

2m11.2688.1

Université de Montréal

**EFFETS DE L'HYPOXÉMIE SUR LA RÉPONSE FONCTIONNELLE DES
POLYMORPHONUCLÉAIRES NEUTROPHILES APRÈS INDUCTION D'UNE
PLEURÉSIE À LA CARRAGÉNINE CHEZ LE MODÈLE DU RAT**

par

Pierre-Benoît Tremblay

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

Septembre 1998

© Pierre-Benoît Tremblay, 1998



1-833-4-1115

QV

705

U58

1999

V.007

EFFETS DE L'HYPERÉMIE SUR LA RÉPONSE FONCTIONNELLE DES
POLYMERHONUCLEAIRES NEUTROPHILES APRES INDUCTION D'UNE
PLÉURÉSIE À LA CARAGÉNE CHEZ LE MODÈLE DU RAT

Dr.
Houng Banou Tamday

Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté à l'École des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître en sciences (M.Sc.)
en Pharmacie (Branche Pharmacie)
Séance publique

Le candidat est

M. Houng Banou Tamday



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**EFFETS DE L'HYPOXÉMIE SUR LA RÉPONSE FONCTIONNELLE DES
POLYMORPHONUCLÉAIRES NEUTROPHILES APRÈS INDUCTION D'UNE
PLEURÉSIE À LA CARRAGÉNINE CHEZ LE MODÈLE DU RAT**

présenté par:

Pierre-Benoît Tremblay

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

<u>Docteur Huy Ong</u>	:	président-rapporteur
<u>Docteure Sylvie Marleau</u>	:	directrice de recherche
<u>Docteur Nigel Phillips</u>	:	membre du jury

Mémoire accepté le: 98.12.15

Sommaire

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) au contact de molécules telles que les cytokines et les chimiokines, les médiateurs lipidiques ainsi que les produits bactériens réagissent par une modification de leur métabolisme appelée amorçage. L'amorçage est caractérisé par une réponse accrue des PMNs lors d'une seconde exposition à des stimuli pro-inflammatoires. Les PMNs amorcés sont ainsi hypersensibles aux stimulants. L'amorçage métabolique des PMNs est considéré comme un changement important dans les mécanismes de défense de l'hôte contre une invasion microbienne. Toutefois, ce processus peut être à l'origine d'importants dommages tissulaires dans les cas où il y a une exacerbation inutile de la réaction inflammatoire. Dans des conditions normales, les PMNs sanguins ne forment pas une population homogène. Ils sont constitués majoritairement de PMNs dormants mais également, dans des proportions beaucoup plus faibles, de PMNs amorcés, activés ainsi qu'en apoptose.

La proportion de PMNs amorcés augmente toutefois de façon significative chez les patients souffrant de différentes pathologies, notamment dans les maladies cardiaques ischémiques comme l'angine instable et l'infarctus aigu du myocarde. L'augmentation du nombre de PMNs amorcés et activés contribue aussi à la pathogénèse des conditions pathophysiologiques aiguës telle que le syndrome de détresse respiratoire et le choc septique. Il n'est pas rare de rencontrer, chez un même patient, une perturbation des gaz et du pH artériels accompagnant les pathologies décrites précédemment. Notre hypothèse de recherche est qu'un état d'hypoxémie modéré peut contribuer à la détérioration d'états pathologiques, en amorçant les PMNs ainsi qu'en augmentant leur arrivée au foyer inflammatoire.

Afin d'évaluer les effets de l'hypoxémie sur la réponse fonctionnelle des PMNs, nous avons développé au cours de ce travail de maîtrise, un modèle animal de pleurésie à la carragénine chez le rat Sprague-Dawley mâle. Dans ce modèle, l'injection intra-pleurale (i.pl.) de carragénine cause une réaction inflammatoire au

niveau de la cavité pleurale, caractérisée par une accumulation accrue de PMNs pendant les premières heures suivant l'injection. Les exsudats et le sang ont été recueillis afin de déterminer le compte total et différentiel des leucocytes et afin de mesurer la réponse fonctionnelle des PMNs en terme de production de monoxyde d'azote et d'anion superoxyde. Nous avons également déterminé le pourcentage d'adhésion cellulaire des PMNs isolés sur des plaques recouvertes de protéines de sérum de veau après leur stimulation par différents agonistes.

Nos résultats montrent que l'hypoxémie induit une augmentation de 50% de la quantité de PMNs dans la circulation sanguine associée à une diminution de 25% du nombre de PMNs ayant migré dans la cavité pleurale chez les rats hypoxémiques comparativement aux rats témoins.

L'hypoxémie modifie la réponse fonctionnelle des PMNs isolés du sang et de l'exsudat *ex vivo*. En effet, l'hypoxémie a augmenté l'adhésion des PMNs sanguins tandis que seule l'adhésion basale des neutrophiles de l'exsudat a été augmentée chez les rats hypoxémiques après stimulation au N-formylméthionylleucylphénylalanine (FMLP), un tripeptide bactérien. De plus, les PMNs de l'exsudat des rats hypoxémiques stimulés au phorbol myristate acétate (PMA), produisent plus d'anion superoxyde que ceux des rats respirant l'air ambiant. Enfin, les PMNs du sang et des exsudats des animaux hypoxémiques produisent 4.5 et 2 fois plus de monoxyde d'azote (NO) après leur stimulation avec le lipopolysaccharide bactérien (LPS), respectivement.

Ce travail montre un effet de l'hypoxémie tant au niveau des manifestations locales que systémiques associées à ce modèle. Ces observations ouvrent de nouveaux axes de recherche, notamment l'élucidation des médiateurs endogènes impliqués dans les effets de l'hypoxémie. L'hypoxémie pourrait être un facteur déterminant dans le développement et la progression de nombreuses pathologies où cette condition est souvent associée.

MOTS CLÉS:

Hypoxémie

Polymorphonucléaires neutrophiles

Pleurésie à la carragénine

Amorçage

Adhésion cellulaire

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
MOTS CLÉS	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTES DES SIGLES ET ABREVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiv
CHAPITRE I: INTRODUCTION	16
1. Le polymorphonucléaire neutrophile	17
1.1. Généralités	17
1.2. Rôle des neutrophiles dans l'inflammation.....	19
1.3. Dommages cellulaires causés par les PMNs	22
2. L'amorçage des PMNs.....	24
2.1. Définition de l'amorçage	24
2.2. Agents responsables de l'amorçage.....	27
2.3. Réponse des PMNs à l'amorçage	27
2.3.1. Changements morphologiques.....	27
2.3.2. Régulation positive des glycoprotéines membranaires.....	28
2.3.3. Sécrétion de médiateurs lipidiques	28
2.3.4. Sécrétion d'hydrolases	28
2.3.5. Production de radicaux libres	29
2.4. Sous-population de PMNs	29
2.5 Implications cliniques.....	29
3. L'hypoxémie.....	30
3.1. Définition et implications cliniques	30
3.2. Études <i>in vitro</i>	30
3.3. Études <i>in vivo</i>	31

4. Le modèle de la pleurésie à la carragénine.....	31
4.1. La carragénine.....	31
4.2. Anatomie de la cavité pleurale.....	32
4.3. Physiologie de la cavité pleurale.....	34
4.4. Pathophysiologie de la pleurésie à carragénine	36
5. L'adhésion des PMNs.....	38
6. L'anion superoxyde	39
7. Le monoxyde d'azote	39
8. But du travail.....	40
 CHAPITRE II: HYPOXEMIA MODIFIES CIRCULATING AND EXUDATE NEUTROPHILS NUMBER AND FUNCTIONAL RESPONSES IN CARRAGEENIN-INDUCED PLEURISY IN THE RAT.....	42
1. Abstract.....	44
2. Introduction.....	45
3. Materials and methods	46
3.1. Chemicals	46
3.2. Induction of hypoxemia and carrageenin pleurisy	47
3.3. Isolation of circulating and exudate rat neutrophils.....	48
3.4. Adhesion assay	48
3.5. Measurement of O ₂ ⁻ production.....	49
3.6. Nitrite production by cultured PMNs	49
3.7. Statistical analysis of the data.....	49
4. Results.....	50
5. Discussion.....	51
6. Acknowledgements	57
7. References	58
 CHAPITRE III: DISCUSSION GÉNÉRALE	77
 BIBLIOGRAPHIE	86

LISTE DES TABLEAUX**CHAPITRE I. INTRODUCTION**

Tableau I. Pathologies associées à des dommages tissulaires causés par les PMNs.....	25
---	----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I. INTRODUCTION

- Figure 1. Représentation schématique d'un polymorphonucléaire neutrophile coloré au Giemsa-Wright.....19
- Figure 2. Représentation schématique de la phagocytose et de la destruction d'un agent pathogène par le neutrophile.....21
- Figure 3. Représentation schématique de la régulation de la réponse fonctionnelle des neutrophiles.....23
- Figure 4. Représentation schématique d'un PMN amorcé au LPS et d'un PMN non amorcé, après stimulation au FMLP.....26
- Figure 5. Représentation schématique de l'évolution de la pleurésie à carragénine en fonction du temps chez le rat.....35
- Figure 6. Représentation schématique de l'accumulation extravasculaire des leucocytes au foyer inflammatoire.....37

**CHAPITRE II. HYPOXEMIA MODIFIES CIRCULATING AND EXUDATE
NEUTROPHILS NUMBER AND FUNCTIONAL RESPONSES
CARRAGEENIN-INDUCED PLEURISY IN THE RAT**

- Figure 1. A) Concentration des leucocytes totaux et des PMNs dans le sang
B) Quantité totale de leucocytes et de PMNs ayant migré dans la cavité
pleurale.....66
- Figure 2. Pourcentage d'adhésion des PMNs du sang A) après stimulation au FMLP
B) au niveau basal et après stimulation au PMA.....68
- Figure 3. Pourcentage d'adhésion des PMNs de l'exsudat au niveau basal et
après stimulation au FMLP et au PMA.....70
- Figure 4. Production d'anion superoxyde des PMNs A) comparaison entre les
PMNs du sang et de l'exsudat, rat hypoxémiques vs rats
témoins B) comparaison entre les PMNs des rats hypoxémiques et les
rats témoins au niveau du sang et des exsudats.....72
- Figure 5. Production de monoxyde d'azote par les PMNs du sang et des exsudats
(rats hypoxémiques et rats témoins).....74
- Figure 6. Production de monoxyde d'azote par les cellules mononuclées du sang et
des exsudats (rats hypoxémiques et rats témoins).....76

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN:	acide désoxyribonucléique
α :	alpha
β :	bêta
©:	marque déposée
C ₁ :	fraction C ₁ du complément
Ca ²⁺ :	ion calcium
Cl ⁻ :	ion chlore
Fc:	fragment cristallisable
F _I O ₂ :	fraction inspiratoire en oxygène
FMLP:	N-formylméthionylleucylphénylalanine
G-CSF:	<i>granulocyte colony-stimulating-factor</i>
GM-CSF:	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor</i>
H ₂ O ₂ :	peroxyde d'hydrogène
HClO:	acide hypochloreux
HUVEC:	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAMs:	intercellular adhesion molecule
IL-1:	interleukine 1
IL-2:	interleukine 2
IL-8:	interleukine 8
i.pl.:	intra-pleurale
LPS:	lipopolysaccharide
LTB ₄ :	leucotriène B ₄
MDP:	muramyl dipeptide
MPO:	myéloperoxidase
ml:	millilitre
mmHg:	millimètre de mercure
ng:	nanogramme
N ₂ :	azote gazeux

DÉDICACE

J'aimerais dédier ce mémoire à mes parents, à Véronique ainsi qu'à Andreas pour leur support inconditionnel, leurs encouragements et leur amour.

NO ₂ ⁻ :	nitrite
NO:	monoxyde d'azote
NOS:	<i>nitric oxide synthase</i>
iNOS:	<i>nitric oxide synthase</i> (isoforme inductible)
O ₂ :	oxygène moléculaire
O ₂ ⁻ :	anion superoxyde
OH•:	radical hydroxy
PaO ₂ :	pression partielle d'oxygène dans le sang artériel
PCO ₂ :	pression partielle de gaz carbonique dans le sang artériel
PL:	phospholipase
PAF:	<i>platelet activating factor</i>
PGE ₂ :	prostaglandine E ₂
PKC:	protéine kinase C
PLA ₂ :	phospholipase A ₂
PMA:	phorbol myristate acétate
PMN:	polymorphonucléaire neutrophile
PPA:	protéines de la phase aiguë
SOD:	superoxyde dismutase
TMB:	3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine
TNF:	<i>tumor necrosis factor</i>
μm:	micromètre
μM:	micromolaire

REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord exprimer ma profonde reconnaissance au Docteur Sylvie Marleau pour l'encadrement ainsi que la précieuse assistance accordés tout au long de la réalisation de ce mémoire. Femme exceptionnelle tant au point de vue de ses qualités professionnelles qu'humaines, elle m'a permis d'acquérir les éléments de base nécessaires à la poursuite d'une carrière scientifique et elle demeurera pour moi, une inspiration dans la poursuite de ma formation surtout en ce qui concerne sa grande rigueur intellectuelle, sa ténacité, sa passion au travail ainsi que sa foi en la recherche.

Naturellement, un projet d'une telle ampleur ne se réalise pas sans l'aide de nombreuses personnes. Je tiens à remercier particulièrement Docteur David M. T. Macari qui tout en travaillant sur son projet post-doctoral dans notre laboratoire, devint un collaborateur de premier plan à tous les niveaux du projet.

Je tiens aussi à témoigner ma grande reconnaissance au Docteur Huy Ong, Vice-doyen aux études supérieures et à la recherche de la Faculté de pharmacie, qui fut un des premiers à m'encourager et à me conseiller dans mon choix d'entreprendre une carrière scientifique. Je vous en suis très reconnaissant.

Merci au Docteur Nigel Phillips pour ses précieux conseils ainsi que ses commentaires constructifs tout au long du projet.

Je tiens également à remercier le Docteur Patrick du Souich du Département de pharmacologie de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal de nous avoir permis d'utiliser sa chambre hypoxie, élément essentiel de notre expérimentation. De gros mercis à Mesdames Lucie Héroux et Hélène Maurice pour l'aide apportée dans l'utilisation des appareils ainsi que pour m'avoir prêté "la fameuse clé" de leur laboratoire.

Je m'en voudrais de ne pas mentionner les différents étudiants sous-gradués: T. T. Hang Nguyen, Lin Lei et Marylène Roy ainsi que la technicienne Chantal Pépin pour toute l'aide technique qu'ils ont pu m'apporter. J'espère qu'ils en garderont un bon souvenir et je leur souhaite tout le succès qu'ils méritent pour l'avenir.

Un merci très spécial au Dr Christina Barja-Fidalgo pour notre belle amitié. Il est si rare de rencontrer des gens de cette trempe remplis d'une soif de vivre aussi intense. Nos soirées de bohème dans les cafés de Montréal ainsi que nos mardis Martini sont gravés à jamais dans ma mémoire.

Je remercie amicalement mes collègues Avedis Panoyan et Marie Roumi pour leurs encouragements, leur soutien et leur aide.

Merci à mon co-locataire Richard Cossette pour m'avoir enduré et pour toutes ces petites attentions (souper, ménage) qui font toute la différence et qui furent tant appréciées.

Une mention d'honneur à mon meilleur ami Yann Boivin que je connais depuis au moins 10 ans et qui fut la victime autant de mes "écoeurites-ultra-aiguës-du-laboratoire" que de mes "crises-de-joies-tout-aussi-ultra-aiguës-du-labo". De toute façon, nous serons riches et célèbres et serons bientôt les «Maîtres» du monde!

Je tiens également à remercier toute ma famille ainsi que ma gang du baccalauréat avec qui j'espère ne jamais perdre contact.

Pour terminer, je désire témoigner ma reconnaissance envers l'AFPC pour leur octroi de la bourse Merck-Frosst-Julien Braun et la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal pour m'avoir accordé toutes les deux un support financier et ainsi me permettre d'entreprendre des études supérieures.

CHAPITRE I
INTRODUCTION

1. Le polymorphonucléaire neutrophile

1.1. Généralités

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) sont des leucocytes bien différenciés qui lorsque colorés au Giemsa-Wright présentent un noyau multilobé bleu foncé sans nucléole et un cytoplasme rose pâle, riche d'une multitude de petits granules d'un rose vif qui contiennent un arsenal de protéines, de glycosaminoglycans et d'enzymes antimicrobiens (figure 1) (Hoffbrand et Pettit, 1987). Ces cellules issues de la moelle osseuse sont relâchées dans la circulation sanguine à un rythme de 10^{11} cellules par jour. Ce processus est principalement réglé par deux facteurs de croissance, le *granulocyte colony-stimulating-factor* (G-CSF) ainsi que le *granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor* (GM-CSF) qui sont sécrétés par les monocytes et les fibroblastes et qui stimulent la prolifération et la différenciation de cellules précurseurs appelées myéloblastes. La période de différenciation et de maturation qui prend généralement entre 12 à 14 jours peut diminuer à une période aussi courte que 24 heures en présence de certains facteurs humoraux ou encore lorsque l'organisme est soumis à un stress, par exemple au cours d'une infection bactérienne (Pabst *et al.*, 1994).

Dans des conditions normales, les PMNs forment entre 50 et 60 % des leucocytes totaux circulants chez l'homme. À l'opposé, les PMNs constituent environ 25% à 30% des leucocytes totaux circulants chez le rat, modèle expérimental utilisé dans ce projet. Une fois libérés de la moelle osseuse, les PMNs circulent dans les vaisseaux sanguins sur une période variant entre 4 et 10 heures avant d'être marginés, i.e. avant leur attachement "lâche" à la paroi des cellules endothéliales. Ils entrent alors dans le pool tissulaire où ils survivront jusqu'à un maximum 48 heures. Les macrophages se chargent à cette étape de phagocyter les PMNs sénescents. Il existe des échanges entre les pools marginés et circulants mais l'importance de ce phénomène n'est pas encore très bien connue (Smith, 1994).

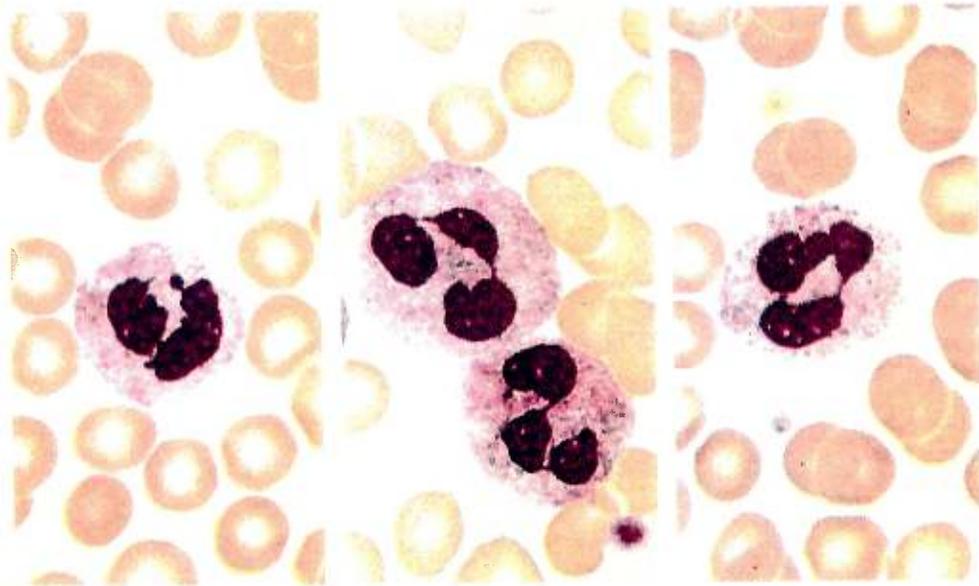


Figure 1. Représentation schématique d'un polymorphonucléaire neutrophile coloré au Giemsa-Wright (Hoffbrand et Pettit, 1987)

1.2. Rôle des neutrophiles dans l'inflammation

Les PMNs font partie du système immunitaire non spécifique et sont essentiels à l'hôte pour sa défense contre les invasions microbiennes. Leur rôle principal est de phagocyter et de détruire les différents agents pathogènes qui ont réussi à pénétrer les barrières physiques de l'organisme. Étant les premières cellules à arriver au site inflammatoire, les PMNs assurent la phase initiale de la défense permettant ainsi le développement de la réponse immunologique qui elle est spécifiquement dirigée contre l'agresseur (Mannion *et al.*, 1990).

D'une façon générale, les médiateurs de l'inflammation générés au site de l'inflammation vont diffuser dans les tissus environnants et activer leurs récepteurs situés d'une part à la surface des PMNs circulants et d'autre part sur les cellules endothéliales adjacentes. Les PMNs activés vont, via les molécules d'adhérence exprimées à la surface des PMNs ainsi qu'à la surface des cellules endothéliales, s'attacher lâchement à la surface endothéliale avant d'y adhérer fermement. Ils migreront par la suite au foyer inflammatoire où ils phagocyteront et tueront les pathogènes (Cronstein *et al.*, 1993). Les mécanismes détaillés de ce processus seront traités ultérieurement au point 5 de la page 36.

Dans le cas d'une agression bactérienne, la phagocytose comporte deux étapes importantes. Premièrement, la reconnaissance du pathogène ainsi que son internalisation dans le phagosome. Deuxièmement, l'inactivation ou la mort du pathogène suivie de sa digestion et la plupart du temps d'une réponse sécrétoire (Mannion *et al.*, 1990).

En ce qui concerne la reconnaissance, les PMNs se lient directement à l'agent pathogène comme par exemple à un lipopolysaccharide (LPS) bactérien. Dans la majorité des cas, cette structure doit au préalable être opsonisée par liaison avec des protéines plasmatiques ou tissulaires. Ces dernières peuvent être de nature spécifique (immunoglobulines) ou non spécifique (la matrice extracellulaire, le complément, etc.).

Les PMNs reconnaissent alors la protéine liée grâce à des récepteurs spécifiques (fragment cristallisable (Fc) et le récepteur du complément) (Pabst *et al.*, 1994).

Lors de la phagocytose, l'agent pathogène est internalisé par invagination de la membrane plasmique du PMN afin de former un phagosome. Les granules cytosoliques se fusionnent à ce phagosome en déversant leur contenu hautement toxique et ainsi former ce qu'on appelle un phagolysosome (figure 2). Cette façon de procéder prévient généralement le déversement du contenu des granules cytosoliques dans le milieu extracellulaire. Par contre, lorsque l'agent pathogène est beaucoup plus gros que la taille d'un PMN, il ne peut y avoir formation du phagosome et le contenu des granules cytosoliques est déversé directement dans le milieu extracellulaire (Klebanoff, 1992).

Une fois le phagolysosome formé, il y a activation de nombreux enzymes spécifiques capables d'engendrer des radicaux libres délétères pour les pathogènes. Certains enzymes utiliseront l'oxygène consommé en très grande quantité par les PMNs afin d'élaborer des radicaux libres comme l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxy ($OH\cdot$), l'acide hypochloreux (HClO) ainsi que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) selon un processus appelé "flambée respiratoire oxydative". D'autres types de radicaux libres seront formés à partir de la voie de synthèse du monoxyde d'azote (NO) (Smith, 1994).

Les PMNs possèdent non seulement des granules cytoplasmiques contenant des enzymes oxydatifs mais également des granules renfermant des enzymes hydrolytiques ainsi que des polypeptides antimicrobiens. Les granules azurophiliques contiennent entre autres de nombreux enzymes protéolytiques et saccharolytiques capables de digérer des protéines de structure microbiennes et des mucopolysaccharides. D'autres contiennent la lactoferrine, capable d'inhiber la multiplication des bactéries ou encore le lysosome qui provoque la destruction de la paroi bactérienne. La plupart de ces protéines sont chargées positivement ce qui augmente leur liaison aux surfaces cellulaires (Borregaard *et al.*, 1993).

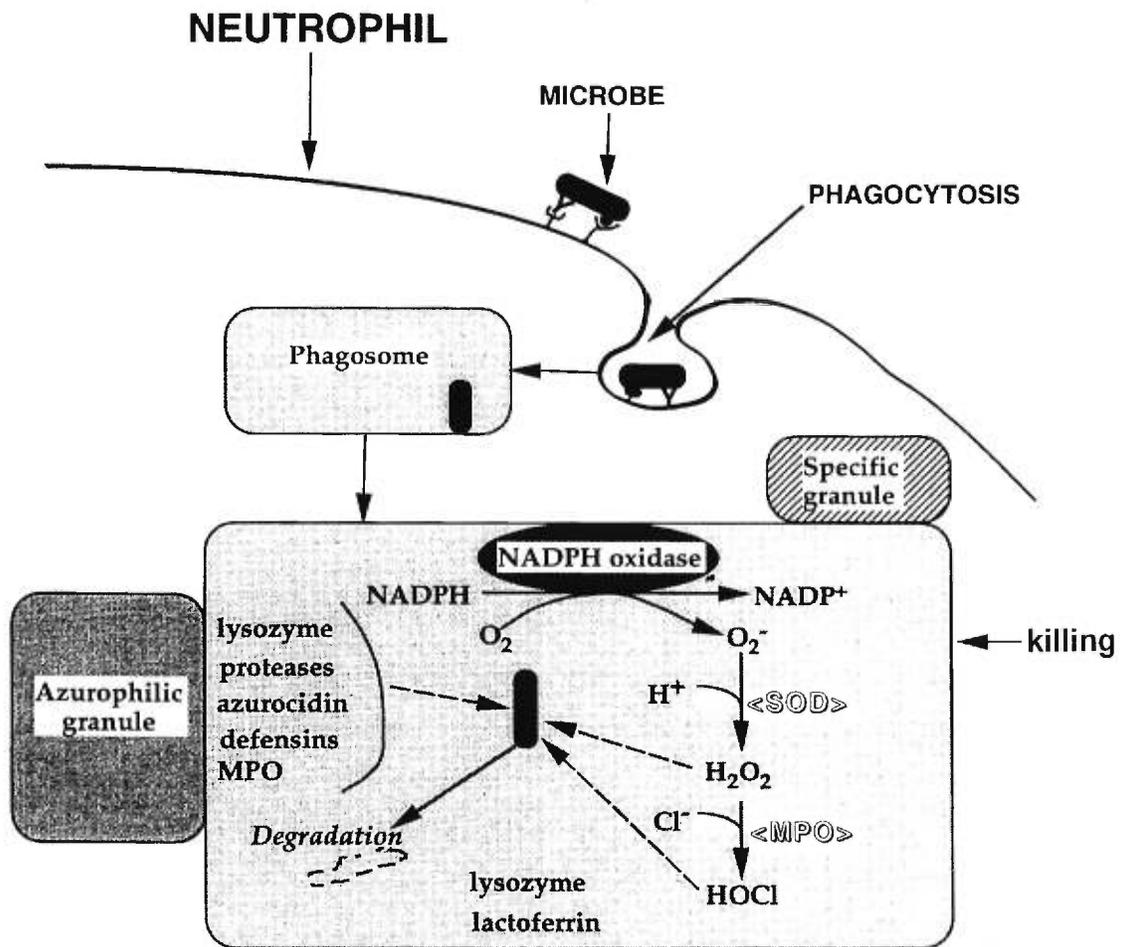


Figure 2. Représentation schématique de la phagocytose et de la destruction d'un agent pathogène par le neutrophile (Smith, 1994)

L'activité des PMNs est modulée par une pléthore de médiateurs sécrétés par différentes cellules des systèmes endocrinien, nerveux et cardiovasculaire ainsi que par d'autres types de cellules du système immunitaire. Ces médiateurs incluent les cytokines, les chimiokines, les hormones et les facteurs lipidiques, pour la plupart sécrétés lorsque l'organisme subit un stress. Dans ce contexte, les médiateurs peuvent voir leurs actions amplifiées par une activité autocrine et paracrine des cellules impliquées (Blalock, 1989); (Reichlin, 1993). De nombreux médiateurs ont la capacité de moduler l'activité tant *in vivo* que *in vitro* des PMNs (figure 3) (Smith, 1994). La figure 3 illustre l'ensemble des médiateurs modulant les fonctions du PMN et montre que cette liste est en constante évolution. De plus, elle n'inclut pas les fragments de la cascade du complément comme le fragment C3b qui augmente l'activité phagocytaire des PMNs ainsi que le fragment C5a qui est un agent chimiotactique (Berger *et al.*, 1988); (Thelen *et al.*, 1993). Il est à noter que les PMNs sont eux aussi capables de sécréter différents médiateurs comme la prostaglandine E_2 (PGE_2), le *tumor necrosis factor* (TNF), le *platelet activating factor* (PAF), le leucotriène B_4 (LTB_4), le GM-CSF, les interleukines 1 et 2 (IL-1 et IL-2) et plus particulièrement l'interleukine 8 (IL-8) (Smith, 1994).

1.3. Dommages cellulaires causés par les PMNs

La migration des PMNs au foyer inflammatoire comporte une cascade d'événements bien définie et hautement régularisée. Ce processus prend fin avec la mort ou l'inactivation des agents pathogènes initiateurs et par conséquent, par l'arrêt de la sécrétion des médiateurs de l'inflammation par les différentes cellules impliquées (Weiss, 1989).

Cependant, il arrive qu'il y ait une défaillance dans les mécanismes de régulation de ce processus entraînant une suractivation ou une prolongation injustifiée de la réponse inflammatoire. L'accumulation et l'activation des PMNs dans ce contexte particulier peut donc produire la destruction des tissus environnants et ainsi contribuer à l'exacerbation des maladies inflammatoires. Ces dommages tissulaires peuvent

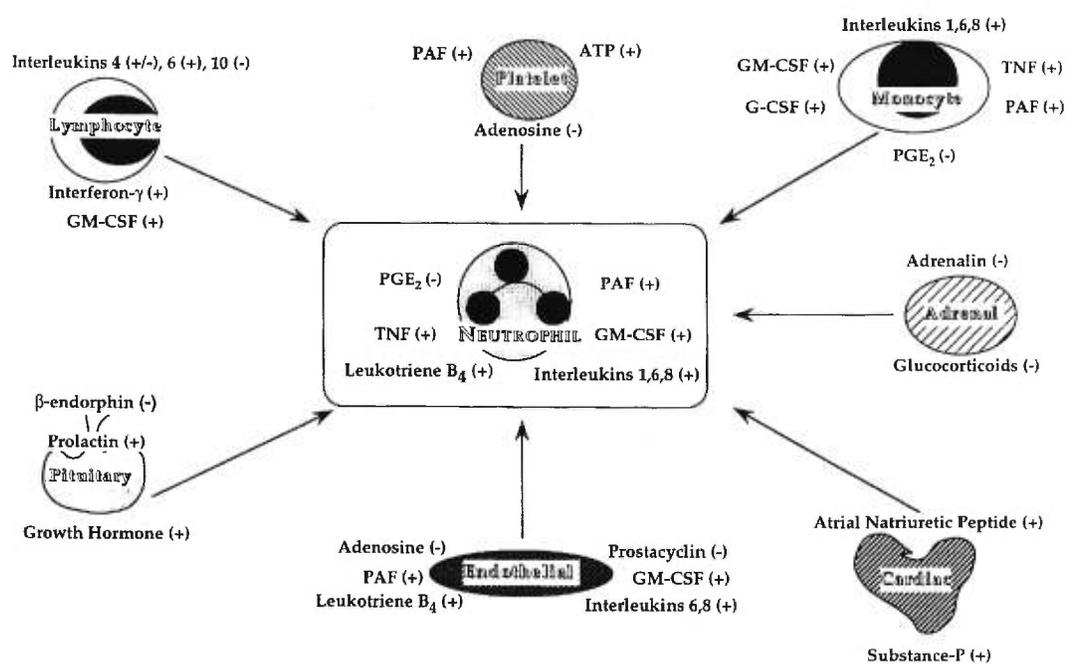


Figure 3. Représentation schématique de la régulation de la réponse fonctionnelle des neutrophiles (Smith, 1994)

résulter de l'activation prématurée des PMNs lors de leur migration par la libération de l'arsenal antimicrobien des PMNs (radicaux libres, enzymes hydrolytiques etc.), par l'élimination des cellules de l'hôte lésées ou mortes lors du processus de réparation tissulaire ou bien encore par une défaillance dans les mécanismes régularisant la résolution de la réponse inflammatoire aiguë (Weiss, 1989). Par exemple, le relâchement massif de protéases par les PMNs lors des infections pulmonaires chroniques par le *Pseudomonas aeruginosa* conduit à la destruction du parenchyme pulmonaire (Ras *et al.*, 1992). L'activation des PMNs par des complexes immuns dans le fluide synovial contribue aux dommages tissulaires observés dans l'arthrite rhumatoïde (Robinson *et al.*, 1992). L'activation chronique des PMNs peut aussi favoriser le développement tumoral en créant des dommages à l'acide désoxyribonucléique (ADN) par la libération extracellulaire de radicaux libres de l'oxygène (Weitzman *et al.*, 1990). D'autres exemples de pathologies associées à des dommages tissulaires causés par les PMNs sont présentés au tableau 1 (Harlan *et al.*, 1993).

2. L'Amorçage des PMNs

2.1. Définition de l'amorçage

L'amorçage se définit comme étant une diminution réversible du seuil de réactivité cellulaire occasionnée par l'exposition des PMNs à des concentrations sous-activatrices de molécules proinflammatoires, contrairement à l'activation des PMNs qui se traduit par le déclenchement immédiat de tout l'arsenal antimicrobien de ces derniers. Cette modification du métabolisme cellulaire se traduit par une hypersensibilité des PMNs à divers stimuli activateurs (Pabst *et al.*, 1994); (Smith, 1994).

Par exemple, si on ajoute un tripeptide bactérien comme le N-formylméthionylleucylphénylalanine (FMLP) à une concentration finale de 0.1 μM à une suspension de PMNs non amorcés (10^6 cellules/ml), on remarque qu'ils ne

Syndromes d'ischémie-reperfusion	Pathologies inflammatoires ou d'origines immunitaires
Infarctus du myocarde	Choc septique
Choc	Syndrome de détresse respiratoire
Accident vasculaire cérébral	Syndrome de défaillances multiples d'organes
Section de membres	Rejet de greffes allogéniques
Transplantation d'organes	Arthrite rhumatoïde
Circulation extracorporelle	Athérosclérose
	Maladies inflammatoires de l'intestin
	Oedème cérébral associé à la méningite
	Réaction du greffon contre l'hôte
	Scléroses multiples
	Vasculites
	Dermatoses inflammatoires
	Diabète
	Asthme
	Pneumonie d'aspiration
	Brûlures
	Engelures

Tableau I. Pathologies associées à des dommages tissulaires causés par les PMNs
(adapté de Harlan *et al.*, 1993)

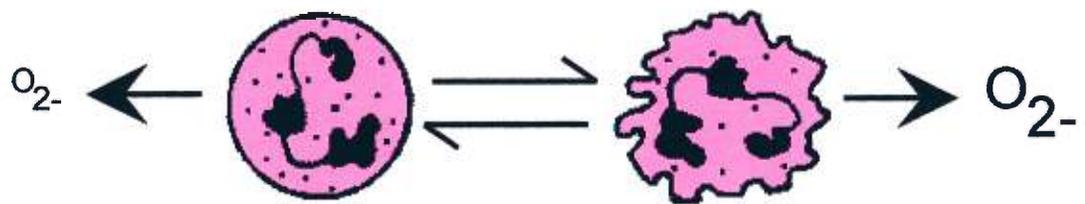


Figure 4. Représentation schématique d'un PMN amorcé au LPS et d'un PMN non amorcé, après stimulation au FMLP

produisent que très peu d'anion superoxyde. Par contre, si on ajoute la même concentration de FMLP à une suspension de PMNs amorcés par du LPS (10 ng/ml) pendant 30 minutes, ces derniers produiront une très forte quantité d'anion superoxyde (figure 4) (Forehand *et al.*, 1989). Le FMLP à des concentrations micromolaires activera directement les phagocytes (Forehand *et al.*, 1989).

2.2. Agents responsables de l'amorçage

De nombreux agents ont été identifiés comme responsables, à de faibles concentrations, de l'amorçage des PMNs. D'une part, nous retrouvons les produits bactériens comme le LPS, un des premiers agents reconnu comme responsable de ce phénomène et retrouvé principalement chez les bactéries Gram-négatives (Cohn *et al.*, 1960); d'autre part, nous retrouvons le muramyl dipeptide (MDP), les peptidoglycanes, composantes principales de la paroi des bactéries Gram-positives et retrouvées en quantité moindre chez les bactéries Gram-négatives (Riveau *et al.*, 1991), l'acide lipoteichoïque ainsi que le FMLP (Lew, 1989). On retrouve également différentes substances d'origine fongique comme les glucans et les mannans ainsi que plusieurs médiateurs sécrétés par différents types cellulaires dont les cytokines, représentées par exemple par le $TNF\alpha$ ainsi que les chimiokines, en particulier l'IL-8 (Daniels *et al.*, 1992). Les brûlures (Bjerknes *et al.*, 1990), le stress et l'activité physique sont aussi des conditions associées à l'amorçage des PMNs (Smith *et al.*, 1990).

2.3. Réponse des PMNs à l'amorçage

2.3.1. Changements morphologiques

Une des premières réponses qui peut être observée lors de l'amorçage des PMNs est le changement de forme de la cellule. Les PMNs qui ont une forme sphérique à l'état de dormance présentent un renflement unilatéral lorsqu'ils sont amorcés. Ce changement morphologique confère aux PMNs un plus grand pouvoir d'agrégation ainsi que d'adhésion aux cellules endothéliales et représente un des

indicateurs les plus sensibles de l'amorçage (Haslett *et al.*, 1985); (Pabst *et al.*, 1994).

2.3.2. Régulation positive des glycoprotéines membranaires

L'amorçage produit la régulation positive de plusieurs glycoprotéines membranaires. Certaines de ces glycoprotéines sont emmagasinées dans des granules qui fusionnent avec la membrane plasmique lors de l'amorçage des PMNs. C'est le cas entre autres des granules qui emmagasinent le récepteur du FMLP lors de l'amorçage au LPS (Borregaard *et al.*, 1987).

2.3.3. Sécrétion de médiateurs lipidiques

Les PMNs amorcés vont synthétiser et sécréter différents médiateurs lipidiques comme le PAF (Betz et Henson, 1980) et le LTB₄ (Dessein *et al.*, 1986) après l'application d'un stimulus activateur comme le l'ionophore calcique A23187. Les agents responsables de l'amorçage vont initier ce processus en se liant à leurs récepteurs couplés à des voies effectrices impliquant l'activation de la protéine kinase C (PKC) et de la phospholipase A₂ (PLA₂), déclenchant ainsi la sécrétion des médiateurs (Mcintyre *et al.*, 1987). Les PMNs amorcés au LPS sont capables de produire du LTB₄, un des principaux eicosanoïdes produit par ces cellules. Cette sécrétion demande toutefois l'application d'un stimulus comme le PMA ou le A23187 (Doerfler *et al.*, 1989).

2.3.4. Sécrétion d'hydrolases

La majorité des enzymes sécrétés au foyer inflammatoire sont synthétisés et entreposés dans des granules lors de la maturation des PMNs dans la moelle osseuse. Plusieurs de ces enzymes comme l'élastase et la cathepsine G font partie de cette famille d'hydrolases sécrétées par les PMNs amorcés au LPS en réponse à la stimulation par le FMLP (Fittschen *et al.*, 1988).

2.3.5. Production de radicaux libres

Les PMNs amorcés et activés par le LPS ou le FMLP produisent de très grandes quantités de radicaux libres oxygénés comme l'anion superoxyde. Les PMNs amorcés de rat, en particulier, produisent également des radicaux libres de l'azote comme le NO (Pabst *et al.*, 1994).

2.4. Sous-population de PMNs

Chez un sujet sain, les PMNs sanguins ne forment pas une population homogène. Ils sont constitués majoritairement de PMNs dormants (non-activés) mais également, dans des proportions beaucoup plus faibles, de PMNs amorcés, activés ainsi qu'en apoptose. Chaque état cellulaire est caractérisé par l'expression de molécules bien précises à la surface de la membrane plasmique (Fc γ RI, CD66, CD69, récepteurs au FMLP etc.) mais également par des réponses fonctionnelles d'intensités variables provoquées par des stimuli spécifiques (Gallin, 1984).

Par exemple, les PMNs amorcés par des concentrations sous-activatrices d'interféron γ exprimeront à leur surface le récepteur du complément Fc γ RI, généralement absent chez les PMNs non-activés. Cette situation entraînera donc une augmentation de la proportion de PMNs amorcés au sein de la population.

2.5. Implications cliniques

De nombreuses conditions physiologiques et pathophysiologiques ont été associées à une augmentation de la quantité des PMNs amorcés en comparaison avec des sujets normaux, par exemple, chez les patients souffrant de brûlures sérieuses (Bjerknes *et al.*, 1990), ou soumis au stress et à l'activité physique (Smith *et al.*, 1990). Il a aussi été démontré que les patients présentant des infections bactériennes aiguës (Bass *et al.*, 1986), de l'hypertension (Pontremoli *et al.*, 1989), ou souffrant de la maladie de Hodgkin (Tullgren *et al.*, 1991), ou d'une maladie inflammatoire de l'intestin

(Suematsu *et al.*, 1987), de même que les patients atteints de psoriasis (Bloomfield et Young, 1988), présentent un très fort pourcentage de PMNs amorcés.

3. L'hypoxémie

3.1. Définition et implications cliniques

L'hypoxémie se définit par une diminution de la pression partielle d'oxygène dans le sang artériel (PaO_2) (Dautzenberg, 1997). C'est une condition qui est fréquemment rencontrée chez les patients souffrant de maladies cardiovasculaires et respiratoires telles que l'insuffisance cardiaque (Dautzenberg, 1997), l'infarctus du myocarde (Aoki *et al.*, 1998), l'asthme et l'emphysème (Wanstall, 1993); (Mian *et al.*, 1993), le syndrome de détresse respiratoire (Simon et Ward, 1992) et compliquant d'autres désordres comme le choc septique (Glauser *et al.*, 1991). Il en résulte une modification de l'homéostasie de différents systèmes et plus particulièrement du système respiratoire. Chez le rat, une hypoxémie aiguë provoque une hyperventilation accompagnée de tachycardie suivie d'une diminution de la ventilation et d'une bradycardie (Thomas *et al.*, 1994). Cet état d'hypoxémie provoque également la vasoconstriction des artères pulmonaires qui est un mécanisme favorisant la redistribution du sang vers l'apex des poumons, aidant ainsi au maintien de la ventilation (Anand, 1994); (Wagner et Hervé, 1985).

3.2. Études in vitro

Les études *in vitro* réalisées jusqu'à présent démontrent que les "*human umbilical vein endothelial cells*" (HUVEC) hypoxiques produisent davantage de médiateurs pro-inflammatoires dont l'interleukine 1 (IL-1) (Shreeniwas *et al.*, 1992), le PAF (Arnoult *et al.*, 1993); (Milhoan *et al.*, 1992) et l'IL-8 (Karakurum *et al.*, 1994). De plus, elles répondent à des changements aigus et chroniques de PaO_2 en modifiant l'homéostasie ainsi que le niveau de substances inflammatoires et vasomotrices dans

le sang (Bauer, 1990); (Pohl, 1990). De plus, les HUVEC voient l'adhérence des PMNs augmenter et la proximité des deux types cellulaires stimulent les PMNs à produire de l'anion superoxyde et du LTB₄ (Arnoult *et al.*, 1994). L'exposition *in vitro* des PMNs du sang à des conditions hypoxiques provoque une augmentation de leur activité phagocytaire, accompagnée par une expression accrue des récepteurs à l'opsonine à la surface de la membrane plasmique (Knowles *et al.*, 1997). Les PMNs hypoxiques démontrent également une expression accrue des récepteurs à l'IL-1 β (type 1), du TNF α (p80) ainsi que de l'IL-8 (Simms et D'Amico, 1996).

3.3. Études in vivo

Les études réalisées *in vivo* montrent qu'une hypoxémie aiguë chez le rat (F_iO₂ 6%, 30 minutes) provoque l'activation des leucocytes se traduisant par des changements morphologiques dont une réduction dans la taille des granules et la présence de lobes en forme de cratères au niveau de la membrane plasmique (*crater-like lobes*) (Mian *et al.*, 1993). Ces conditions expérimentales induisent aussi une adhésion augmentée des leucocytes à l'endothélium des veinules post-capillaires mésentériques et spinotrapéziques (Mian et Marshall, 1993). De plus, l'endothélium répond à des changements aigus et chroniques de PaO₂ en modifiant l'homéostasie ainsi que le niveau de substances pro-inflammatoires et vasoactives dans le sang (Bauer, 1990); (Pohl, 1990). Les effets d'une hypoxémie modérée (F_iO₂ 9%, 12 heures) sur l'accumulation des PMNs et leurs réponses fonctionnelles au site d'inflammation n'avaient pas fait l'objet d'études antérieures.

4. Le modèle de la pleurésie à la carragénine

4.1. La carragénine

La carragénine est un polysaccharide sulfaté extrait à l'eau chaude des cellules

de la paroi de certaines algues de la famille des *Rhodophycés* qui est largement utilisée dans l'industrie alimentaire et cosmétique pour ses propriétés gélifiantes. C'est la ville de Carragheen en Irlande où croît en abondance l'algue rouge *Chondrus crispus* qui a donné son nom à cette substance connue sous le nom de "irish moss" ou de "Carragheen moss" (Roch-Arveiller et Giroud, 1979).

La carragénine est constituée d'un mélange hétérogène de polyglycans sulfatés qui lui confère une propriété anionique. Les extraits sont composés de trois fractions qui varient en fonction du stade de maturation de l'algue : lambda (λ), iota (ι), kappa (κ). Ces polysaccharides possèdent comme principal hexose le D-galactose et certains de leurs hydroxyles sont estérifiés par des ions sulfate et sont liés entre eux en position $\alpha(1-3)$ et/ou en $\beta(1-4)$. Les trois fractions pures se distinguent surtout par leur degré de sulfatation ($\gamma > \iota > \kappa$) (Roch-Arveiller et Giroud, 1979).

L'activité pro-inflammatoire de la carragénine est très bien documentée. Cette substance est très utilisée en pharmacologie dans les modèles d'œdème plantaire (Winter *et al.*, 1962) de pleurésie (Vinegar *et al.*, 1973) et de formation de granulome (Robertson et Schwartz, 1953). La carragénine inhibe la fraction C₁ du complément et possède un pouvoir antigénique spécifique et un effet toxique sur les macrophages. Elle aurait également une action hyperthermique (Roch-Arveiller et Giroud, 1979). L'intensité de l'activité phlogogène est corrélée au degré de sulfatation de la carragénine (Damas, 1980).

4.2. Anatomie de la cavité pleurale

La plèvre est une membrane séreuse qui recouvre le parenchyme pulmonaire, le médiastin, le diaphragme ainsi que la cage thoracique. La plèvre est subdivisée en deux: premièrement la plèvre viscérale qui recouvre la totalité des poumons en incluant les différentes fissures interlobaires et deuxièmement, la plèvre pariétale qui recouvre la surface interne de la cage thoracique, le médiastin ainsi que le diaphragme. Les plèvres viscérale et pariétale se rejoignent toutes deux à la base des poumons créant

ainsi un espace qui porte le nom de cavité pleurale (Light, 1988).

D'un point de vue macroscopique, la plèvre normale est très mince, élastique, transparente et présente une surface lisse. Son étude microscopique révèle cinq couches bien distinctes: une couche de cellules mésothéliales présentant à leur surface de nombreux microvilli, une couche submésothéliale, une couche superficielle élastique, une couche subpleurale lâche et pour terminer, une couche profonde de nature fibroélastique. La présence et l'épaisseur de chaque couche est cependant très variable d'une espèce à l'autre et d'une région à l'autre chez un même animal. La plèvre de l'homme est dite "épaisse" puisqu'elle a une structure cellulaire beaucoup plus complexe qualitativement et quantitativement que celle du rat qui est dite "mince", donc de structure plus simple (McLaughlin *et al.*, 1961).

La plèvre pariétale possède ses propres lits vasculaires. Elle est alimentée par l'artère phrénique et musculophrénique supérieure pour sa région diaphragmatique, par l'artère péricardiophrénique pour sa région médiastinale et par les petites branches des artères intercostales pour sa région costale (Light, 1988).

En ce qui concerne la plèvre viscérale, la vascularisation diffère selon le type de plèvres (épaisse ou mince). Chez l'homme (plèvre épaisse), la plèvre viscérale est alimentée par les artères bronchiales et les capillaires alvéolaires tandis que chez les petits mammifères comme le rat (plèvre mince), elle ne possède pas de vascularisation qui lui est propre. La plèvre de ces animaux compte en effet sur sa très grande proximité avec les capillaires alvéolaires afin d'obtenir les nutriments et l'oxygène dont elle a besoin (Aharinejad *et al.*, 1991).

La plèvre viscérale ne possède pas son propre réseau lymphatique chez l'homme comme chez le rat. Elle est par contre intimement liée au réseau lymphatique pulmonaire qui est très bien développé dans cette région. Malgré cette grande proximité avec le réseau lymphatique pulmonaire, ce dernier ne semble pas impliqué dans l'élimination des protéines et autres particules générées au cours d'un processus inflammatoire au niveau de la cavité pleurale car il n'y a pas de communication directe

entre ces deux structures. La plèvre pariétale par contre possède de nombreux stomates d'un diamètre variant entre 2 et 12 μm qui communiquent directement avec le réseau lymphatique. Ces stomates représentent la seule issue possible pour les grosses particules afin de pouvoir quitter l'espace pleural. Certaines particules de faible poids moléculaire ou certaines molécules protéiques de faible taille pourront diffuser hors de la cavité à l'aide de vésicules de transport (Wang, 1985).

Le liquide pleural est essentiellement constitué d'un ultrafiltrat de sérum. Il a une composition chimique très semblable au sérum correspondant mais contient moins de protéines. Il forme une très fine couche de liquide (10-17 μm) entre la plèvre viscérale et la plèvre pariétale diminuant ainsi le frottement entre ces dernières (Light, 1988). Environ 7.1 millions de cellules résidentes peuvent être obtenues par lavage de la cavité pleurale chez des rats mâles Sprague-Dawley non traités de poids moyen (150-250 g). Cette population est principalement constituée de macrophages (89%), d'éosinophiles (9%), de quelques basophiles (1%) et de moins de 0.5% de PMNs (Vinegar *et al.*, 1982).

4.3. Physiologie de la cavité pleurale

Les mouvements liquidiens au sein de la cavité pleurale correspondent à la somme des pressions hydrostatiques et oncotiques des capillaires de la plèvre pariétale ainsi que de la plèvre viscérale.

Chez les mammifères, la pression hydrostatique est légèrement supérieure au niveau de la plèvre pariétale comparativement à la plèvre viscérale. Les pressions oncotiques quant à elles sont identiques. Il en résulte donc un mouvement liquidien de la plèvre pariétale vers l'espace pleural. Le liquide pleural ne s'accumule toutefois pas dans l'espace pleural car il est rapidement drainé par l'intermédiaire des stomas, portes d'entrée du réseau lymphatique (Light, 1988).

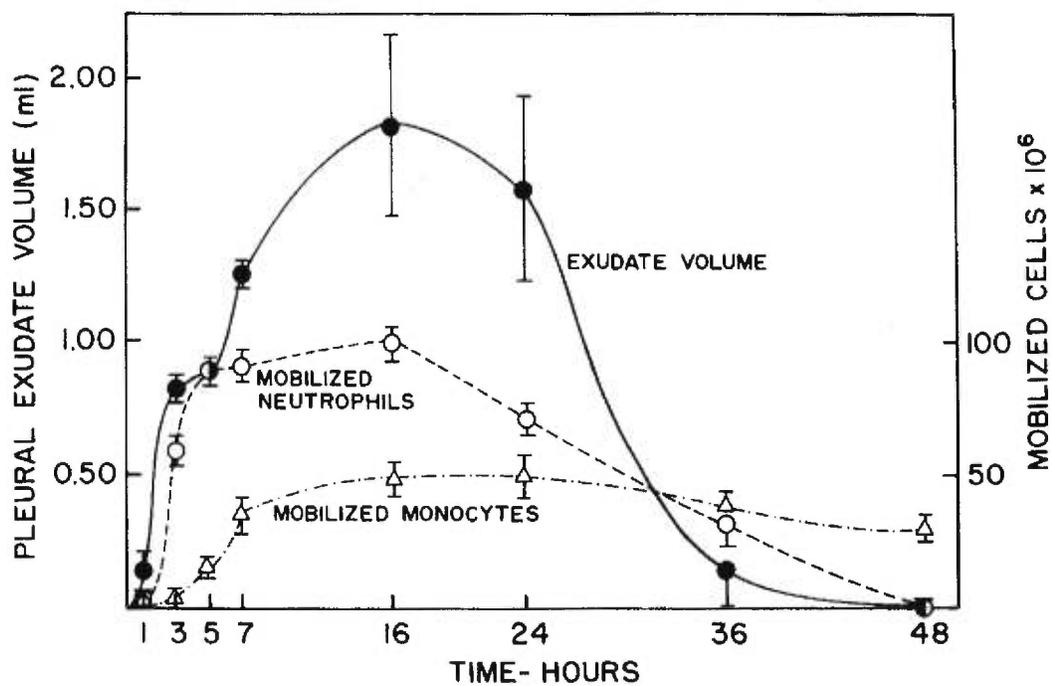


Figure 5. Représentation schématique de l'évolution de la pleurésie à carragénine en fonction du temps chez le rat (Vinegar *et al.*, 1982)

4.4. Pathophysiologie de la pleurésie à carragénine

Après l'injection de la carragénine dans l'espace pleural, il y a libération d'histamine et de sérotonine par les cellules environnantes (endothéliales, mésothéliales, fibroblastes etc.); (Capasso, 1975). Ces deux médiateurs sont les principaux responsables de l'augmentation de la perméabilité au niveau des capillaires permettant l'arrivée de toute une gamme de protéines plasmatiques. La voie alternative de la cascade du complément est activée et le facteur C5a ainsi produit est l'un des premiers et des plus importants facteurs chimiotactiques responsables du début de l'infiltration des PMNs dans la cavité pendant les 3 premières heures suivant l'injection de carragénine (figure 5) (Kroegel et Antony, 1997).

Parallèlement à l'activation de la cascade du complément, il y a libération par les cellules environnantes de différentes cytokines. Le $TNF\alpha$, tout comme le facteur C5a a un rôle très important dans l'infiltration des PMNs au sein de la cavité et son effet persiste jusqu'à seize heures post-injection (Edamitsu *et al.*, 1995). L'IL-1 favorise la production de différentes cytokines comme l'IL-6 et l'IL-8, en synergie avec le $TNF\alpha$. L'IL-6 va induire la synthèse hépatique des protéines plasmatiques de la phase inflammatoire aiguë (PPA) tandis que l'IL-8 favorisera l'infiltration des PMNs dans la cavité (Utsunomiya *et al.*, 1991).

Les cellules mononuclées, peu nombreuses dans les premières heures, voient leur nombre augmenter de façon significative à partir de la cinquième heure (Vinegar *et al.*, 1982).

À partir de la sixième heure, il y a résolution du processus inflammatoire, accompagné d'une diminution du volume des exsudats et de la phagocytose des PMNs sénescents par les macrophages. La cavité pleurale retourne à un état normal quarante-huit heures après l'injection de carragénine, à l'exception des macrophages qui seront présents en plus grande quantité jusqu'à la soixante-douzième heure (Vinegar *et al.*, 1982).

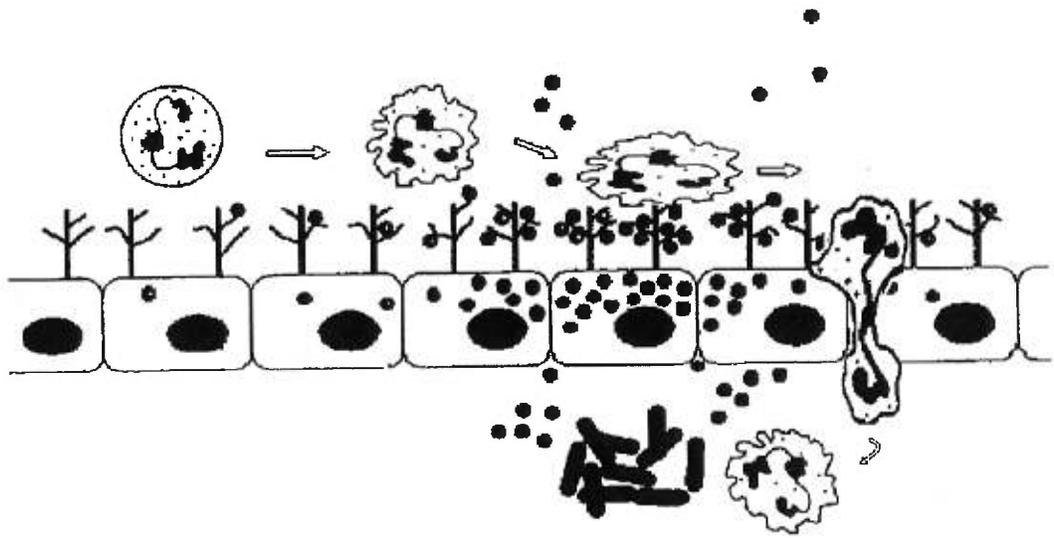


Figure 6. Représentation schématique de l'accumulation extravasculaire des leucocytes au foyer inflammatoire (modifiée Yoshida et Gimbrone, 1997)

5. L'adhésion des PMNs

L'accumulation extravasculaire des PMNs au foyer inflammatoire comporte une séquence d'événements hautement régulière mettant en jeu plusieurs familles de molécules d'adhérence. Les médiateurs pro-inflammatoires sécrétés localement ont pour effet d'activer les PMNs circulants ainsi que les cellules endothéliales adjacentes au site d'inflammation. L'attachement initial "lâche" des PMNs à la surface endothéliale s'effectue par l'interaction entre les molécules d'adhérence de la famille des sélectines et leur contre-ligand, les sialomucines, qui permettent à ces derniers de "rouler" sur la paroi des veinules post-capillaires (figure 6). Le nombre de cellules qui "roulent" augmente rapidement avec le développement de la réponse inflammatoire et cette étape est préalable à leur accumulation au site inflammatoire. La sélectine-L est exprimée de façon constitutive à la surface des PMNs et sa protéolyse est un marqueur de leur activation. La sélectine-P et la sélectine-E quant à elles, sont exprimées de façon transitoire par les cellules endothéliales activées pendant les premières soixante minutes ou les premières six heures après le début de la réaction inflammatoire, respectivement (Brown, 1997).

L'étape qui suit est celle de l'attachement "ferme" des PMNs aux cellules endothéliales par l'interaction des intégrines exprimées à la surface des PMNs et des molécules d'adhérence apparentées à la famille des immunoglobulines (ICAMs). Les PMNs expriment entre autres la MAC-1 (CD11b/CD18), une $\beta 2$ -intégrine dont l'augmentation de l'expression est un marqueur de l'activation de ces derniers. Les cellules endothéliales présentent une faible expression constitutive d'ICAM-1, contre-ligand de la MAC-1, largement induite après stimulation par différentes cytokines dont l'IL-1 et le $TNF\alpha$. La diapédèse des PMNs s'effectue au niveau des jonctions inter-endothéliales par la formation de pseudopodes (Shyy et Chien, 1997).

Les PMNs progressent ensuite vers le site inflammatoire, principalement par une interaction des $\beta 1$ -intégrines avec les protéines de la matrice extracellulaire, ce qui a pour effet d'augmenter la réponse fonctionnelle des PMNs (Walsh *et al.*, 1996).

6. L'anion superoxyde

L'anion superoxyde (O_2^-) est un radical libre produit lors de la "flambée respiratoire oxydative". Ce mécanisme est mis en branle chez le neutrophile lors de la phagocytose car ce radical présente une activité bactéricide (Smith, 1994). L' O_2^- est formé initialement par la réduction d'une molécule d'oxygène par un électron en provenance du NADPH. Cette réaction est catalysée par l'action de la NADPH oxydase exprimée à la surface de la membrane plasmique et du cytochrome b_{558} , accepteur terminal de la courte chaîne de transport d'électrons qui transfère un électron du NADPH à l'oxygène (Babior, 1992) (figure 2).

Bien que l' O_2^- soit un des principaux radicaux libres formés, d'autres types de radicaux ou autres molécules réactives sont également générés. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est aussi produit de façon spontanée ou par l'action catalytique de la superoxyde dismutase (SOD). L'acide hypochloreux (HClO), par la réaction entre le H_2O_2 et l'ion chlore (Cl^-), très abondant au sein du fluide extracellulaire (figure 2). Le HClO peut réagir par la suite avec des composés azotés pour ainsi former toute une gamme d'amines chlorées (Weiss, 1989). L' O_2^- peut aussi réagir avec le monoxyde d'azote (NO) afin de produire le peroxynitrite ($ONOO^-$) ou bien avec le H_2O_2 en formant le radical hydroxy (OH^\bullet), deux radicaux libres très réactifs (Huie et Padmaja, 1993).

7. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical azoté synthétisé à partir de l'acide aminé L-arginine d'une famille d'enzymes appelées oxyde nitrique synthases (NOS). Certaines isoformes sont exprimées de façon constitutive par différents types cellulaires tandis qu'une isoforme est induite (iNOS). Le NO joue un rôle très important dans la physiologie des systèmes cardiovasculaires et nerveux et est l'une des composantes du système de défense non-spécifique de l'hôte contre les cellules

tumorales et les microorganismes. En effet, les macrophages produisent de très grandes quantités de NO lors de la phagocytose. Le NO produit alors son action délétère en se combinant aux centres fer-sulfure, inhibant ainsi les enzymes-clés de la chaîne respiratoire de la mitochondrie et de la synthèse de l'ADN dans le noyau (Smith, 1994).

À l'opposé, la production de NO par les PMNs humains est controversée mais celle-ci est bien documentée chez les PMNs de rats (Miles *et al.*, 1995).

Le NO est un radical très réactif qu'il est difficile de doser directement. Par contre, il est possible de quantifier la production de NO de façon indirecte en mesurant la quantité de nitrite (NO_2^-), un métabolite produit par son oxydation qui est stable pendant plusieurs heures (Moncada et Higgs, 1993).

8. But du travail

Dans le but d'évaluer l'effet de l'hypoxémie sur l'amorçage des PMNs, nous avons réalisé une série d'études chez des rats soumis à une atmosphère réduite en oxygène (9%) permettant d'obtenir une hypoxémie modérée (PaO_2 d'environ 45 mm Hg).

Une inflammation a été induite par l'injection au niveau pleural d'une solution de carragénine (1 mg par cavité) chez les rats hypoxémiques (12 heures post-induction) et les rats témoins respirant l'air ambiant.

Les animaux ont été sacrifiés quatre heures après l'induction de la réponse inflammatoire. Les exsudats et le sang ont été recueillis d'une part afin de déterminer le compte total et différentiel des leucocytes et d'autre part, afin de mesurer la réponse fonctionnelle des PMNs. Ces derniers ont été purifiés sur des gradients discontinus de Percoll. Les comptes totaux et différentiels ainsi que la pureté des PMNs du sang et des exsudats ont été obtenus par microscopie optique après coloration des différents

frottis (Giemsa-Wright). Cette mesure avait pour but de déterminer les effets de l'hypoxémie sur le nombre de PMNs circulants et sur leur capacité de migrer dans le milieu extravasculaire.

Trois réponses fonctionnelles ont été utilisées comme marqueur de l'amorçage des PMNs. Premièrement, nous avons quantifié l'adhésion des PMNs sur des plaques recouvertes de sérum de veau par une réaction colorimétrique permettant de déterminer l'activité enzymatique de la myéloperoxidase. Cette réaction implique l'oxydation d'un substrat, le TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) catalysée par l'addition de peroxyde d'hydrogène. Deuxièmement, nous avons mesuré la production d'anion superoxyde libéré dans le surnageant par une technique colorimétrique impliquant la réduction du cytochrome c (réaction inhibée spécifiquement par l'enzyme superoxyde dismutase). Troisièmement, nous avons effectué le dosage du nitrite dans le surnageant par une réaction colorimétrique impliquant la réaction du nitrite avec le réactif de Griess.

CHAPITRE II

**HYPOXEMIA MODIFIES CIRCULATING AND EXUDATE NEUTROPHILS
NUMBER AND FUNCTIONAL RESPONSES IN CARRAGEENIN-INDUCED
PLEURISY IN THE RAT**

Hypoxemia modifies circulating and exudate neutrophils number and functional responses in carrageenin-induced pleurisy in the rat

Pierre-Benoît Tremblay,^{*} David M.T. Macari,^{*} Patrick du Souich,[†] Christina Barja-Fidalgo,[‡] and Sylvie Marleau^{*}

^{*}Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Québec, Canada, [†]Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Québec, Canada and [‡]Department of Pharmacology IB, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil

Key Word: *inflammation• priming• in vivo•adhesion• superoxide• nitrite*

Running Title: *Hypoxemia primes rat neutrophils*

Correspondence: Sylvie Marleau, PhD, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, 2900 Édouard-Montpetit, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4. E-mail: sylvie.marleau@umontreal.ca

1. Abstract

Rats were maintained in either a hypoxic atmosphere (9% O₂) or room air for 12 h before intrapleural injection of carrageenin. Four hours later, blood was taken, the pleural cavity lavaged, cells counted, and PMN isolated. Hypoxemic rats had 50% more circulating PMN and 25% less PMN in pleural exudate compared to controls. Adhesion to serum-coated plastic and superoxide and nitrite production were assessed. Basal adhesion of blood PMN was unchanged by hypoxemia, whereas FMLP-stimulated adhesion was 50% greater. In contrast, basal adhesion of exudate PMN was 72% greater, whereas FMLP-stimulated adhesion was unchanged. PMA-stimulated adhesion of either PMN-type was unchanged. Following hypoxemia, exudate PMN produced 64% more PMA-stimulated superoxide compared to blood PMN, whereas there was no difference between PMN-type from controls. PMN from blood and exudate of hypoxemic animals produced 4.5- and 2-fold more LPS-stimulated nitrite, respectively. These results may underlie a mechanism by which hypoxemia exacerbates disease.

2. INTRODUCTION

Exposure of polymorphonuclear neutrophils (PMN) to subactivating concentrations of soluble stimuli (such as bacterial products, cytokines, chemokines, hormones and growth factors) induces a state of preactivation (or primed state) characterized by a more powerful response to a second stimulus. Although blood from healthy volunteers contain a mixture of normal, primed, activated and apoptotic PMN, the proportion of primed and/or activated leukocytes increases in pathophysiological conditions (Smith, 1994); (Pabst, 1994). Indeed, PMN isolated from the blood of patients with various disorders associated with leukocyte-mediated tissue injury, such as septicemia (Welbourn and Young, 1992), adult respiratory distress syndrome (ARDS) (Simon and Ward, 1992), and ischemic heart disease (de Servi *et al.*, 1991); (Mehta *et al.*, 1989) respond to agonist stimulation in an enhanced fashion. This altered PMN reactivity could have important consequences, as illustrated by the correlation between the severity of ischemic heart disease and the increased number of activated PMN circulating in blood (de Servi *et al.*, 1991); (Wanstall *et al.*, 1993).

Hypoxemia, a systemic reduction in partial pressure of oxygen in arterial blood (PaO_2), often occurs in patients suffering from respiratory and cardiovascular diseases (Mian *et al.*, 1993); (Wanstall *et al.*, 1993) including life-threatening conditions such as ARDS (Simon and Ward, 1992), septic shock (Glauser *et al.*, 1991), myocardial infarction (Aoki *et al.*, 1998) and their resulting complications (Mulder and Marelli, 1992). *In vitro* studies show hypoxic conditions to modulate endothelial cell and leukocyte functions, which may enhance leukocyte-endothelium interactions. For example, hypoxic endothelial cells show increased production of the inflammatory mediators, interleukin- 1β (IL- 1β) (Shreeniwas *et al.*, 1992), platelet activating factor (PAF) (Arnoult *et al.*, 1993); (Milhoan *et al.*, 1992), and interleukin-8 (IL-8) (Karakurum *et al.*, 1994). Moreover, endothelium responds to acute and chronic changes in PaO_2 by regulating the level of hemostatic, inflammatory and vasoactive agents in the blood (Bauer, 1990); (Pohl, 1990). When co-incubated

under hypoxic conditions, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) enhance PMN adherence via a CD11b/CD18-ICAM-1 interaction, and stimulate PMN to produce superoxide anion (O_2^-) and leukotriene B_4 (LTB_4) (Arnould *et al.*, 1994). *In vitro* exposure of PMN to hypoxic conditions induces a previously inactive population to engage in phagocytosis, which is associated with an increase in plasma membrane expression of opsonic receptors (Knowles *et al.*, 1997). Furthermore, hypoxic PMN have enhanced receptor expression for IL-1 β (type 1), TNF α (p80) and IL-8 (Simms and D'Amico, 1996).

In vivo, acute systemic hypoxia (F_iO_2 6%, 30 min) in rats promotes leukocyte activation, as indicated by the appearance of crater-like lobes, reduction in granule size and modification of the cell membrane (Mian *et al.*, 1993), and increases the number of adherent leukocytes to muscle and mesenteric venules (Mian and Marshall, 1993). However, the effects of moderate hypoxemia (F_iO_2 9%, 12 h) on PMN accumulation and functional responses at sites of inflammation remains unknown. We address this issue in the present study. We document circulating and exudate PMN numbers after induction of carrageenin pleurisy in rats breathing either room air or an atmosphere with a low F_iO_2 . We also compare the ability of both blood and exudate PMN to produce superoxide anion and nitrite, and to adhere to serum-coated plates in response to agonist stimulation. Our results show hypoxemic animals to have fewer PMN in pleural exudate despite enhanced numbers of circulating PMN. In addition, PMN from blood and pleural exudate of hypoxemic animals show enhanced functional responses upon stimulation

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Chemicals

Carrageenin, cytochrome c (from horse heart), superoxide dismutase (SOD), sulfanilamide, N-formyl-Met-Leu-Phe (FMLP), phorbol myristate acetate (PMA), BSA (low endotoxin), lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (serotype 0111:B4),

hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) were purchased from Sigma Chemical Company (Oakville, On, Canada). N-(1-naphthyl)ethylenediamine, Dextran T-500 and Percoll were purchased from Pharmacia Canada Inc. (Baie d'Urfé, Qc, Canada). RPMI 1640 medium, calf serum, Modified Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) and HEPES buffer from Gibco Laboratories (Grand Island, NY). Other chemicals were of reagent grade and all solutions for parenteral administration and cell isolation were diluted with pyrogen-free, sterile 0.9% NaCl (Baxter Travenol Laboratories, Malton, On, Canada).

3.2. Induction of hypoxemia and carrageenin pleurisy

Male Sprague-Dawley rats (180-220 g) were purchased from Charles River (St-Constant, Qc, Canada). One group was exposed to a low $F_{I}O_2$ (9%) atmosphere in a 500 L plexiglass chamber equipped with circulating fans and an on-line oxygen-sensor (OM-15, SensorMedics, Anaheim, CA). A second group was maintained in room air (control normoxic group). The hypoxic environment was established by introducing a mixture of room air and nitrogen into the chamber. Excess humidity was prevented by cooling the recirculation circuit. Rats remained in their usual cages and were allowed full access to food and water. After 12 h exposure in either the chamber or room air, carrageenin was injected intrapleurally (i.p.; 1 mg/cavity) and rats maintained for a further 4 h within experimental conditions. Between 1 and 3 animals were added to each group in order to determine the degree of hypoxemia obtained after the preliminary 12 h exposure and/or after the final 4 h following carrageenin injection. These animals were sedated with an i.m. injection of Hypnorm[®] (Janssen-Cilag Ltd, Kent, UK) and blood obtained by cardiac puncture for measurement of partial pressure of oxygen and pH (IL312 pH/Blood gas analyzer, Instrumentation Laboratory, Lexington, MA). The remaining animals were anesthetized with an i.p. injection of sodium pentobarbital (Somnotol[®], MTC Pharmaceuticals, On, Canada) at the end of the experimental exposure period and blood and pleural exudate collected within 30 min of removal from the chamber. Briefly, rats received 72 iu heparin via the descending aorta before collection of 8 ml blood into EDTA (final concentration of

16 mM). The pleural cavity was lavaged with 3 ml of heparinized saline (10 iu/ml). A hemocytometer and stained cytopsin preparation (Diff Quick stain, Dade Diagnostics of P.R. Inc., Aguada, PR) were used to determine the total and differential leukocyte numbers, respectively, for both blood and pleural lavage fluid.

3.3. Isolation of circulating and exudate rat neutrophils

Eight ml of blood was mixed with 2 ml of 6% Dextran T-500 in 0.9% saline. Erythrocytes were allowed to sediment at 37°C for 30 min and the leukocyte-rich layer removed and centrifuged (275 x g; 6 min). The cell pellet was resuspended in 2 ml HBSS-30 mM HEPES buffer containing 10% rat plasma, layered onto a discontinuous Percoll density gradient (56,60,68 and 72% in platelet poor rat plasma) and centrifuged at 800 x g for 30 min. The neutrophil-rich bands were collected at the 60/68% and 68/72% interfaces. Contaminating erythrocytes were removed by resuspending the cell pellet in 20 ml of 0.2% NaCl at 4°C, leaving for 15 s and then mixing with 20 ml of 1.6% NaCl/10 mM dextrose. Exudate PMN were isolated using the same procedure without dextran sedimentation. Cell suspensions contained $\geq 98.8\%$ neutrophils.

3.4. Adhesion assay

Blood and exudate PMN were resuspended in PBS containing 0.1% BSA, 1.4 mM Ca^{2+} and 0.7 mM Mg^{2+} . PMN (5×10^4 /well) were incubated in calf serum-coated plates at 37°C for 30 min in the presence or absence of FMLP (10^{-8} - 10^{-6} M) or PMA (10^{-8} M). Non-adherent PMN were then removed by flicking the buffer from the wells followed by two gentle washes with fresh PBS/BSA. Adherent PMN were lysed by incubating at room temperature for 20 min with PBS buffer containing 1% HTAB buffer and 20 mM EDTA (pH 6). 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). Rat MPO standards were prepared using isolated blood

PMN diluted in PBS/1% HTAB. The number of adhered PMN was calculated from the standard curve and expressed as a percentage of the total number of PMN added to the well.

3.5. Measurement of O_2^- production

Blood and exudate rat neutrophils (4×10^6 /ml) were suspended in PBS containing 0.1% BSA, 1.4 mM Ca^{2+} and 0.7 mM Mg^{2+} . Cells (8×10^5) were added to 1 ml plastic cuvettes containing a mixture of cytochrome c (0.1 mM) and PMA (10^{-8} M). Superoxide dismutase-inhibitable O_2^- generation was determined by comparison with samples containing SOD (50 μ g/ml). Samples were incubated at 37°C for 30 min in the dark after which the absorbance at 550 nm was determined. Results are expressed as the amount of O_2^- produced per ml using an extinction coefficient of 21.1×10^3 (Pons *et al.*, 1994).

3.6. Nitrite production by cultured PMNs

Freshly isolated circulating or exudate rat neutrophils (2×10^6 /ml) were suspended in RPMI medium supplemented with 10% calf serum. Cell suspensions were incubated for 24 h at 37°C in the presence or absence of LPS (10 μ g/ml). Cell supernatants were then obtained by centrifugation (12 000 x g, 10 min) and nitrite levels determined by a colorimetric assay based on the Griess reaction (Green *et al.*, 1982); (Griess, 1864); (Griess, 1979). Briefly, Griess reagent (1% sulphanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 5% phosphoric acid) was added to an equal volume of the supernatant and the absorbance measured at 570 nm. The concentration of nitrite was determined from a standard curve of sodium nitrite (1 to 200 μ M).

3.7. Statistical analysis of the data

Data is presented as mean \pm SEM. Student's t-test was applied to the data obtained in the superoxide, nitrite and adhesion (following PMA stimulation) assays,

as well as to leukocyte and PMN numbers. One-way ANOVA was applied to the data generated from the adhesion (following FMLP stimulation) and nitrite (mononuclear leukocytes) assays. $P < 0.05$ was accepted as significant.

4. RESULTS

Rats exposed to a low F_{iO_2} were tachypneic and showed less spontaneous activity than observed with animals breathing air. Exposure of rats to 9% F_{iO_2} for 12 h induced a moderate hypoxemia with a PaO_2 of 47 ± 2 mmHg compared with 70 ± 1 mmHg in animals breathing air ($P < 0.01$; $n = 6$ pairs of rats). PaO_2 was further reduced to 36 ± 2 mmHg ($P < 0.05$; $n = 10$) in hypoxemic rats 4 h following i.pl. carrageenin injection. PaO_2 remained constant in rats breathing air (76 ± 3 mmHg; $n = 7$). Blood pH was not affected in hypoxemic animals (7.43 ± 0.02 ; $n = 7$).

Hypoxemic rats had 50% more circulating PMN than observed with rats breathing air (Figure 1A). The total circulating leukocyte number was not significantly different between the two treatment groups. In contrast, hypoxemic rats had 25% less PMN in the pleural exudate than observed with rats breathing air (Figure 1B). This reduction was associated with 24% less total leukocytes in the pleural exudate of hypoxemic rats than observed with rats breathing air.

FMLP ($10^{-6}M$)-stimulated adhesion of isolated blood PMN to serum-coated plastic plates was 50% greater with PMN from hypoxemic rats than with PMN from rats breathing air (Figure 2A). There was no significant difference between the two groups when stimulated with lower concentrations of FMLP ($10^{-7}M$ and $10^{-8}M$). Neither basal nor PMA ($10^{-8}M$)-induced adhesion of blood PMN was different between the two groups (Figure 2B). In contrast, basal adhesion of exudate PMN from hypoxemic rats was 72% greater than with exudate PMN from rats breathing air (Figure 3). Neither FMLP ($10^{-7}M$)- nor PMA-stimulated adhesion of exudate PMN was different between the two treatment groups (Figure 3).

Superoxide production measured by unstimulated PMN isolated from blood or exudate was low (circa 1.0 nmol/ml) and unaffected by hypoxemia (data not shown).

In hypoxemic rats, PMA(10^{-8} M)-stimulated exudate PMN produced 64% more O_2^- than produced by PMA-stimulated blood PMN (Figure 4). PMA-stimulated exudate PMN from hypoxemic rats produced 98% more O_2^- than produced by exudate PMN from rats breathing air. There was no significant difference between O_2^- generation by blood PMN from the two groups (Figure 4).

Blood PMN from hypoxemic rats produced 4.5-fold more LPS (10 μ g/ml)-stimulated nitrite than produced by blood PMN from rats breathing air, when incubated for 24 h at 37°C (Figure 5). Similarly, exudate PMN from hypoxemic rats produced 2-fold more LPS-stimulated nitrite than produced by exudate PMN from rats breathing air. No production of nitrite was detected in unstimulated PMN from either blood or pleural exudate from either group (data not shown).

Mononuclear contamination of PMN preparations was <2% (2×10^4 cells/ml). Production of nitrite by LPS-stimulated mononuclear cells at 2×10^4 /ml was undetectable after 24 h at 37°C, irrespective of source (Figure 6). Furthermore, even at 2×10^6 cells/ml (equivalent to the dilution of PMN used in this study), the production of nitrite by mononuclear cells isolated from blood remained negligible. In contrast, pleural exudate mononuclear cells at 2×10^6 /ml produced 3- to 4.5-fold more nitrite than produced by an equivalent dilution of PMN ($95.0 \pm 37.6 \mu$ M vs $21.2 \pm 6.5 \mu$ M from rats breathing air, $P < 0.05$; $141.1 \pm 47.3 \mu$ M vs $42.8 \pm 10.3 \mu$ M PMN from hypoxemic rats, $P < 0.05$).

5. DISCUSSION

The chemotactic stimuli that attract PMN to infected and damaged sites also modify PMN reactivity (Smith, 1994). Presumably as a consequence, the proportion of primed and/or activated PMN is increased in the blood of patients with various cardiovascular and respiratory diseases (Smith, 1994); (Simon and Ward, 1992);

(Robert *et al.*, 1994). Moreover, the risk of cardiovascular diseases such as atherosclerosis, myocardial infarction and stroke, correlates with increased numbers of activated circulating PMN (de Servi *et al.*, 1991); (Mehta *et al.*, 1989). Hypoxemia often accompanies these and other clinical disorders associated with leukocyte-mediated tissue injury, such as sepsis, ARDS and ischemia-reperfusion syndromes (Wanstall, 1993); (Harlan *et al.*, 1993). We hypothesized that hypoxemia could contribute to disease by enhancing PMN recruitment to sites of inflammation and by priming PMN functions.

The present results show hypoxemic rats to have fewer PMN in pleural inflammatory exudate despite increased numbers of circulating PMN. We determined the effect of hypoxemia on three functional assays: adhesion to serum-coated plastic, superoxide production and nitrite production. Unstimulated PMN isolated from blood of hypoxemic rats did not differ in any functional assay when compared with blood PMN from normoxic rats, but were primed for FMLP-stimulated adhesion and LPS-stimulated nitrite production. Unstimulated exudate PMN differed from circulating PMN in that exudate PMN from hypoxemic rats were more adherent when compared with exudate PMN from normoxic rats, were not primed for FMLP-stimulated adhesion, but were primed for both LPS-stimulated nitrite production and PMA-stimulated superoxide production.

The increased numbers of circulating PMN in hypoxemic rats may represent a combination of increased circulation of PMN from the marginating pool in the lungs and the reduced number of PMN migrating to the pleural cavity. In the rat, acute hypoxemia triggers hyperventilation and tachycardia followed by a secondary fall in ventilation and bradycardia (Thomas *et al.*, 1994). Hypoxic arteriolar pulmonary vasoconstriction results as a mechanism to redistribute blood flux towards the apex of the lung, helping to maintain ventilation (Anand, 1994); (Wagner and Hervé, 1989). This hypoxia-induced vascular remodeling and vasoconstriction could affect the marginating pool of PMN in the lung.

The reason for the reduced number of PMN in the pleural exudate of

hypoxemic rats compared with normoxic controls also remains to be elucidated. It is not possible to determine whether the reduced number of carrageenin-induced exudate PMN in hypoxemic animals represents a specific reduction in PMN accumulation alone or a generalized reduction in a leukocyte accumulation mechanism, since non-PMN leukocytes formed less than 22% of total leukocytes, many of which may be resident leukocytes of the pleural cavity (Wang, 1985). This issue and the effects of hypoxemia on pleural edema formation are currently being investigated in our laboratory.

A number of mediators are responsible for the plasma extravasation and sequential leukocyte accumulation induced by the i.pl. injection of carrageenin. Although mainly complement dependent, PMN accumulation in this model involves the concerted action of other mediators, including prostaglandins, bradykinin, and the cytokine, IL-8 (Ogino *et al.*, 1996). General release of these mediators into the systemic circulation during hypoxemia could affect the extravasation of PMN and other leukocytes to inflammatory foci, for example, by desensitizing the subsequent chemotactic response to mediators induced by i.pl. carrageenin (Hetchman *et al.*, 1991); (Ley *et al.*, 1993). Whether hypoxemia increases plasma levels of endogenous chemotactic mediators remains to be determined, however, exposure of endothelial cells to severe hypoxia (0 - 2% F_iO₂) leads to de novo synthesis of IL-8 (Karakurum *et al.*, 1994) and PAF (Arnould *et al.*, 1993); (Milhoan *et al.*, 1992); (Michiels *et al.*, 1994). In addition, a number of vasoactive substances, including prostacyclin and endothelial-derived relaxing factors, both of which may modulate PMN adhesion to the endothelium, are released in the blood as a function of oxygen availability (Bauer, 1990).

Alternatively, the reduced number of PMN in the pleural exudate of hypoxemic rats may be due to an alteration in endothelial adhesiveness for PMN. Exposure of HUVEC to extreme hypoxia (pO₂=7.5 mmHg) for 2 h significantly decreases the adherence of PMN *in vitro* (Pietersma *et al.*, *Ann. New York Acad. Sci.*, 1994); (Pietersma *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 1994). In contrast, mild hypoxia (pO₂=53 mmHg) induces endothelial hyperadhesiveness for leukocytes (Pietersma *et al.*, *Ann.*

New York Acad. Sci., 1994) and primes circulating PMN for stimulated adhesion to serum-coated plastic in the present study. *In vivo*, an acute drop in PaO₂ and PaCO₂ induced by 3 min exposure of anesthetized rats to 6% O₂ in N₂ was followed by an increased adherence of leukocytes to the venular wall of mesenteric and spinotrapezius microcirculation (Mian and Marshall, 1993).

The enigma of the enhanced adhesion shown in this and other studies and the reduction in number of PMN in pleural exudate may be related to the regional microvasculature. In the rat, both systemic and pulmonary circulation are the source of the pleural blood supply (Aharinejad *et al.*, 1991). In the systemic circulation, PMN emigrate primarily through postcapillary venules, whereas in the pulmonary circulation, these processes occur mainly in capillaries (Hellewell *et al.*, 1994). The involvement of the CD18 integrin family in mediating PMN adhesion to most vascular endothelium, normally a prerequisite step for their subsequent emigration, has been well-documented (Arfors *et al.*, 1987); (Price *et al.*, 1987); (Nourshargh *et al.*, 1989). However, PMN accumulation in rabbit lungs, induced by the intrabronchial instillation of C5a occurs primarily through a CD18-independent mechanism, whereas a CD18-dependent mechanism predominates in the skin of the same animals (Hellewell *et al.*, 1994). Moreover, IL-8, PAF, and chemotactic bacterial cell wall components have been shown to induce PMN accumulation through both CD18-dependent and -independent mechanisms in the pleural cavity (Kroegel and Antony, 1997). Whether this is also true in the rat pleural circulation and whether either mechanism is altered in hypoxemia remains to be documented.

The *in vivo* priming of circulating PMN adhesion and nitrite production by hypoxemia shown in this study supports other studies *in vitro*. Exposure of human peripheral blood PMN *in vitro* to severe hypoxia (pO₂<15 mmHg) increased phagocytosis in response to stimulation by cytokines, including IL-8, TNF α and IL-1 β (Knowles *et al.*, 1997); (Boon, 1996), and increased the microbicidal activity (Knowles *et al.*, 1996). Furthermore, hypoxic PMN show an up-regulated expression of receptors for these cytokines (Simms and D'Amico, 1996). Concomitant with the increase in phagocytosis, hypoxia also enhances cytokine-stimulated (IL-8, TNF and

IL-1) expression of the opsonic receptors, CD32w and CD35 (Knowles *et al.*, 1997). We may speculate that the priming of circulating PMN may be associated with a hypoxemia-induced increase in receptor expression on PMN, though there is currently no evidence to support this hypothesis.

PMN isolated from the pleural exudate of hypoxemic rats show enhanced functional responses compared to PMN isolated from animals breathing air. These enhanced functional responses could increase the tissue damage induced by PMN in disorders complicated by hypoxemia. In the present study, only exudate PMN from hypoxemic rats had a greater ability than circulating PMN to generate superoxide anion. Our findings contrast to previous studies on transmigration where the process of transmigration enhances the potential of human PMN to generate superoxide anion (Yee *et al.*, 1994). Furthermore, the transmigrated PMN in this previous study were unable to increase their already primed ability to generate superoxide anion.

Blood and pleural exudate PMN from hypoxemic rats generate, respectively, 4- and 2- fold more LPS-stimulated nitrite compared to PMN from rats breathing air. Mononuclear contamination of PMN suspensions (lower than 2% in both PMN type) did not alone significantly contribute to the amount of nitrite released. In previous studies, circulating rat PMN did not produce significant amounts of nitrite in the absence of agonist stimulation whereas peritoneal exudate PMN released nitrite into supernatant (Miles *et al.*, 1995). The ability of rat exudate PMN to produce nitrite spontaneously suggests the induction of nitric oxide synthase (NOS) gene expression by the process of cell migration to the inflammatory site (Miles *et al.*, 1995); (Fierro *et al.*, 1996). Our data further suggests that hypoxemia can also induce NOS gene expression and/or can prime for LPS-induced NOS gene expression and nitrite production.

Moderate hypoxemia is a state often encountered in patients suffering from either acute or chronic lung and cardiovascular diseases. The present study shows that hypoxemia in the rat is associated with modified numbers and enhanced functional responsiveness of both circulating and exudate PMN. This may underlie a

mechanism by which hypoxemia could contribute to the progress of many diseases (Aoki *et al.*, 1998), such as the poor long-term outcome of hypoxemic patients with acute myocardial infarction (Aoki *et al.*, 1998), ARDS (Simon and Ward, 1992), or inflammatory pleural disorders which can complicate pulmonary diseases such as pneumonia.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (97-NC-1387) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (6-97-MA-0311). Dr C. Barja-Fidalgo received a Fellowship from the Ministère de l'Éducation du Québec, programme québécois de bourses d'excellence.

7. REFERENCES

- Aharinejad S., Lametschwandtner A., Böck P., Franz P.** (1991) Microvascularization of the pleura in rats and guinea pigs. *Scanning Microscopy* 5, 1097-1103.
- Anand I. S.** (1994) Hypoxia and the pulmonary circulation. *Thorax* 49 Supplement, S19-S24.
- Aoki N., Yanagisawa A., Shimoyama K., Taniuchi M., Fujita H., Mizuno H., Yoshino H., Ishikawa K.** (1998) Clinical significance of hypoxemia without congestive heart failure in patients presenting with acute myocardial infarction. *Cardiology* 89, 40-45.
- Arfors K.-E., Lundberg C., Lindbom L., Lundberg K., Beatty P. G., Harlan J. M.** (1987) A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* 69, 338-340.
- Arnould T., Michiels C., Remacle J.** (1993) Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involvement of PAF, CD18/CD11b, and ICAM-1. *Am. J. Physiol.* 264, C1102-C1110.
- Arnould T., Michiels C., Remacle J.** (1994) Hypoxic human umbilical vein endothelial cells induce activation of adherent polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 83, 3705-3716.
- Bauer C.** (1990) Hypoxia: on the borderline between physiology and pathophysiology. *Experientia* 46, 1157-1160.

Boon E. S. (1996) Enhancement of hypoxemia by right-to-left atrial shunting in severe asthma. *Intensive Care Med* 22, 176

de Servi S., Ricevuti G., Mazzone A., Ghio S., Zito A., Raffaghello S., Specchia G. (1991) Granulocyte function in coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 68, 64B-68B.

Fierro I. M., Barja-Fidalgo C., Cunha F. Q., Ferreira S. H. (1996) The involvement of nitric oxide in the anti-*Candida albicans* activity of rat neutrophils. *Immunology* 89, 295-300.

Glauser M. P., Zanetti G., Baumgartner J., Cohen J. (1991) Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 338, 732-739.

Green L. C., Wagner D. A., Glogowski J., Skipper P. L., Wishnok J. S., Tannenbaum S. R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131.

Griess, J. P. (1864) On a new series of bodies in which nitrogen is substituted for hydrogen. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 154, 667-731.

Griess, J. P. (1879) Bemerkung zu der abhandlung der H. H. Weselsky und Benedint: "Übe einige azo verbindungen". *Chem. Ber.* 12, 426-428.

Harlan JM, Winn RK, Vedder NB. ; Catravas JD, Callow AD, Ryan US, editors. Vascular endothelium. New York: Plenum Press, 1993; Proinflammatory role of leukocyte adhesion molecules. p. 99-105.

Hechtman D. H., Cybulsky M. I., Fuchs H. J., Baker J. B., Gimbrone M. A., Jr. (1991) Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear-leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *J. Immunol.* 147, 883-892.

Hellewell P. G., Young S. K., Henson P. M., Worthen G. S. (1994) Disparate role of the β_2 -integrin CD18 in the local accumulation of neutrophils in pulmonary and cutaneous inflammation in the rabbit. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 10, 391-398.

Karakurum M., Shreeniwas R., Chen J., Pinsky D., Yan S., Anderson M., Sunouchi K., Major J., Hamilton T., Kuwabara K., Rot A., Nowygrad R., Stern D. (1994) Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 93, 1564-1570.

Knowles R., Keeping H., Graeber T., Nguyen K., Garner C., D'Amico R., Simms H. H. (1997) Cytokine control of PMN phagocytosis: regulatory effects of hypoxemia and hypoxemia-reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 272, C1352-C1364.

Knowles R., Keeping H., Nguyen K., Graeber T., D'Amico R., Simms H. (1996) Hypoxemia/reoxygenation down-regulates interleukin-8-stimulated bactericidal activity of polymorphonuclear neutrophil by differential regulation of CD16 and CD35 mRNA expression. *Surgery* 120, 382-388.

Kroegel C., Antony V. B. (1997) Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *Eur. Respir. J.* 10, 2411-2418.

Ley K., Baker J. B., Cybulsky M. I., Gimbrone M. A. ,Jr., Luscinikas F. W. (1993) Intravenous interleukin-8 inhibits granulocyte emigration from rabbit mesenteric venules without altering L-selectin expression or leukocyte rolling. *J. Immunol.* 151, 6347-6357.

Mehta J., Dinerman J., Mehta P., Saldeen T. G. P., Lawson D., Donnelly W. H., Wallin R. (1989) Neutrophil function in ischemic heart disease. *Circulation* 79, 549-556.

Mian R., Marshall J. M. (1993) Effect of acute systemic hypoxia on vascular permeability and leucocyte adherence in the anaesthetised rat. *Cardiovasc. Res.* 27, 1531-1537.

Mian R., Westwood D., Stanley P., Marshall J. M., Coote J. H. (1993) Acute systemic hypoxia and the surface ultrastructure and morphological characteristics of rat leucocytes. *Exp. Physiol.* 78, 839-842.

Michiels C., De Leener F., Arnould T., Dieu M., Remacle J. (1994) Hypoxia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens: role of prostaglandins and bFGF. *Exp. Cell Res.* 213, 43-54.

Miles A. M., Owens M. W., Milligan S., Johnson G. G., Fields J. Z., Ing T. S., Kottapalli V., Keshavarzian A., Grisham M. B. (1995) Nitric oxide synthase in circulating vs. extravasated polymorphonuclear leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 58, 616-622.

Milhoan K. A., Lane T. A., Bloor C. M. (1992) Hypoxia induces endothelial cells to increase their adherence for neutrophils: role of PAF. *Am. J. Physiol.* 263, H956-H962.

Mulder D. S., Marelli D. (1992) The 1991 Fraser Gurd lecture: evolution of airway control in the management of injured patients. *J. Trauma* 33, 856-862.

Nourshargh S., Rampart M., Hellewell P. G., Jose P. J., Harlan J. M., Edwards A. J., Williams T. J. (1989) Accumulation of ¹¹¹In-neutrophils in rabbit skin in allergic and non-allergic inflammatory reactions in vivo. Inhibition by neutrophil pretreatment in vitro with a monoclonal antibody recognizing the CD18 antigen. *J. Immunol.* 9, 3193-3198.

Ogino M., Majima M., Kawamura M., Hatanaka K., Saito M., Harada Y., Katori M. (1996) Increased migration of neutrophils to granulocyte-colony stimulating factor in rat carrageenin-induced pleurisy: roles of complement, bradykinin, and inducible cyclooxygenase-2. *Inflamm. Res.* 45, 335-346.

Pabst MJ. ; Hellewell PG, Williams TJ, editors. Immunopharmacology of neutrophils. London: Academic Press, 1994; 9, Priming of neutrophils. p. 195-221.

Pietersma A., De Jong N., Koster J. F., Sluiter W. (1994) Effect of hypoxia on adherence of granulocytes to endothelial cells in vitro. *Am. J. Physiol.* 267, H874-H879.

Pietersma A., De Jong N., Koster J. F., Sluiter W. (1994) Extreme hypoxia decreases the adherence of granulocytes to endothelial cells in vitro. *Ann. New York Acad. Sci.* 723, 486-487.

Pohl U. (1990) Endothelial cells as part of a vascular oxygen-sensing system: hypoxia-induced release of autacoids. *Experientia* 46, 1175-1179.

Pons F., Williams T. J., Kirk S. A., McDonald F., Rossi A. G. (1994) Pro-inflammatory and anti-inflammatory effects of the stable prostaglandin D₂ analogue, ZK 118.182. *Eur. J. Pharmacol.*

Price T. H., Beatty P. G., Corpuz S. R. (1987) In vivo inhibition of neutrophil function in the rabbit using monoclonal antibody to CD18. *J. Immunol.* 139, 4174-4177.

Robert R., Ferrandis J., Malin F., Herpin D., Pourrat O. (1994) Enhancement of hypoxemia by right-to-left atrial shunting in severe asthma. *Intensive Care Med.* 20, 585-587.

Shreeniwas R., Koga S., Karakurum M., Pinsky D., Kaiser E., Brett J., Wolitzky B. A., Norton C., Plocinski J., Benjamin W., Burns D. K., Goldstein A., Stern D. (1992) Hypoxia-mediated induction of endothelial cell interleukin-1. An autocrine mechanism promoting expression of leukocyte adhesion molecules on the vessel surface. *J. Clin. Invest.* 90, 2333-2339.

Simms H., D'Amico R. (1996) Regulation of polymorphonuclear leukocyte cytokine receptor expression. The role of altered oxygen tensions and matrix proteins. *J. Immunol.* 157, 3605-3616.

Simon RH, Ward PA. ; Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, editors. Inflammation. basic principles and clinical correlates. Second ed. New York: Raven Press, 1992; 51, Adult respiratory distress syndrome. p. 999-1016.

Smith J. A. (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.* 56, 672-686.

Stark J. M., van Egmond A. W. A., Zimmerman J. J., Carabell S. K., Tosi M. F. (1992) Detection of enhanced neutrophil adhesion to parainfluenza-infected airway epithelial cells using a modified myeloperoxidase assay in microtiter format. *J. Virol. Meth.* 40, 225-242.

Tavares-Murta B. M., Cuhna F. Q., Ferreira S. H. (1996) Differential production of nitric oxide by endotoxin-stimulated rat and mouse neutrophils. *Braz. J. Medical Biol. Res.* 29, 381-388.

Thomas T., Elnazir B. K., Marshall J. M. (1994) Differentiation of the peripherally mediated from the centrally mediated influences of adenosine in the rat during systemic hypoxia. *Exp. Physiol.* 79, 809-822.

Wagner W. W. , Jr., Hervé P. (1989) Physiologie du recrutement capillaire pulmonaire. *Rev. Mal. Resp.* 6, 39-44.

Wang N. (1985) Anatomy and physiology of the pleural space. *Clinics Chest Med.* 6, 3-16.

Wanstall J. C. (1993) Vascular reactivity: modulation by hypoxia. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 36, 99-102.

Welbourn C. R. B., Young Y. (1992) Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br. J. Surg.* 79, 998-1003.

Yee J., Giannias B., Kapadia B., Chartrand L., Christou N. V. (1994) Exudative neutrophils. Modulation of microbicidal function in the inflammatory microenvironment. *Arch. Surg.* 129, 99-105.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1

Circulating (A) and exudate (B) leukocyte and PMN numbers in rats exposed to either a low F_iO_2 (9% O_2) atmosphere or room air. Rats were maintained in either environment for 12 h following which they received an i.pl. injection of carrageenin (1 mg/cavity) followed by a further 4 h period within experimental conditions during the development of pleural inflammation. After this period, animals were anesthetized and blood and pleural exudate collected. Aliquots of both fluids were taken to determine total leukocyte numbers in a hemocytometer and differential counts on stained cytopsin preparations. Results are expressed as mean \pm SEM cell counts from 14 pairs of rats. ** $P < 0.01$ compared to values from rats breathing air.

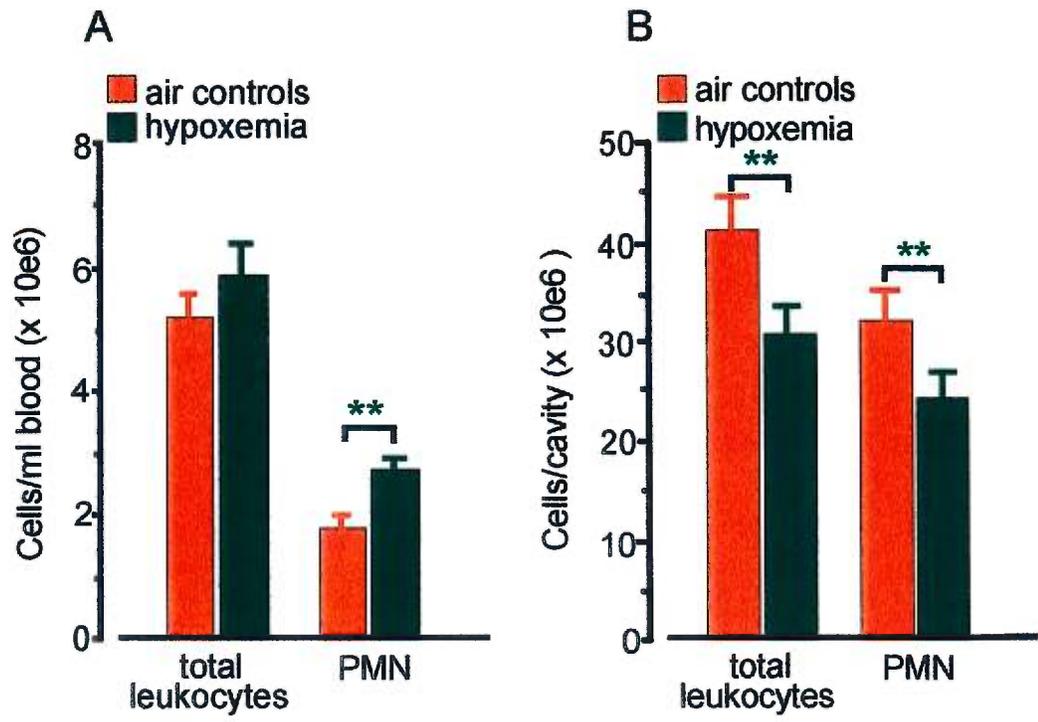


Figure 2

Adhesion of blood PMN to serum-coated plastic following stimulation with 10^{-8}M - 10^{-6}M FMLP (A) or 10^{-8}M PMA (B). Rats were treated as described in Figure 1. PMN were purified on discontinuous Percoll gradients (>98.8% pure) and resuspended in PBS containing 0.1% BSA, 1.4mM Ca^{2+} and 0.7mM Mg^{2+} . PMN (5×10^4 /well) were incubated at 37°C for 30 min \pm agonists. The wells were then twice gently washed to remove non-adherent PMN. Adherent PMN were lysed with buffer containing 1% HTAB buffer (pH 6.0). The number of adherent PMN/well was calculated from a standard curve. Results are expressed as mean \pm SEM % adhesion of PMN from 6 pairs (10^{-8}M FMLP) and 7 pairs of rats. ** $P < 0.01$ compared to values from rats breathing air.

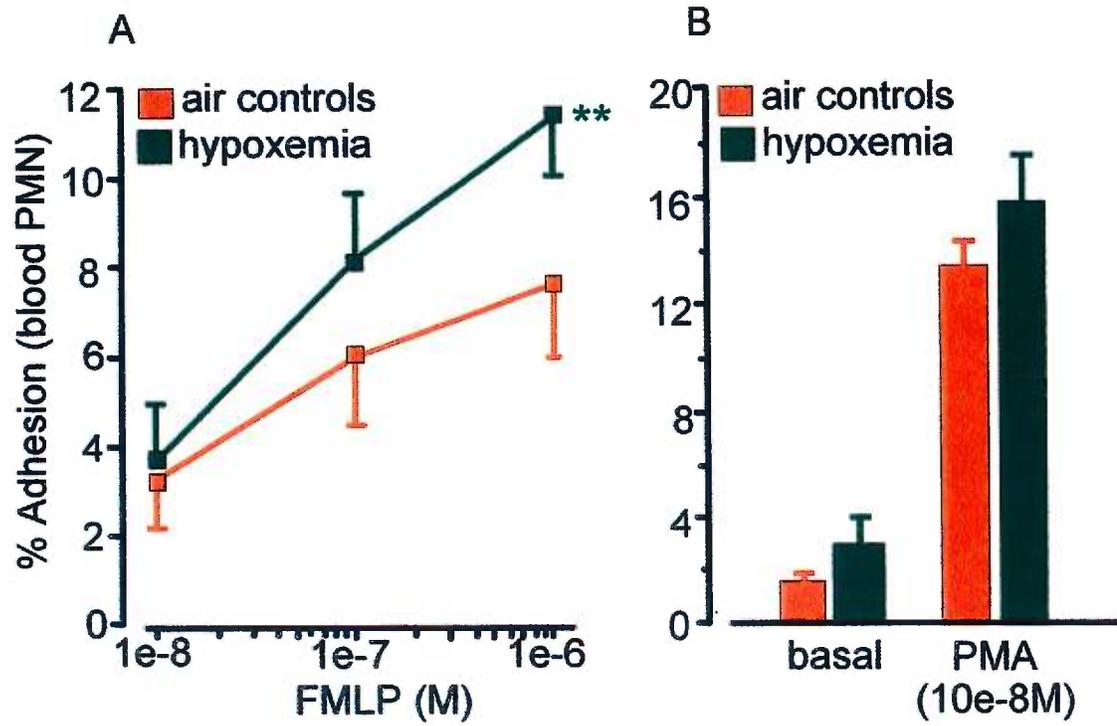


Figure 3

Adhesion of exudate PMN to serum-coated plastic after stimulation with 10^{-7} M FMLP or 10^{-8} M PMA. Methods are as described in Figure 2. Results are expressed as the mean \pm SEM % adhesion of PMN from 5 pairs (basal, PMA) and 4 pairs (FMLP) of rats. * $P < 0.05$ compared to values from rats breathing air.

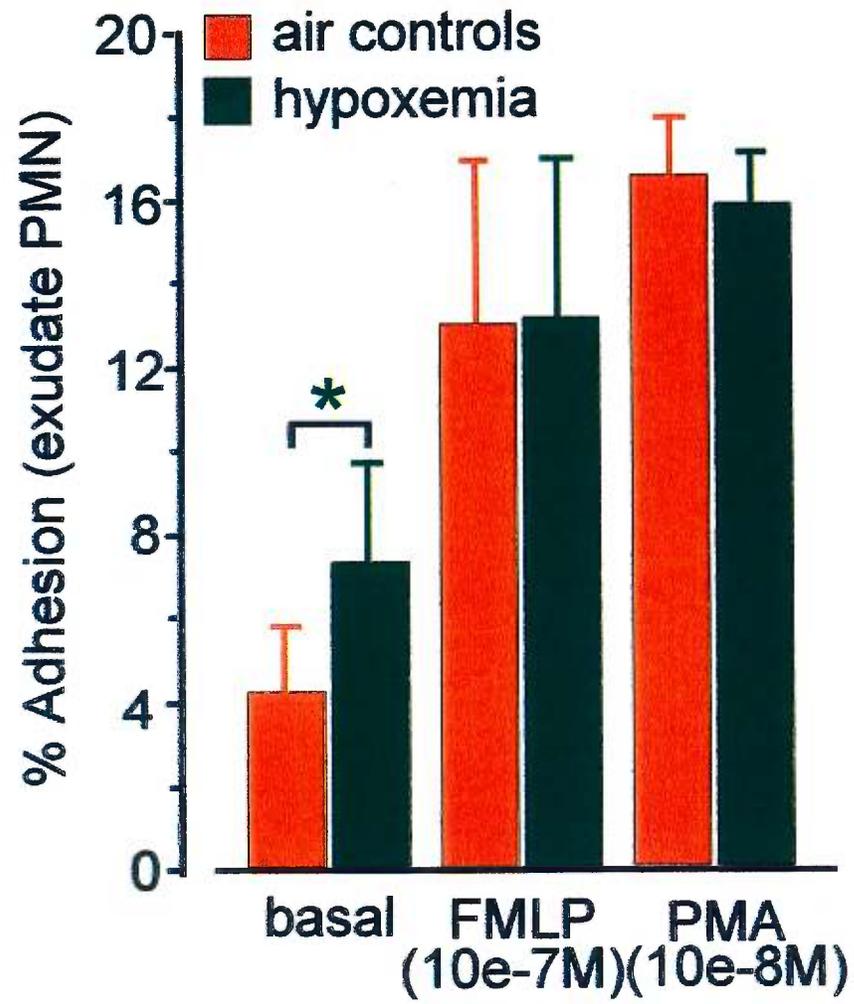


Figure 4

Superoxide production by PMA (10^{-8} M)-stimulated PMN. Rats were treated and PMN purified as described in Figure 2. PMN (8×10^5) in PBS (+ BSA, Ca^{2+} and Mg^{2+}) were added to a mixture of cytochrome c (0.1mM) and buffer, SOD (50 mg/ml) or PMA. Superoxide production was measured as SOD-inhibitable reduction of cytochrome c. Results are expressed as mean \pm SEM superoxide/ml produced by 2×10^6 PMN/ml from 6 pairs of rats.

* $P < 0.05$ compared to values with PMN from blood. ** $P < 0.01$ compared to values from rats breathing air.

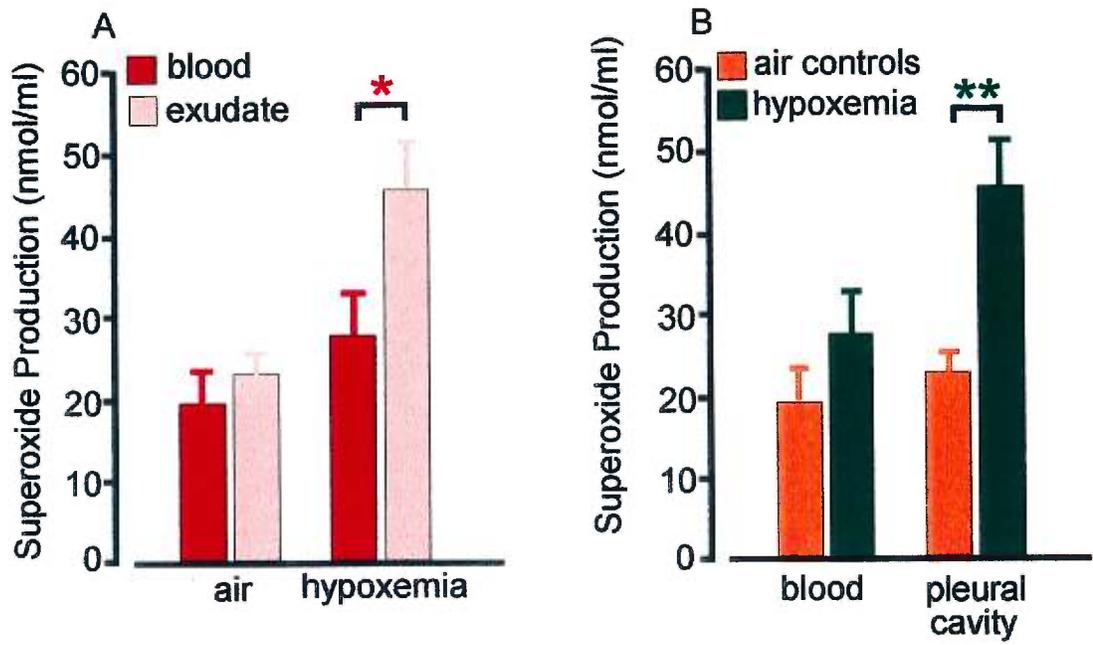


Figure 5

Nitrite production by LPS (10 $\mu\text{g/ml}$)-stimulated PMN. Rats were treated and PMN were purified as described in Figure 2. PMN were resuspended at $2 \times 10^6/\text{ml}$ in RPMI containing 10% fetal calf serum. Aliquots (350 μl) were incubated for 24 h \pm LPS. Nitrite in supernatants was measured as a parameter of nitric oxide formation by incubation with Griess reagent. A standard curve derived using NaNO_2 was used to determine the concentration of nitrite (μM). Results are expressed as mean \pm SEM from 6 pairs of rats. * $P < 0.05$ compared to PMN isolated from rats breathing air.

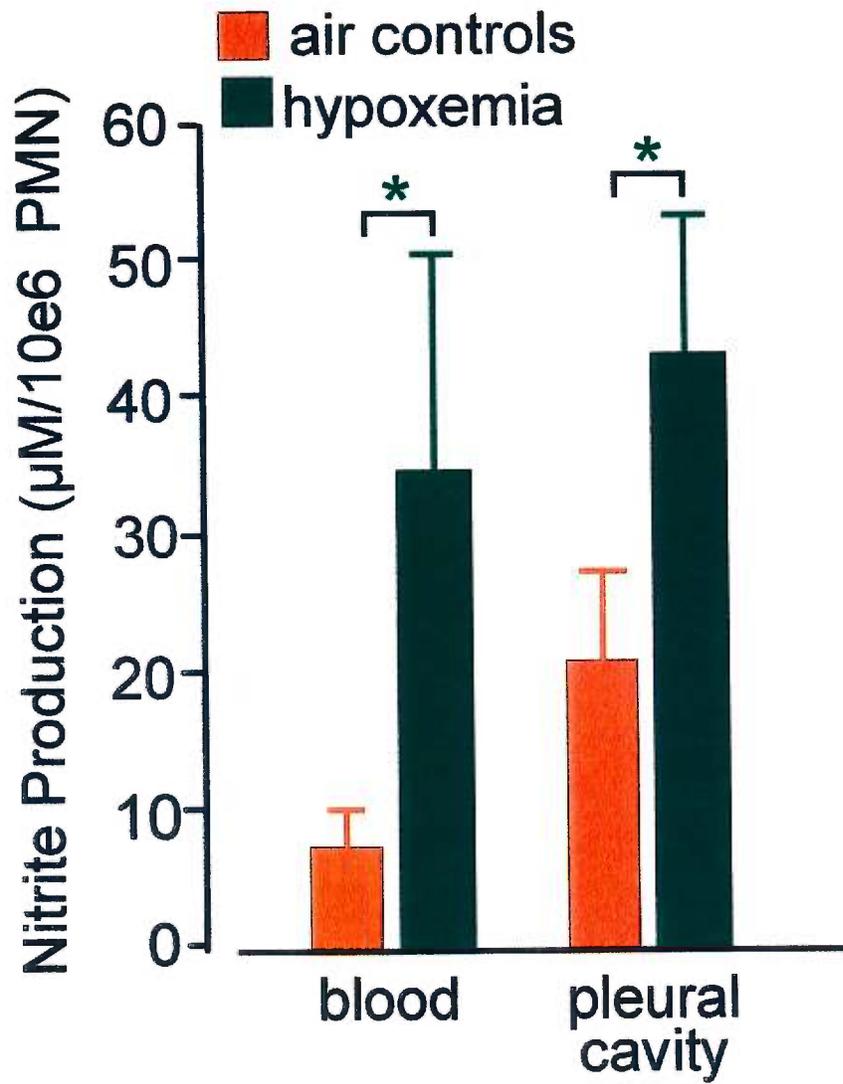
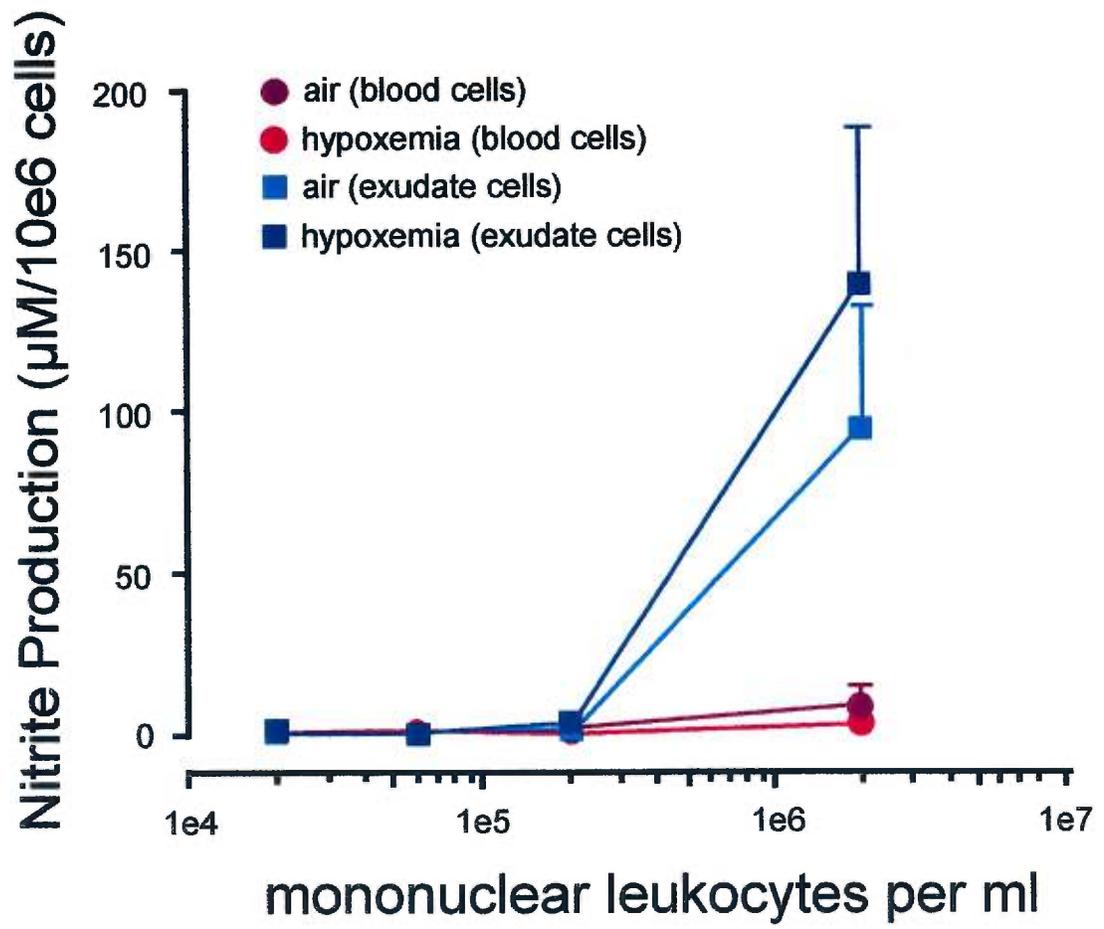


Figure 6

Nitrite production by LPS (10 $\mu\text{g/ml}$)-stimulated mononuclear leukocytes. Rats were treated and mononuclear cells purified as described for PMN in Figure 2. The mononuclear leukocytes are collected on the top of the 56% Percoll density layer with a purity of 100%. Monocytes were resuspended at $2 \times 10^4/\text{ml}$ (approximately the number of contaminating cells in PMN preparations) to $2 \times 10^6/\text{ml}$ in RPMI containing 10% fetal calf serum. Nitrite production over 24 h following LPS stimulation was determined as described in Figure 5. Results are expressed as mean \pm SEM from 6 pairs of rats.



CHAPITRE III
DISCUSSION GÉNÉRALE

Lorsque des PMNs sont mis en présence de concentrations sous-activatrices de stimuli solubles comme les facteurs chimiotactiques libérés à la suite d'une infection ou d'un traumatisme cellulaire, ces leucocytes passent d'un état de dormance à un état de préactivation (amorçage), caractérisé par une réponse accrue lors d'une seconde exposition à de tels stimuli (Smith, 1994). Ce phénomène est observé entre autres, chez les patients présentant différentes pathologies cardiovasculaires et respiratoires. En effet, ces derniers présentent une proportion de PMNs amorcés et/ou activés beaucoup plus importante comparativement aux sujets sains (Smith, 1994); (Simon et Ward, 1992); (Robert *et al.*, 1994). De plus, il a été démontré qu'une augmentation du nombre de PMNs activés pouvait contribuer à la pathogenèse de maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose ou l'infarctus du myocarde (de Servi *et al.*, 1991); (Mehta *et al.*, 1989). L'hypoxémie est une condition souvent associée à ce type de pathologies ainsi que celles mettant en jeu des dommages cellulaires causés par la forte réactivité des PMNs comme dans le cas de la septicémie, du syndrome de détresse respiratoire ou encore dans les syndromes d'ischémie-reperfusion (Wanstall, 1993); (Harlan *et al.*, 1993). Notre hypothèse de recherche est que l'hypoxémie modérée peut contribuer à la détérioration de différents états pathologiques, en amorçant les PMNs ainsi qu'en augmentant leur propriétés chimiotactiques.

Les résultats de notre étude montrent une diminution dans la migration des PMNs et dans leur accumulation au foyer inflammatoire chez les rats hypoxémiques. Ce phénomène est observé malgré une augmentation de la quantité de PMNs sanguins circulants. De plus, nous avons observé que l'hypoxémie amorce les PMNs, qu'ils aient été isolés à partir du sang ou de la cavité pleurale des animaux hypoxémiques. Trois essais fonctionnels ont été utilisés comme marqueur de l'amorçage des PMNs: l'adhésion à une plaque recouverte de protéines de sérum de veau, la production d'anion superoxyde ainsi que la production de monoxyde d'azote (dosage du nitrite). Les PMNs du sang des rats hypoxémiques ont montré une augmentation dans leur capacité d'adhérer aux protéines sériques lorsque stimulés par le FMLP pour l'essai d'adhésion. De plus, les PMNs sanguins isolés des animaux hypoxémiques voient leur production de nitrite augmentée lorsque stimulés par le LPS.

Par contre, la production d'anion superoxyde par les PMNs isolés du sang des rats hypoxémiques n'a pas augmenté de façon significative en comparaison avec la quantité produite par les PMNs isolés du sang des rats respirant l'air ambiant. De plus, il est important de noter que les PMNs sanguins des animaux hypoxémiques voient leur réponse fonctionnelle augmentée après stimulation par le FMLP ou le LPS. En aucun cas la réponse basale des PMNs sanguins n'a été augmentée. Cette observation correspond bien à la définition d'un état d'amorçage des PMNs sanguins plutôt qu'à un état d'activation spontanée.

À l'opposé, les PMNs non stimulés isolés de l'exsudat des rats hypoxémiques ont une capacité d'adhérer augmentée comparativement aux PMNs non stimulés de l'exsudat des rats témoins. À l'opposé des résultats observés pour les PMNs sanguins, l'adhésion des PMNs isolés de la cavité pleurale des animaux hypoxémiques, à l'état basal, a augmenté. L'addition d'un stimulus tel que le FMLP ou le PMA n'a pas provoqué une augmentation de l'adhésion des PMNs de l'exsudat des rats hypoxémiques par comparaison à ceux des rats témoins. Cette observation reflète vraisemblablement le fait que la diapédèse et la migration des PMNs au foyer inflammatoire les activent (Yee et al., 1994). Il est alors difficile de stimuler des cellules déjà activées, du moins en regard avec leur capacité d'adhérer à des plaques recouvertes de sérum de veau. En effet, les PMNs isolés de l'exsudat des rats hypoxémiques ont montré une augmentation de leur production d'anion superoxyde après leur stimulation au PMA et une augmentation de la quantité de monoxyde d'azote libéré dans le surnageant des cellules incubées en présence de LPS.

L'augmentation de la concentration de PMNs sanguins chez les rats hypoxémiques peut être attribuable à au moins trois phénomènes. Premièrement, l'hypoxémie pourrait favoriser la sécrétion de médiateurs chimiotactiques dans la circulation sanguine. En effet, des études *in vitro* ont montré une production accrue d'IL-8 et de PAF par les cellules endothéliales (Karakurum *et al.*, 1994); (Milhoan *et al.*, 1992). La libération de ces médiateurs dans la circulation sanguine aurait pour conséquence d'induire une neutrophilie en favorisant la sortie des PMNs de la moelle osseuse vers la circulation sanguine (Ember *et al.*, 1994). Deuxièmement,

l'augmentation des PMNs circulants pourrait être secondaire à une diminution du nombre de PMNs migrant dans la cavité pleurale. La sécrétion de facteurs chimiotactiques au niveau systémique pourrait aussi expliquer l'inhibition de la chimiotaxie des PMNs sanguins *in vivo*. En effet, l'administration i.v. d'IL-8, par exemple, réduit la capacité des PMNs sanguins de migrer dans le milieu extravasculaire en altérant la conformation moléculaire des microfilaments d'actine (Westlin *et al.*, 1992). Le remodelage de la distribution cellulaire des microfilaments d'actine et les effets de l'IL-8 sur le cycle de polymérisation/dépolymérisation de l'actine résultent en une inhibition de la capacité des leucocytes sanguins d'adhérer et de migrer à travers l'endothélium (Hetchman *et al.*, 1991); (Westin *et al.*, 1992). Troisièmement, la vasoconstriction pulmonaire secondaire à l'hypoxémie pourrait affecter le pool de PMNs marginés et ainsi augmenter les échanges entre les pools marginés et systémiques.

Ainsi, la diminution du nombre de PMNs ayant migré dans la cavité pleurale des rats hypoxémiques pourrait être due à une diminution de l'adhérence des PMNs à la surface des cellules endothéliales. En accord avec cette hypothèse, il a été démontré que l'exposition des HUVEC à une hypoxie extrême ($paO_2 = 7.5$ mmHg) sur une période de deux heures cause une diminution significative de l'adhérence des PMNs *in vitro* (Michiels *et al.*, 1994); (Pietersma *et al.*, 1994). À l'opposé, une hypoxémie modérée ($paO_2 = 53$ mmHg) provoque une augmentation marquée de l'adhérence des leucocytes à la surface des cellules endothéliales et amorce les PMNs sanguins comme démontré dans notre étude (Michiels *et al.*, 1994). Une diminution marquée de la PaO_2 et une augmentation marquée de la $PaCO_2$ induites chez des rats anesthésiés (6% O_2 dans le N_2) pendant 3 minutes a montré une augmentation de l'adhérence des leucocytes au niveau de la paroi des veinules post-capillaires mésentériques et de la microcirculation spinotrapézienne (Mian et Marshall, 1993). Cette observation, bien qu'à l'encontre de l'explication proposée pour expliquer la réduction de la migration des PMNs dans le milieu extravasculaire chez les animaux hypoxémiques, pourrait être la conséquence des conditions expérimentales drastiques imposées à ces rats. Notre protocole expérimental a permis d'induire une hypoxémie modérée chez nos animaux

et de les exposer à ces conditions pendant une période de seize heures au total. Néanmoins, une augmentation de l'adhésion des PMNs aux cellules endothéliales, quoique préalable à leur migration extravasculaire, ne garantit pas cette dernière. En effet, il est intéressant de noter que l'administration par voie systémique du LTB₄ induit une augmentation de l'adhésion des leucocytes dans la microcirculation (Rosenberg *et al.*, 1991) mais empêche ces derniers de migrer au foyer inflammatoire (Marleau *et al.*, résultats non publiés). Ces observations nous permettent de spéculer que l'hypoxémie peut induire une augmentation de ce médiateur lipidique dans la circulation sanguine, inhibant de ce fait la migration extravasculaire des PMNs.

Il n'est pas possible avec les résultats que nous avons présentement de déterminer si la réduction du nombre de PMNs dans l'exsudat, suite à l'induction de la pleurésie à la carragénine chez les rats hypoxémiques est due à un problème spécifique d'accumulation des PMNs ou bien à un problème généralisé à tous les types de leucocytes. En effet, environ 22% des leucocytes retrouvés dans la cavité après induction de la réaction inflammatoire ne sont pas des PMNs. Il est fort probable qu'une bonne proportion de ces leucocytes fassent partie des leucocytes résidents de la cavité pleurale et en conséquence, qu'ils n'aient pas contribué à la réduction observée dans le nombre de PMNs ayant migré dans la cavité pleurale (Vinegar *et al.*, 1982).

De nombreux médiateurs ont été identifiés comme jouant un rôle dans les phénomènes inflammatoires et dans l'accumulation séquentielle des différents sous-types de leucocytes au foyer inflammatoire suivant l'injection intra-pleurale de carragénine. L'accumulation extravasculaire des PMNs, bien que principalement dépendante du complément dans ce modèle, met en jeu plusieurs médiateurs telles que l'IL-8 et possiblement la bradykinine, de même que les prostaglandines vasodilatatrices qui potentialisent leur migration (Ogino *et al.*, 1996). Ainsi, la source des cytokines, chimiokines ou autres médiateurs chimiotactiques potentiellement libérés dans la circulation sanguine, pourrait provenir du foyer inflammatoire induit par l'injection de carragénine dans notre modèle. Une avenue intéressante pour l'avenir serait de déterminer si l'hypoxémie modifie les niveaux plasmatiques endogènes de ces médiateurs. Il faut également mentionner que de nombreuses substances

vasomotrices comme la prostacycline ou les facteurs de relaxation incluant le NO, synthétisés par l'endothélium en fonction de la concentration sanguine d'oxygène, ont la capacité de moduler l'adhésion des PMNs à la surface endothéliale (Bauer, 1990).

L'anatomie particulière de la microcirculation pleurale pourrait aussi rendre compte de certaines de nos observations. En effet, la cavité pleurale du rat est irriguée par deux sources distinctes: la microcirculation pulmonaire de la plèvre viscérale ainsi que la microcirculation systémique de la plèvre pariétale (Aharinejad *et al.*, 1991). Au niveau de la microcirculation systémique, les PMNs migrent principalement au niveau des veinules post-capillaires tandis qu'au niveau de la circulation pulmonaire, les PMNs migrent surtout au niveau des capillaires (Hellewell *et al.*, 1994). La migration des PMNs au niveau de l'endothélium des veinules post-capillaires est un phénomène dépendant des β_2 -intégrines. En effet, celles-ci permettent l'adhésion ferme des leucocytes sur la paroi de la surface endothéliale, étape préliminaire à la migration (Price *et al.*, 1897); (Nourshargh *et al.*, 1989); (Arfors *et al.*, 1987). À l'opposé, l'accumulation des PMNs au niveau pulmonaire se fait en partie par un mécanisme indépendant des β_2 -intégrines (Hellewell *et al.*, 1994). De plus, il a été démontré que l'IL-8, le PAF ainsi que les composantes chimiotactiques des parois des bactéries induisent l'accumulation des PMNs dans la cavité pleurale par des mécanismes à la fois dépendants et indépendants des β_2 -intégrines (Kroegel et Anthony, 1997). Ainsi, la modulation potentielle de l'adhésion dépendante des β_2 -intégrines par l'hypoxémie n'inhiberait que partiellement l'accumulation des PMNs au niveau de la cavité pleurale puisqu'une partie de cette accumulation résulte d'un mécanisme indépendant des β_2 -intégrines. Quoique ces explications corroborent nos observations expérimentales, il faudra vérifier les effets de l'hypoxémie sur l'expression et la fonction des β_2 -intégrines au cours d'études ultérieures.

L'amorçage des PMNs sanguins chez les rats hypoxémiques confirme, dans notre modèle expérimental *in vivo*, les résultats d'études antérieures *in vitro*. L'exposition des PMNs sanguins à une hypoxie sévère ($\text{PaO}_2 < 15 \text{ mm Hg}$) *in vitro* augmente la réponse fonctionnelle des PMNs, par exemple leur activité phagocytaire,

en réponse à leur stimulation par différentes cytokines comme l'IL-8, le TNF α et l'IL-1 β (Knowles *et al.*, 1997); (Boon, 1996) de même que leur pouvoir bactéricide (Knowles *et al.*, 1996). De plus, les PMNs hypoxiques montrent une surexpression des récepteurs pour ces cytokines (Simms et D'Amico, 1996). L'hypoxie augmente non seulement l'activité phagocytaire des PMNs mais également l'expression des sous-types du récepteur Fc γ , CD32 ω et CD35, après stimulation par l'IL-8, le TNF α et IL- β (Knowles *et al.*, 1997). À la lueur de ces résultats nous pouvons supposer que l'hypoxémie modérée augmente l'expression de récepteurs à la surface des PMNs. Cette hypothèse reste à vérifier dans des études ultérieures.

Les PMNs de l'exsudat pleural des rats hypoxémiques présentent une augmentation de leurs réponses fonctionnelles par comparaison aux PMNs isolés de la cavité pleurale des rats témoins. Cette observation est très importante car cette réactivité accrue des PMNs pourrait contribuer à augmenter les dommages tissulaires dans les pathologies associées à l'hypoxémie. Dans cette étude, les PMNs de l'exsudat des rats hypoxémiques ont montré une augmentation dans la production d'anion superoxyde, comparativement aux PMNs de l'exsudat des rats témoins. Nos résultats montrent aussi que les PMNs de l'exsudat des rats hypoxémiques génèrent plus d'anion superoxyde en réponse à la stimulation par le PMA, comparativement aux PMNs sanguins de ces mêmes animaux. Yee *et al.* (1994) ont rapporté que la migration des PMNs augmentait leur capacité à produire de l'anion superoxyde. Nos observations appuient cette hypothèse, du moins chez les animaux hypoxémiques.

Bien que le FMLP ait été utilisé comme agoniste dans le test d'adhésion, ce dernier, utilisé seul, se révèle inefficace en ce qui concerne la stimulation de la production d'anion superoxyde chez les PMNs de rat (Mayer *et al.*, 1993); (Benoni *et al.*, 1998). Le FMLP induit la production d'anion superoxyde seulement après l'amorçage des PMNs par la dihydrocytochalasine B, un alcaloïde fongique interférant avec l'assemblage des filaments d'actine des cellules eucaryotes (Wang *et al.*, 1994); (Hsu *et al.*, 1997). Cette propriété prévient l'utilisation de cette association dans le but d'investiguer l'amorçage des PMNs de rat, puisque l'amorçage des PMNs est associé à une modification du cytosquelette.

Les PMNs sanguins ainsi que les PMNs de l'exsudat des rats hypoxémiques libèrent respectivement quatre et deux fois plus de nitrite dans le surnageant des PMNs incubés en présence de LPS par comparaison aux PMNs des rats témoins. Les cellules mononucléées qui contaminent la suspension de PMNs (moins de 2 % pour les 2 types de PMNs) ne contribuent pas de façon significative à la production de NO en réponse à la stimulation par le LPS. Des études précédentes ont montré que les PMNs sanguins de rat ne produisaient pas de concentrations significatives de NO en absence de stimulation par un agoniste alors que les PMNs de l'exsudat péritonéal de rat en produisaient spontanément (Miles *et al.*, 1995). Cette observation suggère que le processus de migration des leucocytes au foyer inflammatoire induit l'expression du gène de la forme inducible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) (Miles *et al.*, 1995); (Fierro *et al.*, 1996). Les résultats de notre étude suggèrent que l'hypoxémie pourrait induire l'expression du gène codant pour la iNOS et/ou pourrait amorcer les PMNs pour une production accrue de NO après stimulation au LPS.

La pleurésie induite chez les rats par l'injection de carragénine provoque chez ces derniers de la dyspnée, de la tachypnée et peut même entraîner une diminution de la PaO₂ au cours de ce processus inflammatoire. Il est raisonnable de croire qu'une atmosphère réduite en oxygène augmentera l'importance de ces phénomènes pathophysiologiques. Afin de vérifier si le caractère modéré de l'hypoxémie a été préservée pendant la période de 4 heures suivant l'induction de la pleurésie chez les rats soumis à une F_iO₂ de 9%, nous avons effectué une mesure de la PaO₂ au temps 0, soit au moment de l'induction de la pleurésie, ainsi que 4 heures plus tard, à la fin de la période expérimentale. Nous avons observé qu'après une période d'adaptation de 12 heures à un état d'hypoxémie, i. e. avant l'induction de la pleurésie, la PaO₂ des rats était en moyenne de 47 ± 2 mmHg (n=6). Quatre heures plus tard, la PaO₂ moyenne était diminuée à 36 ± 2 mmHg (n=10). Une hypoxémie modérée se définissant par des valeurs de PaO₂ se situant environ entre 40 et 60 mmHg chez l'homme, la PaO₂ à 4 heures se retrouve donc un peu en deçà de la limite inférieure (Pietersma *et al.*, 1994); (Dekoster *et al.*, 1989). Par contre, il est intéressant de noter que même avec cette

PaO₂ relativement basse, les rats n'ont pas présenté les symptômes cliniques d'une hypoxémie sévère (détresse respiratoire, perte de conscience, coma etc.). L'hypoxémie présentée par les rats dans notre protocole expérimental peut donc être considérée comme modérée, quoique à la frontière d'une hypoxémie sévère au moment du sacrifice, 4 heures après l'induction de la pleurésie à la carragénine.

L'hypoxémie modérée est une condition fréquemment rencontrée chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires et pulmonaires, soit aiguës ou chroniques. Les résultats de cette étude montrent que l'hypoxémie module les concentrations sanguines de PMNs et leur capacité d'émigrer au foyer inflammatoire. L'hypoxémie augmente aussi la réponse fonctionnelle des PMNs sanguins et des PMNs isolés de la cavité pleurale. L'hypoxémie est donc une condition susceptible de contribuer à l'exacerbation de nombreuses pathologies tel que suggéré par le pronostic défavorable des patients hypoxémiques atteints d'un infarctus aigu du myocarde (Aoki *et al*, 1998), du syndrome de détresse respiratoire (Simon *et al*, 1992) ou encore des différentes pathologies pleurales qui peuvent compliquer les infections pulmonaires comme la pneumonie.

BIBLIOGRAPHIE

Anand, I. S. (1994) Hypoxemia and the pulmonary circulation. *Thorax* 49, Supplement, S19-S24.

Aoki, N., Yanagisawa, A., Shimoyama, K., Taniuchi, M., Futjita, H., Mizuno, H., Ishikawa, K. (1998) Clinical significance of hypoxemia without congestive heart failure in the patients presenting with acute myocardial infarction. *Cardiology* 89, 40-45.

Aharinejad, S., Lametschwandter, A., Böck, P., Franz, P. (1991) Microvascularization of the pleura in rats and guinea pigs. *Scanning Microscopy* 5, 1097-1103.

Arfors, K.-E., Lundberg, C., Lindbom, L., Lundberg, K., Beatty, P. G., Harlan, J. M. (1987) A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and the plasma leakage in vivo. *Blood* 69, 338-340.

Arnould, T., Michiels, C., Remacle, J. (1994) Hypoxic human umbilical vein endothelial cells induce activation of adherent polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 83, 3705-3716.

Arnould, T., Michiels, C., Remacle, J. (1993) Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involvement of PAF, CD18/CD11b, and ICAM-1. *AM. J. Physiol.* 264, C1102-C1110.

Babior, B. M. (1992) The respiratory burst oxidase. *Adv. Enzymol.* 65, 49-95.

Bass, D. A., Olbrantz, P., Szejda, P., Seeds, M. C., McCall, C. E. (1986) Subpopulation of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. *J. Immunol.* 136, 860-866.

Bauer, C. (1990) Hypoxia: on the borderline between physiology and pathophysiology. *Experientia* 46, 1175-1160.

Benoni, G., Cuzzolin, L., Marrella, M., Crivellente, F., Adami, A., Bertaso, C., Velo, C., Milanino, R. (1998) Neutrophil behavior following exposure to in vivo or in vitro zinc in normal and acutely-inflamed rats: studies on lysosome secretion, superoxide anion release and platelet adhesion. *Inflammation* 22, 175-189.

Berger, M., Wetzler, E. M., Wallis, R. S. (1988) Tumor necrosis factor is the major monocyte product that increase complement receptor expression on mature human neutrophils. *Blood*. 71, 151-158.

Betz, R. L. and Henson, P. M. (1980) Production and release of platelet-activating factor (PAF): dissociation from degranulation and superoxide production in the human neutrophil, *J. Immunol.* 125, 2756-2763.

Bjerknes, R., Vindenes, H., Laerum, O. D. (1990) Altered neutrophils functions in patients with large burns. *Blood Cell* 16, 127-143.

Blalock, J. E. (1989) A molecular basis for the bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Phys. Rev.* 69, 1-32.

Bloomfield, F. J., Young, M. M. (1988) Enhanced chemiluminescence production by phagocytosing neutrophils in psoriasis. *Inflammation* 12, 153-159.

Boon, E. S. (1996) Enhancement of hypoxemia by right-to-left atrial shunting in severe asthma. *Intensive Care Med.* 22, 176.

Borregaard, N., Miller, L. J. and Springer T. A. (1987) Chemoattractant-regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils. *Science* 237, 1204-1206.

- Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Bastholm, L., Nielson, M. H., Bainton, D. F.** (1993) Human neutrophil granules and secretory vesicles. *Eur. J. Haematol.* 51, 187-198.
- Brown, E.** (1997) Neutrophil Adhesion and the therapy of inflammation. *Sem. In Hematol.* 34, 319-326.
- Capasso, F., Dunn, C. J., Yamamoto, S., Willoughby, D. A. et Giroud, J. P.** (1975) Further studies on carrageenan-induced pleurisy in the rats. *J. Pathol.* 116, 117-124.
- Cohn, Z. A. and Morse, S. I.** (1960) Functional and metabolic properties of polymorphonuclear leukocytes. The influence of lipopolysaccharide endotoxin. *J. Exp. Med.* 111, 689-704.
- Cronstein, B. N., Weissmann, G.** (1993) The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum.* 36, 147-157.
- Damas, J.** (1980) Activation du système kininogènes-kinines, pouvoir hypotenseur et oedématogène de quelques carragénines. *Path. Biol.* 28 (5). 287-292.
- Daniels, R. H., Finnen, M. J., Hill, M. E. and Lackie, J. M.** (1992) Recombinant humain monocyte IL-8 primes NADPH oxidase and phospholipase A₂ activation in human neutrophils. *Immunology.* 75, 157-163.
- Dautzenberg, B.** (1997) Conduite à tenir devant une insuffisance respiratoire aiguë. Dans *Décision en pneumologie.* Vigot, Paris, 42-50.
- Dekoster, J., Sergysels, R.** (1989) Hypoxie chronique et souffrance tissulaire (à l'exclusion du coeur droit) dans les bronchopathies chroniques obstructives. *Rev. Mal. Resp.* 6, 31-34.

De Servi, S., Ricevuti, G., Mazzone, A., Ghio, S., Zito, A., Raffaghello, S., Specchia, G. (1991) Granulocyte function in coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 68, 64B-68B.

Dessein, A. J., Lee, T. H., Elsas, P., Ravalese, J., Silberstein, D., David, J. R., Austen, K. F. and Lewis, R. A. (1986) Enhancement by monokines of leukotriene generation by human eosinophils and neutrophils stimulated with calcium ionophore A23187. *J. Immunol.* 147, 4211-4217.

Doerfler, M. E., Danner, R. L., Shelhamer, J. H. and Parrillo, J. E. (1989) Bacterial lipopolisaccharide prime human neutrophils for enhanced production of leukotriene B₄. *J. Clin. Invest.* 83, 970-977.

Edamitsu, S., Matsukawa, A., Ohkawara, S., Takagi, K., Nariuchi, H. et Yoshinaga, M. (1995) Role of TNF, IL-1, and IL-1ra in the mediation of leukocyte infiltration and increased vascular permeability in the rabbits with LPS-induced pleurisy. *Clinical Immunology and Immunopathology* 75, 68-74.

Ember, J. A., del Zoppo, G. J., Mori, E., Thomas, W. S., Copeland, B. R., Hugli, T. E. (1994) Polymorphonuclear leukocyte behavior in a nonhuman primate focal ischemia model. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 14, 1046-1054.

Fierro, I. M., Barja-Fidalgo, C., Cunha, F. Q., Ferreira, S. H. (1996) The involvement of nitric oxide in the anti-Candida Albicans activity of rat neutrophils. *Immunology* 89, 295-300.

Fittschen, C., Sandhaus, R. A., Worthen, G. S. and Henson, P. M. (1988) Bacterial lipopolysaccharide enhances chemoattractant-induced elastase secretion by human neutrophils. *J. Leukocyte Biol.* 43, 547, 556.

- Forehand, J. R., Pabst, M. J., Phillips, W. A., and Johnston, R. B.** (1989) Lipopolysaccharide priming for enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium. *J. Clin. Invest.* 83, 74-83.
- Gallin, J. I.** (1984) Human neutrophil heterogeneity exists, but is it meaningful? *Blood* 63, 977-983.
- Glauser, M. P., Zanetti, G., Baumgartner, J., Cohen, J.** (1991) Septic shock: Pathogenesis. *Lancet* 338, 732-739.
- Harlan, J. M., Robert, K. W., Nicholas, B. V.** (1993) Proinflammatory role of leukocyte adhesion molecules. *Vascular endothelium*, edited by J. D. Vatrasas, A. D. Callow, U. S. Ryan. Plenum Press, New York.
- Haslett, C., Guthrie, L. A., Kopaniak, M. M., Johnston, R. B. Jr and Henson, P. M.** (1985) Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am. J. Path.* 119, 101-109.
- Hechtman, D. H., Cybulsky, M. I., Fuchs, H. J., Baker, J. B., Gimbrone, M. A., Jr.** (1991) Intravascular IL-8. Inhibitor of polymorphonuclear-leukocyte accumulation at sites of acute inflammation. *J. Immunol.* 147, 883-892.
- Hellewell, P. G., Young, S. K., Henson, P. M., Worthen, G. S.** (1994) Disparate role of the β_2 -integrines CD18 in the local accumulation of neutrophils in the pulmonary and cutaneous inflammation in the rabbit. *Am. J. Cell Mol. Biol.* 10, 391-398.
- Hoffbrand, A. V., Pettit, J. E** (1987) Normal Haemopoiesis and Blood Cells. In *Clinical Haematology Illustrated*. Churchill Livingstone, London, 1.2-1.26.
- Huie, R. E., Padjama, S.** (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Rad. Res. Comms.* 18, 195-199.

Hsu, M. F., Raung, S. L., Tsao, L. T., Lin, C. N., Wang, J. P. (1997) Examination of the inhibitory effect of norathyriol in FMLP-induced respiratory burst in rat neutrophils. *Free. Rad. Biol. Med.* 23, 1035-1045.

Karakurum, M., Shreeniwas, R., Chen, D., Yan, S., Anderson, M., Sunouchi, K., Major, J., Hamilton, T., Kuwabara, K. (1994) Hypoxic induction of interleukin-8 gene expression in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 93, 1564, 1570.

Klebanoff, S. J. (1992) Oxygen metabolites from phagocytes. *In Inflammation : Basic Principles and Clinical Correlates*, 2nd ed., (J.I. Gallin, M. Goldstein and R. Snyderman, eds.) Raven Press, New York, 541-588.

Knowles, R., Keeping, H., Grarber, T., Nguyen, K., Garner, C., D'Amico, R., Simms, H. H. (1997) Cytokine control of PMN phagocytosis: regulatory effects of hypoxemia and hypoxemia-reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 272, C1352-C1364.

Knowles, R., Keeping, H., Nguyen, K., Graeber, T., D'Amico, R., Simms, H (1996) Hypoxemia/reoxygenation down-regulates interleukin-8-stimulated bactericidal activity of polymorphonuclear neutrophil by differential regulation of CD16 and CD35 mRNA expression. *Surgery* 120, 382-388.

Kroegel, C., Anthony, V.B. (1997) Immunobiology of pleural inflammation; potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *Eur. Respir. J.* 10, 2411-2418.

Ley, K., Baker, J. B., Cybulsky, M. I., Gimbrone, M. A., Jr., Luscinskas, F. W. (1993) Intravenous interleukin-8 inhibits granulocyte emigration from rabbit mesenteric venules without altering L-selectin expression or leukocyte rolling. *J. Immunol.* 151, 6347-6357.

Lew, D. P. (1989) Receptor signaling and intracellular calcium in neutrophil activation. *Eur. J. Clin. Invest.* 19, 338-346.

Light R. W. (1988) Textbook of Respiratory Medicine (Disorders of the pleura and Pleural effusions), Murray and Nadel. W.B. Saunders Compagny. Philadelphia. Chap 75-76, 1703-1744.

Mayer, A. M., Pittner, R. A., Lipscom, G. E., Spitzer, J. A. (1993) Effect of in vivo TNF administration on superoxide production and PKC activity of rat alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* 264, L43-52.

Mannion, B. A., Weiss, J., Elsbach, P. (1990) Separation of sublethal and letal effects of polymorphonuclear leukocytes on *Escherichia coli*. *J. Clin. Invest.* 86, 631-641.

McIntyre, T. M., Reinhold, S. L., Prescott, S. M. and Zimmerman, G. A. (1987) Protein kinase C activity appears to be required for the synthesis of platelet-activating factor and leukotriene B₄ by human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 262, 15370-15376.

McLaughlin R. F., Tyler W. S. (1991) A study of the subgross anatomy in various mammals. *Am. J. Anat.* 108, 149-165.

Mehta, J., Dinerman, J., Mehta, P., Saldeen, T. G. P., Lawson, D., Donnelly, W. H. (1989) Neutrophils function in ischemic heart disease. *Circulation* 79, 549-556.

Mian, R., Westwood, D., Stanley, P., Marshall, J. M., Coote, J. H. (1993) Acute systemic hypoxia and the surface ultrastructure and morphological characteristics of rats leukocytes. *Exp. Physiol.* 78, 839-842.

Mian, R., Marshall, J. M. (1993) Effect of acute systemic hypoxia on vascular permeability and leukocyte adherence in the anaesthetised rat. *Cardiovasc. Res.* 27, 1531-1537.

Michiels, C., De Leener, F., Arnould, T., Dieu, M., Remacle, J. (1994) Hypoxemia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens: role of prostaglandins and bFGF. *Exp. Cell Res.* 213, 43-54.

Miles, A. M., Owens, M. W., Milligan, S., Johnson, G. G., Fields, J. Z., Ing, T. S., Kottapalli, V. Keshavarzian, A., Grisham, M. B. (1995) Nitric oxide in circulating vs. extravasated polymorphonuclear leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 58, 616-622.

Milhoan, K. A., Lane, T. A., Bloor, C. M. (1992) Hypoxia induces endothelial cells to increase their adherence for neutrophils: role of PAF. *Am. J. Physiol.* 263, H956-H962.

Moncada, S., Higgs, A. (1993) The L-Arginine-Nitric oxide pathway. *N. Eng. J. Med.* 30, 2002-2012.

Mulder, D.S., Marelli, D. (1992) the 1991 Fraser Gurd lecture: evolution of airway control in the management of injured patients. *J. Trauma* 33, 856-862.

Nakagawa, H., Ikeda, M., Tsurufuji, S. (1975) A protective action of an anti-inflammatory steroid on collagen synthesis in the rat carrageenan granuloma. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 27, 794-796.

Noursharg, S., Rampart, M., Hellewell, P. G., Jose, P. J., Harlan, J. M., Edwards, A. J., Williams, T. J. (1989) Accumulation of ¹¹¹In-neutrophils in rabbit skin in allergic and non-allergic inflammatory reactions in vivo. Inhibition by neutrophil pretreatment in vitro with a monoclonal antibody recognizing the CD18 antigen. *J. Immunol.* 9, 3193-3198.

Ogino, M., Majima, M., Kawamura, M., Hatanaka, K., Saito, M., Harada, Y. et Katori M. (1996) Increased migration of neutrophils to granulocyte-colony stimulating factor in rat carrageenin-induced pleurisy: roles of complement, bradykinin, and inducible cyclooxygenase-2. *Inflamm. Res.* 45, 335-346.

Pabst, M. J. (1994) Priming the neutrophils. In *Immunopharmacology of neutrophils* (P. G. Hellewell, T. J. Williams) Academic Press Limited, London 195-221.

Pietersma, A., De Jong, N., Koster, J. F., Sluiter, W. (1994) Extreme hypoxia decreases the adherence of granulocytes to endothelial cells in vitro. *Ann. New York Acad. Sci.* 723, 486-487.

Pohl, U. (1990) Endothelial cells as part of a vascular oxygen-sensing system: hypoxia-induced release of autacoids. *Experientia* 46, 1175-1179.

Pontremoli, S., Salamino, F., Sparatore, B., De Tullio, R., Patrone, M., Tizianello, A., Melloni, E. (1989) Enhanced activation of the respiratory burst oxidase in neutrophils from hypertensive patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 966-972.

Price, T. H., Beatty, P. G., Corpuz, S. R. (1987) In vivo inhibition of neutrophil function in the rabbit using monoclonal antibody to CD18. *J. Immunol.* 139, 4174-7177.

Ras, G. J., Theron, A. J., Anderson, R., Taylor, G. W., Wilson, R., Cole, P. J., van der Merwe, C. A. (1992) Enhanced release of elastase and oxidative inactivation of α -1-protease inhibitor by stimulated neutrophils exposed to *Pseudomonas aeruginosa* pigment 1-hydroxyphenazine. *J. Infec. Dis.* 166, 568-573.

Reichlin, S. (1993) Neuroendocrine-immune interactions. *N Engl. J. Med.* 329, 1246-1253.

Riveau, G. J., Brunel-Riveau, B. G., Audibert, F. M. and Chedid, L. A. (1991) Influence of muramyl dipeptide on human blood leukocyte functions and their membrane antigens. *Cell. Immunol.* 134, 147-156.

Robert, R., Ferrandis, J., Malin, F., Herpin, D., Pourrat, O. (1994) Enhancement of hypoxemia by right-to-left atrial shunting in severe asthma. *Intensive Care Med.* 20, 585-587.

Robertson, W. van B., Schwartz, B. (1953) Ascorbic acid and the formation of collagen. *J. Biol. Chem.* 201, 689-696.

Robinson, J., Watson, F., Bucknall, R. C., Edwards, S. W. (1992) Activation of neutrophil reactive oxidant production by synovial fluid from patient with inflammatory joint disease; soluble and insoluble immunoglobulin aggregates activate different pathways in primed and unprimed cells. *Biochem. J.* 286, 345-351.

Simms, H., D'Amico, R. (1996) Regulation of polymorphonuclear leukocyte cytokine receptor expression. The role of altered oxygen tension and matrix proteins. *J. Immunol.* 157, 3605-3616.

Simon, R. H., Ward, P. A. (1992) Adult respiratory distress syndrome. *In Inflammation. Basic principles and clinical correlates* (J. I. Gallin, I. M. Goldstein, R. Snyderman eds), Raven Press, New York 999-1016.

Shreeniwas, R., Koga, S., Karakurum, M., Pinsky, D., Kaiser, E., Brett, J., Wolitzky, B. A., Norton, C., Plocinski, J., Benjamin, W. (1992) Hypoxemia-mediated induction of endothelial cell interleukin-1. An autocrine mechanism promoting expression of leukocyte adhesion molecules on the vessel surface. *J. Clin. Invest.* 90, 2333-2339.

Shyy, J. Y.-J., Chien, S. (1997) Role of integrins in the cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 707-713.

Smith, J. A., Telford, R. D., Mason, I. B., Weidemann, M. (1990) Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. *Int. J. Sports Med.* 11, 179-187.

Smith, J. A. (1994) Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edge sword. *J. Leukoc. Biol.* 56, 672-686.

- Suematsu, M., Suzuki, M., Kitahora, T., Miura, T., Suzuki, K., Hibi, T., Watanabe, T., Nagata, H., Asakura, H., Tsuchiya, M.** (1987) Increased respiratory burst of leukocytes in inflammatory bowel diseases- the analysis of free radical generation using chemoluminescence probe. *J. Clin. Lab. Immunol.* 24, 125-128.
- Thelen, M., Dewald, B., Baggiolini, M.** (1993) Neutrophils signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol. Rev.* 73, 797-821.
- Thomas, T., Elnazir, B. K., Marshall, J. M.** (1994) Differentiation of the peripherally mediated from the centrally influences of adenosine in the rat during hypoxia. *Exp. Physiol.* 79, 809-822.
- Tullgren, O., Giscombe, R., Holm, G., Johansson, B., Mellstedt, H., Bjorkholm, M.** (1991) Increased luminol-enhanced chemiluminescence of blood monocytes and granulocytes in Hodgkin's disease. *Clin. Exp. Immunol.* 85, 436-440.
- Utsunomiya, I., Nagai, S. et Oh-Ishi, S.** (1991) Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carrageenin-induced pleurisy. *J. Immuno.* 147, 1803-1809.
- Vinegar, R., Truax, J. F., Selph J. L. and Voelker F. A.** (1982) Pathway of onset, development, and decay of carrageenan pleurisy in the rat. *Federation Proc.* 41, 2588-2595.
- Vinegar, R., Truax, J. F., Selph J. L.** (1973) Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rat. *Proc. Soc. exp. Ther.* 143, 711-714.
- Wagner, W. W., Hervé, P.** (1989) Physiologie du recrutement capillaire pulmonaire. *Rev. Mal. Resp.* 6, 39-34.
- Wang, N.-S.** (1985) Anatomy and physiology of the pleural space. *Clinics in Chest Medicine.* 6, 3-16.

- Wang, J. P., Raung, M. F., Hsu, M. F., Chen, C. C.** (1994) Inhibition by gomosin C (a ligand from *Schizandra chinensis*) of the respiratory burst of rat neutrophils. *Br. J. Pharmacol.* 113, 945-953.
- Wanstall, J. C.** (1993) Vascular reactivity: modulation by hypoxia. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 36, 99-102.
- Weiss, S. J.** (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320, 365-376.
- Weitzman, S. A., Gordon, L. I.** (1990) Inflammation and cancer: role of phagocytose-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 76, 655-663.
- Whal, S. M., Feldman, G. M., McCarthy, J. B.** (1996) Regulation of leukocytes adhesion and signaling in inflammation and disease. *J. Leukoc. Biol.* 59, 789-796.
- Winter, C. A., Risley, E. A. and Nuss, G. W.** (1962) Carrageenin-induced oedema in the hindpaw of the rat as an assay for the anti-inflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 544.
- Yee, J., Giannias, B., Kapadia, B., Chartrand, L., Christou, N. V.** (1994) Exudative neutrophils. Modulation of microbicidal function in the inflammatory microenvironment. *Arch. Surg.* 129, 99-105.