanistic aspects of NF- κ B regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis. *Immunity* 3, 263.
46. Fittschen,C., Sandhaus,R.A., Worthen,G.S. and Henson,P.M., 1985. Human neutrophils express elastase in response to chemotactic concentration of FMLP. *Fed. Proc.* 44, 1918.

47. Ford-Hutchinson,A.W., 1990. Leukotriene B₄ in inflammation. *Immunology* 10, 1.
48. Ford-Hutchinson,A.W., Bray,M.A., Doig,M.V., Shipley,M.E. and Smith,M.J., 1980. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 286, 264.
49. Galea-Lauri,J., Blackford,J. and Wilkinson,J.M., 1993. The expression of CD11/CD18 molecules on rabbit leukocytes: identification of monoclonal antibodies to CD18 and their effect on cellular adhesion processes. *Mol. Immunol.* 30, 529.
50. Gaudreault,E., Stankova,J. and Rola-Pleszczynski,M., 2005. Involvement of leukotriene B₄ receptor 1 signaling in platelet-activating factor-mediated neutrophil degranulation and chemotaxis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 75, 25.
51. Goetzl,E.J., Payan,D.G. and Goldman,D.W., 1984. Immunopathogenetic roles of leukotrienes in human diseases. *J Clin Immunol* 4, 79.
52. Goldblum,S.E., Wu,K.-M. and Jay,M., 1985. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J. Appl. Physiol.* 59, 1978.
53. Goldman,D.W. and Goetzl,E.J., 1984. Heterogeneity of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B₄. Identification of a subset of high affinity receptors that transduce the chemotactic response. *J. Exp. Med.* 159, 1027.
54. Gozal,D., Holt,G.A., Graff,G.R. and Torres,J.E., 1998. Platelet-activating factor modulates cardiorespiratory responses in the conscious rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275, 604.

55. Griffiths,R.J., Pettipher,E.R., Koch,K., Farrell,C.A., Breslow,R., Conklyn,M.J., Smith,M.A., Hackman,B.C., Wimberly,D.J., Milici,A.J., Scampoli,D.N., Cheng,J.B., Pillar,J.S., Pazoles,C.J., Doherty,N.S., Melvin,L.S., Reiter,L.A., Biggars,M.S., Falkner,F.C., Mitchell,D.Y., Liston,T.E. and Showell,H.J., 1995. Leukotriene B₄ plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 517.
56. Guthrie,L.A., McPhail,L.C., Henson,P.M. and Johnston,R.B., Jr., 1984a. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial liposaccharide. J. Exp. Med. 160, 1656.
57. Guthrie,L.A., McPhail,L.C., Henson,P.M. and Johnston,R.B., 1984b. The priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide; evidence for increase activity of the superoxide-producing enzyme. J. Exp. Med. 160, 1656.
58. Hamel,R. and Ford-Hutchinson,A.W., 1983. Bronchoconstrictor effects of leukotriene B₄ in the guinea pig in vivo. Prostaglandins 25, 405.
59. Hechtman,D.H., Cybulsky,M.I., Fuchs,H.J., Baker,J.B. and Gimbrone,M.A., Jr., 1991. Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear-leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. J. Immunol. 147, 883.
60. Heise,C.E., O'Dowd,B.F., Figueroa,D.J., Sawyer,N., Nguyen,T., Im,D.-S., Stocco,R., Bellefeuille,J.N., Abramotiz,M., Chen,R., Williams Jr,D.L., Zeng,Z., Liu,Q., Ma,L., Clements,M.K., Coulombe,N., Liu,Y., Austin,C.P., George,S.R.,

- O'Neil,G.P., Metters,K.M., Lynch,K.R. and Evans,J.F., 2000. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 30531.
61. Herbert,J.M., Bernat,A. and Tibiriça,E., 1996. Effect of SR 27417, a novel PAF antagonist on antigen-induced hypotension in the rat. *J. Lipid Mediat. Cell Sign.* 15, 115.
62. Herbert,J.M., Bernat,A., Valette,G., Gigo,V., Lale,A., Laplace,M.C., Lespy,L., Savi,P., Maffrand,J.P. and Le Fluir,G., 1991a. Biochemical and pharmacological activities of SR 27417, a highly potent, long-acting platelet-activating factor receptor antagonist. *J. Pharm. Exp. Ther.* 259, 44.
63. Herbert,J.M., Laplace,M.C., Cailleau,C. and Maffrand,J.P., 1993. Effect of SR 27417 on the binding of (3H)PAF to rabbit and human platelets and human polymorphonuclear leukocytes. *J. Lipid Mediat.* 7, 57.
64. Herbert,J.M., Lespy,L. and Maffrand,J.P., 1991b. Protective effect of SR 27417, a novel PAF antagonist, on lethal anaphylactic and endotoxin-induced shock in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 205, 271.
65. Hoffbrand,A.V. and Petit,J.E., 1987. In: *Normal haemopoiesis and blood cells.* London], pp. 2-26.
66. Hoover,R.L., Karnovsky,M.J., Austen,K.F., Corey,E.J. and Lewis,R.A., 1984. Leukotriene B₄ action on endothelium mediates augmented neutrophil/endothelial adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 2191.
67. Hopkins,S.J., 2003. The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine* 5, S45-S57.

68. Huang,L., Zhao,A., Wong,F., Ayala,J.M., Struthers,M., Ujjainwalla,F., Wright,S.D., Springer,M.S., Evans,J. and Cui,J., 2004. Leukotriene B4 strongly increases monocytes chemoattractant protein-1 in human monocytes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1783.
69. Huie,R.E. and Padmaja,S., 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Rad. Biol. Med.* 18, 195.
70. Humphrey,D.M., McManus,L., Satouchi,K., Hanahan,D.J. and Pinckard,R.M., 1982. Vasoactive properties of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine and analogs. *Lab. Invest.* 46, 422.
71. Iigo,Y., Suematsu,M., Higashida,T., Oheda,J., Matsumoto,K., Wakabayashi,Y., Ishimura,Y., Miyasaka,M. and Takashi,T., 1997. Constitutive expression of ICAM-1 in rat microvascular systems analyzed by laser confocal microscopy. *Am J. Physiol.* 273, H138-H147.
72. Izumi,T., Yokomizo,T., Obinata,H., Ogasawara,H. and Shimizu,T., 2002. Leukotriene receptors: classification, gene expression, and signal transduction. *J. Biochem.* 132, 1.
73. Johnson,C.D., 1999. Platelet-activating factor and platelet-activating factor antagonists in acute pancreatitis. *Dig. Surg.* 16, 93.
74. Jorg,A., Henderson,W.R., Murphy,R.C. and Klebanoff,S.J., 1982. Leukotriene generation by eosinophils. *J Exp Med.* 155, 390.

75. Kanaoka, Y. and Boyce, J.A., 2004. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses. *J. Immunol.* 173, 1503.
76. Kim, N.D., Chou, R.C., Seung, E., Tager, A.M. and Luster, A.D., 2006. A unique requirement for the leukotriene B₄ receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J. Exp. Med.* 4, 829.
77. Klebanoff, S.J., 1992. Oxygen metabolites from phagocytes. In: J.I. Gallin, M. Goldstein, and R. Snyderman (Eds.) *Inflammation: basic principles and clinical correlates.* [Raven Press, New York], pp. 541-88.
78. Klintman, D., Schramm, R., Menger, M.D. and Thorlacius, H., 2002. Leucocyte recruitment in hepatic injury: selectin-mediated leukocyte rolling is a prerequisite for CD18-dependant firm adhesion. *J. Hepatol.* 36, 53.
79. Komatsu, H. and Amano, M., 1997. Inhibition of leukotriene B₄-induced increase in intracellular calcium ion level of human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes by Y-24180, an antagonist of platelet-activating factor receptor. *Int. J. Immunopharmacol.* 19, 661.
80. Kreisle, R.A., Parker, C.W., Griffin, G.L., Senior, R.M. and Stenson, W.F., 2006. Studies of leukotriene B₄-specific binding and function in rat polymorphonuclear leukocytes: absence of a chemotactic response. *J. Immunol.* 134, 3356.
81. Kuebler, W.M., 2005. Inflammatory pathways and microvascular responses in the lung. *Pharmac. Rep.* 57, 196.

82. Kunkel,S.L., Standiford,T., Kasahara,K. and Strieter,R.M., 1991. Interleukin-8 (IL-8): the major neutrophil chemotactic factor in the lung. *Exp Lung Res.* 17, 17.
83. Lampinen,M., Ronnblom,A., Amin,K., Kristjansson,G., Rorsman,F., Sangfelt,P., Safsten,B., Wagner,M., Wanders,A., Winqvist,O. and Carlson,M., 2005. Eosinophil granulocytes are activated during the remission phase of ulcerative colitis. *Gut* 54, 1714.
84. Leonard,E.J. and Yoshimura,T., 1990. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol. Today* 11, 97.
85. Lew,D.P., 1989. Receptor signaling and intracellular calcium in neutrophil activation. *Eur. J. Clin. Invest.* 19, 338.
86. Liang,T.S., Gao,J.L., Fatemi,O., Lavigne,M., Leto,T.L. and Murphy,P.M., 2001. The endogenous opioid spinorphin blocks fMet-Leu-Phe-induced neutrophil chemotaxis by acting as a specific antagonist at the N-formylpeptide receptor subtype FPR. *J Immunol* 167, 6609.
87. Louis,N.A., Hamilton,K.E. and Colgan,S.P., 2005. Lipid mediator networks and leukocyte transmigration. *Prostagl. Leukot. Essent. Fatty Acids* 73, 197.
88. Luscinskas,F.W., Cybulsky,M.I., Kiely,J.-M., Peckins,C.S., Davis,V.M. and Gimbrone Jr,M.A., 1991. Cytokine-activated human endothelial monolayers support enhanced neutrophil transmigration via a mechanism involving both endothelial-leukocytes adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1. *J. Immunol.* 146, 1617.

89. Lynch,J.M., Lotner,G.Z., Betz,S.J. and Henson,P.M., 1979. The release of platelet activating factor by stimulated rabbit neutrophils. *J. Immunol.* 123, 1219.
90. Maclouf,J., Borgeat,P., Grange,M.J., Wautier,J.L. and Caen,J.P., 1984. Prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes. Leur rôle dans les maladies cardiovasculaires, les réactions allergiques et l'inflammation. *Presse Médicale* 13, 91.
91. MacNee,W. and Selby,C., 1990. Neutrophil kinetics in the lungs. *Clin. Sci* 79, 97.
92. Maghni,K., Blanchette,F. and Sirois,P., 1993. Induction of lung eosinophilia and neutrophilia in guinea pigs following injection of sephadex beads. *Inflammation* 17, 537.
93. Maghni,K., Lanoue,C., Cloutier,S., Cristol,J.P., Cadieux,A. and Sirois,P., 1992. Sephadex-induced bronchial hyperreactivity and airway eosinophilia. *Pharmacologist* 34, 358.
94. Maghni,K., Simard,M.J., Arseneault,D. and Sirois,P., 1996. Kinetics of eosinophilia and eosinophil activation in the development of non-allergic bronchial hyperresponsiveness in guinea pigs injected with sephadex beads. *Inflammation* 20, 523.
95. Marleau,S., Fruteau de Laclos,B., Sanchez,A.B., Poubelle,P.E. and Borgeat,P., 1999. Role of 5-lipoxygenase products in the local accumulation of neutrophils in dermal inflammation in the rabbit. *J. Immunol.* 163, 3349.
96. Matsumoto,T., Funk,C.D., Rangstromdmark,O., Hoo,J.O., Jornvall,H. and Samuelsson,B., 1988. Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 263, 26.

97. McColl,S.R., Krump,E., Naccache,P.H., Braquet,P., Braquet,M. and Borgeat,P., 1991. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances the synthesis of leukotriene B₄ by human neutrophils in response to platelet-activating factor. Enhancement of both arachidonic acid availability and 5-lipoxygenase activation. *J. Immunol.* 146, 1204.
98. McDonald,P.P., McColl,S.R., Braquet,P. and Borgeat,P., 1994. Autocrine enhancement of leukotriene synthesis by endogenous leukotriene B₄ and platelet-activating factor in human neutrophils. *Br. J. Pharmacol.* 111, 852.
99. McDonald,P.P., McColl,S.R., Naccache,P.H. and Borgeat,P., 1991. Characterization of the human neutrophil 5-lipoxygenase activation induced by natural agonists. *Biochem. J.*
100. McDonald,P.P., Pouliot,M. and Borgeat,P., 1993. Enhancement by GM-CSF of agonist-induced 5-lipoxygenase activation in human neutrophils involves protein synthesis and gene transcription. *J. Lipid Mediat.* 6, 59.
101. McEver,R.P. and Cummings,R.D., 1997. Perspective series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest* 100, 485.
102. Mencia-Huberta,J.M. and Benveniste,J., 1979. Platelet activating factor and macrophage. I. Evidence for the release from rat and mouse peritoneal macrophages and not from mastocytes. *Eur. J. Immunol.* 9, 409.

103. Mencia-Huberta, J.M., Razin, E., Ringel, E.W., Corey, E.J., Hoover, D., Austen, K.F. and Lewis, A., 1983. Immunologic and ionophore-induced generation of leukotriene B₄ from mouse bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* 125, 1789.
104. Metcalf, D., 1993. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety. *Blood* 82, 3515.
105. Metcalf, D., 1989. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 339, 27.
106. Miyagawa, H., Nabe, M., Hopp, R.J., Agrawal, D.K., Bewtra, A.K. and Townley, R.G., 1990. Elevation of neutrophil chemotactic activity in the human serum and the decreased number of neutrophils after platelet-activating factor inhalation. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 92, 199.
107. Moilanen, E., Kirkkola, A.L., Kankaanranta, H., Nieminen, M.M. and Vapaatalo, H., 1993. Interactions between synthesis of platelet-activating factor and leukotriene B₄ in isolated human polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 17, 705.
108. Monaco, C., Rossi, E., Milazzo, D., Citterio, F., Ginetti, F., D'Onofrio, G., Cianflone, D., Crea, F., Biasucci, L.M. and Maseri, A., 2005. Persistent systemic inflammation in unstable angina is largely unrelated to the atherothrombotic burden. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45, 238.
109. Moraes, T.J., Zurawska, J.H. and Downey, G.P., 2006. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr. Opin. Hematol.* 13, 21.
110. Nicholson, D.W., Ali, A., Vaillancourt, J.P., Calaycay, J.R., Mumford, R.A., Zamboni, R.J. and Ford-Hutchinson, A.W., 1992. Purification to homogeneity and

the N-terminal sequence of human leukotriene C4 synthase: a homodimeric glutathione S-transferase composed of 18-kDa subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2015.

111. Pabst,M.J., 1994. Priming of neutrophils. In: P.G.Hellewell and T.J.Williams (Eds.) *Immunopharmacology of neutrophils*. [Academic Press, London], pp. 195-221.
112. Palacios,I., Miguélez,R., Sánchez-Pernaute,O., Gutierrez,S., Egado,J. and Herrero-Beaumont,G., 1999. A platelet activating factor receptor antagonist prevents the development of chronic arthritis in mice. *J. Rheumatol.* 26, 1080.
113. Palmblad,J., Malmsten,C.L., Uden,A.M., Radmark,O., Engstedt,L. and Samuelsson,B., 1981. Leukotriene B4 is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. *Blood* 58, 658.
114. Palmer,R.M., Stepney,R.J., Higgs,G.A. and Eakins,K.E., 1980. Chemokinetic activity of arachidonic and lipoxygenase products on leukocytes of different species. *Prostaglandins* 20, 411.
115. Peters,S.P., Siegel,M.I., Kagey-Sabotka,A. and Lichtenstein,L.M., 1981. Lipoxygenase products modulate histamine release in human basophils. *Nature* 292, 455.
116. Peters-Golden,M., Canetti,C., Mancuso,P. and Coffey,M.J., 2004. Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses. *J. Immunol.* 173, 589.
117. Peters-Golden,M., 1998. Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157, S227-S232.

118. Peters-Golden,M., Song,K., Marshall,T. and Brock,T., 1996. Translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis. *Biochem J.* 318, 797.
119. Poynter,M.E., Persinger,R.L., Irvin,C.G., Butnor,K.J., van Hirtum,H., Blay,W., Heintz,N.H., Robbins,J., Hemenway,D., Taatjes,D.J. and Janssen-Heininger,Y., 2006. Nitrogen dioxide enhances allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L144-L152.
120. Prescott,S.M., Zimmerman,G.A. and McIntyre,T.M., 1990. Platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 265, 17381.
121. Radmark,O., Malmsten,C., Samuelsson,B., Clark,D.A., Goto,G., Marfat,A. and Corey,E.J., 1980. Leukotriene A: stereochemistry and enzymatic conversion to leukotriene B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 954.
122. Raud,J., Dahlen,S.E., Sydbom,A., Lindbom,L. and Hedqvist,P., 1988. Enhancement of acute allergic inflammation by indomethacin is reversed by prostaglandin E2: apparent correlation with in vivo modulation of mediator release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2315.
123. Read,M.A., Whitley,M.Z., Gupta,S., Pierce,J.W., Best,J., Davis,R.J. and Collins,T., 1997. Tumor necrosis factor α -induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor- κ B and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* 5, 2753.

124. Reid,G.K., Kargman,S., Vickers,P.J., Mancini,J.A., L veill ,C., Ethier,D., Miller,D.K., Gillard,J.W., Dixon,R.A.F. and Evans,J.F., 1990. Correlation between expression of 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and cellular leukotriene synthesis. *J. Biol. Chem.* 265, 19818.
125. Reutershan,J., Morris,M.A., Burcin,T.L., Smith,D.F., Chang,D., Saprito,M.S. and Ley,K., 2006. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J. Clin. Invest.* 116, 695.
126. Riveau,G.J., Theron,A.J., Anderson,R., Taylor,G.W., Wilson,R., Cole,P.J. and van der Merwe,C.A., 1991. Influence of muramyl dipeptide on human blood leukocyte functions on their membrane antigens. *Cell. Immunol.* 134, 147.
127. Roitt,I., Brostoff,J. and Male,D., 2002a. Cellules, tissus et organes du système immunitaire. In: *Immunologie. Bruxelles, Belgique*], pp. 15-45.
128. Roitt,I., Brostoff,J. and Male,D., 2002b. Introduction au système immunitaire. In: *Immunologie. Bruxelles, Belgique*], pp. 1-13.
129. Rossi,A.G., Norman,K.E., Donigi-Gale,D., Shoupe,T.S., Edwards,R. and Williams,T.J., 1992. The role of complement, platelet-activating factor and leukotriene B₄ in a reversed passive Arthus reaction. *Br. J. Pharmacol.* 107, 44.
130. Rot,A., 1992. Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol. Today* 13, 291.
131. Sala,A., Folco,G., Henson,P.M. and Murphy,R.C., 1997. Pharmacological modulation of human platelet leukotriene C₄-synthase. *Biochem. Pharmacol.* 53, 905.

132. Scott,A., Khan,K.M., Roberts,C.R., Cook,J.L. and Duronio,V., 2004. What do we mean by the term "inflammation"? A contemporary basic science update for sports medicine. *Br. J. Sports Med* 38, 372.
133. Serhan,C. and Levy,B., 2003. Success of prostaglandin E₂ in structure-function is a challenge for structure-based therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 8609.
134. Serhan,C.N., 2005. Lipoxins and aspirin-triggered 15epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammatory and resolution. *Prostagl. Leukot. Essent. Fatty Acids* 73, 141.
135. Serhan,C.N., Hamberg,M. and Samuelsson,B., 1984. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Biochemistry* 81, 5335.
136. Serhan,C.N. and Prescott,S.M., 2000. The scent of a phagocyte: advances on leukotriene B₄ receptors. *J. Exp. Med.* 192, F5-F8.
137. Sheron,N. and Williams,R., 1992. IL-8 as a circulating cytokine: induction by recombinant tumour necrosis factor-alpha. *Clin. Exp. Immunol.* 89, 100.
138. Shimizu,T., Izumi,T., Seyama,Y., Tadokoro,K., Radmark,O. and Samuelsson,B., 1986. Characterization of leukotriene A₄ synthase from murine mast cells:evidence for identity to arachidonate 5-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4175.
139. Showell,H.J., Pettipher,E.R., Cheng,J.B., Breslow,R., Conklyn,M.J., Farrell,C.A., Hingorani,G.P., Salter,E.D., Hackman,B.C., Wimberly,D.J., Doherty,N.S., Melvin,L.S., Jr., Reiter,L.A., Biggers,M.S. and Koch,K., 1995. The *in vitro* and *in*

vivo pharmacologic activity of the potent and selective leukotriene B₄ receptor antagonist CP-105696. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273, 176.

140. Sirois,P. and Borgeat,P., 1984a. Les leucotriènes. *Sem. Hop.* 60, 979.
141. Sirois,P. and Borgeat,P., 1984b. Pharmacologie des leucotriènes. *J. Pharmacol.* 15, 53.
142. Sisson,J.H., Prescott,S.M., McIntyre,T.M. and Zimmerman,G.A., 1987. Production of platelet-activating factor by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 138, 3918.
143. Skubitz,K.M. and Craddock,P.R., 1981. Reversal of hemodialysis granulocytopenia and pulmonary leukostasis : a clinical manifestation of selective down-regulation of granulocyte responses to C5a_{desarg}. *J. Clin. Invest* 67, 1383.
144. Smith,J.A., 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.* 56, 672.
145. Smith,W.L., DeWitt,D.L. and Garavito,R.M., 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 145.
146. Snyder,F., Fitzgerald,V. and Blank,M.L., 1996. Biosynthesis of platelet-activating factor and enzyme inhibitors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 416, 5.
147. Sorden,S.D., Lemanske,R.F., Jr. and Castleman,W.L., 1990. Pulmonary eosinophilia and granulomatous pulmonary arteritis induced in rats by intravenous Sephadex. *Vet. Pathol* 27, 217.

148. Souza,D.G., Coutinho,S.F., Silveira,M.R., Cara,D.C. and Teixeira,M.M., 2000. Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 403, 121.
149. Souza,D.G., Pinho,V., Soares,A.C., Shimizu,T., Ishii,S. and Teixeira,M.M., 2003. Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonist treatment. *Br. J. Pharmacol.* 139, 733.
150. Steele,R.W., Steele,C.R., Pilkington,N.S. and Charlton,R.K., 1987. Functional capacity of marginated and bone marrow reserve granulocytes. *Infect. Immun.* 55, 2359.
151. Subbarao,K., Jala,V.R., Mathis,S., Suttles,J., Zacharia,W., Ahamed,J., Ali,H., Tseng,M.T. and Haribabu,B., 2004. Role of leukotriene B4 receptors in the development of atherosclerosis: potential mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 369.
152. Takano,T., Clish,C.B., Gronert,K., Petasis,N. and Serhan,C.N., 1998. Neutrophil-mediated changes in vascular permeability are inhibited by topical application of aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ and novel lipoxin B₄ stable analogues. *J. Clin. Invest.* 101, 819.
153. Tavares de Lima,W., Steil,A.A., Russo,M., Starobinas,N., Teixera,C.F.P. and Jancar,S., 1998. Lipid mediators, tumor necrosis factor and nitric oxide and their interactions in immune-complex-induced lung injury. *Eur. J. Pharmacol.* 358, 69.

154. Till,G.O. and Ward,P.A., 1986. Systemic complement activation and acute lung injury. *Fed. Proc.* 45, 13.
155. Toda,A., Yokomizo,T., Masuda,K., Nakao,A., Izumi,T. and Shimizu,T., 1999. Cloning and characterization of rat leukotriene B4 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 806.
156. Tomhave,E.D., Richardson,R.M., Didsbury,J.R., Menard,L., Snyderman,R. and Ali,H., 1994. Cross-desensitization of receptors for peptide chemoattractants. Characterization of a new form of leukocyte regulation. *J. Immunol.* 153, 3267.
157. Tremblay,P.-B., Macari,D.M.T., Martel,D., du Souich,P., Barja-Fidalgo,C. and Marleau,S., 2000. Hypoxemia modifies circulating and exudate neutrophil number and functional responses in carrageenin-induced pleurisy in the rat. *J. Leukoc. Biol.* 67, 785.
158. Ueda,N., Kaneko,S., Yoshimoto,T. and Yamamoto,S., 1986. Purification of arachidonate 5-lipoxygenase from porcine leukocytes and its reactivity with hydroperoxyeicosatetraenoic acids. *J Biol Chem* 261, 7982.
159. van Eaden,S.F., Klut,M.E., Walker,B.A.M. and Hogg,J.C., 1999. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *journal of Immunological Methods* 232, 23.
160. Wallach,D., Varfolomeev,E.E., Malinin,N.L., Goltsev,Y.V., Kovalenko,A.V. and Boldin,M.P., 1999. Tumor necrosis factor and Fas signaling mechanisms. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 331.
161. Weber,C., 2005. Platelets and chemokines in atherosclerosis. *Circ. Res.* 96, 612.

162. Weiss,S.J., 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320, 365.
163. Weller,P.F., Lee,C.W., Foster,D.W., Corey,E.J., Austen,K.F. and Lewis,R.A., 2006. Generation and metabolism of 5-lipoxygenase pathway leukotriene by human eosinophils: predominant production of leukotriene C4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7626.
164. Williams,T.J. and Peck,M.J., 1977. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature* 270, 530.
165. Wirthmueller,U., Baggiolini,M., de Weck,A.L. and Dahinden,C.A., 1991. Receptor-operated activation of polymorphonuclear leukocytes: different effects of NAP-1/IL-8 and fMET-LEU-PHE or C5a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 972.
166. Woodard,D.S., Lee,T. and Snyder,F., 1987. The final step in the de novo biosynthesis of platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 262, 2520.
167. Woods,J., Evans,J., Ethier,D., Scott,S., Vickers,P.J., Hearn,L., Charleson,S., Heibein,J.A. and Singer,J.I., 1993. 5-Lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J. Exp. Med.* 178, 1935.
168. Yokomizo,T., Izumi,T., Chang,K., Takuwa,Y. and Shimizu,T., 1997. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature* 387, 620.
169. Yokomizo,T., Kato,K., Terawaki,K., Izumi,T. and Shimizu,T., 2000b. A second leukotriene B₄ receptor, BLT2: a new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J. Exp. Med.* 192, 421.

170. Yokomizo,T., Kato,K., Terawaki,K., Izumi,T. and Shimizu,T., 2000a. A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. *J Exp Med* 192, 421.
171. Young,R.N., Gillard,J.W., Hutchinson,J.H., Leger,S. and Prasit,P., 1993. Discovery of inhibitors of the 5-lipoxygenase activating protein (flap). *J. Lipid Mediat.* 6, 233.
172. Zwahlen,R., Walz,A. and Rot,A., 1993. In vitro and in vivo activity and pathophysiology of human interleukin-8 and related peptides. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 34B, 27.

