

Université de Montréal

Rôle des médiateurs lipidiques dans la réaction inflammatoire chez le lapin

Par

Leila Hamdan

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En Vue de l'obtention du grade de Maitre és sciences (M.Sc.)

En sciences pharmaceutiques, option pharmacologie

Avril 2009

©Leila Hamdan, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle des médiateurs lipidiques dans la réaction inflammatoire chez le lapin

Présenté par

Leila Hamdan

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Daniel Lamontagne

Président-rapporteur

Dr. Sylvie Marleau

Directeur de recherche

Dr. Marc Servant

Membre externe du Jury

RESUMÉ

Les médiateurs lipidiques de l'inflammation dont le leucotriène B₄ (LTB₄) et le facteur d'activation plaquettaire (PAF) permettent la régulation de la migration des neutrophiles polymorphonucléaires (PMNs) et l'extravasation plasmatique au site inflammatoire. Afin de déterminer leurs rôles dans la régulation de la migration des PMNs au site inflammatoire, nous avons étudié leur effet potentiellement coopératif en utilisant une approche pharmacologique à l'aide d'antagonistes sélectifs des récepteurs du LTB₄ et du PAF dans un modèle d'inflammation dermique chez le lapin. Les résultats montrent un effet inhibiteur additif des antagonistes des deux médiateurs lipidiques, lorsque utilisés de façon concomitante, sur la migration des neutrophiles induite par le LTB₄, le PAF et aussi sur des médiateurs non-chimiquement apparentés comme le facteur nécrosant des tumeurs (TNF α), ainsi que sur l'inhibition de l'extravasation plasmatique induite par le leucotriène D₄, suggérant un rôle régulateur des récepteurs du LTB₄ et du PAF dans la migration des PMNs au site inflammatoire.

Nous avons déterminé le rôle de ces médiateurs dans la régulation de la migration des PMNs en réponse à une ischémie-reperfusion des membres inférieurs chez le lapin. Les résultats appuient l'hypothèse selon laquelle le LTB₄ et le PAF exercent un rôle important dans l'accumulation des PMNs au site inflammatoire. En effet l'administration concomitante des antagonistes des récepteurs de ces deux médiateurs lipidiques a réduit de façon significative la migration des PMNs aux poumons, intestins et foie. Nos

résultats contribuent à élucider le rôle du LTB_4 et du PAF dans la régulation de l'extravasation des PMNs et du plasma au site inflammatoire.

Mots clés : inflammation dermique, ischémie-reperfusion, LTB_4 , lapin, myéloperoxydase, neutrophiles polymorphonucléaires, œdème, PAF.

SUMMARY

Inflammatory lipid mediators including leucotriene B₄ (LTB₄) and platelet activating factor (PAF) regulate the trafficking of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and plasma extravasation at inflammatory sites. To delineate their role in regulating PMNs extravasation, we studied the effect of PAF and/or LTB₄ selective receptor antagonists in dermal inflammation induced by a variety of agonists in a rabbit bioassay model. The results show that there is an additive inhibitory effect when the two antagonists are used concomitantly on PMNs dermal accumulation induced by LTB₄ and PAF, as well by chemically unrelated agonists including TNF α , in addition to inhibiting plasma extravasation induced by LTD₄. These results support a regulatory role of LTB₄ and PAF in regulating PMNs trafficking and plasma extravasation at inflammatory sites. Next, we studied the regulatory role of lipid mediators in regulating PMNs trafficking in response to hind limb ischemia-reperfusion. The results show that the administration of both PAF and LTB₄ receptor antagonists reduced significantly PMNs migration to the lung, the liver and the intestine.

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

Key words: dermal inflammation, ischemia-reperfusion, LTB₄, myeloperoxidase, oedema, PAF, polymorphonuclear neutrophils, rabbits.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iv
SUMMARY	vi
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xvi
DÉDICACE	xix
REMERCIEMENTS	xx
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1. Réponse inflammatoire	2
1.2. Neutrophiles	6
1.3. Molécules d'adhérence	14
1.4. Rôle du stress oxydatif	21
2.1. Stimuli inflammatoires	23
2.1.1. Les Cytokines	24

2.1.2 Les chimiokines	27
2.1.3. Les médiateurs lipidiques	30
2.1.4. Les lipoxines,.....	30
2.1.5. Les prostaglandines	31
2.1.6. Les leucotriènes	34
2.1.6.1. Le leucotriène B₄	34
2.1.6.2. La synthèse des leucotriènes	36
2.1.6.3. Antagoniste sélectif des récepteurs du LTB₄	39
2.1.7. Le facteur d'activation plaquettaire (PAF)	41
2.1.7.1. La biosynthèse du PAF	42
2.1.7.2. Antagonistes sélectifs des récepteurs du PAF	43
3. L'ischémie-reperfusion (I/R)	45
3.1. Définition	45
3.2. L'I/R des membres inférieurs	46
3.3. Rôle du neutrophile dans l'I/R des membres inférieurs.....	47

3.4. Les effets vasculaires de l'hypoxie	48
3.4.1. Le rôle des ROS	49
3.4.2. Rôle des médiateurs lipidiques dans l'I/R	50
3.4.2.1. Rôle du PAF	50
3.4.2.2. Rôle du LTB₄	52
4. Choix du modèle expérimental	56
5. Objectifs de l'étude et hypothèse de recherche	56
CHAPITRE II	59
5.1. Abstract	60
5.2. Introduction	61
5.3. Material and methods	63
5.3.1. Animals.....	63
5.3.2. Materials.....	63
5.3.3. Dermal inflammation	64
5.3.4. Vascular permeability and oedema	65

5.3.5. Hind limb ischemia-reperfusion	66
5.3.6. Cutaneous blood flow measurement	67
5.3.7. MPO assay	68
5.3.8. Whole blood chemiluminescence.....	68
5.3.9. Statistical analysis	69
5.4. Results	69
5.4.1. Effect of concomitant blockade of BLT1/BLT2 and PAF receptor on agonist-stimulated leukocyte recruitment, vascular permeability and blood flow in rabbits	69
5.4.2. Effect of a concomitant blockade of CysLTs, LTB₄ and PAF receptors in regulating leukocyte recruitment and plasma extravasation to various agonists	71
5.4.3. Cooperative role of LTB₄ and PAF receptors in remote organ injury following reperfusion of ischemic lower limbs in rabbits	72
5.5. Discussion	73
5.6. References	76
5.7. Legend to figures	88

5.7. References	88
CHAPITRE III	92
3.1. Discussion générale	92
3.2. Perspectives	95
4. Bibliographie	96

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Tableau 1. Pathologies associées à des dommages tissulaires causés par les PMNs	12
Tableau 2. Les molécules d'adhérence impliquées dans l'interaction des leucocytes avec l'endothélium	19

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1. La réponse inflammatoire aiguë: étapes.....	4
Figure 2. Les neutrophiles.....	13
Figure 3. L'adhésion des neutrophiles à l'endothélium vasculaire est assurée par les intégrines.....	16
Figure 4. Migration des neutrophiles	17
Figure 5. La "flambée respiratoire oxydative" chez les neutrophiles	22
Figure 6. Conversion de la PGH ₂	32
Figure 7. Une voie synthétique de la PGH ₂	33
Figure 8. Représentation schématique du leucotriène B ₄	34
Figure 9. La synthèse des leucotriènes	37
Figure 10. Représentation schématique du BIIL 284	40

Figure 11. Représentation schématique du PAF.....	43
Figure 12. Représentation schématique du WEB 2086.....	44
Figure 13. L'I/R induit l'adhésion leucocyte-cellule endothéliale et la transmigration	54
Figure 14. Hypothèse de recherche	58

CHAPITRE 2: COOPERATIVE ROLE OF ENDOGENOUS LEUKOTRIENE B₄ AND PLATELET-ACTIVATING FACTOR FOLLOWING HIND LIMB ISCHEMIA-REPERFUSION-MEDIATED REMOTE TISSUE INJURY IN THE RABBIT

Figure 1. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on PMN recruitment to skin sites	81
Figure 2. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on PMN recruitment to skin sites elicited by chemically unrelated agonists.....	82
Figure 3. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on plasma extravasation to skin sites.....	83
Figure 4. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on cutaneous blood flow.....	84
Figure 5. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on PMN recruitment to remote organs following bilateral hind limb I/R	85
Figure 6. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on tissue oedema in remote organs following bilateral hind limb I/R.....	86
Figure 7. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on blood leukocyte ROS production following bilateral hind limb I/R.....	87

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

- 5-LO: 5-Lipoxygénase
AA: acide arachidonique
BLT: récepteur du LTB₄
C5a: Fragment activé du complément C5
CAMs: molécules d'adhérence cellulaire
CI₅₀ : concentration inhibitrice à 50% de la réponse maximale
CMC : carboxyméthylcellulose
COX : cyclooxygénase
cPLA₂ : phospholipase A₂ cytosolique
CysLTs : cystéinyl leucotriènes
DI₅₀ : dose inhibitrice à 50% de la réponse maximale
Fc : fragment cristallisable
FLAP : *5-lipoxygenase activating protein*
FMLP : N-Formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
G-CSF : facteur de croissance granulocytaire
GM-CSF : facteur de croissance granulo-macrophagique
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HOCL : acide hypochloreux
ICAM : molécule d'adhérence intercellulaire
IL : interleukine
IR : ischémie-reperfusion
K_i : constante de dissociation
LAMP-2 : protéine membranaire lysosomale-2
LPS : lipopolysaccharide
LT : leucotriène
LX : lipoxine
MAC-1 : *macrophage antigen-1*
MCP-1 : protéine chimioattractante monocytaire-1

M-CSF : facteur de croissance des macrophages
MIP-2 : protéine inflammatoire du macrophage-2
MPO : myéloperoxydase
NAP : facteur activant les neutrophiles
 O_2^- : anion superoxyde
P.O. : par voie orale
PAF : facteur d'activation plaquettaire (*platelet activating factor*)
PAFR : récepteur du PAF
PG : prostaglandine
PMN : neutrophile polymorphonucléaire
RCPG: Récepteurs couplés aux protéines G
ROS : métabolites réactifs de l'oxygène
RANTES: *regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted*
RNS: métabolites réactifs de l'azote
SOD: superoxyde dismutase
TMB : 3,3', 5,5'- tétraméthylbenzidine
TNF- α : facteur nécrosant des tumeurs- α (*tumor necrosis factor- α*)
VCAM : molécule d'adhésion cellulaire vasculaire
ZAP : plasma activé par le zymosan

DÉDICACE

Allah le Très Haut a dit : « Dis: Sont-ils égaux, ceux qui savent et ceux qui ne savent pas ?" Seuls les doués d'intelligence se rappellent... » (Coran, 39 : 9).

Et a dit : « Dis : "Moi, mon Seigneur m'a guidé vers un chemin droit, une religion droite, la religion d'Abraham, le soumis exclusivement à Dieu et qui n'était point parmi les associateurs. Dis : "En vérité, ma Salat, mes actes de dévotion, ma vie et ma mort appartiennent à Dieu, Seigneur de l'Univers. A Lui nul associé ! Et voilà ce qu'il m'a été ordonné, et je suis le premier à me soumettre. » (Coran, 6: 161-162-163).

Je dédie ce mémoire à toute ma famille, mon père, ma mère, mon mari Khaled, mon bébé Abderrahmen, ma tante Mona et tous mes frères...

Je le dédie aussi à tous ceux que j'aime...

REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord exprimer ma reconnaissance à docteure Sylvie Marleau pour l'encadrement ainsi que pour la précieuse assistance accordés tout au long au de la réalisation de ce mémoire, elle m'a permis d'acquérir les éléments de base nécessaires à la poursuite d'une carrière scientifique. C'est une femme reconnue pour sa grande rigueur intellectuelle, sa ténacité, sa passion au travail ainsi que sa foi en la recherche.

Je tiens aussi à témoigner ma grande reconnaissance au docteur Pierre Borgeat mon co-directeur de recherche, pour son courage et son soutien. J'en suis reconnaissante pour ses précieux conseils ainsi que ses commentaires constructifs tout au long du projet.

Je remercie tous les étudiants du laboratoire de l'Université de Montréal et les techniciennes en santé animale.

Je tiens également à remercier Andrée Mathieu pour son aide. Et les employés de la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal.

Merci à toute ma famille, qui ma toujours soutenue pour continuer mon chemin de recherche.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

1.1. La réponse inflammatoire

La réponse inflammatoire est vitale à la survie de l'homme, notamment pour combattre l'infection et prévenir sa propagation, ainsi que pour promouvoir la réparation des tissus endommagés. Cette réponse est caractérisée traditionnellement par les 4 mots latins *color, dolor, rubor* et *tumor*, qui caractérisent les différentes étapes de la réponse inflammatoire et la réponse aux cytokines et autres médiateurs inflammatoires qui agissent au niveau des veinules post-capillaires et/ou des capillaires tissulaires. Une des premières étapes de cette réponse implique la vasodilatation des vaisseaux sanguins et l'augmentation de la perméabilité vasculaire qui entraîne une augmentation du flux sanguin associée à l'extravasation des fluides et protéines plasmatiques (Chertov et al., 2000). Ces événements entraînent la chaleur, la rougeur et l'œdème. La migration des leucocytes sanguins débute peu après l'initiation de la lésion et est amplifiée dans les heures qui suivent le recrutement tissulaire des phagocytes, ainsi que la sécrétion de cytokines et autres facteurs impliqués dans l'hyperalgésie, qui entraînent la douleur (Chertov et al., 2000). Les principaux leucocytes qui sont recrutés au foyer inflammatoire dans la phase initiale sont les neutrophiles polymorphonucléaires (PMNs *polymorphonuclear neutrophils*), qui sont les principales cellules qui phagocytent et détruisent les microorganismes initialement (Chertov et al., 2000). La cinétique d'accumulation des leucocytes mononucléés, principalement les

monocytes, est généralement retardée de quelques heures par rapport à celle des PMNs (Van der poll, T., 2001). Les monocytes se différencient rapidement en macrophages au niveau tissulaire et participent aussi à la clairance des débris ou microorganismes, mais aussi à la cicatrisation dans les étapes subséquentes (Van der poll, T., 2001). La réponse inflammatoire tardive implique aussi les lymphocytes B qui sont activés par les antigènes microbiens. Finalement, la phase de résolution de la réponse inflammatoire s'en suit, phase associée à la génération de médiateurs endogènes de nature anti-inflammatoire, dont certaines cytokines et médiateurs lipidiques (Svanburg et al., 1999).

1.1.1. La réponse inflammatoire aiguë: étapes

La réponse immunitaire innée est une réponse immédiate qui survient chez tout individu en absence d'immunisation préalable. Elle constitue la première barrière de défense vis-à-vis de divers agents pathogènes. Elle est en grande partie assurée par les cytokines, incluant les chimiokines et les facteurs de croissance, les médiateurs lipidiques dont les leucotriènes, les prostaglandines et le facteur d'activation plaquettaire (PAF) et d'autres facteurs protéiques dont le complément activé (Kohl., 2001). Les cellules phagocytaires y jouent un rôle clé.

La séquence d'événements qui suit l'activation des récepteurs des agents chimiotactiques à la surface des phagocytes initie des sentiers de signalisation qui conduisent à l'activation des molécules d'adhérence et à leur interaction avec les molécules d'adhérence

exprimées par les cellules endothéliales. Ces événements conduisent à l'adhésion, la diapédèse et la migration des phagocytes au foyer inflammatoire (Svanborg et al., 1999). Le recrutement séquentiel des leucocytes, avec l'arrivée des leucocytes polynucléés suivie des leucocytes mononucléés, est associé à un changement dans la biosynthèse des médiateurs endogènes de nature pro- à anti-inflammatoire. La phase de résolution débute en fait au pic de l'accumulation des PMNs, pour se terminer lorsque celle-ci décline et est surpassée par l'accumulation des monocytes et leur transformation en macrophages (Serhan et al., 2005).

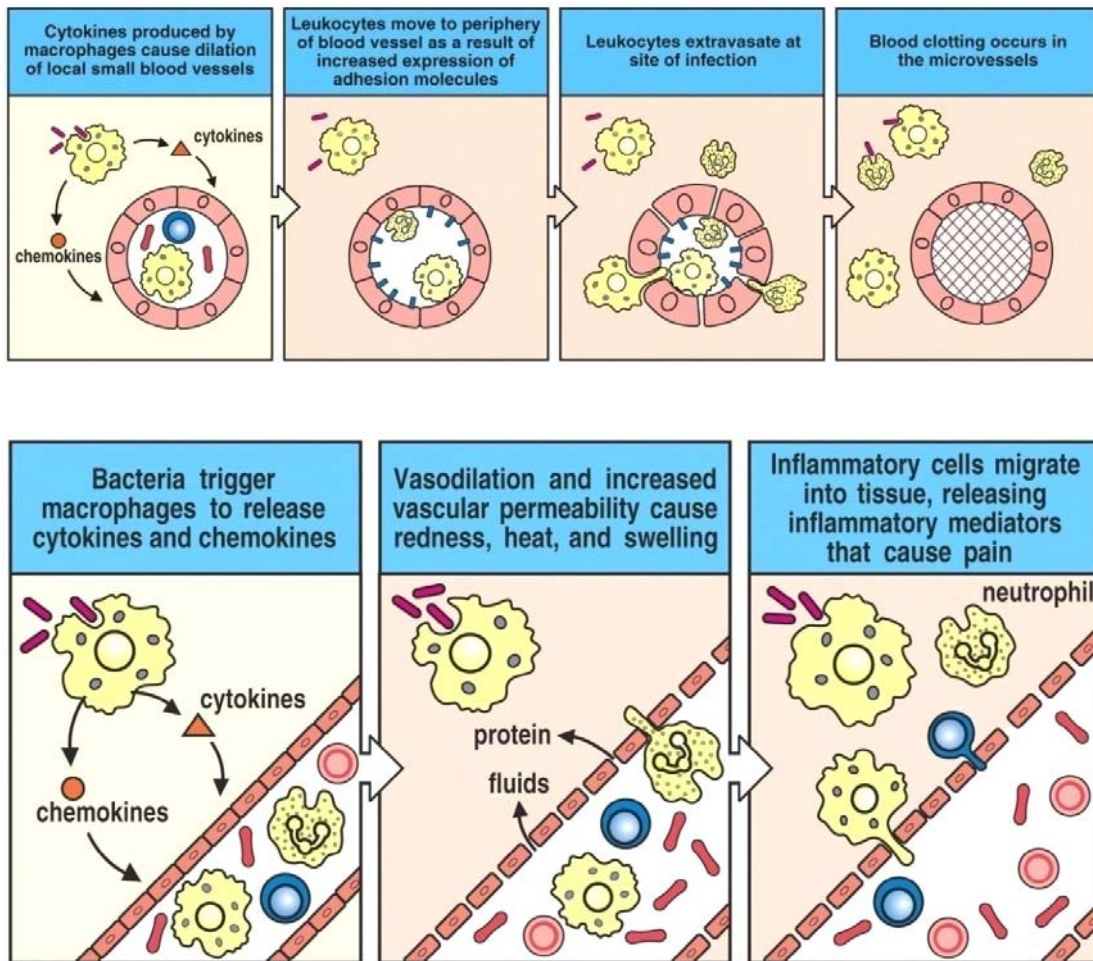


Figure 1: La réponse inflammatoire aiguë: étapes. Les macrophages sécrètent les cytokines qui augmentent initialement la dilatation des petits vaisseaux. Les macrophages produisent aussi des chimiokines qui dirigent la migration des neutrophiles au foyer inflammatoire; les leucocytes adhèrent à la paroi des vaisseaux et passent à travers les cellules endothéliales, en premier les neutrophiles, ensuite les monocytes. L'accumulation de liquide et de cellules au foyer inflammatoire entraîne la rougeur, l'œdème, la chaleur et la douleur, reconnue ensemble comme l'inflammation.

Les neutrophiles et les macrophages sont les cellules inflammatoires principales, les lymphocytes activés contribuent aussi à la réponse inflammatoire à un stade plus avancé de la réponse inflammatoire. (Tiré de Immunobiology: the immune system in health and disease/ Charles A. Janeway. Jr. et al., 6th edition).

1.2. Les neutrophiles

Les PMNs sont des leucocytes qui peuvent être colorés au Giemsa-Wright. Elle 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 (Hoffbrand et petit., 1987).

Les PMNs sont issus la moelle osseuse et relâchés dans la circulation sanguine à un rythme de 10^{11} cellules par jour. Ce processus est principalement régulé 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 des 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).

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,

elles assurent la phase initiale de la défense permettant ainsi le développement subséquent de la réponse immunologique qui est spécifique et dirigée contre l'agresseur (Mannion et al., 1990).

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 exprimer des molécules d'adhérence de même que les cellules endothéliales activées, avant d'adhérer fermement. Les PMNs se dirigeront par la suite au foyer inflammatoire où ils phagocyteront et tueront les agents pathogènes (Cronstein et al., 1993).

Dans le cas d'une agression bactérienne, la phagocytose comporte deux étapes importantes. Premièrement, la reconnaissance de l'agent 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).

Les PMNs se lient directement à l'agent pathogène 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 aux récepteurs 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 forment ce qu'on appelle un phagolysosome. 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, le contenu des granules cytosoliques est déversé directement dans le milieu extracellulaire (Klebanoff, 1992).

Une fois le phagolysosome formé, il y a activation de nombreuses enzymes spécifiques capables d'engendrer des radicaux libres délétères pour les agents pathogènes. Certaines enzymes utiliseront l'oxygène consommé en très grande quantité par les PMNs afin d'élaborer des radicaux libres comme l'anion superoxyde (O_2^-) et le radical hydroxy (OH^\cdot), l'acide hypochloreux (HClO), 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 oxydatives 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. Les granules contiennent la lactoferrine, capable d'inhiber la multiplication bactérienne. La plupart de ces protéines sont chargées positivement ce qui augmente leur liaison aux surfaces cellulaires (Borregaard et al., 1993).

L'activité des PMNs est modulée par une variété 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* qu'*in vitro* des PMNs (Smith, 1994). Il est à noter que les PMNs sont eux aussi capables de sécréter différents médiateurs comme la prostaglandine E₂ (PGE₂), le facteur nécrosant des tumeurs (*tumor necrosis factor*) alpha (TNF- α), le facteur d'activation plaquettaire (*platelet activating factor*) (PAF), le leucotriène B₄ (LTB₄), le GM-CSF, les interleukines-1 et -2 (IL-1 et IL-2) et plus particulièrement l'interleukine-8 (IL-8) (Smith, 1994).

La migration des PMNs au foyer inflammatoire comporte une cascade d'événements bien définie et hautement régulisée. Ce processus prend fin avec la mort ou

l'inactivation des agents pathogènes initiateurs et 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 résulter de l'activation prématurée des PMNs lors de leurs 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 désoxyribonucéique (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).

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

Tableau 1. Pathologies associées à des dommages tissulaires causés par les PMNs (adapté de Harlan et al., 1993).



Cell		Activated function
Neutrophil		Phagocytosis and activation of bactericidal mechanisms
		

Figure 2: Les neutrophiles : Ce sont des cellules phagocytaires qui phagocytent les agents pathogènes et les détruisent dans des vésicules intracellulaires. (Tiré de Immunobiology: the immune system in health and disease/ Charles A. Janeway. Jr. et al., 6th edition).

1.3. Les molécules d'adhérence

L'accumulation extravasculaire des PMNs au foyer inflammatoire comporte une séquence d'événements hautement régulisée 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 aux PMNs de "rouler" sur la paroi des veinules post-capillaires. 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-E est exprimée de façon transitoire par les cellules endothéliales activées pendant les premières soixante minutes, tandis que la sélectine-E est exprimée pendant les premières six à huit heures après le début de la réaction inflammatoire (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 β_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, ligand de la MAC-1, largement induite après stimulation par différentes

cytokines dont l'IL-1 et le TNF- α . La diapédièse 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 β_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).

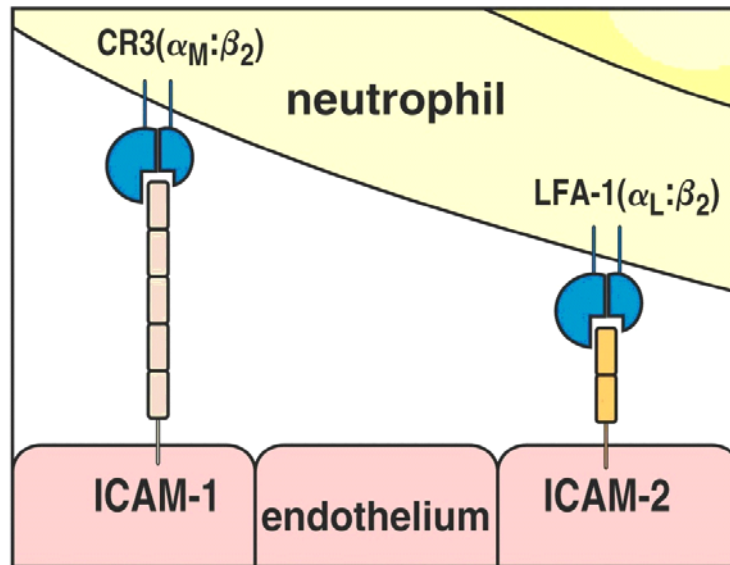


Figure 3: L'adhésion des neutrophiles à l'endothélium vasculaire est assurée par les intégrines. L'endothélium vasculaire, lorsqu'il est activé par les médiateurs inflammatoires, exprime deux molécules d'adhérence, ICAM-1 (régulé à la hausse) et ICAM-2. Ces derniers sont des ligands pour les intégrines exprimées par les neutrophiles: $\alpha_L:\beta_2$ (appelée aussi LFA-1 ou CD11a:CD18) et $\alpha_M:\beta_2$ (appelée aussi CR3, Mac-1 ou CD11b:CD18). (Tiré de Immunobiology: the immune system in health and disease/ Charles A. Janeway. Jr. et al., 6th edition).

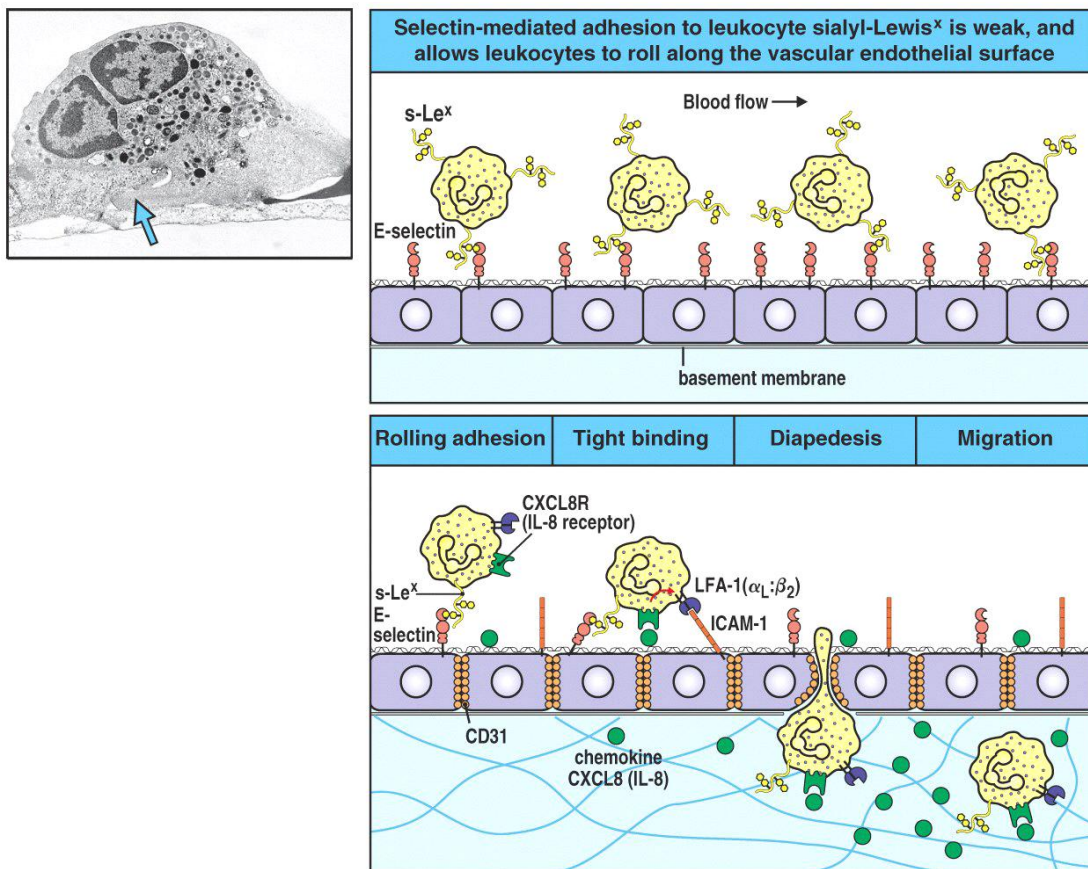


Figure 4: Migration des neutrophiles : Les neutrophiles quittent la circulation sanguine et migrent vers le foyer inflammatoire suivant un processus de plusieurs étapes médiées par les interactions adhésives qui sont contrôlées par les cytokines et les chimiokines dérivées des macrophages. La première étape implique la liaison réversible des neutrophiles à l'endothélium vasculaire par les interactions entre les sélectines induites dans l'endothélium et leurs ligands glycosylés dans le neutrophile, présentés dans la figure pour la sélectine-E et son ligand le sialyl-Lewis^x (s-Le^x). Cette interaction ne permet pas de résister aux forces du flux sanguin ce qui fait que les leucocytes roulent le long de l'endothélium d'une façon continue alternant liaison et rupture du contact.

La liaison par les intégrines activées permet des interactions plus solides avec ICAM-1 sur l'endothélium. Les intégrines LFA-1 et CR3 (Mac-1) dans le leucocyte sont activées par la signalisation induite par les chimiokines comme le CXCL8. L'attachement ferme entre ces molécules entraîne l'arrêt du roulement et permet au leucocyte de traverser entre les cellules endothéliales (l'extravasation). Les intégrines leucocytaires LFA-1 et Mac-1 sont nécessaires pour l'extravasation et pour la migration en réponse au chimiotactisme. L'adhésion entre les molécules CD31 exprimées chez les leucocytes et les jonctions des cellules endothéliales contribue aussi à l'extravasation. Le leucocyte doit aussi de traverser la membrane basale, dans laquelle il pénètre avec l'aide de l'enzyme de la matrice métalloprotéinase qui est exprimée à la surface cellulaire. Finalement le neutrophile migre le long d'un gradient de concentration de chimiokines (représenté ici par CXCL8) secrété par les cellules au foyer inflammatoire. Le micrographe électronique montre l'extravasation du neutrophile entre les cellules endothéliales. La flèche bleue indique le pseudopode que le neutrophile introduit entre les cellules endothéliales.

Titre de : Migration du neutrophile, (X 5500) I.Bird et J.Spragg. (Tiré de Immunobiology, 6th edition) (Immunobiology: the immune system in health and disease/ Charles A. Janeway. Jr. et al., 6th edition).

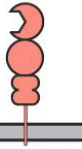
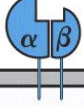

		Name	Tissue distribution	Ligand
Selectins	 P-selectin	P-selectin (PADGEM, CD62P)	Activated endothelium and platelets	PSGL-1, sialyl-Lewis ^x
		E-selectin (ELAM-1, CD62E)	Activated endothelium	Sialyl-Lewis ^x
Integrins	 LFA-1	$\alpha_L:\beta_2$ (LFA-1, CD11a/CD1)	Monocytes, T cells, macrophages, neutrophils, dendritic cells	ICAMs
		$\alpha_M:\beta_2$ (C3, Mac-1, CD11b/CD1)	Neutrophils, monocytes, macrophages	ICAM-1, iC3b, fibrinogen
		$\alpha_X:\beta_2$ (C4, p150.95, CD11c/CD1)	Dendritic cells, macrophages, neutrophils	iC3b
		$\alpha_5:\beta_1$ (VLA-5, CD49d/CD29)	Monocytes, macrophages	Fibronectin
Immunoglobulin superfamily	 ICAM-1	ICAM-1 (CD54)	Activated endothelium	LFA-1, Mac1
		ICAM-2 (CD102)	Resting endothelium, dendritic cells	LFA-1
		VCAM-1 (CD106)	Activated endothelium	VLA-4
		PECAM (CD31)	Activated leukocytes, endothelial cell-cell junctions	CD31

Tableau 2: Les molécules d'adhérence impliquées dans l'interaction des leucocytes.

Plusieurs structures de familles de molécules d'adhérence ont un rôle dans la migration des leucocytes, la domiciliation et les interactions cellule-cellule: les sélectines, les intégrines et les protéines apparentes à la superfamille des immunoglobulines. Cette figure propose une présentation schématique d'un exemple d'un membre de chaque famille et une liste des autres membres de la famille qui participent dans les interactions

leucocytaires. Leur distribution cellulaire et leurs ligands dans les interactions adhésives sont indiqués. (Tiré de Immunobiology: the immune system in health and disease/ Charles A. Janeway. Jr. et al., 6th edition).

1.4. Rôle du stress oxydatif

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 b558, accepteur terminal de la courte chaîne de transport d'électrons qui transfère un électron du NADPH à l'oxygène (Babior, 1992).

Bien que l' O_2^- soit un des principaux radicaux libres formés, d'autres types de radicaux ou autres molécules réactives sont également générées. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est aussi produit de façon spontanée ou par l'action catalytique du superoxyde dismutase (SOD). L'acide hypochloreux (HClO), est formé par la réaction entre le H_2O_2 et l'ion chlore (Cl^-), très abondant au sein du fluide extracellulaire. 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^\cdot), deux radicaux libres très réactifs (Huie et Padmaja, 1993).

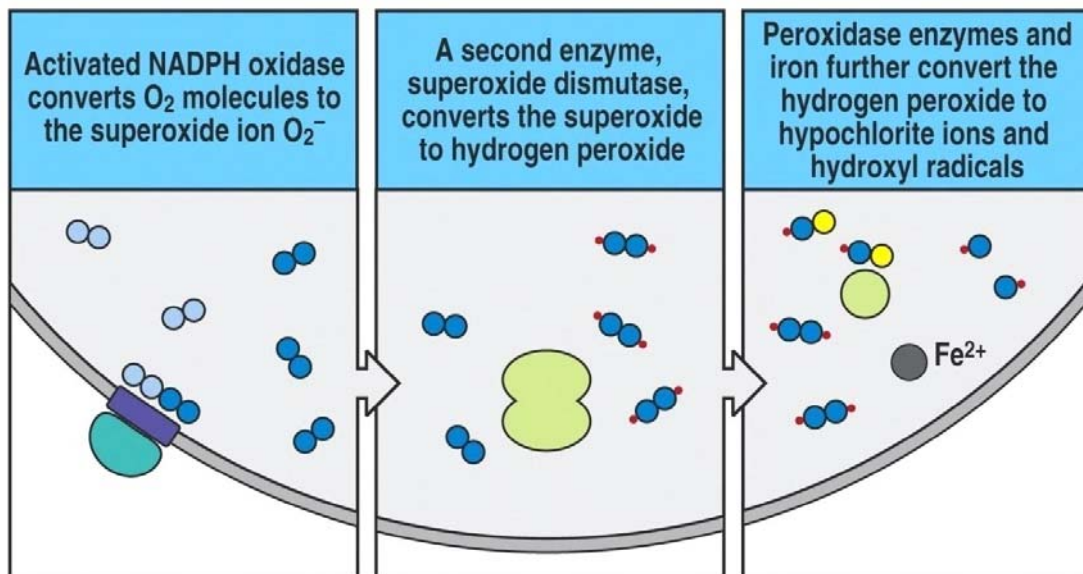


Figure 5: la flambée respiratoire oxydative chez les neutrophiles est causée par une augmentation transitoire dans la consommation d'oxygène durant la production des métabolites d'oxygène microbicides. L'activation de la phagocytose permet d'assembler les sous unités multiples de l'enzyme NADPH oxydase à partir de ses composantes. L'enzyme activée va convertir l'oxygène moléculaire en anion superoxyde O₂⁻ et d'autres radicaux libres d'oxygène. L'anion superoxyde est converti par l'enzyme superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène qui peut détruire les microorganismes et être converti par la myéloperoxydase et l'ion ferreux en hypochlorure et en radicaux hydroxyles. (Tiré de Immunobiology: the immune system in health and disease/ Charles A. Janeway. Jr. et al., 6th edition).

2.1. Stimuli inflammatoires

Plusieurs stimuli inflammatoires sont impliqués dans les différentes phases de la réaction inflammatoire, soit les phases vasculaire, cellulaire et de résolution, parmi ceux-ci les chimiokines, les écosanoïdes et les kinines (Sirois, P. and Borgeat, P., 1984a). La phase vasculaire est caractérisée par une vasoconstriction artériolaire très brève, d'une durée de quelques secondes, sous l'action du système sympathique, qui peut perturber l'équilibre thrombocytaire et activer les plaquettes avec le relâchement de la thromboxane A₂ (TxA₂), un vasoconstricteur puissant libéré par les plaquettes et qui entraîne leur agrégation (Byrne et al., 1997, Stanke-Labesque et al., 2000). S'en suit une vasodilatation artérielle médiée, entre autres, par les kinines via l'induction de la NO synthase endothéliale (eNOS) et de la prostacycline (Byrne et al., 1997, Stanke-Labesque et al., 2000). Cet effet se produit parallèlement à une constriction veineuse, par une action directe sur le muscle lisse, ce qui augmente la pression hydrostatique dans les capillaires et donc la sortie de plasma conduisant à la formation d'œdème. La bradykinine augmente aussi la contraction des cellules endothéliales, augmentant ainsi l'espace intercellulaire et la perméabilité vasculaire. Les amines vasoactives, incluant l'histamine et la 5-hydroxytryptamine (sérotonine) libérées par les basophiles et les plaquettes, respectivement, se joignent à la bradykinine pour induire ces effets (Kaplan et al., 2002) Ces médiateurs sont ainsi responsables de l'hyperémie locale, caractérisée par de la rougeur et de la chaleur. D'autres médiateurs inflammatoires aussi impliqués

précocement incluent, outre la TxA_2 , les prostaglandines dont la PGE_2 et la PGI_2 et les leucotriènes LTs, tous issus des voies métaboliques de l'acide arachidonique (AA) (Crowley SR., 1996). Les PGs, générées à partir du métabolisme de l'AA par les cyclooxygénases, sont synthétisées par plusieurs types cellulaires dont les leucocytes sanguins (Lefebvre.Y., 1975). La PGE_2 , notamment, induit une vasodilatation en synergie avec d'autres médiateurs comme l'histamine et la bradykinine entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire et l'œdème (Davies P et al., 1984). La PGE_2 entraîne cette vasodilatation en activant les récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés aux protéines G, les GPCR (*G protein coupled-receptor*). Les leucotriènes dérivés des basophiles et des mastocytes (les cystéinylleucotriènes) ont une action similaire à l'histamine sur les vaisseaux (Davies P et al., 1984). La phase cellulaire, qui suit la phase vasculaire, est caractérisée par un afflux extravasculaire des leucocytes au site lésé. Cette phase implique l'effet des protéines activées du complément, les médiateurs lipidiques, les chimiokines et cytokines, médiateurs décrits dans les points suivants.

2.1.1. Les cytokines

Les cytokines sont des molécules de communication intercellulaire qui jouent un rôle extrêmement important dans la régulation de la réponse inflammatoire. L'action des cytokines peut être additive, synergique ou inhibitrice en respect des fonctions du système immunitaire. Les cytokines sont des petites glycoprotéines solubles de 8 à 80

kilodaltons (kDa) produites par une grande variété de cellules immunitaires et non immunitaires qui ont des fonctions pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Moldoveneau et al., 2001). Les cytokines ont des effets autocrines et paracrines en plus d'activités endocrines. À titre d'exemple, l'interleukine-1 (IL-1) peut stimuler l'hypothalamus et causer la fièvre. (Dinarello et al., 1999). Les cytokines sont importantes pour le fonctionnement normal et l'intégration de la réponse immunitaire. Elles se lient à des récepteurs membranaires en activant des voies de signalisation impliquant des enzymes intracellulaires et des facteurs de transcription, pouvant entraîner l'inhibition ou l'activation des gènes régulés par les cytokines (Schwetz et al., 1994).

L'effet d'une cytokine particulière sur une cellule donnée dépend de la cytokine, de son abondance extracellulaire, de la présence et de l'abondance de ses récepteurs membranaires. Les cytokines sont caractérisées par une redondance considérable, et plusieurs partagent les mêmes fonctions.

Plusieurs types de nomenclature ont été proposés pour les cytokines et celle principalement retenue est «interleukine», dont certaines se développent en sous-familles, par exemple la famille des interleukines-10 ou des interleukines-17 (Nakov et al., 2002). Une autre famille importante dans la réaction inflammatoire aiguë est la famille du TNF, une importante famille de cytokines impliquées dans l'inflammation systémique et dans la réaction de phase aiguë. Le TNF α est une glycoprotéine de 185

acides aminés, obtenue par clivage d'un précurseur de 212 acides aminés se trouvant à la surface de macrophages ou de fibroblastes. Certaines cellules sécrètent des isoformes plus ou moins longs. Génétiquement, le TNF provient du chromosome 7p21 chez les humains. La structure globale du TNF α est décrite comme un sandwich formé de deux feuillets beta antiparallèles, eux-mêmes constitués de 8 brins antiparallèles (Nakov et al., 2002). Des ponts disulfure lient les monomères afin de stabiliser la structure, mais ils ne sont pas nécessaires à l'activité biologique. L'extrémité C-terminale est à l'intérieur du sandwich alors que l'autre (N-terminale) est libre à l'extérieur. On dénombre donc deux formes de TNF α : une soluble et une liée à la membrane. Ces deux formes sont actives mais ont des affinités différentes pour les récepteurs (TNFR-1 et TNFR-2). Il existe également des récepteurs solubles, ou circulants, par opposition aux récepteurs membranaires des cellules. Ils ont un rôle de leurre (*decoy*), fixant le TNF α et l'empêchant ainsi de stimuler les récepteurs membranaires. (Carswell EA et al., 1975). Le TNF α est libéré par les leucocytes, l'endothélium et d'autres tissus généralement en réponse à un dommage, par exemple une infection. Sa libération est stimulée par plusieurs autres médiateurs, comme l'IL1 ou l'endotoxine bactérienne. Il possède plusieurs actions sur divers organes et systèmes, généralement en coopération avec les IL1 et IL6.

Ses effets sur l'hypothalamus sont:

- stimulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire, via la libération de l'hormone corticotrope ou *corticotropin releasing hormone* (CRH) ;
- suppression de l'appétit (d'où son nom de "cachexine" - la cachexie étant une perte de poids sévère lors de processus pathologiques);
- fièvre;

Ses effets sur le foie: stimulation de la phase de réponse aiguë, conduisant à une augmentation de la protéine C réactive et d'autres médiateurs ;

Son effet sur les neutrophiles: il attire très efficacement les PMNs et les aide à adhérer à la paroi des cellules endothéliales, d'où elles sortiront par diapédèse.

Son effet sur les macrophages: stimulation de la phagocytose, production d'IL-1, d'oxydants et de lipides pro-inflammatoires, par exemple la (PGE2).

Son effet sur d'autres tissus: augmentation de la résistance à l'insuline. (Carswell EA et al., 1975).

2.1.2. Les chimiokines

Les chimiokines sont des cytokines chimiotactiques, produites de façon générale par les leucocytes, qui permettent le recrutement des leucocytes au site de l'inflammation. Plusieurs chimiokines présentent une sélectivité envers un sous-type de leucocytes donné. Elles regroupent plus de 40 peptides avec un poids moléculaire entre 8 et 10 kDal et

partagent des séquences homologues considérables. Il existe au moins quatre familles de chimiokines classifiées en fonction de leur séquence primaire. La famille α , ou CXC ont deux cystéines du domaine N-terminal séparées par un acide aminé (représenté par un X), par exemple le CXCL8, selon la nomenclature systématique, mieux connue sous la terminologie d'IL8 qui est une chimiokine puissante pour les neutrophiles. La famille β ou CC ont deux cystéine adjacentes dans le domaine N-terminal (Laing et al., 2004), par exemple le CCL-2, aussi connu sous la terminologie de *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) et le CCL5 ou RANTES. Les β chimiokines sont chimiotactiques pour une variété de leucocytes incluant les basophiles, les monocytes, les éosinophiles et les lymphocytes. Les chimiokines- α fonctionnent de concert avec les chimiokines- β et les cytokines pour réguler la réponse inflammatoire. La famille CX3C ou delta, dont l'unique membre est la fractalkine (ou neurotactine ou CX3CL1), possède trois acides aminés entre les deux premières cystéines. Les chimiokines-CX3C, représentées par la fractalkine possèdent un domaine hydrophile extracellulaire de 77 a.a. et un domaine hydrophobe de 18 a.a. qui permettent son implantation dans la membrane plasmique. La fractalkine se trouve à la surface des cellules endothéliales et de certaines cellules du cerveau. Le domaine extracellulaire peut être protéolysé libérant une chimiokine soluble chimiotactique pour les monocytes, les lymphocytes T et les neutrophiles. Enfin, il y a la famille C ou gamma, dont les membres ne possèdent qu'une seule cystéine. Les membres de la sous-famille, lymphotactine (XCL1) et SCM-1 β (single cysteine motif 1 β ou XCL2) ont leurs gènes localisés sur le chromosome 1 humain dans la région q23. La lymphotactine et la SCM-1 β sont chimiotactiques pour les lymphocytes.

Les récepteurs des chimiokines appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ces récepteurs sont divisés en 4 familles selon le ligand (CC, CXC, CX3C et C), soit de la famille CXC, d'où le récepteur CXCR ou encore CC, d'où le récepteur CCR. Ils se partagent plusieurs caractéristiques structurales, dont une séquence d'environ 350 acides aminés, un domaine N-terminal court, 7 domaines transmembranaires avec trois hélices intracellulaires et trois hélices extracellulaires hydrophiliques, et un domaine intracellulaire C-terminal contenant des résidus sérine et thréonine importants pour la régulation du récepteur (désensibilisation) (Murdoch and Finn, 2000). Les récepteurs de chimiokines s'associent avec les protéines G pour transmettre la signalisation cellulaire suivant la liaison du ligand. L'activation des protéines G par les récepteurs des chimiokines causent l'activation subséquente d'une enzyme, dont la phospholipase C (PLC). La PLC entraîne le clivage du phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP₂) en 2 messagers secondaires, soit l'inositol triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) qui dirigent les événements du signal intracellulaire. DAG active une autre enzyme appelée protéine kinase C (PKC) tandis que l'IP₃ dirige la libération du calcium des compartiments intracellulaires. Ces événements contrôlent plusieurs cascades de signalisation (comme la voie de la MAP kinase) qui génère des réponses comme la chimiotaxie, la dégranulation, la libération de l'anion superoxyde et les changements dans l'expression des molécules d'adhérence cellulaire, les intégrines. (Murdoch and Finn, 2000).

2.1.3. Les médiateurs lipidiques

Les médiateurs lipidiques regroupent les leucotriènes, les lipoxines (LX), le facteur d'activation plaquettaire (PAF) les prostaglandines (Louis et al., 2005), les résolvines et les protectines (Serhan et al., 1984).

2.1.4. Les lipoxines

Les LX sont des écosanoïdes non classiques qui jouent un rôle important dans la résolution de l'inflammation. Les LX sont des ligands de haute affinité pour le récepteur de la LXA₄ (LXA₄R), dont la signalisation inhibe la chimiotaxie, la transmigration, la génération du superoxyde et l'activation de NF-κB (Chiang et al., 2005). D'une façon similaire aux leucotriènes, le LXA₄ va former les lipoxines cystéinyles: LXC₄, LXD₄ et LXE₄ (Powell WS et al., 1995). À des concentrations sous nanomolaires, LXA₄ et LXB₄ inhibent les interactions stimulées par les leucotriènes chez les neutrophiles humains et les cellules endothéliales (Papayianni et al., 1996) Les LX ont un effet antagoniste envers les récepteurs des leucotriènes cystéinyles de type 1 (CysLT1) permettant à plusieurs leucotriènes (LTC₄, LTD₄ et LTE₄) de médier la contraction des muscles lisses (Papayianni et al., 1996). Les récepteurs CysLT1 sont aussi le site d'action du médicament montelukast dans l'asthme (Drazen et al., 1999). Durant l'inflammation, les cellules meurent par apoptose, les LX stimulent les macrophages pour le nettoyage de ces

cellules par phagocytose (Mitchell et al., 2002). Durant le processus de l'inflammation aiguë, les cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron gamma (IFN- γ) et l'IL-1 β peuvent induire l'expression des médiateurs anti-inflammatoires comme les lipoxines et l'IL-4 qui contrôlent la phase de résolution de l'inflammation (McMahon et al., 2006).

2.1.5. Les prostaglandines

Les prostanoides est un terme utilisé pour décrire une sous classe d'écosanoïdes comprenant les prostaglandines, les thromboxanes et les prostacyclines. La prostaglandine synthétase ou cyclooxygénase (COX) catalyse la conversion de l'AA en prostanoides par deux fonctions enzymatiques : une fonction dite cyclooxygénase, responsable de l'oxydation de l'acide arachidonique en PGG₂ suite à l'insertion de deux molécules d'O₂⁻ et une fonction peroxydase qui réduit les PGG₂ en PGH₂ (Smith W.L. et al., 1991). Il existe 2 types de PGHS : PGHS-1 et PGHS-2 ou COX-1 et COX-2 qui catalysent toutes les deux la formation des PGH₂ à partir de l'acide arachidonique. La PLA₂ et la COX transforment les phospholipides membranaires en PGH₂, qui est ensuite converti par des enzymes spécifiques des tissus en prostacycline, prostaglandines et thromboxane. La PGH₂, après avoir été synthétisé par les COX, est transformé par des synthétases différentes en PGD₂, PGE₂, PGF_{2a} ou TXA₂ (Romina Claudia., 2002).

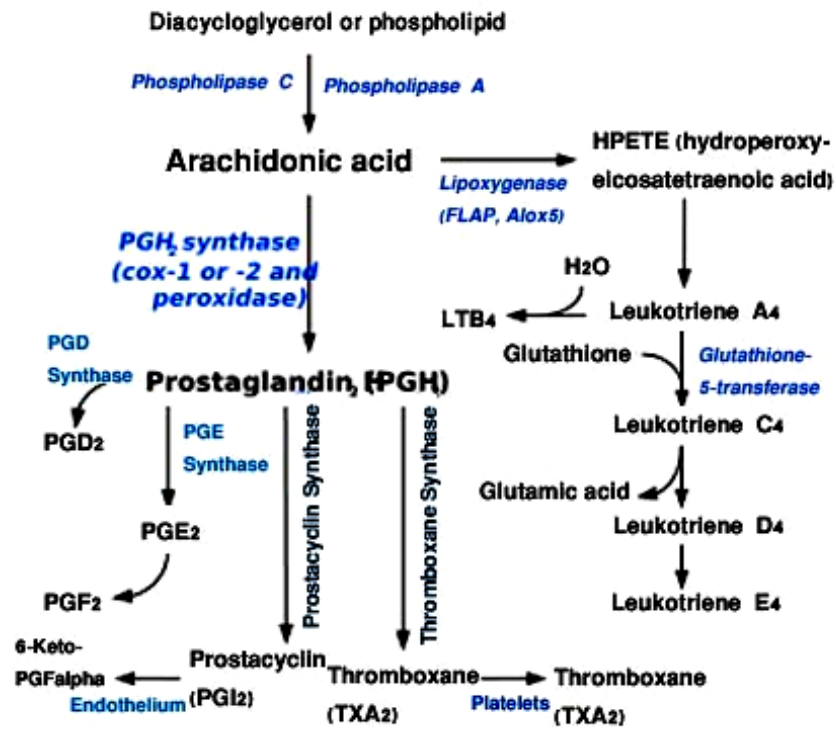


Figure 6: Conversion de la PGH₂. Cette figure montre comment la PGH₂ (dérivée de l'acide arachidonique) est métabolisée (Romina Claudia Capoccia., 2002).

- Par la PGE synthétase en PGE₂ (qui est de retour converti en PGF₂)
- Par la PGD synthétase en PGD₂
- Par la prostacycline synthétase en prostacycline (PGI₂)
- Par la thromboxane synthétase en thromboxanes

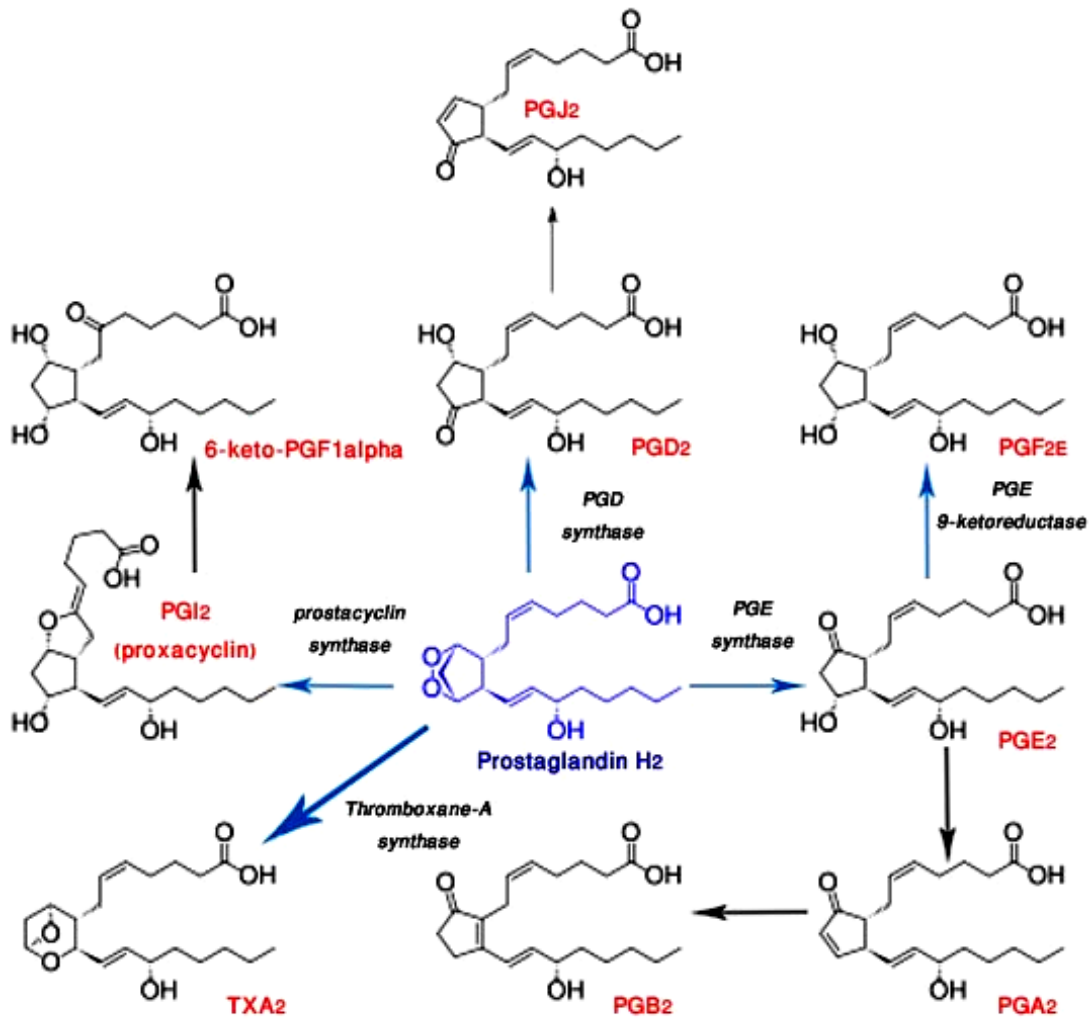


Figure 7: une voie synthétique de la PGH₂ (les composés parents) en prostaglandines, prostacyclines et thromboxane (Romina Claudia Capoccia., 2002).

2.1.6. Les leucotriènes

Le nom *leucotriène*, vient du mot *leucocyte* et *triène* (indiquant les trois doubles liens conjugués). La famille des leucotriènes regroupe le LTA₄, le LTB₄, le LTC₄, le LTD₄ et le LTE₄, qui sont des acides gras insaturés de 20 carbones avec quatre liaisons doubles. Trois de ces liaisons constituent le triène conjugué et deux groupements polaires dont une fonction hydroxyle en C₅ et une fonction hydroxyle ou cystéine en C₆ ou C₁₂. Ces leucotriènes sont générés par la voie de la 5-lipoxygénase (5-LO) (Borgeat et al., 1985 – Borgeat, 1989). LTC₄, LTD₄ et LTE₄ sont souvent nommés leucotriènes cystéinyles à cause de la présence d'un acide aminé dans leur structure.

2.1.6.1. Le leucotriène B₄

Le leucotriène B₄ est un acide gras dihydroxylé, formé à partir de l'acide arachidonique par la voie 5-LO.

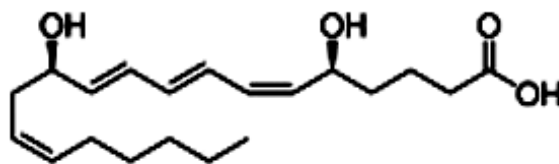


Figure 8. Représentation schématique du leucotriène B₄

Les principales fonctions biologiques du LTB₄ sont le recrutement et l'activation des cellules inflammatoires, en particulier les neutrophiles et les lymphocytes (Ford-Hutchinson., 1990). Le LTB₄ a aussi un rôle important dans la régulation de l'apoptose des neutrophiles (Lee et al., 1999). Le LTB₄ est produit principalement par les macrophages et les neutrophiles (Hubbard et al., 1991), des cellules qui entraînent le processus de l'inflammation chronique. Le LTB₄ perpétue sa propre production d'une manière autocrine, un mécanisme pour perpétuer l'inflammation (Borgeat, 1989 – Sirois et al., 1997). Chez le neutrophile, le LTB₄ exerce ces effets chimiotactiques et chimiocinétiques, augmente leur adhérence, dégranulation et production d'anion superoxyde par sa liaison à un récepteur spécifique du LTB₄, le BLT1. (Yokomizo et al., 1997). Le BLT2, un deuxième récepteur du LTB₄, fonctionne comme un récepteur de faible affinité pour l'ensemble des ligands écosanoïdes, et médie des rôles biologiques et physiopathologiques distincts du BLT1. Immédiatement après que le LTB₄ se lie à son récepteur, les niveaux intracellulaires de Ca²⁺ augmentent de façon transitoire, un indicateur très précoce de la stimulation du neutrophile et de l'activation cellulaire. (Richter et al., 1990).

Le LTB₄ augmente aussi la perméabilité vasculaire et induit l'expression des molécules d'adhérence, comme l'intégrine MAC-1 (CD11b/CD18) chez les PMNs (Morgan et al., 1995). Le LTB₄ contribue non seulement à l'accumulation des neutrophiles mais aussi à celle des macrophages, des lymphocytes T, et des éosinophiles au site de

l'inflammation. Le LTB_4 a été suggéré comme un médiateur important dans la pathophysiologie de nombreuses pathologies dont la maladie pulmonaire obstructive chronique, l'asthme sévère, l'arthrite rhumatoïde, la fibrose kystique... etc.

2.1.6.2. La synthèse des leucotriènes

La synthèse des leucotriènes a lieu au niveau de la membrane périmoléculaire par le métabolisme de l'acide arachidonique par la 5-LO, le mécanisme catalytique impliquant l'insertion d'un oxygène dans une position spécifique dans l'épine dorsale de l'acide arachidonique. La 5-LO est une enzyme soluble monomérique de 78 kDal (Dixon et al., 1990 – Matsumoto et al., 1988) son activité dépend de l'augmentation du calcium intracellulaire et de l'ATP.

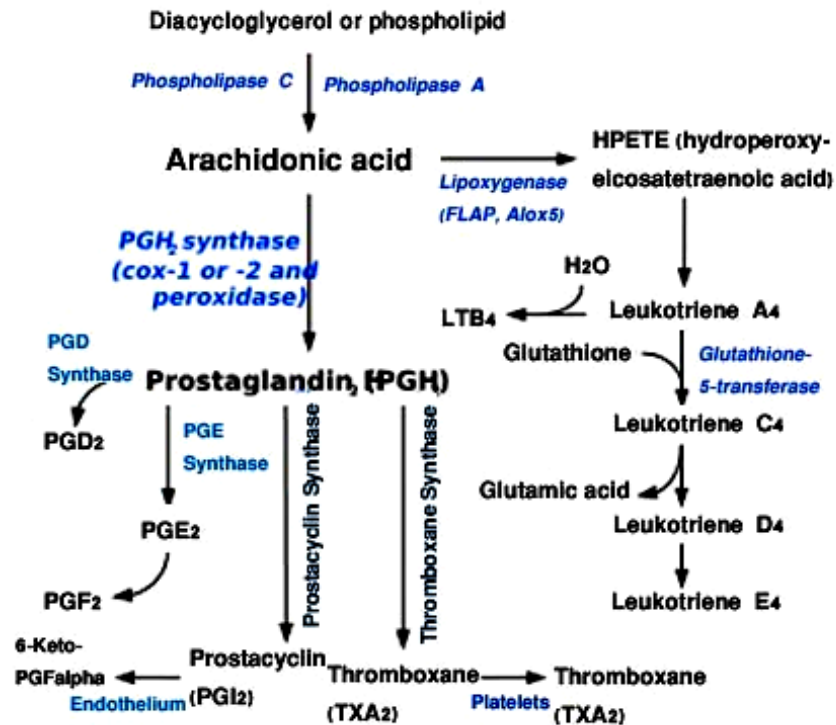


Figure 9. La synthèse des leucotriènes (Romina Claudia Capoccia., 2002).

La voie de la lipoxygénase est activée chez les leucocytes, incluant les mastocytes les éosinophiles, les neutrophiles, les monocytes et les basophiles. Lorsque ces cellules sont activées, l'acide arachidonique est libéré des phospholipides de la membrane périmoléculaire par la phospholipase A₂, et présenté par la 5-LO activating protein (FLAP) à la 5-LO.

La 5-LO utilise la FLAP pour convertir l'acide arachidonique en acide 5-hydroperoxyéicosatétraénoïque (5-HPETE), qui est spontanément réduit en acide 5-hydroxyéicosatétraénoïque (5-HETE). L'enzyme 5-LO agit encore sur 5-HPETE pour la convertir en leucotriène A (LTA_4), un époxyde instable.

Chez les cellules qui expriment l'enzyme LTA_4 hydrolase, comme les neutrophiles et les monocytes, le LTA_4 est converti en LTB_4 , qui est un médiateur chimiotactique puissant pour les neutrophiles par la signalisation des récepteurs BLT_1 et BLT_2 membranaires.

Chez les cellules qui expriment la LTC_4 synthétase, comme les mastocytes et les éosinophiles, le LTA_4 est conjugué avec le tripeptide glutathione pour former le premier cystéinyl-leucotriène, LTC_4 . Á l'extérieur de la cellule, le LTC_4 peut être converti par une enzyme ubiquitaire pour former successivement le LTD_4 et le LTE_4 , qui assurent des fonctions biologiques y compris l'augmentation de la migration des polynucléaires neutrophiles et des éosinophiles, l'agrégation des neutrophiles et des monocytes, l'adhérence des leucocytes, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la contraction des muscles lisses.

Les cystéinyl-leucotriènes agissent au niveau de leurs récepteurs de la surface cellulaire $CysLT1$ et $CysLT2$ dans les cellules musculaires bronchique et vasculaire, conduisant à la bronchoconstriction et à une augmentation de la perméabilité des petits vaisseaux sanguins, respectivement. Le LTB_4 et les cystéinyl-leucotriènes (LTC_4 , LTD_4 , LTE_4) sont

respectivement) (Birk et al., 2001). Une grande puissance de BIIL 284 a été démontrée dans plusieurs modèles inflammatoire *in vivo*. Par exemple, BIIL 284 inhibe l'inflammation locale (lobe de l'oreille) chez la souris induite par le LTB₄ avec une DE₅₀ = 0.008 mg/kg (p.o). BIIL 284 a aussi inhibé la chimiotaxie des neutrophiles induite par le LTB₄ au niveau du derme chez les cobayes avec un DE₅₀ = 0.03 mg/kg p.o., de même que la neutropénie induite par le LTB₄ chez le singe (DE₅₀ = 0.004 mg/kg p.o.), et l'expression de MAC-1 chez le singe induite par LTB₄ (DE₅₀ = 0.05 mg/kg p.o.). Le blocage complet des récepteurs de LTB₄ durant 24 heures a été atteint avec 0.3 mg/kg de BIIL 284 après une seule dose orale le singe. Ainsi, le BIIL 284 est un antagoniste des récepteurs de LTB₄ puissant et présentant une longue durée d'action. (Birk et al., 2001). Cet antagoniste a été utilisé dans nos études pour sa puissance et sa bioactivité chez le lapin.

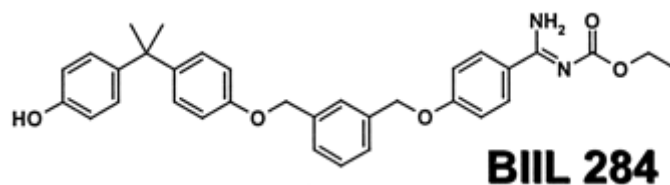


Figure 10. Représentation schématique du BIIL 284

2.1.7. Le facteur d'activation plaquettaire

Le PAF (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) a été découvert par l'immunologiste français Jacques Benveniste en 1970. (Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG ,1972), (Benveniste J, 1974). Sa structure a été élucidée par Constantinos A. Demopoulos en 1979. (Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ, 1979).

Le PAF appartient à la famille des esters phosphorylcholine (Johnson, 1999). Il est synthétisé et libéré par les cellules endothéliales (Camussi et al., 1983), les plaquettes (Chignard et al., 1979), les neutrophiles (Sisson et al., 1987 – Lynch et al., 1979), les macrophages et les monocytes (Mencia-Huberta et Benveniste, 1979 – Camussi et al., 1983), les éosinophiles et les mastocytes (Borgeat et al., 1985).

La synthèse du PAF est étroitement liée à la production du LTB₄ et du 5-HPETE par les neutrophiles adhérents (Sisson et al. 1987), dû à l'effet du PAF qui augmente la biosynthèse de LTB₄ de façon paracrine (McDonald et al., 1994), (Borgeat et al., 1985).

Le PAF augmente aussi la chimiotaxie et l'adhésion des neutrophiles et permet le relâchement de l'anion superoxyde par les leucocytes (Guthrie et al., 1984). Le PAF augmente aussi la perméabilité vasculaire (Humphrey et al.,1982), le relâchement d'histamine (Benveniste et al., 1972), l'agrégation et la dégranulation des plaquettes (Benveniste et al., 1972) et aussi la dégranulation et la sécrétion des élastases des neutrophiles (Fittschen et al., 1985).

2.1.7.1. La biosynthèse du PAF

Le PAF est un médiateur pro-inflammatoire important qui peut agir de manière autocrine et paracrine. Il est synthétisé à partir d'un précurseur inactif, le lyso-PAF (Johnson, 1999) par deux voies:

1- La voie de *novo*: celle-ci est constitutive et s'effectue selon deux voies enzymatiques distinctes (Woodard et al., 1987). Elle peut se faire par l'acétylation de 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine par l'acétyltransférase alkylglycérophosphate (AGP) ou par le transfert de la base phosphocholine au groupement 1-alkyl-2-acétyl-sn-glycérol par l'enzyme choline phosphotransférase à l'aide de CDP-choline (cytidine-5-diphosphate choline). Cette voie de *novo* permet de synthétiser le PAF nécessaire pour les fonctions physiologiques de base (Snyder et al., 1996).

2- La voie inductible de remodelage: celle-ci est inductible en réponse à une stimulation spécifique ou la synthèse se fait via le remodelage des phospholipides membranaires, elle est activée après une stimulation inflammatoire (Johnson, 1999) c'est à dire que cette voie est activée durant l'inflammation. L'activation de la PLA₂ cytosolique permet de catalyser l'hydrolyse de résidus d'acide gras en position sn-2 à partir d'un alkyl choline phosphoglycéride en formant un intermédiaire, le 1-O-alkyl-sn-glycéro-3-phosphocholine ou le lyso-PAF et des acides gras libres (Prescott et al., 1990). Après cette étape vient l'acétylation du lyso-PAF par l'acétyltransférase pour former le PAF. La dégradation du PAF est induite à l'aide d'un acétylhydrolase hautement spécifique pour

les phospholipides, cette dégradation a lieu lorsque le PAF n'est plus nécessaire dans l'inflammation.

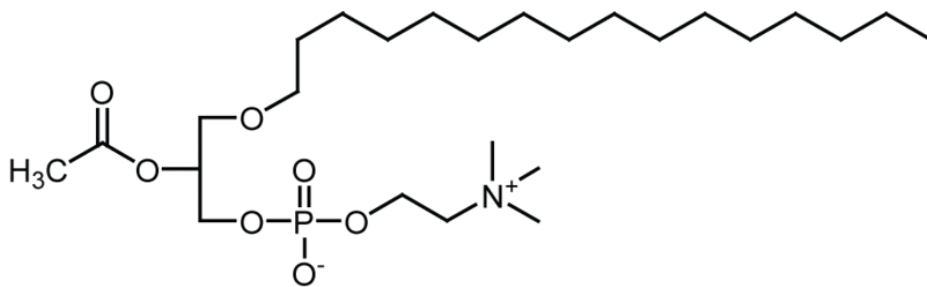


Figure 11. Représentation schématique du PAF

2.1.7.2. Antagonistes sélectifs des récepteurs du PAF

Plusieurs antagonistes sélectifs des récepteurs du PAF ont été synthétisés, et même si plusieurs ont fait l'objet d'études cliniques, aucun n'a été commercialisé à ce jour. Le WEB-2086 a été utilisé dans nos études en raison de sa disponibilité et de sa biodisponibilité par voie orale chez le lapin.

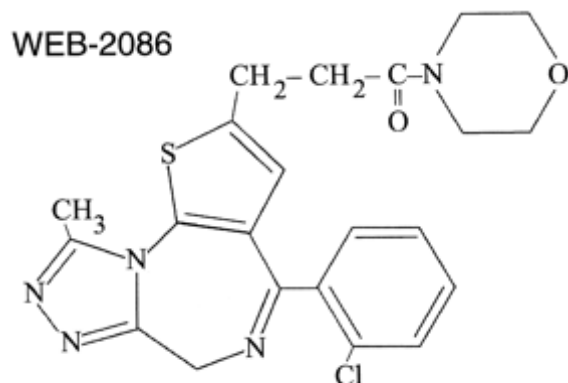


Figure 12. Représentation schématique du WEB 2086

WEB 2086 est un antagoniste des récepteurs du PAF (PAFR) d'une grande spécificité, dont la structure dérive des triazolobenzodiazépines anxiolytiques, le nom chimique du WEB 2086 est: 3-[4-(2-chlorophenyl)-9-méthyl-6*H*-thieno[3,2-*f*][1,2,4]triazolo[4,3-*a*][1,4]-diazépine-2-yl]-1-(4-morphonlinyl)-1-propanone. (Cellai et al., 2002).

Le WEB 2086 est actif autant *in vitro* que *in vivo* (Casals-Stenzel et al., 1987). Il inhibe l'agrégation des plaquettes et des neutrophiles avec un $Cl_{50} = 0,17$ et $0,36 \mu\text{M}$, respectivement. Il est actif chez différentes espèces dont le cobaye, le rat et le lapin.

3. L'ischémie-reperfusion (I/R)

3.1. Définition

Le rétablissement de la circulation sanguine après l'ischémie s'ajoute d'une façon paradoxale au dommage effectué par l'ischémie prolongée (Nano bashvili et al., 2002). Ce phénomène est nommé l'ischémie-reperfusion (I/R), qui est caractérisée par les désordres de la perfusion et la formation de l'œdème interstitiel comme résultat de la constriction de l'endothélium capillaire et l'augmentation de la perméabilité (Huk et al., 1998). La reperfusion des tissus ischémiques résulte en la génération de l'anion superoxyde (Huk et al., 1998), (Huk et al., 2000), ainsi que d'autres radicaux libres dérivés d'oxygène extrêmement réactifs (Huk et al., 2000). Les radicaux libres dérivés de l'oxygène entraînent la peroxydation des lipides (Idstrom et al., 1990), et par conséquence, l'interruption de l'intégrité des fonctions de transport des membranes cellulaires (Roth et al., 1998). Les voies de la production de l'anion superoxyde incluent la voie hypoxanthine-xanthine oxydase (McCord et al., 1985), l'activation des leucocytes polymorphonucléaires (Hernandez-Maldonado et al., 1992), le transport mitochondrial d'électrons, l'oxydation des catécholamines et le métabolisme des prostaglandines (Nanobashvili et al., 2002).

3.2. L'I/R des membres inférieurs

La restauration de la circulation sanguine dans les membres inférieurs ischémiques est essentielle pour prévenir le dommage tissulaire irréversible. La reperfusion peut résulter en une réponse inflammatoire locale et systémique, qui entraîne une augmentation des dommages tissulaires beaucoup plus importante que dans l'ischémie à elle seule. Les dommages tissulaires après la reperfusion des tissus ischémiques viables dans les membres inférieurs, sont nommés ischémie-reperfusion des membres inférieurs. Cette I/R est caractérisée par la production d'oxydants, l'activation du complément, l'adhésion des cellules endothéliales et leucocytaires, l'agrégation des plaquettes et des leucocytes, l'augmentation de la perméabilité microvasculaire et la diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium (Carden and Granger, 2000). Dans les cas les plus sévères l'I/R peut entraîner le dysfonctionnement de plusieurs organes et la mort.

La reperfusion des membres inférieurs ischémiques entraîne une augmentation beaucoup plus importante des dommages tissulaires que ceux induits par l'ischémie toute seule. Par exemple, les changements histologiques observés après 3 heures d'ischémie des membres inférieurs suivies de 2 heures de reperfusion sont beaucoup plus importants que ceux observés après 4 heures d'ischémie seule sans reperfusion.

De plus, l'I/R des membres inférieurs entraîne des dommages dans les organes non ischémisés tels que les poumons, le foie et les intestins.

3.3. Rôle du neutrophile dans l'I/R des membres inférieurs

L'I/R des membres inférieurs est caractérisée par l'activation des leucocytes, la chimiotaxie, l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales et leur transmigration (Carden and Granger, 2000). L'interaction du leucocyte avec l'endothélium vasculaire se fait via une série d'étapes distinctes caractérisées par le roulement sur l'endothélium, l'adhésion ferme du leucocyte à l'endothélium et la transmigration endothéliale (Springer TA, 1994). La première étape débute par l'augmentation de l'expression endothéliale de la sélectine-P (CD62P) induite par l'I/R, qui se lie avec son récepteur au niveau des leucocytes, la P-sélectine glycoprotéine-1 (PSGL-1). Cette affinité basse initiale résulte de la liaison intermittente entre les PMNs et l'endothélium et donne lieu au roulement du leucocyte à la surface endothéliale. L'adhérence ferme du leucocyte à l'endothélium résulte de l'interaction subséquente des intégrines leucocytaires $\beta 2$ (CD11a/CD18 et CD11b/CD18) avec les molécules d'adhérence endothéliale intercellulaires-1 (ICAM-1). La transmigration des leucocytes dans le compartiment interstitiel est facilitée par les *platelet endothelial cell adhesion molecules-1* (PECAM-1) exprimées constitutivement le long des jonctions des cellules endothéliales. Pour atteindre le compartiment extravasculaire, les leucocytes activés libèrent les ROS toxiques, les protéases et les élastases entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité microvasculaire, l'œdème, la thrombose et la mort des cellules du parenchyme (Carden and Granger, 2000). L'accumulation des PMNs dans le

compartiment extravasculaire est aussi facilitée par l'interleukine 8 (IL-8) libérée des tissus hypoxiques et formant un gradient chimiotactique qui dirige les neutrophiles de l'espace intravasculaire vers l'interstitium hypoxique (Colgan et al., 1996).

3.4. Les effets vasculaires de l'hypoxie

La pathogénèse de l'I/R débute par une hypoxie de l'endothélium vasculaire qui n'est pas seulement une barrière vasculaire, mais qui est aussi responsable du trafic des PMNs (Kong et al, 2004), (Springer TA, 1994). L'hypoxie active aussi bien les voies transcriptionnelles que non transcriptionnelles, et plusieurs similitudes existent entre les réponses des tissus à l'hypoxie et à l'inflammation aiguë. (Kong et al, 2004),(Tamura et al., 2002). Par exemple, Plusieurs mécanismes endogènes existent pour protéger la barrière vasculaire durant l'ischémie. Les PMNs actifs libèrent une variété de médiateurs solubles qui régulent la perméabilité vasculaire incluant les glutamates (Collard et al., 2002), et les nucléotides adényliques (sous forme d'ATP ou d'adénosine monophosphate AMP) qui, par leur conversion métabolique, libèrent l'adénosine à la surface vasculaire (Eltzschig et al., 2004), (Eltzschig et al., 2003), (Synnestvedt et al., 2002). L'adénosine protège en particulier les fonctions de la barrière endothéliale microvasculaire dans le rétablissement du contact cellules - cellules suite à la transmigration des PMNs par la stimulation des récepteurs de l'adénosine (AdoRA_{2B}) (Lennon et al., 1998). De l'autre côté, les PMNs activés par l'engagement des intégrines

β_2 libèrent aussi des facteurs solubles qui peuvent induire le réarrangement du cytosquelette et augmenter la perméabilité vasculaire (Gautam et al., 2001). Un facteur de perméabilité dérivé des PMNs est la protéine liant l'héparine (HBP), aussi connue sous la terminologie d'azurocidine ou CAP37, qui est un membre de la famille des serprocidines, de la famille des peptides cationiques (Gautam et al., 2001). L'HBP, contrairement à d'autres protéines des granules des neutrophiles (comme l'élastase et la cathepsine G), induit le changement du cytosquelette calcium-dépendant dans les cellules endothéliales en culture, et dirige les fuites macromoléculaires *in vivo*. Les neutrophiles qui émigrent permettent à l'HBP de se lier à la surface endothéliale, permettant ainsi de médier ces effets sur l'adhésion des monocytes.

3.4.1. Le rôle des ROS

La reperfusion des tissus ischémiques entraîne la formation des ROS incluant l'anion superoxide (O_2^-) le radical hydroxyle (OH^\cdot), l'acide hypochloreux (HOCl), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le peroxy-nitrite dérivé du NO (Kaminski et al., 2002). L'ischémie et l'hypoxie favorisent la conversion de la *xanthine déshydrogénase* en *xanthine oxydase* et l'accumulation de son substrat, l'*hypoxanthine*. Lorsque l'oxygène est réintroduit durant la reperfusion, la conversion de l'excès de l'hypoxanthine par la xanthine

oxydase entraîne la formation des ROS toxique. (Li C and Jackson RM, 2002), (Berry CE, and Hare JM, 2004).

Les ROS peuvent causer des dommages tissulaires via plusieurs mécanismes, dont la peroxydation des lipides membranaires (Li C and Jackson RM, 2002), (Toyokuni S, 1999), l'activation des leucocytes et leur chimiotaxie, par l'induction de la phospholipase A2, et la biosynthèse des écosanoïdes (comme la thromboxane A2 et le LTB₄), (Toyokuni S, 1999). Finalement, les ROS augmente l'expression des gènes pour les molécules d'adhérence des leucocytes et les cytokines par l'activation des facteurs de transcription comme le facteur nucléaire κB (NF- κB) et l'activation protéine 1 (AP-1).

3.4.2. Rôle des médiateurs lipidiques dans l'I/R

3.4.2.1. Rôle du PAF

Bien que la reperfusion du lit vasculaire ischémique soit essentielle à la survie du tissu, la reperfusion des tissus ischémiques est associée à une activation locale et systémique des leucocytes, du dysfonctionnement de la barrière endothéliale dans les veinules post-capillaires, de l'augmentation de la production des médiateurs inflammatoires et une grande léthalité. (Lefer & Lefer, 1996), (Granger, 1999) (Carden and Granger, 2000).

Le PAF est parmi les médiateurs libérés dans la cascade inflammatoire qui sont

importants pour les dommages associés à la reperfusion. (Kubes et al., 1990a,b), (Montrucchio et al., 2000), (Souza et al., 2000b). Le PAF est un phospholipide naturel qui sous les conditions physiologiques, est faiblement produit. Cependant durant l'inflammation aiguë ou sous les conditions de stress oxydatif comme il arrive durant l'I/R, le PAF est libéré par les neutrophiles ou les monocytes et exprimé sur la face externe des cellules endothéliales (Montrucchio et al., 2000). Une fois libéré, l'activation des récepteurs du PAF (PAFR) résulte en diverses activités biologiques associées avec l'inflammation aiguë, incluant l'activation des neutrophiles et la chimiotaxie, l'altération de la perméabilité vasculaire et l'activation des plaquettes, où le tout contribue aux manifestations cliniques de l'I/R (Montrucchio et al., 2000). Les effets du traitement avec les antagonistes du PAFR, le UK74,505 et le WEB 2086, dans des modèles d'I/R sévère chez le rat (Souza et al., 2000b) ont montré une réduction de l'augmentation de la perméabilité vasculaire. En outre, l'activation du PAFR a montré un rôle important dans la pathophysiologie des modèles d'I/R dans plusieurs autres territoires vasculaires, incluant le cœur, l'intestin, le rein et le poumon, (Canale et al., 1994), (Carter et al., 1996), (Riera et al., 1997), (Qayumi et al., 1998), (Morgan et al., 1999), (Kecskemeti & Balogh 2000), (Kim et al., 2000), (Sun et al., 2001, 2002). De plus, le rôle du PAF a été confirmé durant l'I/R par l'utilisation des souris modifiées génétiquement, déficientes en PAFR (PAFR^{-/-}) (Suza et al., 2003).

Cependant, parmi les stratégies thérapeutiques pour prévenir l'I/R médiée par les leucocytes, l'inhibition des médiateurs inflammatoires comme le PAF et le LTB₄ peut être efficace.

3.4.2.2. Rôle du LTB₄

L'I/R entraîne des dommages locaux et des dommages dans les organes éloignés, qui sont caractérisés par l'accumulation des neutrophiles activés et l'œdème tissulaire qui résulte de l'augmentation de la perméabilité vasculaire durant la période de reperfusion. Les leucotriènes sont parmi les médiateurs lipidiques pro-inflammatoires synthétisés à partir de l'acide arachidonique par la voie de la 5-LO (Keppler, D, 1992). Les leucotriènes ont été associés avec l'I/R dans différents tissus, entre autres le cerveau (Rao et al, 1999), l'intestin (Souza et al., 2000), le rein (Noiri et al., 2000), le myocarde (Rossoni et al., 1996), les membres inférieurs (Chiang et al., 1999) et le foie (Hughes et al., 1992), (Gulluoglu et al., 1996).

Le LTB₄ est un des facteurs chimiotactiques les plus puissants pour les neutrophiles (Ford-Hutchinson, 1990). Le LTB₄ est reconnu par son activation des neutrophiles et l'induction de leur recrutement *in vivo* (Salmon and Garland, 1991), (Marleau et al., 1999). Le LTB₄ peut stimuler la chimiotaxie du neutrophile, leur agrégation, la

flambée respiratoire, la dégranulation et l'adhésion aux cellules endothéliales vasculaires (Powell et al.,1996). On a décrit récemment les effets d'un traitement avec l'antagoniste des récepteurs BLT, le CP,105,696 et le LY 255,283 dans un modèle d'ischémie et reperfusion (Souza et al, 2000a). Dans ce modèle, l'antagoniste du récepteur du LTB₄ a effectivement inhibé les changements de perméabilité vasculaire, mais le traitement n'a pas altéré d'une façon significative le recrutement des neutrophiles dans la majorité des tissus affectés (Souza et al, 2000a). Plus récemment il a été démontré qu'il y'a une production substantielle de LTB₄ dans le tissu intestinal suite à l'I/R de l'artère mésentérique supérieure (Souza et al., 2001).

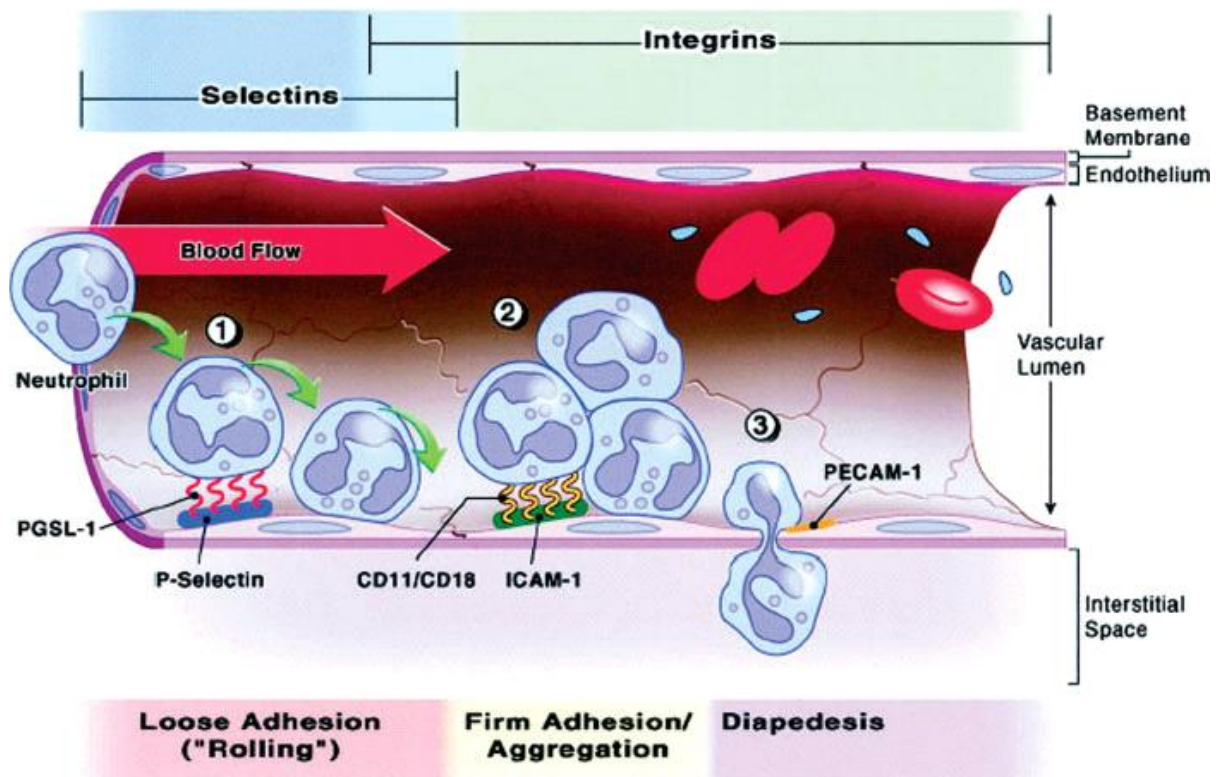


Figure 13. L'I/R induit l'adhésion leucocyte-cellule endothéliale et la transmigration.

Les interactions leucocyte-cellule endothéliale sont médiées via une série d'étapes distinctes: (1) le roulement du leucocyte initié par l'augmentation de l'expression de la sélectine-P endothéliale induite par l'I/R qui se lie avec son récepteur au niveau du leucocyte, la PGSL-1. (2) L'interaction des intégrines- β 2 CD11a/CD18 et CD11b/CD18, avec l'ICAM-1 endothéliale entraîne l'adhésion ferme et l'agrégation. (3) La transmigration du leucocyte dans le compartiment interstitiel est facilitée par PECAM-1

dans les jonctions des cellules endothéliales. (Reproduit de Collard and Gelman., 2001.

Anesthesiology, 94, 1133–8.)

4. Choix du modèle expérimental

Les lapins New-Zealand mâles ont été choisis pour la réalisation de nos expérimentations de par leur sensibilité aux différents stimuli inflammatoires, leur réponse aux antagonistes utilisés, et la possibilité de tester plusieurs stimuli inflammatoires chez le même animal dans le modèle de l'inflammation dermique, où nous avons pu administrer jusqu'à 80 injections intradermiques sur le dos du lapin. Ceci permet de réduire le nombre d'animaux utilisés, et de réduire la variabilité interindividuelle dans nos comparaisons de l'effet des drogues sur différents agonistes

De plus, au niveau anatomique, la ligature de l'artère fémorale à l'aide de clips, que nous pouvons enlever tout simplement sans abimer l'artère, facilite les manipulations lors de la reperfusion au cours des expérimentations dans le modèle de l'I/R des membres inférieurs.

5. Objectifs de l'étude et hypothèse de recherche

Les LTs et le PAF sont des médiateurs lipidiques très puissants de l'inflammation, ils règlent les fonctions des neutrophiles incluant la migration, l'expression des molécules d'adhérence, la sécrétion d'enzymes et de métabolites réactifs de l'oxygène. Bien que la migration des neutrophiles du sang vers les espaces extravasculaires est un processus essentiel pour les mécanismes de défense de l'organisme, cette fonction peut aussi être

préjudiciable dans certains contextes pathologiques. Notre projet a été consacré à l'élucidation du rôle du LTB₄ et du PAF dans la régulation du trafic des PMNs au foyer inflammatoire.

Les objectifs de notre recherche sont :

- Étudier l'effet d'antagonistes sélectifs des récepteurs du LTB₄ et du PAF dans un modèle d'inflammation dermique chez le lapin afin de déterminer les doses optimales à utiliser chez ce modèle expérimental. Les antagonistes ont été administrés seuls ou en association par gavage oral avant l'induction de l'inflammation. La réponse inflammatoire a été induite dans le derme par l'injection de différents médiateurs (TNF, IL-8, C5a et fMLP), outre le LTB₄ et le PAF. Ce modèle a permis de vérifier l'effet des antagonistes sur la migration des PMNs, la perméabilité vasculaire et le débit sanguin.
- Étudier le rôle des médiateurs LTB₄ et PAF dans les dommages à des organes éloignés du site d'ischémie et de reperfusion (membres inférieurs) par une approche pharmacologique utilisant les antagonistes sélectifs des récepteurs du LTB₄ et du PAF chez le lapin. .

Nous résultats montrent de façon très convaincante un effet coopératif des médiateurs lipidiques dans la régulation de l'extravasation des PMNs.

Ces résultats nous permettront possiblement de suggérer une nouvelle avenue thérapeutique anti-inflammatoire dans des contextes pathologiques encore plus complexes.

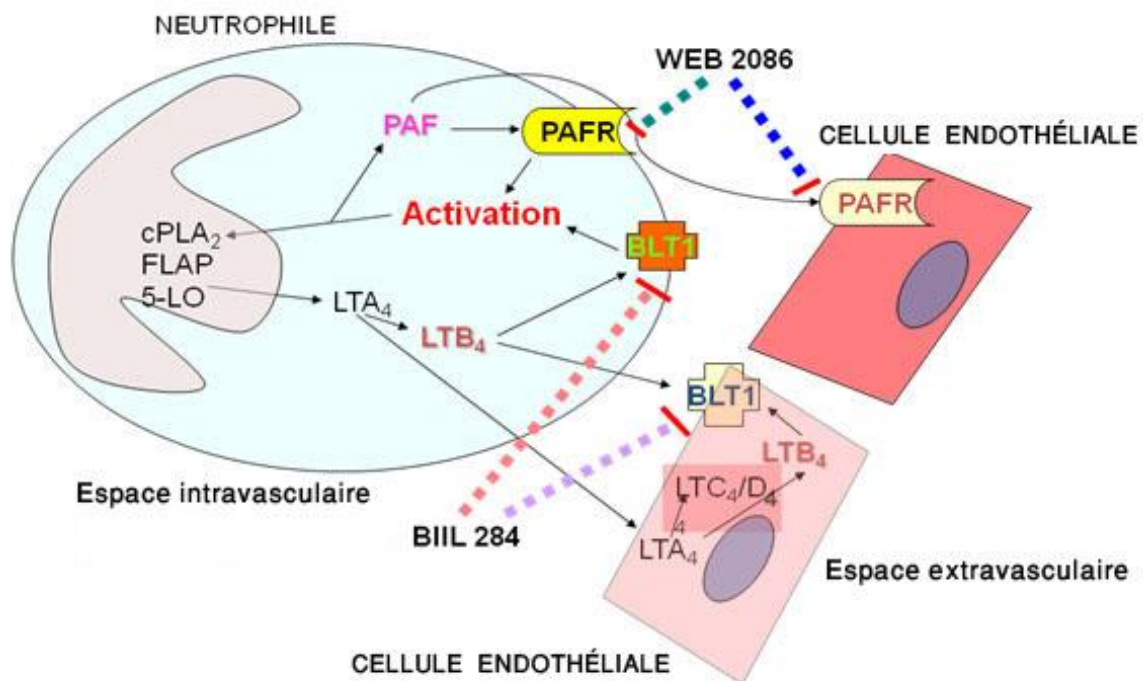


Figure 14. Hypothèse de recherche : modifié de (Marleau et al., 1999). Abréviations: 5-LO, 5-lipoxygénase; BLT1, récepteur du leucotriène B₄; BIIL 284, antagoniste sélectif du récepteur du LTB₄; cPLA₂, phospholipase A2 cytosolique; FLAP, *5-lipoxygénase activante*; LTA₄, leucotriène A₄; LTB₄, leucotriène B₄; LTC₄, leucotriène C₄; PAF, facteur d'activation plaquettaire; PAFR, récepteur du PAF; WEB 2086, antagoniste sélectif du récepteur du PAF.

CHAPITRE II

**CCOOPERATIVE ROLE OF ENDOGENOUS LEUKOTRIENE B₄ AND PLATELET-
ACTIVATING FACTOR FOLLOWING ISCHEMIA-REPERFUSION-MEDIATED
REMOTE TISSUE INJURY IN THE RABBIT HIND LIMB**

Cooperative role of endogenous leukotriene B₄ and platelet-activating factor following ischemia-reperfusion-mediated remote tissue injury in the rabbit hind limb¹

Leila Hamdan*, Valérie L. Bessi*, Julie Lefebvre[†], Pierre Borgeat^{2†} and Sylvie Marleau^{2*}

*Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Québec, Canada and [†]Centre de recherche en rhumatologie et immunologie, Centre de recherche du CHUQ, Centre Hospitalier de l'Université Laval, Québec, Canada.

²**Correspondence:** Dr. Sylvie Marleau, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, 2940 Chemin de la polytechnique, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4 ; Telephone : 514-343-7110 ; FAX : 514-343-2102 ; Emails: [REDACTED] or

Dr. Pierre Borgeat, Centre de recherche en rhumatologie et immunologie, Centre de recherche du CHUQ (CHUL), 2705, boul. Laurier, local T1-49, Québec, Canada, G1V 4G2. Telephone : 418-654-2772; FAX : 418-654-2765; Email: [REDACTED]

Running title: Cooperative role of LTB₄ and PAF in remote I/R tissue injury

Keywords: Leukocyte trafficking, Inflammation, Lipid mediator, Neutrophil, Rodent, Skin

¹This work was supported by a grant from the Canadian Health Research Institute (MOP-12391) to P.B. and S.M.

5.1. Abstract

A number of studies reported the involvement of either leukotriene B₄ (LTB₄) or platelet-activating factor (PAF) in reperfusion injury. The aim of the present study was to determine the potentially co-operative effect of these mediators in regulating polymorphonuclear neutrophils (PMN) trafficking and plasma extravasation in remote tissues following 2 hours of bilateral hind limb ischemia and 4 hours of reperfusion. To this aim, rabbits were pre-treated orally with selective BLT1 (BIIL 284, 0.01 mg/kg) and/or PAF (WEB 2086, 10 mg/kg) receptor antagonists. Whole blood chemiluminescence, a measure of ROS generation, tissue oedema and myeloperoxidase activity, a marker of PMN accumulation, were assessed. Our results support that LTB₄ and PAF play a critical role in the regulation of PMN accumulation at remote sites following hind limb ischemia and reperfusion. The inhibitory effect on PMN trafficking is accompanied by a reduced systemic production of ROS by leukocytes.

5.2. Introduction

Major limb trauma involving concomitant arterial and venous occlusion is characterized by both local and distant multisystem organ injury exacerbated following reperfusion, with the lungs as the most vulnerable target organ (1). Skeletal muscle ischemia may lead to failure of ion homeostasis and membrane phospholipid breakdown (2), as well as to the formation of cytotoxic products and phospholipid A₂ activation (3). Reintroduction of molecular oxygen after blood flow restoration further increases polymorphonuclear neutrophil (PMN) adhesion to the microvascular endothelium, and activates PMNs to release reactive oxygen species (ROS) and vasoactive mediators, thereby promoting damage to local and peripheral tissues (4). Among vasoactive mediators, platelet-activating factor (PAF) (5), leukotriene B₄ (LTB₄) (6,7) and prostanoids (8) have been shown to be involved in post-ischemic vasoactive and/or leukocyte adhesion events using first generation receptor antagonists and enzyme inhibitors. Yet, whether a cooperative role for lipid mediators exacerbates reperfusion-induced remote tissue injury following hind limb ischemia has not been investigated.

LTB₄ has long been recognized as a potent chemotactic lipid mediator signaling mainly through high (BLT1) and low (BLT2) affinity receptors in mediating leukocyte activation and recruitment in acute inflammation and host defense (9). LTB₄ has also been ascribed a pathogenic role in chronic inflammatory diseases, including arthritis, inflammatory bowel disease, sepsis, psoriasis and asthma, which led to the development of selective and potent receptor antagonists as a novel pharmacological

approach for the treatment of inflammatory diseases (10). In acute inflammation such as that observed following limb I/R, de novo LTB₄ generation has been associated with PMN activation and distant tissue injury (6). In addition to LTB₄, adhesion of activated PMN to microvascular endothelial cells also leads to an increased biosynthesis of endothelial cysteinyl-containing leukotrienes (CysLTs) through transcellular metabolism of LTA₄ (11). In that context, CysLTs may contribute to increased vascular permeability and tissue oedema (12), in addition to triggering PAF biosynthesis (13). In a similar manner, PAF is concomitantly biosynthesized with eicosanoids within activated leukocytes (14) and endothelial cells (15) and has been pinpointed as an important early mediator of I/R injury (16), in addition to contributing to chronic inflammatory diseases such as asthma (17). Both PAF and LTB₄ may act in an autocrine/paracrine (18) or intracrine (19) fashion to enhance intracellular arachidonic acid availability and LT biosynthesis. Interdependence between these mediators is also illustrated by the role of BLT1 signaling in PAF-mediated PMN degranulation and chemotaxis, and by partial LTB₄-mediated desensitization to PAF stimulation (20). Yet, despite the acknowledged importance for lipid mediators in both acute and chronic inflammatory responses, targeting a single mediator has provided only limited therapeutic benefit.

In view of the pathogenic role of leukotrienes and PAF in I/R-induced remote tissue injury and to their redundant and complementary pro-inflammatory properties, the present study aimed to elucidate whether leukotrienes and PAF may act in a cooperative

manner to regulate plasma extravasation and PMN trafficking to inflammatory sites. To this end, the effect of potent BLT1/BLT2 and PAF receptor (PAFR) antagonists were used as pharmacological tools in local (skin bioassay) and systemic (bilateral hind limb I/R) acute inflammatory responses in the rabbit. Our results support a cooperative and central role of the lipid mediators in promoting PMN recruitment to inflammatory sites elicited by various stimuli.

5.3. Materials and methods

5.3.1. Animals

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee of the Université de Montréal, in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of experimental animals. Male New-Zealand rabbits (2.5 - 3 kg) were purchased from Charles River (St-Constant, Qc, Canada). They were housed in individual cages with free access to food (Purina pellets) and water ad libitum for ~5 days prior to the terminal experiment.

5.3.2. Materials

BIIL 284 and WEB 2086 were kindly provided by Dr. F. Birke (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co., Biberach/Riss, Germany). 5(*S*),12(*R*)-dihydroxy-6,14-*cis*-8,10-*trans*-eicosatetraenoic acid (LTB₄) was purchased at Cayman Chemicals (Ann Harbor, MI, USA)

and MK-571 (montelukast sodium) was generously provided by Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Kirkland, Québec, Canada. The stock solution of LTB₄ (200 µg/ml, in ethanol) was kept at -20°C and diluted in vehicle immediately before use. BSA (very low endotoxin), DMSO, hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), hydrogen peroxide (H₂O₂), luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phtalazinedione), fMLP, PAF, prostaglandin E₂ (PGE₂), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and zymosan A were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). IL-8 and TNF-α was purchased from PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ). Modified HBSS, HEPES buffer and DMEM were from Gibco Life Technologies (Grand Island, NY). Ketamine was bought from Vetrepharma-Canada Inc. (Belleville, On, Canada) and xylazine from Bimeda-MTC Animal Health Inc (Cambridge, On, Canada) were obtained from CDMV (St-Hyacinthe, Qc, Canada). Acepromazine was purchased from Ayerst Veterinary Laboratories (Guelph, On, Canada) and isoflurane USP was obtained from Pharmaceutical Partners of Canada Inc (Richmond, On, Canada). Pentobarbital (Euthansol) was obtained from Schering-Plough Canada Inc. (Pointe-Claire, Qc, Canada). All other solutions for parental administration were purchased from Baxter Corporation Laboratories (Toronto, On, Canada).

5.3.3. Dermal inflammation

On the day of the experiment, WEB 2086 was diluted in 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) suspension and BIIL 284 was diluted in sterile water. Both drugs were

administered orally (1 ml/kg) 2 h before intradermal (i.d.) injections. The rabbits were sedated with acepromazine (0.5 mg/kg) and anesthetized with a solution of ketamine/xylazine (35:5) (0.4 ml/kg) and the dorsal area was shaved. The agonists under study, including LTB₄ (100-500 pmol/site), PAF (0.2-2 nmol/site), TNF- (10 pmol/site), IL-8 (10 pmol/site) and zymosan-activated plasma (ZAP, 1%), were diluted in (HBSS/0.1%BSA). Each agonist was injected i.d. (50 µl by site) in quadruplicate, according to a predetermined site plan. The accumulation of neutrophils into i.d. sites over a 2-hour period was assessed by measuring myeloperoxidase activity (MPO). Briefly, the rabbits were killed with an overdose of pentobarbital, the dorsal skin was cleansed of blood and fat, and biopsies (11 mm diameter) were punched out and frozen at - 80°C until assayed. Blood samples (2 ml) were taken from the central artery of the ear for total and differential leukocyte counts at 0, 60 and 120 min following i.d. injections.

5.3.4. Vascular permeability and oedema

In additional experiments, the rabbits received an i.v. injection of ¹²⁵I-BSA (1 µCi/kg) thirty minutes before sacrifice. Five minutes later, agonists were injected i.d. (50 µl/site) with LTB₄ (100 pmol/site), PAF (200 pmol/site), LTD₄ (1000 pmol/site) and LTC₄ (160 pmol/site) to assess vascular permeability. Biopsies and plasma were counted in a gamma counter (1277 GammaMaster, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA) and

oedema was quantified as $\mu\text{l plasma extravasated} = \text{CPM (biopsy)}/\text{CPM (1}\mu\text{l plasma)}$. In ischemia-reperfusion experiments, lung oedema was assessed by calculating the blood free wet-to-dry weight ratio for the right lower lobe. Briefly, anaesthetized rabbits were killed by an overdose of pentobarbital, the lungs were flushed in situ, removed, the right lobe blotted to remove excess fluid and the wet weight was recorded. The right lobe was then placed in an incubator at 60°C for 5 days, and the dry weight was recorded (21).

5.3.5. Hind limb ischemia-reperfusion

Sedation was induced by acepromazine (0.5 mg/kg), and anesthesia was induced and maintained by inhaled anesthetic mixture of oxygen (2 L/min) and 3% to 5% isoflurane administered through face mask. The animals were maintained on heating pads throughout the experimental protocol. Transient, bilateral ligation of the femoral arteries, veins and collateral vessels was performed by cutting soft-tissue and bony structures, exclusive of femoral vessels around the thighs and by clamping all the vessels *in situ* with a microvascular clip. For sham-operated controls, the same surgical procedure was done without clamping of the vessels. After a 2-h period of ischemia, the clips were removed to allow reperfusion for 4 hours. Blood samples (2 ml) were taken at 0, 2 and 6 h from the central artery of the ear for total and differential leukocyte counts and for chemiluminescence assay. Rabbits were sacrificed with an overdose of

pentobarbital. The heart was flushed with 180 ml 0.9% NaCl containing 10 UI heparin and tissue aliquotes of lungs, intestine (jejunum) and liver (left lobe) were snap frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until assayed for MPO activity.

5.3.6. Cutaneous blood flow measurement

Cutaneous blood flow was measured on the dorsal skin of anesthetized rabbits, after hair removal with a depilatory lotion the day prior to the experiment. Changes in cutaneous blood flow in the skin were measured using a probe (model 407-1) connected to a laser Doppler flowmeter (Periflux 5000, Perimed, Sweden) following the i.d. injection (50 $\mu\text{l}/\text{site}$) of either LTB_4 (500 pmol/site), PAF (2 nmol/site), TNF- α (10 pmol/site), IL-8 (10 pmol/site) or vehicle (HBSSA/0.1% BSA). Blood flow was expressed in arbitrary Laser Doppler Perfusion Monitoring units (LDPM) using the Perimed 2.0 software, and recorded from -5 min to 15 min after injections. Basal LDPM units value was subtracted from peak hyperemic flux value for each site.

5.3.7. MPO assay

Tissue MPO activity was assayed as previously described (22), with some modifications. Briefly, tissues were homogenized in 1 ml of PBS 1X and the pellets, as well as skin biopsies, were homogenized in 1 ml acetate buffer (100 mM), pH 6.0, containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) and 20 mM EDTA. Tissue homogenates, except skin biopsies, were heated to 65°C for 120 min in a water bath. The homogenates were subjected to three freeze-thaw cycles and then centrifuged at 2000 g for 10 minutes. MPO (freed from PMN granules) was assayed by incubating supernatants with 3.2 mM TMB and 0.3 mM H₂O₂ for 5 min at 37°C. The reaction was stopped by the addition of 100 μ l of 0.2 M sodium acetate (pH 3.0). PMN calibration curves were prepared using rabbit peritoneal PMN following i.p. glycogen stimulation (0.2% glycogen, 4 h accumulation). PMN numbers were calculated from the standard curves and expressed as PMN per site or per g tissue.

5.3.8. Whole blood chemiluminescence

Luminol-enhanced whole blood chemiluminescence of mouse leukocytes was studied using opsonized zymosan (1 mg/ml) as a stimulus. Briefly, heparinized blood was collected and processed immediately. Blood was diluted (1/10) in DMEM containing 50 mM HEPES and 4 M luminol and incubated under continuous stirring for 5 min at 37°C before stimulation. The chemiluminescence signals were recorded using a computer-

assisted luminometer (model 500; Chronolog Corp, Havertown, PA, USA). Chemiluminescence intensities were measured as the peak amplitude in arbitrary units.

5.3.9. Statistical analysis

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

5.4. RESULTS

5.4.1. Effect of concomitant blockade of BLT1/BLT2 and PAF receptors on agonist-stimulated leukocyte recruitment, vascular permeability and blood flow in rabbits

BLT1/BLT2 (BIIL 284) and PAF (WEB 2086) receptor antagonists were used in a rabbit skin bioassay to determine optimal doses to assess the potentially cooperative role of PAF and LTB₄ receptor signaling in acute inflammatory responses. This experimental model allowed the non-invasive determination of PMN accumulation, tissue oedema and cutaneous blood flow in response to locally administered agonists in each test rabbit. The first series of experiments aimed at determining the dose-inhibition curves

of receptor antagonists against LTB₄- and PAF-elicited PMN accumulation in the dermis. Pretreatment of rabbits with BIIL 284 and WEB 2086 caused a dose-dependent inhibition of PMN recruitment in response to i.d. injections of LTB₄ (500 pmol) and PAF (100 pmol) (Fig. 1A), respectively. Doses of antagonists for combined drug administration were selected as 0.01 mg/kg for BIIL 284 (Fig. 1B) and 10 mg/kg for WEB 2086 (Fig. 1C), which partially reduced LTB₄- and PAF-elicited PMN accumulation by ~45%, within the range of reported ED₅₀ values for oral administration of WEB 2086 (23) and below the dose of BIIL 284 necessary for full blockade of LTB₄ receptors in rodents (24). While single administration of either BIIL 284 or WEB 2086 inhibited partially both LTB₄- (Fig. 1B) and PAF-elicited (Fig. 1C and D) PMN accumulation, additive effects were observed following combined drug administration. The addition of PGE₂ as a vasodilator to enhance PMN recruitment to skin sites (Fig 1C) did not change the accumulation profile as shown for a higher dose of PAF injected without PGE₂ (Fig. 1D). There was no effect of the drug on circulating blood leukocyte counts (results not shown).

To investigate whether BLT1 or PAFR antagonists may also regulate PMN trafficking in response to chemically unrelated soluble agonists, 10 pmol of TNF- α and IL-8 and 50 l of 1% ZAP (a source of C5a_{desarg}) were injected i.d. in rabbits pretreated with the drugs (Fig. 2). Whereas single drug administration partially blocked PMN migration to dermal sites treated with the inflammatory agents, combined drug regimen showed additive effects.

For instance, while single doses of BIIL 284 and WEB 2086 inhibited TNF- α -elicited PMN accumulation by 31% ($p < 0.001$) and 24% ($p < 0.01$) compared to vehicle, respectively, combined drug administration reduced PMN recruitment by 50%, ($p < 0.05$ and $p < 0.01$), compared to BIIL 284 or WEB 2086 alone, respectively (Fig. 2A). Similar observations were made for IL-8 (Fig. 2B) and ZAP (Fig. 2C). Microvascular permeability, as assessed by the quantification of plasma protein leakage into skin sites injected with the soluble agonists LTB₄, PAF, LTC₄ and LTD₄, was partially inhibited (by ~ 40 -50%) in animals pretreated with either BLT1 or the PAFR antagonist. For all agonists but PAF, the effect of combined drug treatment was slightly enhanced, but not significantly compared with single drug administration (Fig. 3A-D). In agreement, transient changes in cutaneous blood flow elicited by i.d. injections of agonists were significantly reduced in animals pretreated with both drug antagonists, supporting a cooperative role for PAF and LTB₄ in regulating early changes in cutaneous flow (Fig. 4A-B). However, hyperemic flux elicited by chemically unrelated mediators such as TNF and IL-8 were not further modulated by combined BLT1 and PAF receptor antagonist (results not shown).

5.4.2. Effect of a concomitant blockade of CysLTs, LTB₄ and PAF receptors in regulating leukocyte recruitment and plasma extravasation to various agonists

These experiments aimed to determine whether LTC₄ and/or LTD₄ may act in a cooperative manner with LTB₄ and PAF to regulate the acute inflammatory response. As

illustrated in Fig. 1B and C, neither MK-0571 administration alone, or combined to BIIL 284 and WEB 2086, further reduced PMN trafficking to LTB₄ or PAF, or agonist-induced oedema formation (Fig. 3A-D) compared to combined BIIL 284 + WEB 2086 drug administration.

5.4.3. Cooperative role of LTB₄ and PAF receptors in remote organ injury following reperfusion of ischemic lower limbs in rabbits

The role of LTB₄ and PAF in regulating PMN recruitment to remote organ following acute I/R of lower limbs was next investigated. Rabbits were pretreated with BIIL 284 and/or WEB 2086 followed by bilateral ischemia of the lower limbs for a 30 minutes period, followed by 4 hours of reperfusion. PMN recruitment to the lungs was ~7-fold higher in lungs than in intestine or liver (Fig. 5A-C). Whereas either BIIL 284 or WEB 2086, administered alone, did not significantly attenuate PMN recruitment, the concomitant administration of these drugs had additive effects, reducing PMN accumulation by 45% compared to vehicle (Fig. 5A). Additive inhibitory effect of BIIL 284 and WEB 2086 were also observed for PMN recruitment to the intestine (Fig. 5B), while combined drug administration appeared to act synergistically in liver (Fig. 5C). In a similar manner, lung and intestine tissue oedema was reduced significantly only in

animals having received both treatment (Fig. 6A-B) and a similar tendency was observed in liver (Fig. 6C). Furthermore, our results show an additive effect of BIIL 284 and WEB 2086 pretreatment on blood leukocyte activation and reactive oxygen species (ROS) generation 4 hours after reperfusion of ischemic limbs (Fig. 7B), without modulation of basal (pre-I/R) blood response to opsonized zymosan stimulation (Fig. 7A).

5.5. Discussion

Our results support a cooperative role of the lipid mediators LTB₄ and PAF in the regulation of PMN trafficking to inflammatory sites. PMN migration was inhibited with LTB₄ and PAF antagonists. Interestingly, LTB₄ elicited-dermal PMN accumulation was partially blocked by the PAF receptor antagonist WEB 2086, and a similar tendency was observed for PAF-elicited dermal accumulation in rabbit dorsal skin (fig1.). Similar results were observed in rats (Bélanger et al., 2006), and interaction between LTB₄ and PAF biosynthesis has also been reported (Moilanen et al., 1993 ; McDonald et al., 1994), which underscored an autocrine role for endogenous LTB₄ and PAF on LT biosynthesis. We also demonstrated an additive effect of LTB₄ and PAF receptors blockade on PMN recruitment elicited by either of the lipid mediator. A significant reduction of PMN influx

in response to chemically unrelated chemoattractants such as TNF- α and IL 8 (fig 2) have been observed also in our studies in the rabbit model.

A cooperative role of the two mediators, LTB₄ and PAF in regulating PMN trafficking and plasma extravasation at inflammatory sites was observed in our studies (fig 3). Indeed, the dermal accumulation of PMNs induced by intradermal injection of LTB₄ was inhibited by 34 \pm 4% (P< 0.001) by BILL 284 pretreatment at a dose of 0.1 mg/kg and by 62 \pm 4% (P< 0.001) with the selective PAF receptor antagonist at the dose used (10 mg/kg). The concomitant administration of the two drugs together, induced a reduction in PMN numbers of 80 \pm 3% (P< 0.001). A similar tendency was observed following the local injection of PAF. Similar results were observed for the inhibition of the migration elicited by TNF α , by 31% (p<0.001) with BILL 284 at the dose of 0.01 mg/kg, and by 24% (P<0.01) with WEB 2086 at the dose of 10 mg/kg and by 50 % (p<0.01) with BILL 284 and WEB 2086, respectively.

The addition of MK-0571 to the two drugs inhibited more the PMN migration to inflammatory sites.

We assisted also to a cooperative role of LTB₄ and PAF in a pathological model of acute inflammation, where we induced vascular ischemia by a bilateral ligation of both femoral arteries and veins, followed by reperfusion. This pathological model of I/R in hind limbs is known to involve a variety of mediators including cytokines, chemokines and lipid mediators and elicited PMN accumulation in remote tissues.

Total accumulation of PMNs in the lungs was inhibited by $36 \pm 5\%$ with BILL 284 (0.01 mg/kg), and by $47 \pm 5\%$ with WEB 2086 (10 mg/kg), and by $96 \pm 2\%$ ($p < 0.01$) with the concomitant administration of the two drugs. The same tendency has been observed in other tissues like the liver and intestine, as well as for plasma extravasation.

In summary our results support a cooperative role of LTB_4 and PAF in regulating PMN migration and plasma extravasation to inflammatory sites, representing a novel therapeutic target in inflammatory diseases.

5.6. References

1. Harkin, D. W., A. A. D'Sa, M. M. Yassin, I. S. Young, J. McEneny, D. McMaster, M. D. McCaigue, M. I. Halliday, and T. G. Parks. 2000. Reperfusion injury is greater with delayed restoration of venous outflow in concurrent arterial and venous limb injury. *Br.J Surg.* 87:734-741.
2. Korth, U., G. Merkel, F. F. Fernandez, O. Jandewerth, G. Dogan, T. Koch, K. van Ackern, O. Weichel, and J. Klein. 2000. Tourniquet-induced changes of energy metabolism in human skeletal muscle monitored by microdialysis. *Anesthesiology* 93:1407-1412.
3. Lambert, I. H., S. F. Pedersen, and K. A. Poulsen. 2006. Activation of PLA2 isoforms by cell swelling and ischaemia/hypoxia. *Acta Physiol (Oxf)* 187:75-85.
4. Welbourn, C. R., G. Goldman, I. S. Paterson, C. R. Valeri, D. Shepro, and H. B. Hechtman. 1991. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br.J Surg.* 78:651-655.

5. Wang, W. Z., S. Z. Guo, T. M. Tsai, G. L. Anderson, and F. N. Miller. 2000. Platelet-activating factor contributes to postischemic vasospasm. *J Surg.Res* 89:139-146.
6. Goldman, G., R. Welbourn, I. S. Paterson, J. M. Klausner, L. Kobzik, C. R. Valeri, D. Shepro, and H. B. Hechtman. 1990. Ischemia-induced neutrophil activation and diapedesis is lipoxygenase dependent. *Surgery* 107:428-433.
7. Homer-Vanniasinkam, S. and M. J. Gough. 1994. Role of lipid mediators in the pathogenesis of skeletal muscle infarction and oedema during reperfusion after ischaemia. *Br.J Surg.* 81:1500-1503.
8. Klausner, J. M., I. S. Paterson, G. Goldman, L. Kobzik, C. R. Valeri, D. Shepro, and H. B. Hechtman. 1989. Thromboxane A₂ mediates increased pulmonary microvascular permeability following limb ischemia. *Circ.Res* 64:1178-1189.
9. Tager, A. M. and A. D. Luster. 2003. BLT1 and BLT2: the leukotriene B₄ receptors. *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids* 69:123-134.
10. Hicks, A., S. P. Monkarsh, A. F. Hoffman, and R. Goodnow, Jr. 2007. Leukotriene B₄ receptor antagonists as therapeutics for inflammatory disease: preclinical and clinical developments. *Expert.Opin.Investig.Drugs* 16:1909-1920.

11. Claesson, H. E. and J. Haeggstrom. 1988. Human endothelial cells stimulate leukotriene synthesis and convert granulocyte released leukotriene A4 into leukotrienes B4, C4, D4 and E4. *Eur.J Biochem* 173:93-100.
12. Lehr, H. A., A. Guhlmann, D. Nolte, D. Keppler, and K. Messmer. 1991. Leukotrienes as mediators in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J Clin Invest* 87:2036-2041.
13. Rovati, G. E. and V. Capra. 2007. Cysteinyl-leukotriene receptors and cellular signals. *ScientificWorldJournal*. 7:1375-1392.
14. Garcia, M. C., S. Fernandez-Gallardo, M. A. Gijon, C. Garcia, M. L. Nieto, and C. M. Sanchez. 1990. Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF) in human polymorphonuclear leucocytes. The role of lyso-PAF disposal and free arachidonic acid. *Biochem J*. 268:91-98.
15. Whatley, R. E., D. F. Fennell, J. A. Kurrus, G. A. Zimmerman, T. M. McIntyre, and S. M. Prescott. 1990. Synthesis of platelet-activating factor by endothelial cells. The role of G proteins. *J.Biol.Chem*. 265:15550-15559.
16. Carden, D. L. and D. N. Granger. 2000. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 190:255-266.
17. Kasperska-Zajac, A., Z. Brzoza, and B. Rogala. 2008. Platelet activating factor as a mediator and therapeutic approach in bronchial asthma. *Inflammation* 31:112-120.

18. McDonald, P. P., S. R. McColl, P. Braquet, and P. Borgeat. 1994. Autocrine enhancement of leukotriene synthesis by endogenous leukotriene B₄ and platelet-activating factor in human neutrophils. *Br.J.Pharmacol.* 111:852-860.
19. Sisson, J. H., S. M. Prescott, T. M. McIntyre, and G. A. Zimmerman. 1987. Production of platelet-activating factor by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. Correlation of synthesis with release, functional events, and leukotriene B₄ metabolism. *J.Immunol.* 138:3918-3926.
20. Tomhave, E. D., R. M. Richardson, J. R. Didsbury, L. Menard, R. Snyderman, and H. Ali. 1994. Cross-desensitization of receptors for peptide chemoattractants. Characterization of a new form of leukocyte regulation. *J.Immunol.* 153:3267-3275.
21. Van Putte, B. P., J. Kesecioglu, J. M. Hendriks, V. P. Persy, E. van Marck, P. E. Van Schil, and M. E. De Broe. 2005. Cellular infiltrates and injury evaluation in a rat model of warm pulmonary ischemia-reperfusion. *Crit Care* 9:R1-R8.
22. Tremblay, P.-B., D. M. T. Macari, D. Martel, P. du Souich, C. Barja-Fidalgo, and S. Marleau. 2000. Hypoxemia modifies circulating and exudate neutrophil number and functional responses in carrageenin-induced pleurisy in the rat. *J.Leukoc.Biol.* 67:785-792.

23. Bozza, P. T., P. M. Silva, H. C. Castro-Faria-Neto, M. A. Martins, and R. S. COrdeiro. 1992. Increase in the rat blood leukocyte counts induced by PAF-acether is suppressed by general anesthesia. *J Leukoc.Biol.* 51:146-150.
24. Birke, F. W., C. J. Meade, R. Anderskewitz, G. A. Speck, and H.-M. Jennewein. 2001. In vitro and in vivo pharmacological characterization of BIIL 284, a novel and potent leukotriene B₄ receptor antagonist. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 297:458-466.

Figure 1.

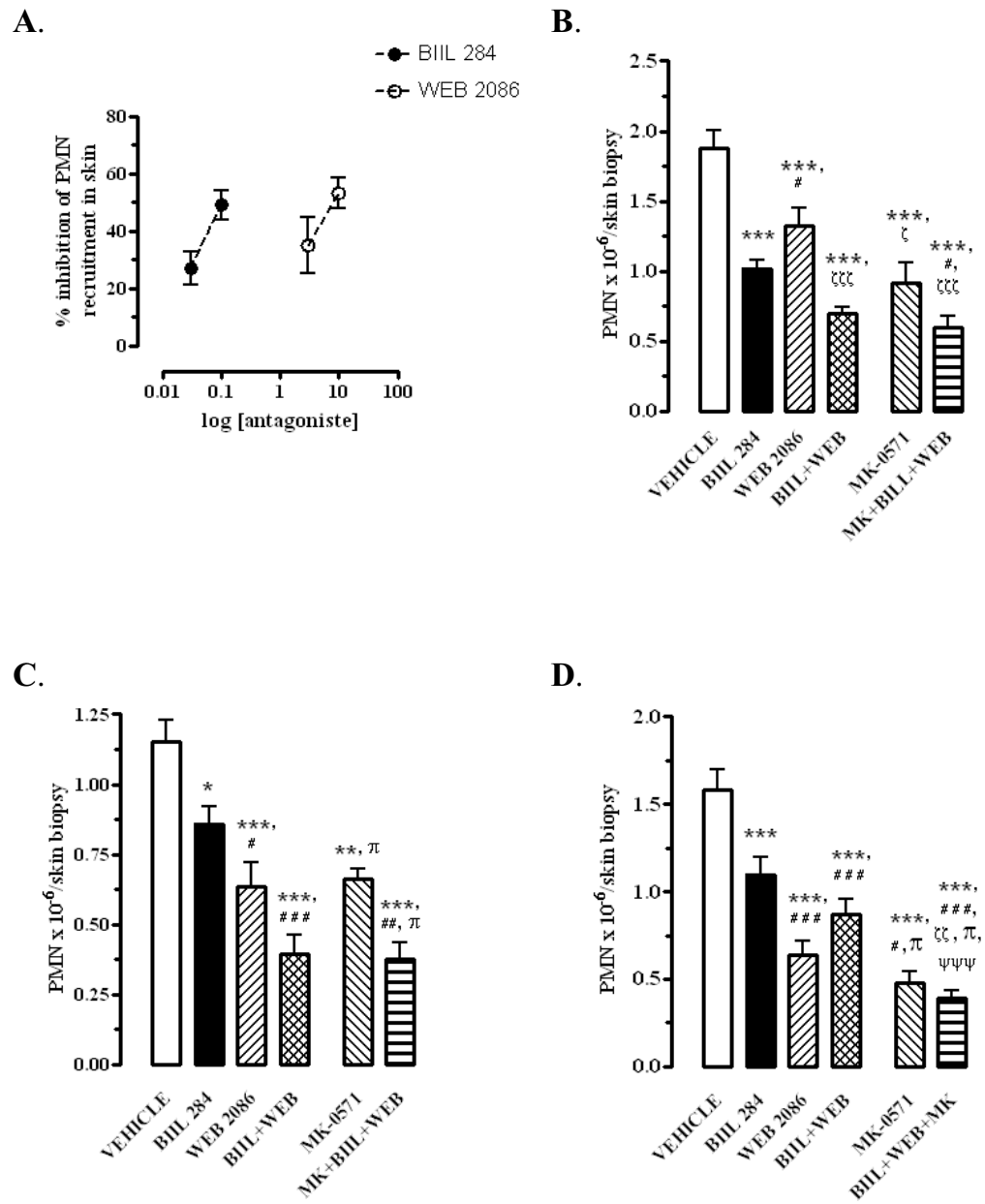


Figure 2.

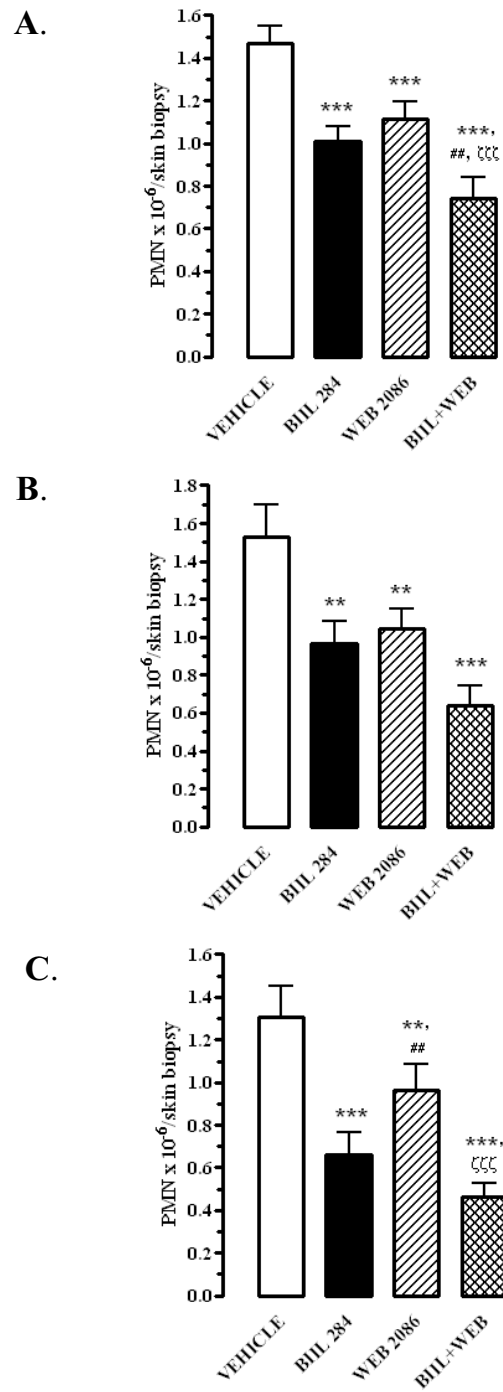
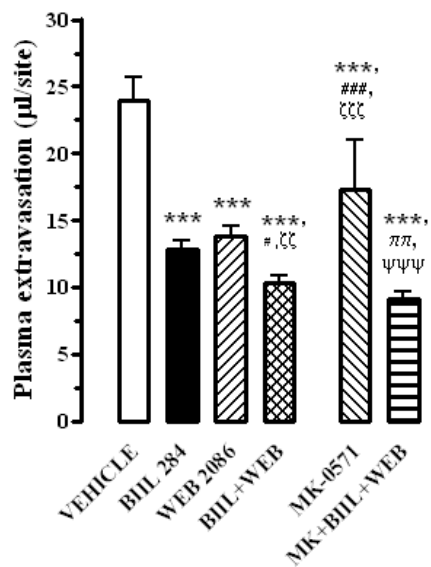
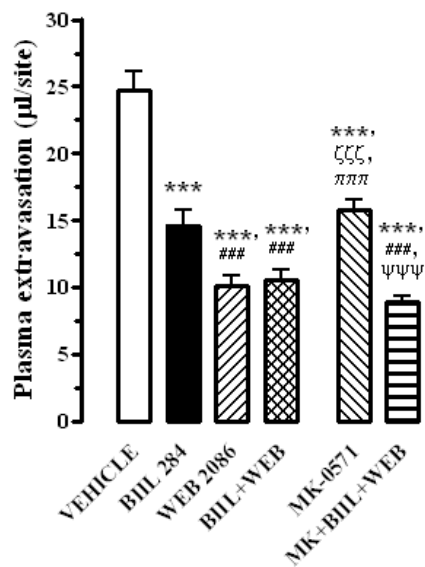


Figure 3.

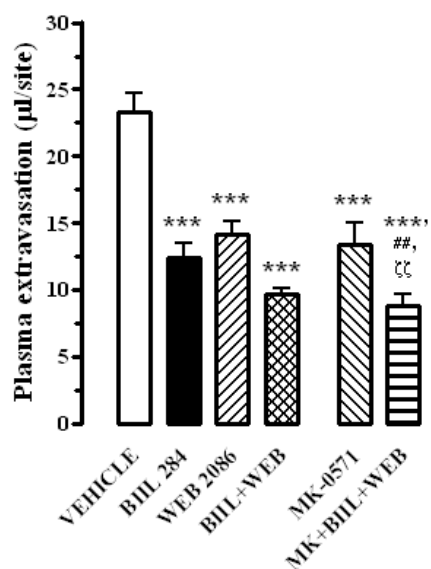
A.



B.



C.



D.

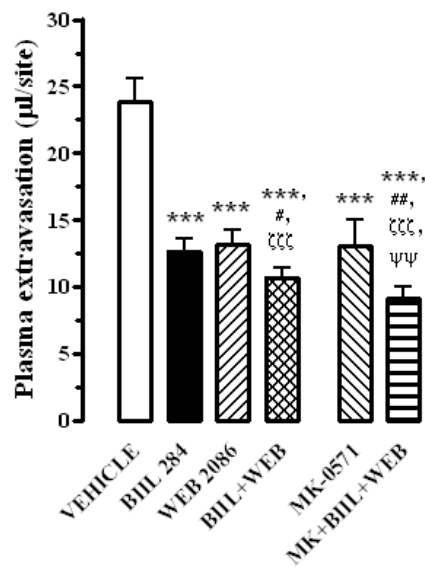
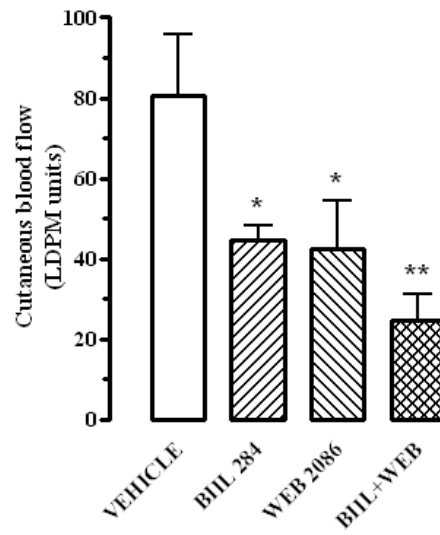


Figure 4.

A.



B.

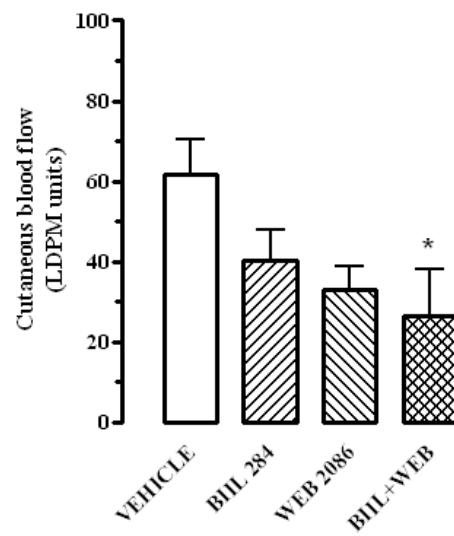


Figure 5.

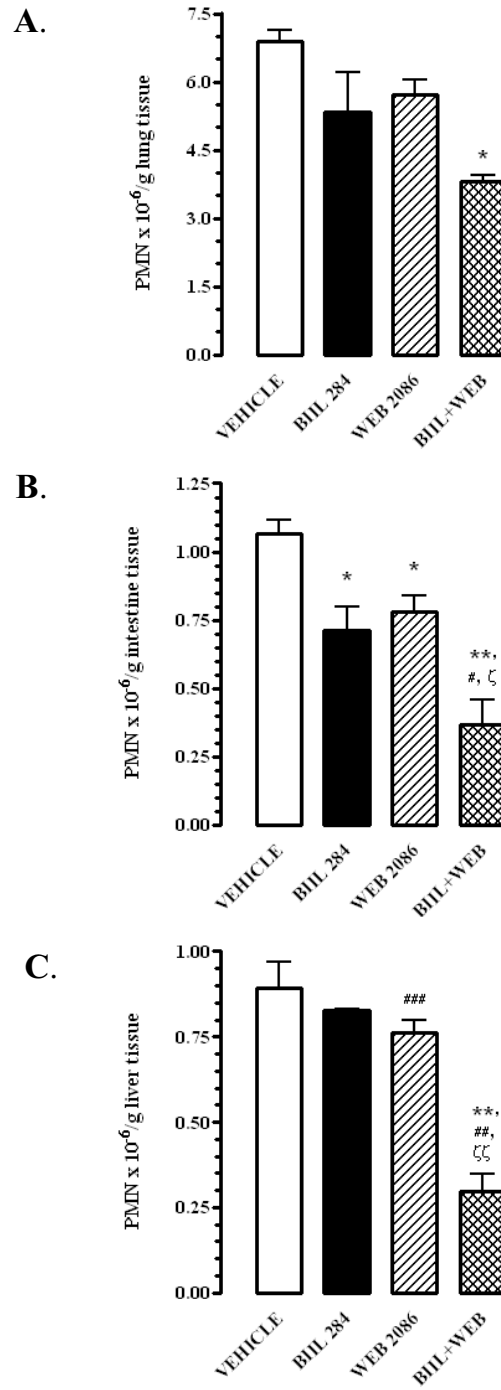
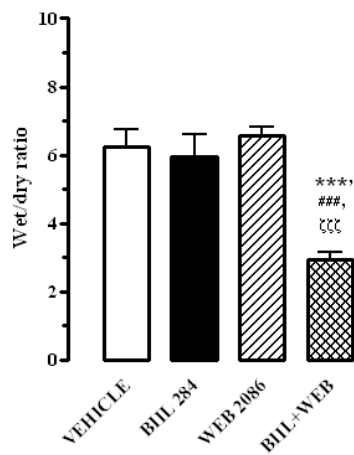
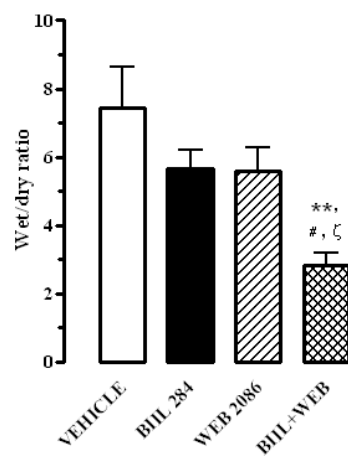


Figure 6.

A.



B.



C.

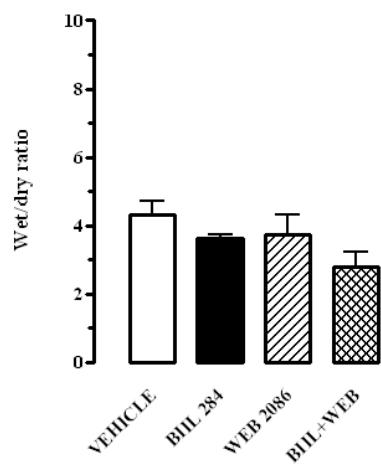
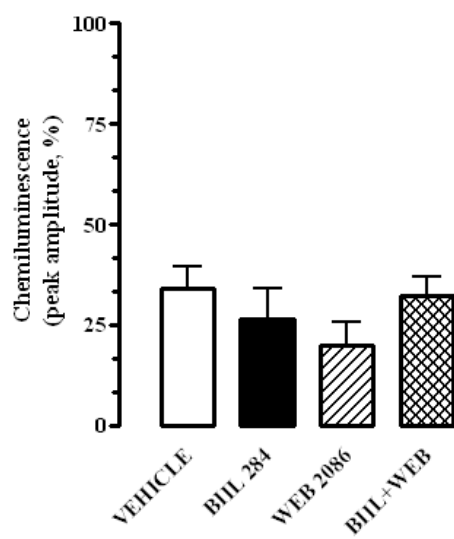
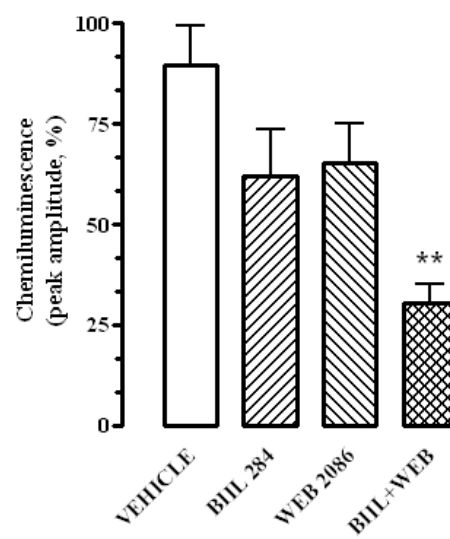


Figure 7.**A.****B.**

5.7. Legend to Figures

Figure 1. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on PMN recruitment to skin sites. *A*, Dose-dependent inhibition of PMN recruitment in rabbits pretreated orally with either BIIL 284 or WEB 2086. Effect of BIIL 284 (0.01 mg/kg), WEB 2086 (10 mg/kg), and MK-0571 (10 mg/kg), administered 2 hours prior to intradermal injections of *B*, LTB₄ (500 pmol/site), *C*, PAF (100 pmol/site, containing 250 pmol PGE₂) and *D*, PAF (1000 pmol/site). PMN numbers were assessed using the myeloperoxidase assay. Data are the mean ± SEM obtained from 16 biopsies (4 rabbits per treatment). *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001 compared to vehicle; #, P < 0.05; ##, P < 0.01; ###, P < 0.001 compared to BIIL 284; ζ, P < 0.05; ζζζ, P < 0.001 compared to WEB 2086; π, P < 0.05 compared to MK-0571.

Figure 2. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on PMN recruitment to skin sites elicited by chemically unrelated agonists. Effect of a single or combined administration of BIIL 284 (0.01 mg/kg) and/or WEB 2086 (10 mg/kg), administered orally in rabbits 2 hours prior to the intradermal injections (50 μl) of *A*, TNFα (10 pmol/site), *B*, IL-8 (10 pmol/site) and *C*, 1% ZAP. PMN numbers were assessed using myeloperoxidase assay. Data are the mean ± SEM obtained from 16 biopsies (4 rabbits per treatment). **, P < 0.01; ***, P < 0.001 compared to vehicle; ##, P < 0.01 compared to BIIL 284; ζζζ, P < 0.001 compared to WEB 2086.

Figure 3. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on plasma extravasation to skin sites. Effect of a single dose of either BIIL 284 (0.01 mg/kg), WEB 2086 (10 mg/kg) and MK-0571 (10 mg/kg), administered orally in rabbits 2 hours prior to the intradermal injections of soluble agonists including *A*, LTB₄ (100 pmol/site), *B*, PAF (200 pmol/site), *C*, LTC₄ (160 pmol/site) and *D*, LTD₄ (1 nmol/site). Plasma extravasation was assessed following the injection of ¹²⁵I-BSA (1 μCi/kg) 30 min prior to sacrifice. Data are the mean ± SEM obtained from 16 biopsies (4 rabbits per treatment). ***, P < 0.001 compared to vehicle; #, P < 0.05; ##, P < 0.01; ###, P < 0.001 compared to BIIL 284; ζζ, P < 0.01; ζζζ, P < 0.001 compared to BIIL+WEB; ππ, P < 0.01; πππ, P < 0.001 compared to MK-0571; ψψ, P < 0.01; ψψψ, P < 0.001 compared to MK+ BIIL+WEB.

Figure 4. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on cutaneous blood flow. Effect of BIIL 284 (0.01 mg/kg) and/or WEB 2086 (10 mg/kg), administered orally in rabbits 2 hours prior to the intradermal injections of soluble agonists including *A*, LTB₄ (100 pmol/site), *B*, PAF (200 pmol/site). Recording were taken 5 min prior and up to 15 min after the i.d. injections (50 μl/site) of LTB₄ (500 pmol/site), PAF (2 nmol/site), TNFα (10 pmol/site), IL-8 (10 pmol/site) or vehicle (HBSSA/0.1% BSA). Blood flow was expressed in arbitrary Laser Doppler Perfusion Monitoring units (LDPM). Data are the mean ± SEM obtained from 4-8 sites (4 rabbits). *, P < 0.05; **, P < 0.01 compared to vehicle.

Figure 5. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on PMN recruitment to remote organs following hind limbs I/R. A combined pretreatment of BIIL 284 (0.01 mg/kg) and/or WEB 2086 (10 mg/kg), administered orally 2 hours prior to the bilateral ligation of the femoral arteries and veins for a period of 2 hours followed by 4 hours reperfusion in anesthetized rabbits, showed additive *A*, lung (left lobe) and *B*, jejunum or synergistic *C*, liver (left lobe) inhibitory effect of drug receptor antagonists on PMN accumulation as assessed by MPO assay. Data are the mean \pm SEM obtained from 4 rabbits. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ compared to vehicle; #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$ compared to BIIL 284; ζ , $P < 0.05$; $\zeta\zeta$, $P < 0.01$ compared to WEB 2086.

Figure 6. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on tissue oedema in remote organs following hind limbs I/R. A combined pretreatment of BIIL 284 (0.01 mg/kg) and/or WEB 2086 (10 mg/kg), administered orally 2 hours prior to bilateral ligation of the femoral arteries and veins for 2 hours followed by 4 hours reperfusion in anesthetized rabbits, showed *A*, synergistic (lung, right lobe) or *B*, additive (intestine) inhibitory effect of drug receptor antagonists on plasma extravasation as assessed by the wet/dry ratio. *C*, No significant effect of combined drug administration was observed in liver. Data are the mean \pm SEM obtained from 4 rabbits. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ compared to vehicle; #, $P < 0.05$; ###, $P < 0.001$ compared to BIIL 284; ζ , $P < 0.05$; $\zeta\zeta\zeta$, $P < 0.001$ compared to WEB 2086.

Figure 7. Effect of BIIL 284 and WEB 2086 on blood leukocyte ROS production following hind limbs I/R. A combined pretreatment of BIIL 284 (0.01 mg/kg) and/or WEB 2086 (10 mg/kg), administered orally 2 hours prior to the bilateral ligation of the femoral arteries and veins for a period of 2 hours followed by 4 hours reperfusion in anesthetized rabbits, showed additive effect of drug receptor antagonists on reactive oxygen species (ROS) generation in opsonised zymosan (Opz)-stimulated whole blood, as assessed by luminol-dependent chemiluminescence. *A*, Opz-stimulated whole blood before I/R and *B*, Opz-stimulated whole blood after 6 hours reperfusion. Data are the mean \pm SEM obtained from 4 rabbits. **, $P < 0.01$ compared to vehicle.

CHAPITRE III

DISCUSSION GÉNÉRALE

3. Discussion générale

Dans cette étude nous avons évalué l'hypothèse selon laquelle les médiateurs lipidiques, dont le LTB₄ et le PAF, agissent de manière concertée pour induire la migration et l'extravasation des PMNs aux sites inflammatoires indépendamment de la nature chimique du stimulus qui active le PMN dans le contexte de la réponse inflammatoire. Nous avons utilisé une approche pharmacologique visant à bloquer l'activité des récepteurs du LTB₄ et ou du PAF à l'aide d'antagonistes sélectifs pour ces récepteurs. Selon notre hypothèse de travail, le blocage simultané de ces deux récepteurs devait avoir un effet inhibiteur additif ou synergique sur la migration des PMNs aux foyers inflammatoires. Ce qui nous a amenés à utiliser différents modèles expérimentaux pour vérifier cette hypothèse et confirmer un effet coopératif du PAF et du LTB₄ dans la migration des neutrophiles.

Dans nos études, nous avons choisi les lapins New Zéland blanc mâles, qui nous ont permis d'avoir un modèle très sensible aux médiateurs inflammatoires, et qui nous a permis de tester plusieurs stimuli inflammatoires chez le même animal dans le bioessai de l'inflammation dermique. En effet, nous pouvons administrer jusqu'à 60 injections intradermiques sur le dos du lapin. Il en résulte donc une réduction du nombre d'animaux requis. Les lapins sont aussi très sensibles aux stimuli inflammatoires permettant de détecter la moindre réponse aux différentes doses utilisées.

Les drogues ont été données par voie orale (gavage), un mode d'administration non invasif comparativement à l'administration intraveineuse. Le BILL 284 a été dissout dans

l'eau stérile et le WEB 2086 dans du carboxyméthylcellulose sodique (0.5%) deux véhicules inoffensifs pour l'hôte. Des expériences préliminaires ont été effectuées pour déterminer les doses permettant d'inhiber 50% de la migration des PMNs induite par l'injection intradermique de LTB₄ par le BIIL 284 de même pour l'injection intradermique du PAF par le WEB 2086. Les doses obtenues ont été de 0.1 mg/kg pour le BIIL 284 et de 10 mg/kg pour le WEB 2086 respectivement.

La période d'accumulation des neutrophiles dans les sites de peau a été fixée à 2 heures suivant l'injection des agonistes, dû au fait que plus que 70% des neutrophiles ont migré pendant cette période (Marleau et al., non publié; Borregaard et al., 2005). Ils seront ensuite remplacés par les macrophages et les lymphocytes et les fibroblastes permettant la réparation du tissu atteint. Le nombre de PMNs par biopsie a été estimé par la mesure de la myéloperoxydase libérée par les granules azurophiles et, utilisée comme marqueur de la migration des PMNs au site inflammatoire (Borregaard et al., 1983). La formation d'œdème par l'injection locale de LTD₄ a été mesurée par la détermination de radioactivité à l'aide de l'albumine bovine marquée à l'iode 125.

De même pour les expériences de l'ischémie-reperfusion, les délais d'ischémie et de reperfusion ont été fixés selon le degré de dommages obtenus dans les différents tissus dont les poumons, le foie et les intestins. Les dommages ont été évalués par la détermination du nombre de PMNs dans les tissus cibles.

La réalisation d'une ischémie expérimentale nécessite le contrôle de plusieurs paramètres, le choix du modèle d'ischémie-reperfusion doit être pris en considération.

Dans notre modèle expérimental d'ischémie-reperfusion des membres inférieurs chez le lapin mis au point depuis de nombreuses années et progressivement amélioré a permis une meilleure connaissance de la physiopathologie et des cibles pharmacologiques potentielles dans l'ischémie-reperfusion des membres inférieurs.

Ce modèle d'ischémie-reperfusion est facile à exécuter et ne demande que quelques heures pour induire une accumulation des PMNs appréciable dans les poumons, le foie et les intestins, suite à la reperfusion. Le temps d'ischémie et le temps de reperfusion ont été déterminés dans des expériences préliminaires.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence un effet coopératif des médiateurs lipidiques, particulièrement du PAF et du LTB_4 , dans la migration extravasculaire des PMNs aux foyers inflammatoires et dans la formation d'œdème. La poursuite de ces études serait nécessaire, soit par l'utilisation de souris génétiquement déficientes en l'un ou l'autre de ces récepteurs, ou encore par le modèle d'athérosclérose chronique, qui pourrait être aussi un des meilleurs modèles d'inflammation chronique, permettant ainsi de découvrir l'effet de l'inhibition de ces deux médiateurs lipidiques. Aussi un inhibiteur de LTD_4 pourrait être utilisé permettant de voir si l'inhibition des trois récepteurs provoquera une inhibition encore plus importante de la migration des neutrophiles dans un contexte d'inflammation provoqué par plusieurs médiateurs, cas plus complexe.

4. Perspectives

Ces études appuient un rôle régulateur important des médiateurs lipidiques dans l'accumulation des neutrophiles au foyer inflammatoire. Cette accumulation massive, en plus de la libération de leur contenu protéolytique et la génération de ROS, contribue à l'étendue des dommages tissulaires. La réduction du recrutement des neutrophiles pourrait se révéler bénéfique en protégeant la zone à risque dans différent tissus. La poursuite de ces études dans le cadre d'une l'ischémie-reperfusion cardiaque pourrait s'avérer intéressante et utile, bien que certaines études appuient un effet bénéfique d'un traitement anti-leucotriène dans l'ischémie cardiaque. Des études prochaines pourraient non seulement de confirmer cet effet bénéfique, mais montrer un effet additif ou synergique d'un blocage simultané de plus d'un médiateur, et d'en déterminer les mécanismes sous-jacents. Dans ces études proposées, nous pourrions étudier le rôle de LTB₄, LTD₄ et du PAF dans la régulation du recrutement des leucocytes à la zone péri-infarctus. Les résultats pourraient conduire à un nouveau traitement des cardiopathies ischémiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Babior, B.M. 1992. The respiratory burst oxidase. *Adv. Enzymol.* 65:49-95.
- Benveniste, J., Henson, P.M. and Cochrane, C.G. 1972. Leucocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 136:1356-77.
- Benveniste, J. 1974. Platelet-activating factor, a new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. *Nature.* 249:581-82.
- Bélanger, C., Elimam, H., Borgeat, P. and Marleau, S. 2008. Cooperation of leukotriene B₄ and platelet activating factor in the regulation of neutrophil trafficking to dermal and pulmonary inflammatory sites in rats. *Immunol.* 124:295-30.

- Berry, C. E. & Hare, J. M. 2004 Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J. Physiol.* 555: 589–06.
- Birke, F.W., Meade,C.J., Anderskewitz,R., Speck,G.A. and Jennewein,H.-M. 2001. In vitro and in vivo pharmacological characterization of BIIL 284, a novel and potent leukotriene B₄ receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297: 458-66.
- Blalock, J. E. 1989. A molecular basis of bidirectional communication between the immune and the neuroendocrine systems. *Physiol. Rev.* 96:1-32.
- Borgeat,P., 1989. Biochemistry of the lipoxygenase pathways in neutrophils. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 67: 936-42.

- Borgeat,P. and Naccache,P.H. 1990. Biosynthesis and biological activity of leukotriene B₄. Clin. Biochem. 23:459-68.
- Borgeat, P., Picard,S., Poubelle,P., Sirois,P., Rola-Pleszczynski,M. and Braquet,P. 1985b. Leucotriènes et inflammation. Union Med. Can. 114:611-17.
- Borgeat,P. and Samuelsson,B. 1979. Transformation of arachidonic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Formation of a novel dihydroxycosatetraenoic acid. J. Biol. Chem. 245:2642-47.
- Borgeat,P. and Sirois,P. 1980. Les leucotriènes: la conclusion de 40 ans de recherche sur les médiateurs de l'anaphylaxie. Union Med. Can. 109:557-67.
- Borregaard, N., Lollike, K., 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 therapy of inflammation. Sem. Hematol. 34: 319-26.
- Byrne, R.L. Gompertz R.H. Venables C.W. 1997. Surgery for chronic pancreatitis: a review of 12 years experience. Ann. R. Coll. Surg. Engl. 79:405-09.
- Camussi,G., Aglietta,M., Malavasi,F., Tetta,C., Piacibello,W., Sanovio,F. and Bussolino,F. 1983. The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture. J. Immunol. 131: 2397-03.
- Canale VC, Smith CH. 1994. Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. Eur. J. Immunol. 24:3057-62.
- Carden D.L. Granger D.N. 2000. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury. J. Pathol. 190: 255-66.

- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. & Williamson, B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72:3666-70.
- Carter B.D. Kaltschmidt C. Kaltschmidt B. Offenhauser N. Bohm-Matthaei R., Baeuerle P.A, Barde Y,A. 1996. Selective activation of NF- κ B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. Science. 272:542-45.
- Chertov, O., Yang, D., Howard, O.M., and Oppenheim, J.J. 2000. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. Immunol. 177:68-78.
- Chiang,N., Arata,M. and Serhan,C.N., 2005. Anti-inflammatory circuitry: lipoxin, aspirin-triggered lipoxins and their receptor ALX. Prostagl. Leukot. Fatty acids 73: 63.

- C. Chiang, Y. Litingtung, E. Lee, K. E. Young, J. L. Corden, H. Westphal and Beachy. P. A. 1996. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog. *Nature*. 383:407–13.
- Chignard, M., LeCouedic, J.P., Tencé, M., Vargaftig, B.B. and Benveniste, J. 1979. The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature*. 279:799-800.
- Colgan DF, Murthy KG, Prives C, Manley JL. 1996. Cell-cycle related regulation of poly (A) polymerase by phosphorylation. *Nature*. 21:282–85.
- Collard, C. D., Vakea, A., Morrissey, M.A., Agah, A., Rollins, S. A. Reenstra, W. R., Buras, J. A., Meri, S., Stahl, G. L., 2002. Complement activation after oxidative stress: role of the lectin complement pathway. *Am. J. Pathol.* 156: 1549-56.
- Cronstein, B. N., Weissmann, G. 1993. The adhesion molecule of inflammation. *Arthritis Rheum.* 36: 147-57.

- Crowley SR., Cohen. R. L., Lucas. B. K., Liu. G., Shuman. M.A. and Levinson. A. D. 1996. Prevention of metastasis by inhibition of the urokinase receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90: 5021-25.
- Davies P. Bailey P.J. Goldenberg M.M. Ford-Hutchinson A.W. 1984. The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation. Annu. Rev. Immunol. 2:335-57.
- Demopoulos C.A. Pinckard R.N. Hanahan D.J. 1979. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). J. Biol. Chem. 19:9355–58.
- Dinarello C.A. Endres S. Meydani S.N. Meydani M. Hellerstein M.K. 1990. Interleukin1, anorexia and dietary fatty acids. Annals of the New York Academy of Sciences. 587:332-38.

- Dixon, R.A.F., Diehl, R.E., Opas, E., Rands, E., Vickers, P.J., Evans, J.F., Gillard, J.W. and Miller, D.K. 1990. Requirement of 5-Lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature*. 343:82.
- Drazen J.M. Israel E. O'Byrne P.M. 1999. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N. Engl. J. Med.* 21:197–06.
- Eberl M. 2002. Don't count your interleukins before they've hatched. *Trends Immunol.* 23:341-42.
- Eltzschig H.K. Ibla J.C. Furuta G.T. Leonard M.O. Jacobson K.A. Enjyoji K. Robson S.C. and Colgan S.P. 2003. Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J. Exp. Med.* 198: 783–96
- Fittschen,C., Sandhaus,R.A., Worthen,G.S. and Henson,P.M. 1985. Human neutrophils express elastase in response to chemotactic concentration of FMLP. *Fed. Proc.* 44: 1918-24.

- Ford-Hutchinson, A.W. 1990. Leukotriene B₄ in inflammation. *Immunology*. 10:1-12.
- Gautam, A., Densmore, C.L., and Waldrep, J.C. 2001. Pulmonary cytokine responses associated with PEI-DNA aerosol gene therapy. *Gene Ther.* 8: 254-57.
- Gulluoglu B.M. Aktan A.O. Yegen C. Kurtel H. Yalin R. 1996. Endothelin release in augmented with captopril in rat ischemia-reperfusion injury of the liver. *Res. Exp. Med (Berl)*. 196: 227-33.
- Guthrie, L.A., McPhail, L.C., Henson, P.M. and Johnston, R.B., Jr. 1984a. Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial liposaccharide. *J. Exp. Med.* 160: 1656-71.
- Harlan J.M. Win R.K. Vedder N.B. Catravas J.D. Callow A.D. Ryan U.S. 1993. Vascular endothelium: Proinflammatory role of leukocyte adhesion molecules. *Blood*. 84:2068-01.

- Hernandez-Maldonado, J. J. Padberg, F.T., Rubelwosky, J.J. 1992. Infra-popliteal artery injury: prompt revascularization affords optimal limb salvage. *J. Vasc. Surg.* 16: 877-85.
- Hoffbrand, A.V. and Pettit, J.E. 1987. Normal haematopoiesis and blood cells. *Blood.* 69: 467-72.
- Holger E.K. and Charles C.D. 2004. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British Medical Bulletin.* 70:71-86.
- Hubbard, J.A., Martin, S. A., Chaplain, L.C., Kelly, S.M. and Price J.A. 1991. Solution structures of calcitonin-gene-related-peptide analogues of calcitonin-gene-related peptide and amylin *Biochem. J.* 275:785–88.
- Hughes, K., Pulverer, B., Theocharous, P., and Woodgett, J.R. 1992. *Eur. J. Biochem.* 203: 305-11.

- Huie, R.E. and Padmaja,S. 1993. The reaction of NO with superoxide. Free Rad. Biol. Med. 18: 195-99.
- Huk J. Fryczkowski M. Bihun M. Połać R. 2001. Laparoscopic varicocele ligation. The comparative assessment of artery-ligating and artery-preserving varicocelectomy. Wiad Lek. 54:621-31.
- Huk, I., Nanobashvili., C., Neumayer, P., Polterauer,M., Parger,S.P and Malinsky T. 2000 Prostaglandin E1 reduces ischemia/reperfusion by normalizing nitric oxide and superoxide release. Shock. 14:234-42.
- Humphrey,D.M., McManus,L., Satouchi,K., Hanahan,D.J. and Pinckard, R.M. 1982. Vasoactive properties of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine and analogs. Lab. Invest. 46:422-27.

- Idstrom, J. P., Soussi, B. Elander, A. and Bylund- Fellenius, A.C. Purine metabolism after in vivo ischemia and reperfusion in rat skeletal muscle. 1990. Am. J. Physiol. 258: H1668-H1673.
- Janeway. C. A. Jr., Travers, P., Walport, M., Sholmchik, M. J. Immunobiology: The immune system in health and disease, 6th edition. Garland Science Publishing Inc.: New York; 2005.
- Johnson,C.D. 1999. Platelet-activating factor and platelet-activating factor antagonists in acute pancreatitis. Dig. Surg. 16: 93-01.
- Kaminski. K. A., Bonda. T. A., Korecki. J and Musical. W. 2002. Oxidative stress and neutrophil activation the two keystones of ischemia/reperfusion injury. Intl. J. Cardiol. 86: 41-45.
- Kaplan, A.P., Joseph, K. and Silverberg, M. 2002. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. J. Allergy. Clin. Immunol. 109: 195-09.

- Kecskemeti V., Balogh I. 2000. The role of platelet-activating factor (PAF) antagonists and nitric oxide in cardiac actions of PAF. Electrophysiological and morphological study. *J. Physiol. Pharmacol.* 51: 723-35.
- Keppler, D. 1992. Leukotriene biosynthesis, transport, inactivation, and analysis. *Revu. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 121: 1-30.
- Klebanoff, S.J., Gallin, M., Goldstein, and R. Snyderman. 1992. Oxygen metabolites from phagocytes. *Inflammation: basic, principles and clinical correlates.* New York, Raven Press. 541–588.
- Kim. D., Mebius, R.E., MacMicking. J. D., Jung. S., T., Castellanos, Y. 2000. Regulation of peripheral lymph node genesis by the tumor necrosis factor family member TRANCE. *J. Exp. Med.* 192:1467-78.
- Kohl, J., 2001. Anaphylatoxins and infectious and non infectious inflammatory diseases. *Mol. Immunol.* 38: 175-87.

- Kong. C., Ito K., Walsh M. A., Wada M. M., Liu Y., Kumar S., Barford. D., Nakamura Y., and Song H. 2004. Crystal structure and functional analysis of the eukaryotic class II release factor eRF3 from *S. Pombe*. *Mol. Cell.* 14: 233-45.
- Kubes P., Ibbotson G., Russell J., Wallace J.L. & Granger D.N., 1990*a*. Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am. J. Physiol.* 259: G300–G305.
- Kubes P, Suzuki M & Granger DN., 1990*b*. Platelet-activating factor-induced microvascular dysfunction: role of adherent leukocytes. *Am. J. Physiol.* 258: G158–G163.
- Labesque , F. S., Pofelski, J., Moreau-Gaudry, A., Bessard, G., Bonaz, B. 2000. Urinary leukotriene E₄ excretion: A biomarker of inflammatory bowel disease activity. *Inflammatory Bowel Diseases.* 14:769-74.
- Laing, W., Bulley, S., Wright, M., Cooney, J., Jensen, D., Barraclough and MacRae, E. 2004. A highly specific L-galactose-1-phosphate phosphatase on the path to ascorbate biosynthesis. *Proc.Nat.Acad.Sei.* 101:16976-81.

- Lee, D.S., Kingdon, R.D., Pacyna, J.M., Bouwman. A.F. and Tegen, I. 1999. Modelling base cations in Europe sources, transport and deposition of calcium. *Atmos. Environ.* 33:22410-56.
- Lennon. N.J., Kho. A., Backsai B.J., 1998. Dysferin interacts with annexins A1 A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J. Biol. Chem.* 50:466-73.
- Li C. and Jackson R.M., 2002. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *A.J. of Physiol.Cell Physiol.* 282: C227-C241.
- Louis,N.A., Hamilton,K.E. and Colgan,S.P. 2005. Lipid mediators networks and leukocyte transmigration. *Prostagl. Leukot. Essent. Fatty Acids.* 73:197-02.
- Lynch,J.M. Lotner,G.Z., Betz,S.J. and Henson,P.M. 1979. The release of platelet-activating factor by stimulated rabbit neutrophils. *J. Immunol.* 123: 19-26.

- Manev R., Manev H. 2004. 5-Lipoxygenase as a putative link between cardiovascular and psychiatric disorders. *Crit.Rev.Neurobiol.* 16:181-86.
- Mannion, BA., Weiss,J., Elsbach,P. 1990. Separation of sublethal and letal effects of polymorphonuclear leukocytes on Escherichia coli. *J. Clin. Invest.* 86:631-41.
- Marleau,S., Fruteau de Lacos.B., Sanchez, A.B., Poubelle, P.E. and Borgeat,P. 1999. Role of 5-lipoxygenase products in the local accumulation of neutrophils in dermal inflammation in the rabbit. *J. Immunol.* 163: 3349-58.
- Matsumoto, T., Funk, C.D., Rangstromdmark,O., Hoo,J.O., Jornvall,H. and Samuelsson,B., 1988. Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:26-30.
- McColl, S.R., Krump, E., Naccache, P. H., Braquet,P., Braquet,M. and Borgeat,P. 1991. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor enhances the synthesis of leukotriene B₄ by human neutrophils in response to platelet-activating factor. Enhancement of both arachidonic acid availability and 5-lipoxygenase activation. *J. Immunol.* 146: 1204-11.

- McCord, J. M., 1985. Oxygen-derived free radicals in post-ischemic tissue injury. N. Eng. J. Med. 312: 165-63.
- McDonald, P.P., McColl, S.R., Braquet, P. and Borgeat, P., 1994. Autocrine enhancement of leukotriene synthesis by endogenous leukotriene B₄ and platelet-activating factor in human neutrophils. Br. J. Pharmacol. 111: 852-60.
- McMahon, Blaithe and Godson, Catherine. 2004. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 286: F189-F201.
- Mencia-Huerta, J.M. and J. Benveniste, 1979. Platelet-activating factor and macrophages. Evidence for the release from rat and mouse peritoneal macrophages and not from mastocytes. Eur. J. Immunol. 9: 409-15.
- Mitchell S., Thomas G., Harvey K. 2002. Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of inflammation: stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in vivo. J. Am. Soc. Nephrol. 13 :2497-07.

- Moilanen, E., Kirkkola, A. L., Kankaanranta, H., Nieminen, M.M. and Vapaatalo, H. 1993. Interactions between synthesis of platelet-activating factor and leukotriene B₄ in isolated human polymorphonuclear leukocytes. *Inflammation* 17:705-14.
- Moldoveanu, A.I., Shephard, R.J., Shek, P.N. 2001. The cytokine response to physical activity and training. *Sports Medicine*. 31:115-44.
- Montrucchio G., Lupia E., Battaglia E., Del Sorbo L., Boccellino M., Biancone L., Emanuelli G., Camussi G. 2000. Platelet-activating factor enhances vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and neoangiogenesis in a murine matrigel model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:80–88.
- Morgan C. D., Nordin, S., and Murphy, C. 1995. Olfactory identification of an early marker of Alzheimer's disease. Impact of lexical functioning and detection sensitivity. *J.Clin.Exp.Neuropsychol.* 17:793-03.

- Morgan, Hugh D., Sutherland, Heidi G.E., Martin, David I.K., & Whitelaw, Emma. 1999. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nature Genetics*. 23:314-18.
- Murdoch, C. and Finn, A. 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 95:3032-43.
- Nakov R.1; Pfarr E.; Eberle S. 2002. HEAT Investigators. *Am.Hyperten*. 15: 583-9.
- Nano B, J., Kopadze T, Tvaladze M. 2002. Injuries of major extremity arteries. *World. J. Surg*. 27: 134-39.
- Noiri. E., Yokomizo. T., Nakao. A. 2000. An in vivo approach showing the chemotactic activity of leukotriene B₄ in acute renal ischemic-reperfusion injury. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 97:823-28.

- Pabst, M.j., Hellewell, P.G., Willams T.J. 1994. Immunopharmacology of neutrophils. priming of neutrophils. London. Academic press. 195-221.
- Papayianni A, Serhan C.N., Brady H.R. 1886. Lipoxin A₄ and B₄ inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells. J. Immunol. 156:2264–72.
- Powell, W. Morgante M., Doyle J. J., McNicol. J. W., Tingey, S. V. and Rafalski, J. A. 1996. Gene pool variation in genus glycine subgenus soja revealed a polymorphic nuclear and chloroplast microsatellites. Genetics. 144:793-03.
- Prescott J.H, Richardson J.T, Gillespie C.R. 1990. Cognitive function in diabetes mellitus: the effects of duration of illness and glycaemic control. Br. J. Clin. Psychol. 29:167–75.

- Qayumi A. K., Nikbakht-Sangari MN., Godin D.V. 1998. The relationship of ischemia/reperfusion injury of transplanted lung and the up-regulation of major histocompatibility complex II on host peripheral lymphocytes. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 115:978-89.
- Rao VSN., Santos FA., Paula, W.G., Silva. R. M. Campos A.R. 1999. Effect of acute and repeated dose administration of caffeine and pentoxifilline- induce mouse behavior in the hole-board test. *Psychopharmacol.* 144:61-66.
- 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.* 166:568-73.
- Reichlin, S. 1993. Neuroendocrine-immune interactions. *N. Engl. J. Med.* 329: 1246-53.

- Richter C., Theus. M., Schlegel. J., 1990. Cyclosporine A inhibits mitochondrial Pyridine nucleotide hydrolysis and calcium release. *Biochem. Pharmacol.* 40: 779-782.
- Riera et al., 1997 Rivera JA, Fernandez-del Castillo C, Pons M, Compton CC, Lewandrowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. 1997. Pancreatic mucinous ductal ectasia and intraductal papillary neoplasms. A single malignant clinicopathologic entity. *Ann. Surg.* 225:637-44.
- 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.* 286:345-51.
- Romina Claudia Capoccia., 2002. Modulation par l'oestradiol et l'aldosterone du contrôle hormonale de l'expression de la COX-2 dans les cardiomyocytes. Présentée à la Faculté de Médecine de l'Université de Genève. Thèse n° 10294.

- Rossoni G, Sala A, Berti F, Testa T, Buccellati C, Molta C, Muller-Peddinghaus R, Maclouf J and Folco GC., 1996. Myocardial protection by the leukotriene synthesis inhibitor BAY X1005: Importance of transcellular biosynthesis of cysteinyl-leukotrienes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 276: 335-41.
- Roth, C. König, S. Wienzek, S. Weigel, S.R. and Dobbstein. M. 1998. Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton and E4 34-kilodalton oncoproteins. *Journal of Virology.* 72:8510-16.
- Salmon, J. A. and Garland, L. G. 1991. Leukotriene antagonists and inhibitors of leukotriene biosynthesis as potential therapeutic agents. *Prog. Drug. Res.* 37: 9-90.
- Schwetze, L.M., Milligan. C.E., Bielke, W. and Robinson, S.J. 1994. Cloning cell death genes. *J. Neurobiol.* 25: 1005- 16.
- Serhan, C.N., Hamberg, M. and Samuelsson, B. 1984. Lipoxins: novel series of biologically active compounds from arachidonic acid in human leukocytes. *Biochemistry.* 81: 5335-39.

- Serhan, C. and Levy, B. 2003. Success of prostaglandine E2 in structure-fonction is a challenge for structure-based therapeutics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:8609-11.
- Serhan, C. N. 2005. Lipoxins and aspirin-triggered 15epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammatory and resolution. Prostagl. Leukot. Essent. Fatty acids. 73:141-62.
- Serio,D., Rizvi,T.A., Cartas,M., Kalyanaraman,V.S., Weber,I.T., Koprowski,H. and Srinivasan,A. 1997. Development of a novel anti-HIV-1 agent from within: Effect of chimeric Vpr-containing protease cleavage site residues on virus replication. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 94:3346–51.
- Shyy, J. Y.-J., and Chien, S. 1997. Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. Cur. Opin. Cell Biol. 9:707-13.
- Sirois, P. and Borgeat, P. 1984a. Pharmacologie des leucotriènes. J. Pharmacol. 15: 53-68.

- Sisson, J. H., Prescott, S.M., McIntyre, T.M. and Zimmerman, G. A. 1987. Production of platelet-activating factor by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.* 138:3918-26.
- Smith J. A. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol.* 65: 672-86.
- Smith, W. L., Borgeat, P. and Fitzpatrick, F. A. 1991. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (eds Vance, D. E. & Vance, J.) 297–325 (Elsevier, New York).
- Snyder, F., Fitzgerald, V. and Blank, M.L. 1996. Biosynthesis of platelet-activating factor and enzyme inhibitors. *Adv. Exp. Med. Biol.* 416: 5-10.
- Souza, C.J.H, Campbell, B.K, Orr B & Baird D.T. 2000. Role of bone morphogenetic proteins (BMPs) in granulosa cell differentiation in the sheep. *J. Reprod. Fertility Abstracts Series.* 26:32-38.

- Souza, D.G., Pinho,V., Soares, A.C., Shimizu, T., Ishii,S. and Teixeira,M.M. 2003. Role of PAF receptors during intestinal ischemia and reperfusion injury. A comparative study between PAF receptor-deficient mice and PAF receptor antagonists treatment. *Br. J. Pharmacol.* 139:733-40.
- Souza D.G, Cara D.C, Cassali G.D, Coutinho S.F. Silveira M.R. Andrade S.P. Poole S.P. Teixeira M.M. 2000a. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 131:1800-08.
- Souza D.G, Cassali G.D, Poole S, Teixeira M.M. 2001. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. *Br. J. Pharmacol.* 134: 985-94.
- Springer T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocytes emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 76: 301-14.

- Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R. 2001. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scand. J. Gastroenterol.* 36: 55-65.
- Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R. 2001. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scand. J. Gastroenterol.* 36: 55-65.
- Svanburg, C., Godaly, G., and Hedlund, M. 1999. Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Curr. Opin. Microbiol.* 2 :99-05.
- Synnestvedt K, Furuta G.T. Comerford K.M. Louis N, Karhausen J. Eltzschig H.K. 2002. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* 110: 993–02.

- Tamura M., Ohta. Y., Nakamura. H., Oda. M., Watanabe. G. 2002. Diagnostic value of plasma vascular endothelial growth factors as a tumor marker in patients with non-small cell lung cancer. *Int. J. Biol. Markers.* 17:275-79.
- Toyokuni S. 1999. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol. Int.* 49:91-02.
- Van der poll, T. 2001. Coagulation and inflammation. *J. Endotoxin Res.* 7:301-04.
- Walsh D.S, Tsou H.C. Harrington A. James WD, Peacocke M. 1996. Clonality of basal cell carcinoma—molecular analysis of an interesting case. *J. Invest. Dermatol.* 106:579–82.
- Weiss, S. J. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320:365-76.
- Weitzman, S. A. Gordon, L. I. 1990. Inflammation and cancer: role of phagocytose generated oxidants in carcinogenesis. *Blood.* 76:655-63.

- Woodard, D. S., Lee, T. and Snyder, F. 1987. The final step in the novo biosynthesis of platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.* 262:2520-27.
- Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takawa, Y, and Shimizu, T. 1997. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis. *Nature.* 387: 620-24.