

Université de Montréal

**Rôle de la phospholipase A₂ de type V dans le recrutement de
leucocytes au foyer inflammatoire**

Par

Stéphanie Lapointe

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maître es Science (M.Sc.)

En pharmacologie

Août 2008

© Stéphanie Lapointe, 2008

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :
Rôle de la phospholipase A₂ de type V dans le recrutement de leucocytes au
foyer inflammatoire

Présenté par
Stéphanie Lapointe

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pierre Beaulieu

Président-rapporteur

Dr Martin G. Sirois

Directeur de recherche

Dre Sylvie Marleau

Membre du jury

RÉSUMÉ

Les phospholipases A_2 sécrétées (sPLA₂) font partie d'une grande famille d'enzymes impliquées dans la synthèse d'écosanoïdes, de chimiokines et dans l'expression de molécules d'adhérence. Ce groupe comprend dix isoformes différentes (sPLA₂-IB, -IIA, -IIC, -IID, -IIE, -IIF, -III, -V, -X et XII) dont la majorité sont surexprimées en présence de molécules pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 β (IL-1 β) et le lipopolysaccharide bactérien (LPS). La sPLA₂-IIA fut longtemps considérée comme la principale sPLA₂ associée à l'inflammation. Toutefois, un nombre grandissant d'études suggère l'implication d'autres isoformes dans la réponse inflammatoire. Étant donné la similarité structurelle des différentes isoformes de sPLA₂, la majorité des inhibiteurs présentement disponibles sont non spécifiques et bloquent simultanément plus d'une sPLA₂. De ce fait, encore peu de choses sont connues quant au rôle précis de chacune des sPLA₂ dans la réponse inflammatoire. Ayant accès à des souris génétiquement modifiées n'exprimant pas la sPLA₂-V (sPLA₂-V^{-/-}), nous avons donc investigué le rôle spécifique de la sPLA₂-V dans le recrutement leucocytaire induit par le LPS, ainsi que sa capacité à moduler l'expression de certaines molécules d'adhérence. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle inflammatoire de la poche d'air sous-cutanée. L'administration de LPS dans la poche d'air de souris contrôles (WT) entraîne un recrutement leucocytaire important. Cet appel de cellules inflammatoires est cependant significativement diminué chez les souris sPLA₂-V^{-/-}. De plus, l'expression des molécules d'adhérence VCAM-1 et ICAM-1 est également diminuée chez les souris sPLA₂-V^{-/-} comparativement aux souris WT. Nos résultats démontrent donc le rôle important de la sPLA₂-V dans le recrutement leucocytaire et l'expression de molécules d'adhérence induits par le LPS, confirmant ainsi l'implication de cette enzyme dans le processus inflammatoire.

Mots clés: sPLA₂-V, leucocytes, lipopolysaccharide, molécule d'adhérence intercellulaire 1 (ICAM-1), molécules d'adhérence vasculaire 1 (VCAM-1), 12-épi-scalaradial et inflammation

ABSTRACT

Secretory phospholipases A₂ (sPLA₂s) are well known for their contribution in the biosynthesis of inflammatory eicosanoids. These enzymes also participate in the inflammatory process by regulating chemokine production and protein expression of adhesion molecules. The majority of sPLA₂ isoforms are up-regulated by proinflammatory stimuli such as bacterial lipopolysaccharide (LPS), which predominantly increases the expression of group V sPLA₂ (sPLA₂-V). Furthermore, it has recently been shown that sPLA₂-V is a critical messenger in the regulation of cell migration during allergic airway responsiveness. Herein, we investigated the effect of sPLA₂-V on LPS-mediated leukocyte recruitment and its capacity to modulate adhesion molecule expression. We conducted our study in the murine air pouch model, using sPLA₂-V null mice (sPLA₂-V^{-/-}) and control wild-type (WT) littermates. We observed that LPS (1 µg/mL)-mediated leukocyte migration in sPLA₂-V^{-/-} was attenuated by 52 and 86% after 6 and 12 hours of treatment, respectively, as compared to WT mice. In WT mice, treatment with the cell-permeable sPLA₂ inhibitor (12-epi-scalaradial; SLD) reduced LPS-mediated leukocyte recruitment by 67%, but had no additional inhibitory effect in sPLA₂-V^{-/-} mice. Protein analyses from the air pouch skin were carried out upon LPS-challenge, and the expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 were both significantly reduced in sPLA₂-V^{-/-} mice as compared to control WT mice. Together, our data demonstrate the role of sPLA₂-V in LPS-induced ICAM-1 and VCAM-1 protein overexpression and leukocyte recruitment, supporting the contribution of sPLA₂-V in the development of inflammatory innate immune responses.

Keywords: sPLA₂-V, leukocytes, lipopolysaccharide, intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, 12-epi-scalaradial, inflammation

TABLE DES MATIÈRES

1.0 INTRODUCTION	1
1.1 Le système immunitaire	2
1.1.1 Présentation générale	2
1.1.2 Cellules du système immunitaire / leucocytes	3
1.2 La réponse inflammatoire	5
1.2.1 Définition et description	5
1.2.2 La cascade d'adhésion leucocytaire	8
1.2.2.1 La famille des sélectines	10
1.2.2.2 La famille des intégrines.....	11
1.2.2.3 La superfamille des immunoglobulines	11
1.2.3 Les médiateurs solubles de la réponse inflammatoire	13
1.2.3.1 Les cytokines	14
1.2.3.2 Les chimiokines.....	15
1.2.3.3 Les protéines plasmatiques.....	17
1.2.3.4 Les médiateurs lipidiques	19
1.2.3.4.1 Le facteur d'activation plaquettaire (PAF).....	20
1.2.3.4.2 Les voies de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase...	20
1.3 Les phospholipases A₂	25
1.3.1 Les phospholipases A ₂ cytosoliques	26
1.3.2. Les phospholipases A ₂ indépendantes du calcium.....	26
1.3.3 Les phospholipases A ₂ sécrétées.....	27
1.3.3.1 Les récepteurs des sPLA ₂	35
1.3.3.2 Principales fonctions des sPLA ₂	36
1.3.3.2.1 Propriétés anti-bactériennes des sPLA ₂	36
1.3.3.2.2 Implication des sPLA ₂ dans le processus apoptotique....	37
1.3.3.2.3 Rôle des sPLA ₂ dans la réponse inflammatoire.....	38

1.3.3.2.4 Le rôle spécifique de la sPLA ₂ -V dans l'inflammation....	42
1.3.3.3 Implication des sPLA ₂ dans certaines pathologies	43
1.3.3.3.1 Les sPLA ₂ dans le SDRA	45
1.3.3.3.2 Les sPLA ₂ dans l'athérosclérose	46
1.3.3.4 Les différents inhibiteurs des PLA ₂	50
1.4 But du projet de recherche	51
1.5 Modèle expérimental	52
2.0 ARTICLE SCIENTIFIQUE	53
2.1 Abstract	57
2.2 Introduction	58
2.3 Material & Methods	61
Air pouch experiments	62
2.4 Results	65
3.0 DISCUSSION	90
3.1 Rôle de la sPLA ₂ -V dans le recrutement leucocytaire	91
3.2 Rôle de la sPLA ₂ -V sur les sous-populations de leucocytes ...	96
3.3 Rôle de la sPLA ₂ -V sur l'expression de ICAM-1 et VCAM-1	98
4.0 CONCLUSION	100
5.0 BIBLIOGRAPHIE	102

LISTE DES TABLEAUX

- Table I : Vue d'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme
- Table II : Principales molécules d'adhérence impliquées dans l'interaction cellules endothéliales-leucocytes
- Tableau III : Classification et caractérisation des phospholipases A₂
- Tableau IV : Rôle des phospholipases A₂ sécrétées dans certaines pathologies

Article

- Table I : Effect of DMSO on inflammatory cell migration into the mouse air pouch

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Les principales étapes de la réaction inflammatoire
- Figure 2 : Cascade d'adhésion et de migration leucocytaire
- Figure 3 : Relation entre les différents facteurs plasmatiques de l'inflammation
- Figure 4 : Schématisation de la synthèse des différents médiateurs inflammatoires lipidiques et de leurs principales fonctions
- Figure 5 : Illustration du site spécifique d'hydrolyse des phospholipides par les phospholipases A_2
- Figure 6 : Structure des sPLA₂
- Figure 7 : Représentation des effets des sPLA₂ sur les différentes cellules inflammatoires
- Figure 8 : Diverses fonctions des sPLA₂

ARTICLE

- Figure 1 : Representative PCR genotyping of sPLA₂-V
- Figure 2: Effect of sPLA₂-V on leukocyte recruitment mediated by LPS injection into the mouse air pouch
- Figure 3: Inhibitory effect of 12-epi-scalaradial on LPS-mediated leukocyte recruitment into the mouse air pouch
- Figure 4: Characterization by flow cytometry of leukocyte subpopulations recruited into the mouse air pouch
- Figure 5: Contribution of sPLA₂-V on LPS-mediated ICAM-1 and VCAM-1 protein expression

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA : acide arachidonique

Ag : antigène

BPB : bromure de p-bromophénacyle

Ca²⁺ : calcium

COX : cyclooxygénase

cPLA₂ : phospholipase A₂ cytosolique

DAL : déficience d'adhésion leucocytaire

DMSO : diméthylsulfoxyde

ESGL : *E-selectin glycoprotein ligand-1*

GlyCAM-1 : *glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*

HDL: lipoprotéines de haute densité

ICAM-1 : molécule d'adhérence intercellulaire-1

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

INF γ : Interféron gamma

iPLA₂ : phospholipase A₂ indépendante du calcium

LDL : lipoprotéines de faible densité

LOX : lipoxygénase

LPC : lysophosphatidylcholine

LPS : lipopolysaccharide

LT : leucotriènes

LX : lipoxines

MAPK : *mitogen-activated protein kinase*

MCAS: maladie coronarienne athérosclérotique

NF- κ B : facteur nucléaire Kappa B

PAF : facteur d'activation plaquettaire

PCR : réaction en chaîne par polymérase

PECAM-1: *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*

PG: prostaglandines

PLA₂ : phospholipase A₂

PSGL : *P-selectin glycoprotein ligand-1*

SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë

SLD : 12-épi-scalaradial

Souris sPLA₂-V^{-/-} : souris transgéniques n'exprimant pas la sPLA₂ type V

sPLA₂ : phospholipase A₂ sécrétée

TNF- α : *tumor necrosis factor α*

TXA₂ : thromboxane A₂

VCAM-1 : molécule d'adhérence cellulaire vasculaire-1

WT : *wild-type* / souris témoin

*«Chaque progrès donne un nouvel espoir suspendu à la solution
d'une nouvelle difficulté. Le dossier n'est jamais clos»
Claude Lévi-Strauss*

REMERCIEMENTS

Premièrement, je voudrais remercier le Dr Martin Sirois pour son accueil chaleureux et pour sa grande disponibilité. Les années passées dans son laboratoire furent enrichissantes tant sur le plan académique que personnel.

Merci au Dr Pierre Beaulieu et au Dre Sylvie Marleau d'avoir accepté d'investir de leur temps à la correction de ce mémoire.

Merci aux docteurs Bruce Allen, Angelino Calderone, Éric et Nathalie Thorin ainsi qu'à Dominique Lauzier et Louis Villeneuve pour les collaborations, le soutien technique et les précieux conseils qui ont grandement contribué au succès de ce projet de recherche.

Merci au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie (CRSNG), au Département de pharmacologie de la Faculté de médecine de l'Université de Montréal ainsi qu'à la Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal pour avoir cru à ce projet et avoir apporté leur soutien financier important.

Merci à Catherine et Caroline, mes deux complices féminines, pour leur écoute et leur participation active à la chorale des chansons « québécoises » ainsi qu'à Paul-Éduard et Ricardo pour leur sens de l'humour incomparable qui a contribué à égayer mes journées.

Merci à Alexandre Brkovic pour ses idées géniales et sa collaboration à l'élaboration de ce projet.

Je tiens aussi à remercier David pour son soutien, son amour ainsi que pour sa patience légendaire face à mes légers sauts d'humeur et nombreux retards.

Enfin, un merci tout particulier à ma mère et Mario ainsi qu'à toute ma famille et amis (es) pour leur compréhension et leurs encouragements soutenus.

AVANT-PROPOS

L'inflammation est une réaction tissulaire normale face aux agressions telles que les infections bactériennes, les traumatismes physiques, les corps étrangers, etc. Elle joue un rôle protecteur en participant au processus de défense innée de l'organisme et se manifeste cliniquement par quatre signes cardinaux : rougeur, chaleur, douleur et œdème, en plus d'engendrer fréquemment une limitation fonctionnelle de l'organe atteint. L'inflammation se divise en deux groupes selon la persistance du phénomène : L'inflammation *aiguë* se caractérise comme une réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée et qui tend à guérir naturellement. Pour sa part, l'inflammation *chronique* n'a aucune tendance à la guérison spontanée et évolue en persistant ou en s'aggravant. Dans ce cas, la réponse inflammatoire n'est plus considérée comme bénéfique, mais est plutôt associée à de nombreuses pathologies dont : l'athérosclérose, l'arthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires du tube digestif et bien d'autres.

Les phospholipases A_2 sécrétées (sPLA₂) font partie d'une grande famille d'enzymes d'intérêt majeur pour la recherche sur l'inflammation puisqu'elles participent à la production de médiateurs inflammatoires lipidiques et sont surexprimées dans plusieurs maladies inflammatoires. Des avancements importants ont été réalisés au cours des dernières années en ce qui a trait à la compréhension des différents médiateurs impliqués dans le développement de la réponse inflammatoire. Cependant, de nombreuses études sont encore nécessaires afin d'élucider le rôle précis de chacune des isoformes des sPLA₂ dans l'inflammation. Ainsi, cela permettrait de développer des médicaments capables de bloquer spécifiquement certaines sPLA₂ pro-inflammatoires sans toutefois affecter les fonctions physiologiques des autres isoformes. Ce travail de recherche vise donc une meilleure compréhension du rôle de la phospholipase A_2 de type V dans le recrutement de leucocytes au foyer d'inflammation et ce dans le but de découvrir une nouvelle cible potentielle pour le développement de thérapies anti-inflammatoires efficaces et plus spécifiques.

1.0 INTRODUCTION

1.1 Le système immunitaire

1.1.1 Présentation générale

Le système immunitaire est un système de défense nécessaire à la protection des individus contre les micro-organismes pathogènes ayant réussi à franchir les barrières naturelles (peau et muqueuses). Il s'agit d'un système très précis capable de faire la discrimination entre les molécules étrangères (antigènes; Ag) et les molécules de l'organisme lui-même (le soi).

Chez l'humain, on distingue deux types de réactions immunitaires : l'immunité innée (naturelle) et l'immunité acquise (adaptative) (Tableau I). L'immunité innée fait partie des mécanismes de défense non spécifiques, i.e. elle ne distingue pas les agents pathogènes les uns des autres. Elle débute tôt après l'exposition à la molécule étrangère et nécessite la participation de plusieurs types cellulaires dont les neutrophiles, les monocytes et les macrophages. La réponse inflammatoire est aussi comprise dans ce type de réaction immunitaire et sera abordée plus en détail ultérieurement. La réaction immunitaire acquise, quant à elle, se met en place plus tardivement. Elle est capable de reconnaître et d'éliminer sélectivement chaque type d'envahisseur (spécificité antigénique) et ce grâce à la participation de deux groupes cellulaires: les lymphocytes (cellules B et T) et les cellules présentatrices d'antigènes. Il est important de noter que, bien qu'elles soient séparées au point de vue théorique, les réactions immunitaires innée et acquise n'opèrent pas indépendamment l'une de l'autre. Elles interagissent et coopèrent de manière à assurer une immunité plus efficace.

Tableau I : Vue d'ensemble des mécanismes de défense de l'organisme

Mécanismes de défense non-spécifiques		Mécanismes de défense spécifiques
Barrières anatomiques et physiologiques	Immunité innée (naturelle)	Immunité acquise
<ul style="list-style-type: none"> • Peau • Muqueuses / sécrétions • Température corporelle 	<ul style="list-style-type: none"> • Phagocytes • Médiateurs chimiques • Réaction inflammatoire 	<ul style="list-style-type: none"> • Lymphocytes • Anticorps

1.1.2 Cellules du système immunitaire / leucocytes

Le système immunitaire comprend plusieurs types cellulaires nommés globules blancs ou leucocytes. Parmi ceux-ci, on retrouve les granulocytes aussi nommés polynucléaires, qui regroupent les neutrophiles, les basophiles et les éosinophiles. Les neutrophiles représentent à eux seuls environ 50-70% de l'ensemble des leucocytes sanguins. Ce sont les premières cellules retrouvées au niveau du foyer inflammatoire et elles sont nécessaires à la capture, l'ingestion et la digestion de particules solides inertes ou vivantes (phagocytose) [1]. Les éosinophiles sont également recrutés au site d'inflammation, en particulier lorsque celle-ci est engendrée par une réaction allergique [2]. Ces cellules ont un pouvoir phagocytaire moins important que les neutrophiles, mais important dans la défense contre les parasites. Les basophiles, quant à eux, sont très peu nombreux (< 1% de tous les leucocytes). Ils interviennent dans certaines réponses allergiques via la libération du contenu de leurs granules cytoplasmiques (dégranulation) [3]. De plus, les mastocytes sont aussi impliqués dans les réactions inflammatoire et allergique. Ce sont des cellules mononuclées, dont la participation se fait par la libération d'amines vasoactives (histamine, sérotonine) nécessaires à la vasodilatation et à l'augmentation de la perméabilité capillaire locale.

Au sein des cellules du système immunitaire on retrouve également des cellules phagocytaires mononuclées; les monocytes / macrophages. Les monocytes circulant dans le sang migrent dans le tissu extravasculaire vers le site d'inflammation et se différencient par la suite en macrophages activés [4]. Ces derniers participent au nettoyage tissulaire et à l'élimination des pathogènes grâce à leur propriété phagocytaire. De plus, ils sont aussi essentiels au déclenchement de la réponse immunitaire acquise en agissant comme cellules présentatrices d'antigènes [5]. Cette présentation d'antigènes est importante pour l'activation des lymphocytes qui, tel que mentionné précédemment, sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire spécifique (acquise). Les lymphocytes représentent environ 20-40 % des leucocytes et peuvent être grossièrement divisés en trois groupes; les cellules B, les cellules T et les cellules NK (*natural killer*) [6]. Les lymphocytes T sont responsables de l'immunité cellulaire, i.e. la formation de lymphocytes spécialement sensibilisés, capables de se fixer aux substances étrangères et de les détruire, tandis que les lymphocytes B sont impliqués dans l'immunité humorale, i.e. qu'ils se transforment en plasmocytes et produisent les anticorps (Ac) circulants, également capables d'attaquer les agents envahisseurs. Malgré le fait que les cellules NK font partie d'une sous-population de lymphocytes, ces dernières n'expriment pas de récepteurs membranaires et n'ont donc pas de spécificité immunologique précise. Elles assurent ainsi une réponse immunitaire non spécifique contre les cibles pathogènes grâce à leurs granules contenant certaines enzymes cytotoxiques.

1.2 La réponse inflammatoire

1.2.1 Définition et description

L'inflammation est un mécanisme de défense physiologique qui se déroule dans les tissus conjonctifs vascularisés en réponse à différentes agressions. Il s'agit d'une réaction immunitaire innée ayant comme but ultime de détruire l'agent causal, de limiter l'extension des lésions tissulaires et d'activer le processus de réparation. La plupart des caractéristiques de la réponse inflammatoire ont été décrites dès 1600 avant J.-C., dans des papyrus égyptiens. Ce n'est toutefois qu'au 1er siècle après J.-C. que le médecin romain Aulus Cornelius Celsus décrit les quatre signes cardinaux classiques de l'inflammation: *rubor* (rougeur), *calor* (chaleur), *dolor* (douleur) et *tumor* (gonflement; œdème). Un cinquième signe fut ajouté à cette liste, par Rudolf Virchow en 1858. Il s'agit de la *functio laesa* (perte fonctionnelle) qui est fréquemment observée au niveau de l'organe atteint.

Plusieurs agents endogènes et exogènes peuvent provoquer des lésions tissulaires et ainsi initier la réponse inflammatoire. Parmi les facteurs déclenchants, on retrouve des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, mycoses), des traumatismes physiques (engelures, brûlures, radiations) ou chimiques (venins, toxines, acides, bases), des corps étrangers, des réactions immunologiques, ainsi que certaines lésions vasculaires associées à une mort cellulaire (nécrose par ischémie).

Quel que soit son siège ou la nature de l'agent pathogène en cause, le déroulement de la réaction inflammatoire présente certaines phases caractéristiques [7] (Figure 1). Premièrement, tôt après l'agression initiale, il y a congestion active engendrée par une vasodilatation artériolaire, ce qui se traduit par une augmentation du flux sanguin et un ralentissement de la circulation au niveau du foyer inflammatoire. Ces capillaires engorgés sont

responsables de la rougeur (érythème) et de l'augmentation de la température du tissu (chaleur). Deuxièmement, il y a augmentation de la perméabilité vasculaire par contraction des cellules endothéliales permettant ainsi l'exsudation de liquide et de protéines plasmatiques au niveau tissulaire. L'accumulation de l'exsudat contribue au gonflement du tissu (œdème). Finalement, l'activation locale de l'endothélium vasculaire entraîne l'expression membranaire de molécules d'adhérence, ce qui permet aux leucocytes activés d'y adhérer et de le traverser afin d'atteindre le site lésionnel et d'enclencher la réparation tissulaire.

Le processus inflammatoire peut être classifié en deux groupes : l'inflammation aiguë ou chronique. L'inflammation aiguë se définit comme étant une réponse immédiate et de courte durée face à un agent agresseur. Elle est caractérisée par des phénomènes dits vasculo-exsudatifs, i.e. vasodilatation, augmentation de la perméabilité vasculaire permettant l'exsudation plasmatique et migration de cellules inflammatoires, principalement constituées de neutrophiles polymorphonucléaires. Elle dure en moyenne de quelques jours à quelques semaines et guérit habituellement sans trop de séquelles. L'inflammation chronique, quant à elle, témoigne d'une élimination incomplète du stimulus inflammatoire initial. Elle persiste sur une longue période (mois ou années) et entraîne une destruction tissulaire importante, principalement soutenue par les cellules inflammatoires recrutées. Ces dernières se composent essentiellement de macrophages, de lymphocytes et de plasmocytes. L'inflammation chronique est également caractérisée par la prolifération de fibroblastes, la déposition de collagènes, la fibrose et la néoangiogenèse.

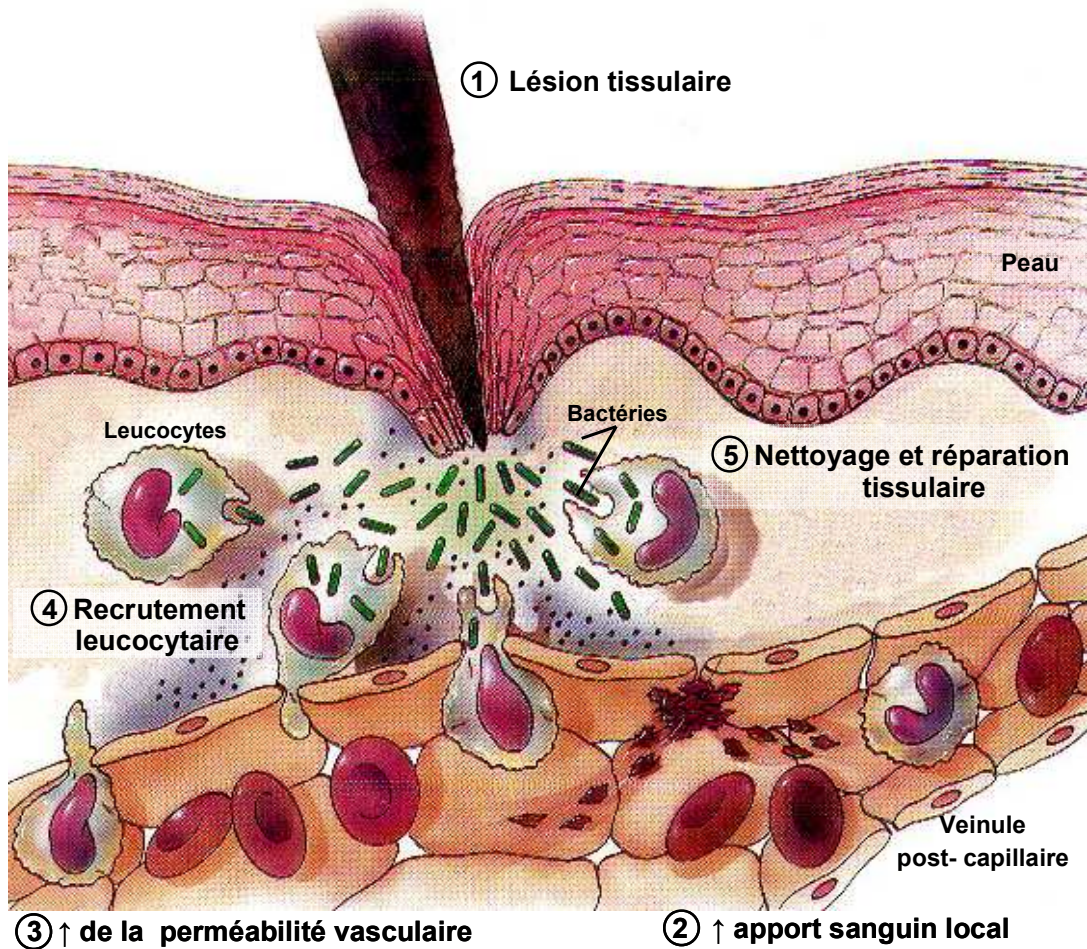


Figure 1 : Les principales étapes de la réaction inflammatoire. Plusieurs agents causent des dommages tissulaires (1) responsables de l'initiation du processus inflammatoire. Quelques minutes après l'agression, il y a vasodilatation artériolaire causant l'augmentation (↑) du flux sanguin local (2), suivi par une augmentation (↑) de la perméabilité vasculaire à l'origine de l'œdème (3). Par la suite, il y a migration des leucocytes activés (4) et participation de ceux-ci au nettoyage du foyer lésionnel permettant une réparation tissulaire adéquate (5).
 (Image adaptée d'après: <http://www.biologymad.com/Immunology/inflammation.jpg>)

1.2.2 La cascade d'adhésion leucocytaire

Dès les premiers instants de la réaction inflammatoire, les leucocytes circulants affluent en grand nombre au niveau du foyer lésionnel grâce à la libération de médiateurs inflammatoires, ainsi qu'à la vasodilatation locale. Cette dernière entraîne un ralentissement important du courant circulatoire favorisant ainsi la margination des leucocytes à proximité de l'endothélium. L'infiltration leucocytaire des tissus enflammés est initiée par la capture et le roulement des leucocytes à la surface des cellules endothéliales. Cette capture lâche et transitoire entraîne l'activation des leucocytes et permet, par la suite, leur adhésion ferme à la surface des veinules post-capillaires. Pour terminer, il y a diapédèse et migration unidirectionnelle des leucocytes dans les tissus extravasculaires vers le site inflammatoire.

Ce processus d'infiltration leucocytaire est minutieusement régulé et requiert la participation de plusieurs molécules d'adhérence exprimées à la surface des cellules endothéliales et des leucocytes. Ces molécules sont impliquées dans les interactions homophiliques (leucocyte-leucocyte), hétérophiliques (leucocyte-cellule endothéliale) et dans les interactions leucocytes-matrice extracellulaire. Il existe quatre familles majeures de molécules d'adhérence cellulaire : les cadhérines, les sélectines, les intégrines et la superfamille des immunoglobulines (superfamille Ig). Seules les trois dernières participent à une étape bien précise de la cascade d'adhésion leucocytaire (Figure 2).

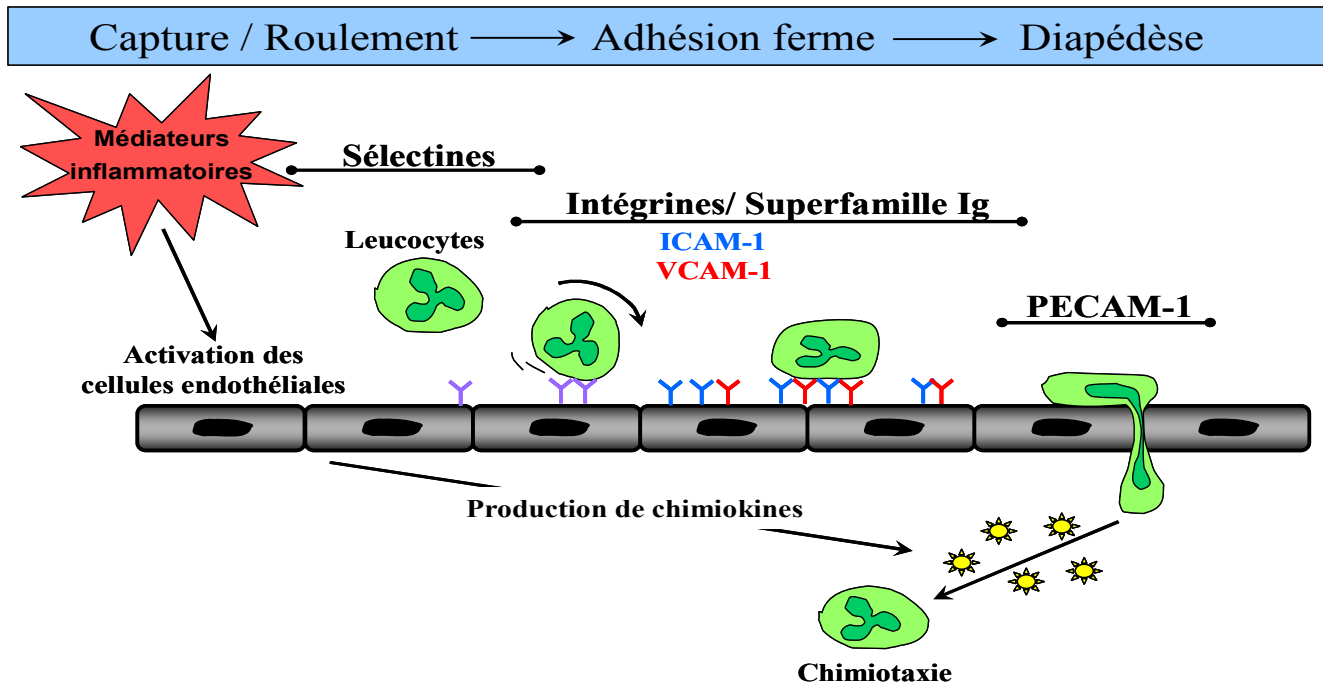


Figure 2 : Cascade d'adhésion et de migration leucocytaire. Initialement, un stimulus inflammatoire active les cellules endothéliales entraînant l'expression membranaire de molécules d'adhérence. Les sélectines exprimées sont impliquées dans la capture initiale et le roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium. Cette captation lâche permet l'activation des leucocytes par des médiateurs inflammatoires. Par la suite, l'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium est possible grâce aux intégrines et aux molécules d'adhérence apparentées aux immunoglobulines (superfamille Ig). Finalement, l'interaction avec PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) permet la diapédèse. Une fois sortis du vaisseau les leucocytes migrent de manière unidirectionnelle selon un gradient de concentration (chimiotaxie). (Figure adapté d'après réf : [8])

1.2.2.1 La famille des sélectines

Les sélectines (CD62) sont des glycoprotéines transmembranaires impliquées dans la capture initiale et le roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium vasculaire. Cette famille de molécules d'adhérence comprend trois membres; la sélectine L, la sélectine E et la sélectine P. La sélectine E est exprimée uniquement à la surface des cellules endothéliales activées. De ce fait, son expression est uniquement observable suite à la stimulation par des médiateurs pro-inflammatoires tels que le facteur nécrosant des tumeurs (TNF- α , pour *tumor necrosis factor α*), l'interleukine-1 β (IL-1 β), la thrombine et le lipopolysaccharide bactérien (LPS) [9, 10]. La sélectine P est emmagasinée dans les granules α des plaquettes et dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales [11, 12]. Suite à la stimulation de ces deux types cellulaires, la sélectine P est rapidement et transitoirement exprimée à la membrane cytoplasmique après quoi, elle est clivée ou réinternalisée [13, 14]. La sélectine L, quant à elle, est exprimée de manière constitutive à la surface des leucocytes. Lorsque les leucocytes sont activés, la partie extracellulaire de la sélectine L est clivée par une métalloprotéinase [15, 16]. De ce fait, la sélectine L est surtout reconnue pour être un marqueur de l'activation des leucocytes [17].

Les sélectines interagissent faiblement avec leurs ligands oligosaccharidiques respectifs (contre-récepteur). Parmi ces ligands, le PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*) [18, 19] est constitutivement exprimé sur toutes les cellules leucocytaires et se lie aussi bien à la sélectine P qu'à la E, tandis que le ESGL-1 (*E-selectin glycoprotein ligand-1*) est un ligand spécifique pour la sélectine E [20]. De plus, il existe aussi un contre-récepteur important pour la sélectine L, le GlyCAM-1 (*glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1*), qui est exprimé sur les cellules endothéliales des HEV (*high endothelial venules*) afin de permettre la domiciliation des lymphocytes aux nodules lymphatiques [21, 22].

1.2.2.2 La famille des intégrines

Les intégrines sont exprimées à la surface des leucocytes et impliquées dans leur adhésion ferme et leur diapédèse à travers la paroi endothéliale. Elles sont donc essentielles à l'accumulation leucocytaire au foyer d'inflammation. Ces molécules d'adhérence sont des hétérodimères composés d'une sous-unité α et d'une β , liées ensemble de manière non-covalente. Jusqu'à présent, au moins 18 sous-unités α et 8 sous-unités β ont été identifiées, permettant ainsi plusieurs combinaisons [23, 24]. Les différentes intégrines formées sont alors catégorisées selon la sous-unité β qu'elles contiennent. Les intégrines de la famille de β_1 (CD29) permettent principalement l'interaction des leucocytes avec les différentes composantes de la matrice extracellulaire telles que la laminine, la fibronectine et le collagène [25-27]. Les intégrines de la famille β_2 (CD18) sont, quant à elles, spécifiques aux leucocytes [28]. Elles sont exprimées à leur surface suite à la stimulation par différents médiateurs inflammatoires : l'interleukine 8 (IL-8), le facteur d'activation plaquettaire (PAF, pour *platelet activating factor*) et le LPS [29, 30]. Les intégrines permettent le contact cellule-cellule en s'associant avec les molécules d'adhérence apparentées aux immunoglobulines (superfamille Ig). L'importance de cette interaction est bien démontrée chez les individus présentant un déficit génétique en intégrines β_2 . Ces gens sont atteints d'une maladie nommée déficience d'adhésion leucocytaire (DAL). Ils souffrent d'infections graves et récurrentes dues à un défaut de recrutement de neutrophiles au niveau des sites infectieux, et meurent généralement en bas âge [31].

1.2.2.3 La superfamille des immunoglobulines

Les molécules d'adhérence appartenant à la superfamille des immunoglobulines possèdent toutes au moins deux domaines extracellulaires de type immunoglobulinique (Ig). Cette famille comprend cinq ICAM

(*intercellular adhesion molecule*) soit ; ICAM-1 à ICAM-5, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*)-1 et PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*)-1.

ICAM-1 est faiblement exprimée à la surface des cellules endothéliales non activées, ainsi qu'au niveau des monocytes et de certains lymphocytes [32]. Son expression peut être induite en condition inflammatoire suite à la stimulation par diverses molécules telles que ; IL-1 β , TNF- α , INF γ (interféron gamma) et LPS [33-35]. De plus, ICAM-1 joue un rôle important dans l'inflammation en permettant l'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium vasculaire. Cette adhésion est possible grâce à la liaison de ICAM-1 avec les intégrines α L β 2 (LFA-1 ou CD11a/CD18) et α M β 2 (Mac-1 ou CD11b/CD18) présents à la surface des leucocytes [36, 37]. De par son interaction avec l'intégrine α L β 2, ICAM-2 semble également impliquée dans l'interaction leucocytes-cellules endothéliales [38]. Cependant, contrairement à ICAM-1, ICAM-2 est exprimée de manière constitutive au niveau de l'endothélium et son taux d'expression n'est pas modulé en condition inflammatoire [39, 40].

VCAM-1 est observable au niveau de l'endothélium vasculaire suite à son activation par l'IL-1, le LPS ou le TNF- α . Son expression soutenue permet l'adhésion des monocytes, lymphocytes et éosinophiles aux cellules endothéliales. Les neutrophiles ne peuvent cependant pas s'y lier, puisqu'ils ne possèdent pas le contre-récepteur de VCAM-1 ; l'intégrine α 4 β 1 (VLA-4 ou CD49d/CD29) [41]. PECAM-1 (CD31), quant à elle, est présente sur toutes les cellules du compartiment vasculaire [42]. Elle est exprimée à des degrés variables sur la plupart des leucocytes et des plaquettes en plus d'être un des constituants majeurs des jonctions intercellulaires au niveau de l'endothélium. De par son interaction homotypique (CD31-CD31) elle permet la diapédèse des leucocytes à travers les cellules endothéliales et donc, l'appel de cellules inflammatoires dans les tissus extravasculaires [43-45].

Tableau II : Principales molécules d'adhérence impliquées dans l'interaction cellules endothéliales-leucocytes.

Molécules d'adhérence endothéliales	Ligands leucocytaires	Rôle principal
Sélectine P	PSGL-1	Roulement des leucocytes (neutrophiles, monocytes et lymphocytes) à la surface de l'endothélium
Sélectine E	ESGL-1 PSGL-1	Roulement et adhésion à l'endothélium activé (neutrophiles, monocytes et lymphocytes T)
ICAM-1	Intégrines $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1) Intégrines $\alpha_M\beta_2$ (MAC-1)	Adhésion, arrêt et migration des leucocytes à travers l'endothélium
ICAM-2	Intégrines $\alpha_L\beta_2$ (LFA-1)	Adhésion, arrêt et migration des leucocytes à travers l'endothélium
VCAM-1	Intégrines $\alpha_4\beta_1$ (VLA-4)	Adhésion à l'endothélium (éosinophiles, basophiles, monocytes et lymphocytes)
GlyCam-1 CD34	Sélectine L	Permettre la domiciliation des lymphocytes aux nodules lymphatiques
PECAM-1 (CD31)	PECAM-1	Migration des leucocytes à travers l'endothélium

1.2.3 Les médiateurs solubles de la réponse inflammatoire

Au cours de la réponse inflammatoire une variété de médiateurs sont libérés par les cellules du système immunitaire, les cellules endothéliales activées et les plaquettes. Ces médiateurs servent à déclencher ou à amplifier des aspects spécifiques de la réponse inflammatoire. De plus, certaines de ces molécules sont aussi responsables de la migration unidirectionnelle et orientée des leucocytes au site d'inflammation. Ce phénomène se nomme chimiotaxie et se caractérise plus spécifiquement par un déplacement cellulaire selon un gradient de concentration établi par les molécules

chimioattractantes, i.e. d'un endroit avec une faible concentration d'agents chimiotactiques vers un emplacement à haute concentration.

1.2.3.1 Les cytokines

Les cytokines sont des molécules importantes au développement et maintien d'une réponse inflammatoire. Ce sont des médiateurs peptidiques solubles sécrétés par une variété de cellules leucocytaires et non-leucocytaires en réponse à de nombreux stimuli. Ces molécules de faible poids moléculaire agissent de manière autocrine (sur les cellules qui les ont synthétisées) ou paracrine (sur les cellules voisines) par l'intermédiaire d'une fixation à leurs récepteurs spécifiques. De ce fait, les cytokines sont donc essentielles à la communication intercellulaire lors du processus inflammatoire [46].

Les cytokines régulent l'intensité et la durée de la réponse immunitaire en stimulant ou en inhibant l'activation, la prolifération et la différenciation de différentes cellules ainsi qu'en régulant la sécrétion des anticorps ou de d'autres cytokines. Elles ont des actions pléiotropiques, i.e. qu'une même cytokine peut avoir des effets biologiques différents sur diverses cellules, et redondants, i.e. que plusieurs cytokines peuvent avoir les mêmes fonctions. Bon nombre de cytokines sont nommées interleukines (IL), ce qui indique qu'elles sont sécrétées par des leucocytes et agissent également sur ceux-ci. Vu la grande diversité des cytokines nous ne verrons pas, dans le cadre de ce mémoire, les fonctions spécifiques de chacune des cytokines. Nous allons plutôt nous concentrer sur les principales cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire.

Les principales cytokines pro-inflammatoires sont : l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- α . Elles sont majoritairement (non exclusivement) synthétisées par les macrophages activés et sont les premières cytokines libérées lors de la réaction inflammatoire. Il existe deux formes importantes d'IL-1 : l'IL-1 α et IL-

IL-1 α est synthétisée et maintenue à l'intérieur de la cellule où elle peut se lier au noyau tandis que IL-1 β est libérée dans le milieu extracellulaire [47]. La sécrétion de cette dernière ainsi que celle du TNF- α est stimulée par des produits bactériens (ex : LPS), des toxines, des complexes immuns et d'autres cytokines. L'IL-1 β et le TNF- α ont des effets similaires et multiples. Ils induisent les effets systémiques de la réponse inflammatoire aiguë, i.e. la fièvre, l'inappétence, l'asthénie, la libération sanguine de neutrophiles à partir de la moelle osseuse, etc. [48]. Ces cytokines stimulent également l'adhésion des leucocytes à l'endothélium en augmentant l'expression des molécules d'adhérence ainsi que la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène nécessaire à la réparation tissulaire. De plus, l'interféron γ (IFN- γ) est aussi important pour la réponse inflammatoire. Il est principalement synthétisé par les lymphocytes activés et agit de manière indirecte en favorisant la production d'IL-1 et de TNF- α par les macrophages et en inhibant l'IL-10 qui elle-même bloque la synthèse des cytokines pro-inflammatoires [49-51].

L'IL-6, quant à elle, stimule la synthèse hépatique des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (ex : protéine C réactive, fibrinogène, facteurs du complément) [52], tandis que l'IL-8 agit comme puissant agent chimiotactique pour les neutrophiles et stimule leur dégranulation. L'IL-8 fait donc partie d'un groupe de cytokines nommées chimiokines [53-55].

1.2.3.2 Les chimiokines

Les chimiokines (**chimiotactiques cytokines**) font partie de la grande famille des molécules chimioattractantes. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire (6-14 kDa) capables d'induire une migration cellulaire selon un gradient de concentration (chimiotaxie) [56, 57] ou par un gradient de protéines d'adhérence fixées dans la matrice extracellulaire (haptotaxie).

Certaines chimiokines sont produites et sécrétées de manière constitutive. Elles participent ainsi à l'homéostasie de l'organisme en contrôlant le recrutement lymphocytaire au niveau des organes lymphoïdes [58]. Toutefois, tel que mentionné précédemment, la synthèse de plusieurs chimiokines peut également être induite par des molécules pro-inflammatoires tels que certaines cytokines (IL-1 β , TNF- α) et des produits bactériens (LPS). Ces chimiokines inflammatoires sont relâchées par les monocytes et les macrophages ainsi que par les cellules endothéliales, épithéliales et fibroblastiques. Elles contrôlent sélectivement l'adhésion, la chimiotaxie et l'activation de nombreux leucocytes. Elles dirigent ainsi, par l'entremise de leurs récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G [59], le mouvement des leucocytes vers le foyer inflammatoire.

Jusqu'à présent plus de 50 chimiokines ont été identifiées et séparées en quatre grands groupes selon la position de leurs deux premiers résidus cystéines. Les chimiokines du sous-groupe CC ou chimiokines β sont les plus nombreuses et agissent principalement sur les monocytes et lymphocytes T. Les membres les plus connus sont; MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*; CCL2), MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein a*; CCL3) et RANTES (*regulated on activation normal T-cell expressed and secreted*; CCL5), qui présentent une activité chimiotactique pour les monocytes, les cellules NK et les lymphocytes T [60-62], en plus d'induire la dégranulation des basophiles et des éosinophiles [63, 64].

Les chimiokines du sous-groupe CXC (chimiokine α) possèdent un acide aminé entre leurs deux premières cystéines. La chimiokine la plus connue de ce groupe est l'IL-8 (CXCL8). Tout comme cette dernière, la majorité des chimiokines CXC attire les neutrophiles aux sites d'inflammation aiguë [55]. De plus, CXCL8 est une chimiokine à caractère pro-inflammatoire principalement sécrétée par les cellules endothéliales et les macrophages.

Elle accroît la perméabilité vasculaire [65, 66] et l'adhésion des neutrophiles activés à la surface de l'endothélium [67, 68].

Le troisième sous-groupe, CX₃C (chimiokines γ), dont les deux premières cystéines sont séparées par trois acides aminés, est formé d'un seul membre, la fractalkine (aussi nommée neurotactine). Il s'agit d'une chimiokine un peu particulière puisqu'elle possède à la fois un domaine hydrophile extracellulaire et un domaine hydrophobe, qui permet son ancrage dans la membrane plasmique des cellules endothéliales et de certaines cellules cérébrales [69, 70]. Le domaine extracellulaire peut également être clivé donnant ainsi naissance à une chimiokine soluble [71]. Lorsqu'elle est liée à la membrane plasmique, la fractalkine agit comme une molécule d'adhérence, tandis que sous sa forme soluble, elle se comporte comme un agent chimioattractant pour les monocytes, les lymphocytes T et les neutrophiles [72].

Les chimiokines du sous-groupe C, quant à elles, ne possèdent que deux résidus cystéine. La lymphotactine α (XCL1) et la lymphotactine β (XCL2) sont les deux seuls membres de ce sous-groupe et ont un effet chimiotactique pour les lymphocytes [73, 74].

1.2.3.3 Les protéines plasmatiques

Tel que mentionné précédemment, les manifestations systémiques de l'inflammation comprennent, la fièvre, l'asthénie, l'hyperleucocytose et également une perturbation de l'équilibre des protéines plasmatiques. Celles-ci comprennent entre autre trois grands systèmes interconnectés producteurs de médiateurs inflammatoires, i.e. les systèmes des kinines, de la coagulation et du complément (Figure 3).

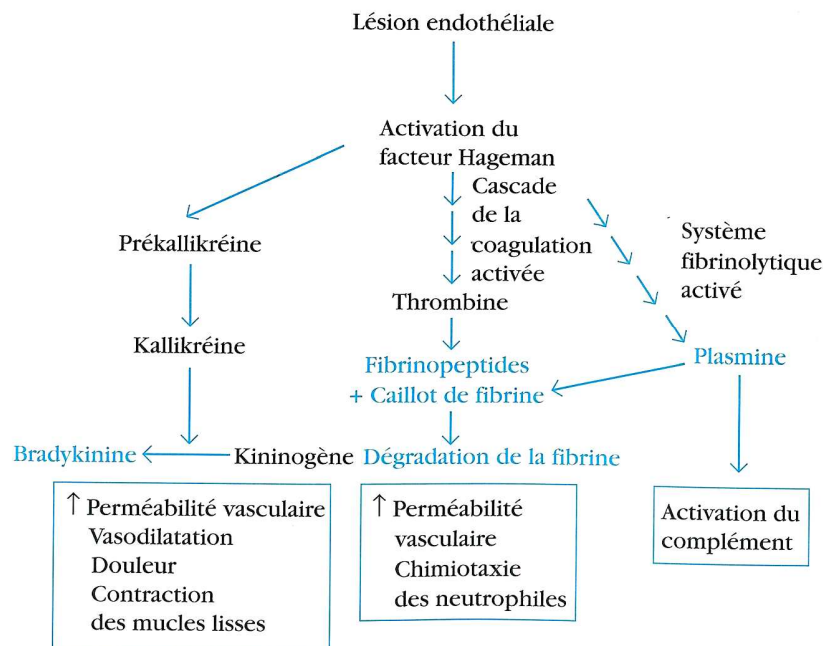


Figure 3 : Relation entre les différents facteurs plasmatiques de l'inflammation. La lésion tissulaire induit l'activation du facteur de Hageman (XII) et par la suite la formation de médiateurs enzymatiques plasmatiques par le système des kinines et le système de coagulation, en plus d'activer le système du complément. Ces différents systèmes interagissent tous ensemble et contribuent à la phase aiguë de la réponse inflammatoire. (↑ = augmentation). Tirée du livre; *Immunologie : Le cours de Janis Kuby*, ©Dunod, Paris, 2001.

De manière générale, le système des kinines est une cascade enzymatique initiée par une lésion tissulaire, entraînant l'activation du facteur de coagulation XII (Hageman) et se terminant par la formation de bradykinine. Cette dernière participe à la réponse inflammatoire locale en induisant une vasodilatation et une hyperperméabilité vasculaire. De plus, elle provoque également de la douleur et une contraction des muscles lisses, symptômes fréquemment associés à l'inflammation [75].

Tout comme le système des kinines, c'est également l'activation du facteur XII par des fragments tissulaires altérés qui constitue le mode de

déclenchement habituel du système de la coagulation au cours de l'inflammation. Une fois activé, ce système entraîne la formation de caillots de fibrine permettant ainsi de prévenir les saignements et limiter la dispersion des pathogènes envahisseurs dans la circulation sanguine. De plus, les produits de dégradation de la fibrine ainsi formée contribuent à la réponse inflammatoire en agissant comme puissant agent chimiotactique pour les neutrophiles [76, 77].

Le système du complément comprend plus de 30 protéines solubles, principalement sécrétées par le foie [78]. Ce système hautement régulé participe à la réponse inflammatoire via la formation d'anaphylatoxines (C3a, C4a et C5a). Ces petites molécules formées par le clivage de protéines du complément se lient aux récepteurs des mastocytes et des basophiles et induisent leur dégranulation. L'histamine ainsi libérée provoque la contraction des muscles lisses et l'augmentation de la perméabilité vasculaire. De plus, le C3a et le C5a sont également des molécules chimioattractantes capables d'induire l'adhésion des leucocytes à l'endothélium [79]. Ces anaphylatoxines participent aussi à la migration leucocytaire au niveau du site inflammatoire via la relâche de chimiokines (MCP-1, RANTES et IL-8) [80, 81].

1.2.3.4 Les médiateurs lipidiques

Les médiateurs lipidiques forment un groupe complexe de molécules synthétisées à partir des phospholipides membranaires. En effet, l'hydrolyse des phospholipides par la phospholipase A₂ (PLA₂), entraîne la libération d'acides gras libres et de lysophospholipides. Parmi les acides gras libres, l'acide arachidonique (AA) est le plus souvent produit et est le précurseur commun des médiateurs inflammatoires de la famille des écosanoïdes comprenant entre autres : les prostaglandines, les leucotriènes, les

thromboxanes ainsi que les lipoxines. De plus, la libération de lysophospholipides, plus spécifiquement de lyso-PAF, est également essentielle à la synthèse d'un autre médiateur inflammatoire puissant, le PAF (Figure 4).

1.2.3.4.1 Le facteur d'activation plaquettaire (PAF)

Le PAF fut initialement découvert en 1970 grâce à sa capacité d'activer les fonctions plaquettaires. Depuis, il a également été identifié comme un puissant médiateur pro-inflammatoire. Il est produit et relâché par un grand nombre de cellules telles que les monocytes, les macrophages, les granulocytes, les cellules endothéliales et il joue un rôle important à plusieurs niveaux de la cascade inflammatoire. En effet, en plus d'augmenter la perméabilité vasculaire [82, 83], le PAF induit également la dégranulation des basophiles, éosinophiles et neutrophiles [84, 85], l'activation des mastocytes [86] ainsi que la synthèse de cytokines (IL-6, IL-4) [87, 88] et de leucotriènes [89, 90]. De plus, le PAF est également impliqué dans l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire [91, 92].

1.2.3.4.2 Les voies de la cyclooxygénase et de la lipoxygénase

En 1982, les Dr Bergstrom, Vane et Samuelsson se sont vus octroyer le prix Nobel de médecine pour leurs recherches sur les leucotriènes (LT), les thromboxanes (Tx) et les prostaglandines (PG) [93]. La synthèse de l'ensemble de ces médiateurs inflammatoires à partir de l'AA se fait via deux voies : la voie de la cyclooxygénase (COX) et celle de la lipoxygénase (LO).

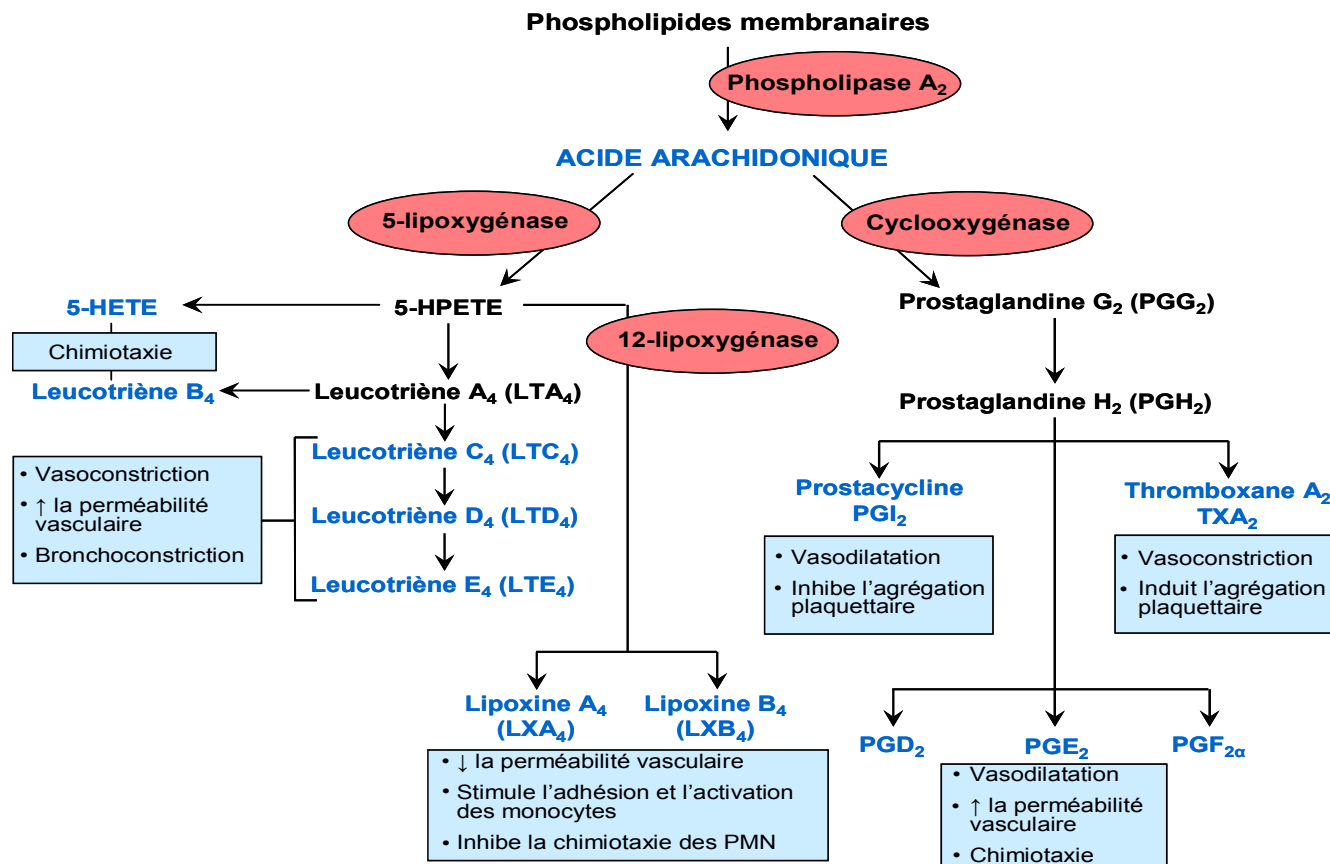


Figure 4. Schématisation de la synthèse des différents médiateurs inflammatoires lipidiques et de leurs principales fonctions. ↑ = augmentation, ↓ = diminution, PMN = neutrophile polymorphonucléaire, 5-HETE = acide 5-hydroxyéicosatétraénoïque et 5-HPETE = acide 5- hydroperoxyéicosatétraénoïque)

La voie de la lipoxigénase assure la synthèse de leucotriènes (LTB₄, LTC₄, LTD₄ et LTE₄) et de lipoxines (LXA₄ et LXB₄) via le métabolisme de l'AA par l'enzyme 5-lipoxigénase. Cette dernière est présente dans les cellules inflammatoires : neutrophiles, basophiles, éosinophiles, mastocytes, macrophages et lymphocytes. Ces cellules assurent la synthèse de leucotriènes en réponse à de nombreux stimuli incluant le facteur C5a du complément, le LPS, le PAF, l'IL-8, etc. Bien qu'il ait été établi que les cellules endothéliales ne possèdent pas la 5-lipoxigénase, donc ne synthétisent pas de leucotriènes, elles peuvent cependant générer les LTC₄ et LTD₄ par un métabolisme transcellulaire [94, 95]. Au moment de l'activation des leucocytes, le LTA₄ libéré à proximité des cellules endothéliales est transféré et par la suite transformé en LTC₄ et LTD₄ par l'endothélium.

Les fonctions biologiques des LTC₄, LTD₄ et LTE₄ sont connues depuis les années 1940. Cependant, à cette époque ces leucotriènes étaient plutôt considérées comme une seule molécule nommée SRS-A (*slow-reacting substance of anaphylaxis*). Celle-ci était relâchée par les macrophages lors de réactions allergiques sévères (réaction anaphylactique) et entraînait une bronchoconstriction [96]. Depuis il a été démontré que les LTC₄, D₄ et E₄ ne sont pas seulement impliqués dans la bronchoconstriction, mais également dans la vasoconstriction et l'hyperperméabilité vasculaire. Le LTB₄, quant à lui, ne produit qu'une minime augmentation de la perméabilité vasculaire. Il a le rôle le plus important dans la réaction inflammatoire puisqu'il exerce un puissant pouvoir chimiotactique sur les polynucléaires [97], sur les éosinophiles [98] et sur les lymphocytes T [99]. De plus, il stimule aussi l'adhésion des polynucléaires aux cellules endothéliales, leur dégranulation et la libération de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et les lymphocytes [100].

La 5-lipoxygénase, en collaboration avec la 12-lipoxygénase, permet également la synthèse de lipoxines. Les LXA₄ et LXB₄ sont impliquées de plusieurs façons dans la résolution de la réponse inflammatoire. En effet, elles diminuent le chimiotactisme des polynucléaires [101] et leur adhésion aux cellules endothéliales [102] stoppant ainsi leur migration aux foyers d'inflammation. De plus, elles activent les monocytes [103] et stimulent la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages [104]. Leur rôle anti-inflammatoire s'oppose donc à celui des leucotriènes pro-inflammatoires.

La voie de la cyclo-oxygénase implique la participation de deux enzymes, COX-1 et COX-2. COX-1 est exprimée de manière constitutive dans la majorité des tissus de l'organisme et est nécessaire à la protection du tube digestif et de la fonction rénale. La COX-2 est, quant à elle, surexprimée en réponse à divers stress cellulaires et stimuli inflammatoires (ex : LPS, IL-1 β , TNF- α) [105]. De plus, contrairement à COX-1, COX-2 est associée à de nombreux processus pathologiques (cancer, inflammation chronique, douleur, etc.). L'activation de ces enzymes est à l'origine de la synthèse des prostaglandines (PGD₂, PGE₂ et PGF_{2 α}), de la prostacycline (PGI₂) et du thromboxane A₂ (TXA₂).

Une fois produite et libérée par les cellules endothéliales, la PGI₂ peut inhiber l'agrégation plaquettaire et induire une hyperpolarisation [106] des cellules musculaires lisses entraînant une vasodilatation locale [107, 108]. Ces effets peuvent être contrés par le TXA₂, un antagoniste naturel de la PGI₂, principalement produit par les plaquettes sanguines. Une fois fixé à son récepteur spécifique couplé à une protéine G [109], le TXA₂ peut engendrer une vasoconstriction, une activation plaquettaire ainsi qu'une prolifération des cellules musculaires lisses [110]. En ce qui a trait aux prostaglandines, leurs effets sont très variables et dépendent du type de prostaglandines impliquées (PGD₂, PGE₂ ou PGF_{2 α}) et de leur concentration. De ce fait, il a été démontré que de fortes concentrations de PGE₂ bloquent l'augmentation de

la perméabilité vasculaire induite par la bradykinine tandis qu'à des concentrations plus faibles, la PGE₂ induit une hyperperméabilité [111]. De manière générale, les prostaglandines sont également responsables de la fièvre, de la douleur, de la vasodilatation et du recrutement leucocytaire associé au processus inflammatoire.

De nombreux agents anti-inflammatoires ciblant la voie des COX ont été développés afin de traiter les pathologies ayant une composante inflammatoire. Parmi ces médicaments, on retrouve les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) non spécifiques, i.e. ils inhibent simultanément COX-1 et COX-2 (aspirine, ibuprofène, indométhacine, naproxène, etc.). De par leur inhibition de la COX-1, ces médicaments entraînent des effets secondaires importants principalement des douleurs gastro-intestinales et des ulcères (saignements). Afin de prévenir ces effets non désirables certains inhibiteurs spécifiques de la COX-2 ont également été développés : célécoxib (Celebrex®) et rofécoxib (Vioxx®) qui fut retiré du marché en 2004 à cause du risque de problèmes cardiovasculaires. Malheureusement, aucun de ces médicaments ne parvient à guérir les maladies inflammatoires chroniques.

En somme, l'inflammation est habituellement un processus physiologique bénéfique participant à l'homéostasie tissulaire. Cependant elle peut devenir néfaste si elle perdure trop longtemps ou est mal régulée. De ce fait, l'inflammation chronique est donc associée à de nombreuses pathologies inflammatoires incluant entre autres : polyarthrite rhumatoïde, maladie de Crohn, colite ulcéreuse, pancréatite chronique, etc.

1.3 Les phospholipases A₂

Les phospholipases A₂ (PLA₂) sont des enzymes qui hydrolysent la liaison ester des phospholipides membranaires en position *sn*-2, produisant ainsi des lysophospholipides et des acides gras libres (Figure 5). Tel que mentionné précédemment, ce clivage des phospholipides est à l'origine de la synthèse des médiateurs inflammatoires de la famille des écosanoïdes et du PAF. Ces enzymes sont classées en trois sous-groupes selon leur localisation, leur poids moléculaire et la quantité de calcium (Ca²⁺) dont elles ont besoin pour soutenir leur activité catalytique : les PLA₂ Ca²⁺-dépendantes cytosoliques (cPLA₂), les PLA₂ Ca²⁺-dépendantes sécrétées (sPLA₂) et les PLA₂ Ca²⁺-indépendantes (iPLA₂).

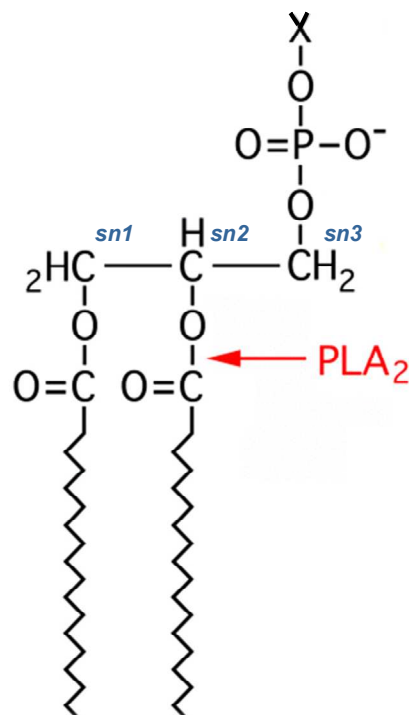


Figure 5 : Illustration du site spécifique d'hydrolyse des phospholipides par les phospholipases A₂. (Figure adaptée de la référence [112])

1.3.1 Les phospholipases A₂ cytosoliques

Les cPLA₂ sont des enzymes de haut poids moléculaire (85 kDa) nommées ainsi de par leur localisation principale. Ce sous-groupe de PLA₂ comprend trois membres : les cPLA₂ α, β et γ également appelés respectivement cPLA₂-IVA, -IVB et -IVC [113]. La cPLA₂α est constitutivement exprimée dans la majorité des cellules de l'organisme à l'exception des lymphocytes, tandis que la cPLA₂β est exprimée dans le pancréas, le cerveau, le cœur ainsi que le foie et la cPLA₂γ dans le muscle squelettique [113] (Tableau III). La cPLA₂α fut découverte en 1991 dans le cytosol de plusieurs types cellulaires et tissus [114, 115] et est depuis l'enzyme la mieux connue de ce groupe. Son expression est augmentée suite à la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires et s'accompagne d'un accroissement de la production de médiateurs lipidiques. La synthèse de ces médiateurs est rendue possible grâce à l'activation de la cPLA₂α, qui est régulée à la fois par les niveaux de Ca²⁺ intracellulaire et par la phosphorylation de certains de ses résidus sérine. Cette activation permet à la cPLA₂α de migrer au niveau périmoléculaire, favorisant ainsi son interaction avec ses substrats (phospholipides) [116]. Cela lui permet également de libérer de l'AA à proximité des enzymes responsables de la synthèse d'écosanoïdes, i.e. les cyclooxygénases et les lipoxygénases et ainsi favoriser la synthèse de ces médiateurs inflammatoires lipidiques.

1.3.2. Les phospholipases A₂ indépendantes du calcium

Le groupe VI, soit les iPLA₂, comprend uniquement deux membres : la iPLA₂β (VIA) et la iPLA₂γ (VIB) (Tableau III). Ce sont des enzymes ayant un poids moléculaire de 85-88 kDa et qui, comme leur nom l'indique, ne dépendent pas du Ca²⁺ pour être complètement actives. La iPLA₂β est exprimée de manière ubiquitaire dans le cytosol de plusieurs cellules et est

principalement impliquée dans l'homéostasie des membranes cellulaires [117]. Pour ce faire, elle participe au contrôle des niveaux de phospholipides ainsi qu'au remodelage des membranes cytoplasmiques et intracellulaires [118]. De plus, la iPLA₂β semble également jouer un rôle dans la prolifération cellulaire [119, 120] et, paradoxalement, dans le processus apoptotique [121, 122] par des mécanismes encore mal élucidés. En ce qui a trait à la iPLA₂γ, due à sa découverte tardive [123], ses fonctions enzymatiques et physiologiques demeurent encore inconnues.

1.3.3 Les phospholipases A₂ sécrétées

Les sPLA₂ ont été initialement découvertes dans les venins d'abeilles et de serpents [124]. Ces sPLA₂ sont considérées comme myotoxiques et neurotoxiques puisque leur administration entraîne une nécrose rapide des fibres musculaires squelettiques ainsi que des dommages nerveux importants [125]. Chez les mammifères, les sPLA₂ représentent le sous-groupe de PLA₂ le plus volumineux, comprenant dix enzymes ou isoformes différentes : sPLA₂-IB, -IIA, -IIC, -IID, -IIE, -IIF, -III, -V, -X et -XII (Tableau III). Le profil d'expression de ces différentes sPLA₂ varie énormément d'une cellule à l'autre. Cependant, elles partagent certaines caractéristiques communes soit un faible poids moléculaire (14 à 19 kDa), un contenu important en ponts disulfures et le besoin de Ca²⁺ (concentrations de l'ordre du millimolaire) pour soutenir leur activité catalytique. Ces enzymes sont exprimées et emmagasinées à l'intérieur des cellules. Suite à une activation appropriée de ces dernières, les sPLA₂ sont habituellement relâchées dans le milieu extracellulaire, mais peuvent également rester dans des vésicules cytoplasmiques ou être associées aux membranes des différents organelles [126, 127].

Tableau III. Classification et caractérisation des phospholipases A₂^a

Groupes	Autre noms	Espèces	Source chez l'humain	Localisation	Poids (kDa)	Besoin en Ca ²⁺	Fonctions principales
I	A	Serpents	-----	Sécrétée	13- 15	mM	Toxine de venin
	B	Mammifères	Pancréas, poumons, reins, rate	Sécrétée	13- 15	mM	Digestion de nourriture
II	A	Mammifères et serpents	Synovie, poumons, placenta, sérum, rate, thymus, os, moelle osseuse, chondrocytes, kératinocytes, plaquettes, mastocytes, macrophages	Sécrétée	13- 15	mM	Toxine, bactéricide, relâche d'AA
	B	Serpents	-----	Sécrétée	13- 15	mM	Toxine
	C	Rongeurs (testicules)	-----	Sécrétée	15	mM	
	D	Humains et rongeurs	Organes lymphoïdes, côlon, pancréas, endothélium, éosinophiles, mastocytes, kératinocytes	Sécrétée	14	mM	Relâche d'AA
	E	Humains et rongeurs	Cerveau, cœur, poumons, placenta, muscle lisse	Sécrétée	15	mM	Relâche d'AA
	F	Humains et rongeurs	Reins, foie, placenta, synovie, testicules, thymus, endothélium	Sécrétée	17	mM	Relâche d'AA

Groupes	Autre noms	Espèces	Source chez l'humain	Localisation	Poids (kDa)	Besoin en Ca ²⁺	Fonctions principales	
III		Humains et reptiles	Cœur, reins, foie, muscle	Sécrétée	55	mM	Toxine	
IV	A	cPLA ₂ α	Mammifères	Majorité des cellules	Cytosolique	85	< μM	Relâche d'AA
	B	cPLA ₂ β	Mammifères	Cerveau	Cytosolique	110	< μM	Relâche d'AA
	C	cPLA ₂ γ	Mammifères	Muscles squelettiques, coeur	Cytosolique	60	Aucun	Relâche d'AA
V		Humains et rongeurs	Cœur, poumons, placenta, épithélium respiratoire, endothélium vasculaire, chondrocytes, fibroblastes, kératinocytes, macrophages, neutrophiles	Sécrétée	14	mM	Relâche d'AA	
VI	A	iPLA ₂ β	Mammifères	Majorité des cellules	Cytosolique	85-88	Aucun	Remodelage phospholipides
	B	iPLA ₂ γ	Mammifères	Muscle, coeur	Membranaire	90	Aucun	N/D
VII	A	PAF-AH	Mammifères	Plasma, macrophages, foie	Sécrétée	45	Aucun	Dégrade le PAF
	B	PAF-AH-II	Humains et bovins	Reins, foie	Cytosolique	40	Aucun	Dégrade le PAF
VIII	A	PAF-AH-I α ₁	Humains	Cerveau	Cytosolique	30	Aucun	Dégrade le PAF
	B	PAF-AH-I α ₂	Humains	Cerveau	Cytosolique	30	Aucun	Dégrade le PAF

Groupes	Autre noms	Espèces	Source chez l'humain	Localisation	Poids (kDa)	Besoin en Ca ²⁺	Fonctions principales
IX		Escargots marins	-----	Sécrétée	14	mM	N/D
X		Humains et souris	Intestin, poumons, rate, thymus, épithélium et endothélium respiratoire, macrophages, kératinocytes, neutrophiles	Sécrétée	14	mM	Relâche d'AA remodelages phospholipides
XI	A	Plantes	-----	Sécrétée	12,4	N/D	N/D
	B	Plantes	-----	Sécrétée	12,8	N/D	N/D
XII	A	Humains et souris	Cœur, cerveau, intestin, reins, foie, poumons, pancréas, placenta, muscle squelettique	Sécrétée	19	mM	Relâche d'AA
	B	Humains	Intestin, reins, foie	Sécrétée	19	mM	Relâche d'AA

N/D : non déterminé, AA : acide arachidonique, PAF : facteur d'activation plaquettaire

^a Tableau adapté de : [128] et [129]

Avant 1986, seule une sPLA₂ était connue chez les mammifères, soit la sPLA₂-IB [130]. Cette dernière est exprimée dans les cellules acinaires du pancréas et est abondamment présente dans le liquide pancréatique. Elle est sécrétée sous forme inactive et c'est le clivage de son prépropeptide en position N-terminale au niveau du duodénum qui la rend active. Elle fut initialement considérée uniquement comme une enzyme digestive nécessaire à l'hydrolyse des phospholipides alimentaires. Toutefois, sa découverte dans d'autres organes non digestifs [131], ainsi que sa grande affinité pour le récepteur de type-M des sPLA₂ [132], suggère une implication de cette enzyme dans la signalisation intracellulaire. Les récepteurs des sPLA₂ seront abordés plus loin.

La deuxième sPLA₂ décrite fut la sPLA₂-IIA. Cette dernière fut isolée à partir du liquide synovial de patients atteints d'arthrite [133] et, par la suite, associée à de nombreuses pathologies inflammatoires. Elle est constitutivement exprimée dans certains organes du système digestif, en plus d'être emmagasinée dans les granules de sécrétion de nombreuses cellules du système immunitaire dont, entre autres, les éosinophiles [134], les mastocytes [135] et les neutrophiles [136]. Son expression augmente suite à une stimulation par des médiateurs pro-inflammatoires tels que LPS, TNF- α , IL-1 β , et est réduite en présence de glucocorticoïdes. De plus, il a aussi été démontré que le niveau de sPLA₂-IIA dans le plasma et les différents exsudats est étroitement corrélé avec la sévérité de la maladie inflammatoire. De ce fait, la sPLA₂-IIA est depuis longtemps considérée comme la principale sPLA₂ impliquée dans le processus inflammatoire.

La sPLA₂-IIC fut originalement identifiée au niveau des testicules de rats [137]. Chez l'humain, le gène de la sPLA₂-IIC est considéré comme un pseudogène, puisque l'absence d'une portion d'un exon entraîne la génération d'un peptide non fonctionnel [137]. Par la suite, le criblage de banques de données d'ADN génomique mena à la découverte d'une grande

quantité de sPLA₂ dont les sPLA₂-IID, -IIE et -IIF qui ne sont encore aujourd'hui que très peu connues. La sPLA₂-IID est constitutivement exprimée dans les organes digestifs et immunitaires. Cette dernière semble impliquée dans le processus inflammatoire puisqu'il a été démontré que l'administration systémique de LPS chez le rat entraîne une augmentation de son expression dans une variété de tissus [138]. La sPLA₂-IIE est également induite par une stimulation au LPS et se retrouve, chez l'homme, au niveau du cœur, du placenta, du cerveau et des poumons [139].

Contrairement aux autres sPLA₂, la sPLA₂-III est une enzyme beaucoup plus volumineuse ayant un poids moléculaire de 55 KDa. Elle est présente dans les venins d'abeilles et fut uniquement découverte en 2000 chez l'humain [140]. Une étude récente laisse sous-entendre que la sPLA₂-III pourrait devenir un nouveau biomarqueur efficace pour le dépistage des cancers du côlon [141].

La sPLA₂-X est la plus distincte de toutes les sPLA₂, partageant uniquement 35 % d'homologie avec la sPLA₂-IIA. Elle est exprimée dans les organes digestifs (côlon, estomac, etc.) et immunitaires (thymus, rate, leucocytes) ainsi que dans les testicules [142]. Tout comme la sPLA₂-IB, la sPLA₂-X est sécrétée sous une forme inactive et le clivage de sa portion N-terminal est nécessaire à son activation. La sPLA₂-X est l'une des enzymes lipolytiques les plus actives de sa famille, en plus de posséder une certaine affinité pour le récepteur type-M des sPLA₂ [143]. Certaines études affirment que la sPLA₂-X est une enzyme pro-inflammatoire importante de par sa capacité à induire la synthèse d'écosanoïdes [144]. Cependant, il a récemment été démontré que la surexpression de cette dernière dans une lignée cellulaire de macrophages entraîne une diminution de l'activation de ces derniers ainsi qu'une atténuation de la réponse inflammatoire [145]. De ce fait, l'implication de la sPLA₂-X dans la réponse inflammatoire demeure donc controversée.

La sPLA₂-V, quant à elle, fut clonée en 1994 chez le rat et la souris. Chez l'humain, cette enzyme est exprimée dans une grande variété de tissus, incluant principalement le cœur et le placenta [146]. On la retrouve également dans les cellules du système immunitaire : mastocytes [127], macrophages [147] et neutrophiles [148] ainsi qu'au niveau de l'endothélium vasculaire [149, 150]. Son expression est induite par plusieurs molécules pro-inflammatoires dont, entre autres, le LPS et l'IL-1 β [151]. Initialement, la sPLA₂-V et la sPLA₂-IIA furent considérées comme ayant des activités biologiques redondantes. Cependant, cela fut infirmé par la découverte que la PLA₂-V est plus efficace que les sPLA₂-IIA et -IB pour induire la relâche d'AA de plusieurs types cellulaires et que la sPLA₂-V et la sPLA₂-IIA n'ont pas toujours la même localisation intracellulaire. En effet, il a été démontré que, contrairement à la sPLA₂-IIA, la sPLA₂-V ne se loge pas dans les granules de sécrétion des mastocytes mais est plutôt localisée au niveau des membranes plasmiques et nucléaires [127]. De plus, la sPLA₂-V est impliquée dans la réponse inflammatoire de par sa capacité à promouvoir la synthèse d'écosanoïdes dans de nombreux types cellulaires.

Les sPLA₂-IIA, -IIC, -IID, -IIE, -IIF et V présentées précédemment font partie des sPLA₂ du groupe II. Ce sous-groupe fut formé sur la base de la proximité chromosomique de ces enzymes et de leurs similitudes structurelles (Figure 6). En effet, les sPLA₂ du groupe II sont toutes regroupées dans le même locus du chromosome 1 chez l'humain et du chromosome 4 chez la souris [152]. Durant plusieurs années, les études portant sur le rôle des sPLA₂ dans la réponse inflammatoire se sont principalement intéressées à la sPLA₂-IIA. Toutefois, l'identification des autres isoformes de sPLA₂ du groupe II a mis en évidence l'implication potentielle de ces enzymes dans le processus inflammatoire. De plus, la découverte de souches de souris n'exprimant naturellement pas la sPLA₂-IIA, mais présentant une réponse inflammatoire appropriée est venue également renforcer cette hypothèse [153].

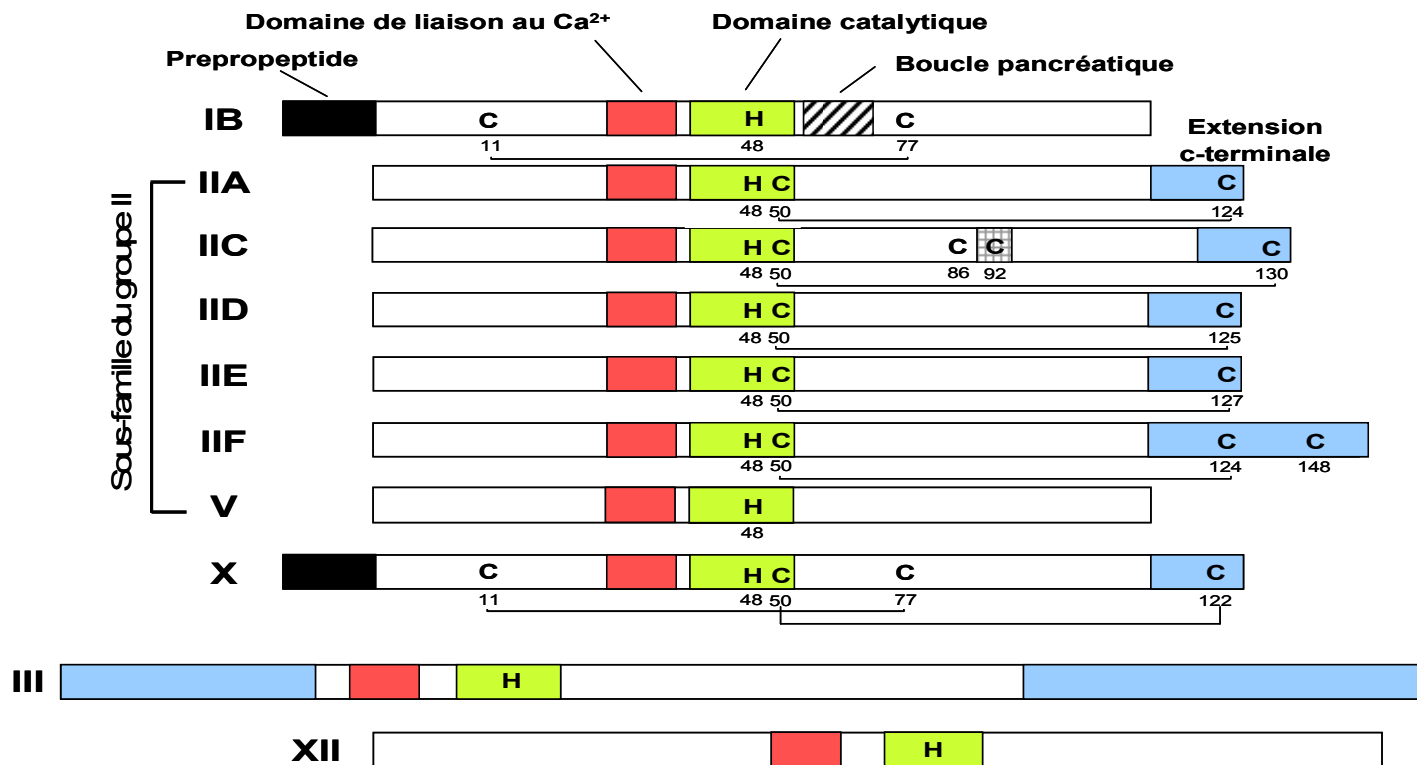


Figure 6 : Structure des sPLA₂. Le domaine catalytique entourant l'histidine (H) catalytique ainsi que la boucle de liaison au Ca²⁺ sont bien conservés chez toutes les sPLA₂. Les sPLA₂-IB et -X possèdent un prépropeptide qui doit être clivé afin que ces enzymes soient activées. La sPLA₂-IB a également une insertion unique nommée boucle pancréatique. Les sPLA₂ de la sous-famille du groupe II se ressemblent et possèdent un pont disulfure bien conservé, réunissant deux cystéines (C⁵⁰ à C terminale) ainsi qu'une extension C-terminale (à l'exception de la sPLA₂-V). Figure adaptée de [154].

1.3.3.1 Les récepteurs des sPLA₂

Jusqu'à récemment, les activités biologiques des sPLA₂ étaient uniquement attribuables à leur capacité d'hydrolyse des phospholipides membranaires. Cependant, la découverte de récepteurs pour les sPLA₂ a permis de mettre en évidence l'implication de ces enzymes dans plusieurs autres fonctions physiologiques.

Les premières études ayant démontré la capacité de liaison des sPLA₂ à certaines protéines membranaires furent effectuées avec des sPLA₂ de venins de cobras et d'abeilles. Ces études démontrèrent que les effets neurotoxiques et myotoxiques de ces enzymes sont principalement engendrés par leur interaction avec deux récepteurs structurellement et pharmacologiquement distincts : le type-N (type neural) [155] et le type-M (type musculaire) [156]. Le récepteur de type-N est exprimé en grande quantité au niveau cérébral et possède une faible affinité pour les sPLA₂-IB et -IIA [157]. De plus, d'autres récepteurs similaires, mais non identiques au récepteur de type-N, ont aussi été identifiés au niveau des poumons, du foie, du cœur et des reins [155, 158].

Le récepteur de type-M est une glycoprotéine transmembranaire de type I de 180 kDa qui est clonée depuis 1995 chez l'humain [159]. Il est structurellement similaire au récepteur du mannose (DEC-205) retrouvé à la surface des macrophages et comprend un seul passage transmembranaire, une petite portion cytoplasmique ainsi qu'un grand domaine extracellulaire. Il est exprimé en grande quantité dans le muscle squelettique [156], mais se retrouve également dans les poumons, le foie, le cœur, les reins [132] et à la surface des cellules myéloïdes [160-162]. Ce récepteur était initialement considéré comme un mécanisme de protection servant à éliminer les enzymes actives du milieu extracellulaire. Cependant, les études récentes ont établi que la liaison des sPLA₂ au récepteur de type-M se fait

indépendamment du Ca^{2+} . Cette interaction entraîne l'activation de voies de signalisation intracellulaire, principalement la voie des MAP Kinases, assurant ainsi plusieurs fonctions importantes dont la prolifération et la migration cellulaire ainsi que la production de cytokines, d'hormones et de médiateurs lipidiques [163]. De plus, il a été démontré que les souris génétiquement modifiées n'exprimant pas le récepteur de type-M possèdent une résistance accrue au choc endotoxique induit par le LPS. Les niveaux plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1 β) sont également réduits suite à l'administration de LPS chez ces souris [164]. Contrairement au récepteur de type-N, le récepteur de type-M murin a une haute affinité pour les sPLA₂-IB, -IA et -X, mais non pour les sPLA₂ de venins. Malheureusement, les résultats de ces études d'affinité de liaison des sPLA₂ au récepteur de type-M ne sont pas extrapolables chez l'humain en raison de la grande variabilité inter-espèce de cette interaction. Ceci explique en partie le manque d'information disponible aujourd'hui quant aux ligands naturels de ce récepteur chez l'humain.

1.3.3.2 Principales fonctions des sPLA₂

1.3.3.2.1 Propriétés anti-bactériennes des sPLA₂

Les propriétés anti-bactériennes de la sPLA₂-IIA sont connues depuis plusieurs années. Cette enzyme est plus efficace contre les bactéries gram positif (Gram⁺), mais parvient également à pénétrer la paroi plus épaisse des bactéries gram négatif (Gram⁻) à l'aide d'un co-facteur essentiel libéré par les leucocytes : le BPI (*bacterial permeability-increasing protein*) [165]. L'action anti-bactérienne de la sPLA₂-IIA fut démontrée *in vivo* par l'administration de *Staphylococcus aureus* (bactéries Gram⁺) et d'*Escherichia coli* (bactéries Gram⁻) chez des souris transgéniques surexprimant la sPLA₂-IIA. Ces souris

démontrèrent une résistance accrue à l'invasion bactérienne, une augmentation de leur capacité de destruction de ces bactéries ainsi qu'une diminution de mortalité [166, 167]. En plus de la sPLA₂-IIA, d'autres membres de la famille des sPLA₂ possèdent des propriétés bactéricides [168]. Chez l'humain, le classement des différentes sPLA₂ selon leur efficacité à détruire les bactéries Gram⁺ est le suivant: sPLA₂-IIA > -X > -V > -XII > -IIE > -IB = IIF [169]. Le mécanisme par lequel ces sPLA₂ exercent leurs fonctions anti-bactériennes repose sur l'hydrolyse des phospholipides des membranes bactériennes, i.e. sur la perturbation de l'intégrité membranaire.

1.3.3.2.2 Implication des sPLA₂ dans le processus apoptotique

L'implication des sPLA₂ dans le processus apoptotique demeure encore aujourd'hui controversée. L'effet pro-apoptotique des sPLA₂ fut démontré grâce à la stimulation de monocytes par les sPLA₂ isolées du plasma de patients atteints de sepsis. Cet effet pro-apoptotique semble être causé par l'interaction des sPLA₂ avec le récepteur de type-M. Une fois les sPLA₂ fixées au récepteur, il y a activation de la voie de signalisation des MAP Kinases (mitogen-activated protein kinase) qui induit la surexpression membranaire de Fas Ligand et favorise ainsi l'apoptose [170]. De plus, la sPLA₂-III a également démontré un effet pro-apoptotique au niveau des cellules neuronales et ce en induisant des dommages à l'ADN [171].

Contrairement aux études précédentes, le groupe de Zhang et coll. a démontré que la sPLA₂-IIA a un effet anti-apoptotique sur les cellules rénales de hamsters, et que cet effet peut être inhibé par l'ajout d'un inhibiteur des sPLA₂ du groupe II, le 12-épi-scalaradial [172]. Il a également été démontré que la stimulation de cellules intestinales de souris par le BPB (*p-bromophenacyl bromide*), un autre inhibiteur des sPLA₂, déclenche le

processus apoptotique chez ces dernières [173]. De plus, l'activation du récepteur de type-M par la sPLA₂-IB et -III protège les mastocytes contre l'apoptose précoce [174]. À la lumière de ces résultats, il semble donc nécessaire de poursuivre les études afin de bien comprendre l'implication de chacune des sPLA₂ dans le processus apoptotique.

1.3.3.2.3 Rôle des sPLA₂ dans la réponse inflammatoire

L'implication des sPLA₂ dans l'inflammation fut initialement considérée grâce à des études démontrant que l'administration *in vivo* de sPLA₂ induit certains phénomènes associés à la réponse inflammatoire. Par exemple, l'injection intra-articulaire de sPLA₂ cause des dommages cartilagineux, en plus d'initier la phase aiguë de la réponse inflammatoire [175]. De plus, l'injection de zymosan (particule insoluble de la paroi des levures) dans la cavité péritonéale de rats entraîne un appel leucocytaire important pouvant être bloqué par un inhibiteur non-spécifique des sPLA₂ du groupe II, le scalaradiol [176]. Il a également été démontré que l'administration de sPLA₂ de venins dans la cavité pleurale de rats est à l'origine d'une infiltration considérable de cellules inflammatoires [177].

Cet effet chimiotactique des sPLA₂ sur les leucocytes circulants est rendu possible grâce à la libération de molécules chimioattractantes ainsi qu'à l'induction de molécules d'adhérence à la surface cellulaire. En effet, il a été démontré que les homologues des sPLA₂ du groupe II, isolés à partir de venins de serpents, sont impliqués dans la migration *in vitro* des neutrophiles via la relâche de PAF et de LTB₄ [178]. Ces derniers sont synthétisés à partir de l'AA libéré par l'action des PLA₂ sur les phospholipides membranaires. Il est bien établi que les sPLA₂ induisent la relâche de médiateurs inflammatoires lipidiques d'une grande variété de cellules et contribuent, de cette façon, au développement et au maintien de la réponse inflammatoire.

Toutefois, les sPLA₂ agissent aussi en stimulant l'expression de molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales et des leucocytes (Figure 7). Il a été démontré que le traitement au LPS de cellules endothéliales de la microcirculation pulmonaire (LMVEC) entraîne une surexpression de ICAM-1. Cette augmentation d'expression est encore plus importante lorsque le LPS est combiné avec la sPLA₂-IIA ou -IB [179]. En ce qui a trait aux molécules d'adhérence à la surface des leucocytes, la stimulation de neutrophiles par la sPLA₂-IIA et d'éosinophiles par la sPLA₂-V provoque une surexpression membranaire de l'intégrine Mac-1 (CD11b/CD18) chez ces deux types cellulaires [180, 181]. Ces interactions leucocytes-cellules endothéliales permettent ainsi l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et leur migration dans les tissus extravasculaires inflammatoires.

Une fois recrutés au niveau du foyer inflammatoire, la stimulation des neutrophiles, éosinophiles et mastocytes par la sPLA₂-IIa entraîne une libération du contenu de leurs granules de sécrétion [180, 182, 183]. Ce processus se fait indépendamment de l'activité catalytique de la sPLA₂-IIa et est nécessaire tant à la destruction des agents pathogènes, qu'à la vasodilatation locale et qu'à l'augmentation de la perméabilité vasculaire. De plus, il a aussi été démontré que certaines sPLA₂ augmentent l'expression et l'activité des métalloprotéinases (MMP) [184, 185]. Ces enzymes protéolytiques jouent un rôle important dans la dégradation de la matrice extracellulaire et dans l'activation de cytokines. Il s'agit là d'un autre mécanisme par lequel les sPLA₂ influencent les dommages tissulaires et le remodelage associés à la réaction inflammatoire.

Les sPLA₂ participent également à la réponse inflammatoire en activant la production de cytokines et de chimiokines par de nombreuses cellules du système immunitaire (Figure 7). En effet, il a été démontré que la stimulation de monocytes humains par les sPLA₂-IB et -IIA provoque une relâche concentration-dépendante d'IL-6, IL-12 et de TNF- α [186]. Ces enzymes

induisent également la synthèse d'IL-8 par les éosinophiles [182] et les neutrophiles [187]. De plus, une étude récente révèle que la sPLA₂-IB induit aussi la synthèse de cytokines (IL-6 et IL-10) et de chimiokines (MCP-1, MIP- α et β ainsi que l'IL-8) par les macrophages pulmonaires humains [188]. Cette production de cytokines et chimiokines induite par certaines sPLA₂ n'est pas seulement restreinte aux leucocytes, mais est également observable au niveau de l'endothélium vasculaire. La stimulation de LMVEC par les sPLA₂-IB et -IIA mène aussi à la libération de Gro- α (CXCL1), ENA-78 (CXCL5) et IL-8 [179]. La synthèse de ces cytokines et chimiokines est possible grâce à la fixation des sPLA₂ au récepteur de type-M à la surface cellulaire. Cette fixation, entièrement indépendante du Ca²⁺, déclenche la signalisation intracellulaire menant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) et à la stimulation de la transcription génique [174, 187, 188]. L'induction de la synthèse des cytokines et chimiokines par les sPLA₂ supporte bien le concept voulant que ces enzymes jouent un rôle essentiel dans les maladies inflammatoires en régulant l'inflammation locale, la réponse immunitaire et l'appel de cellules leucocytaires dans les tissus extravasculaires.

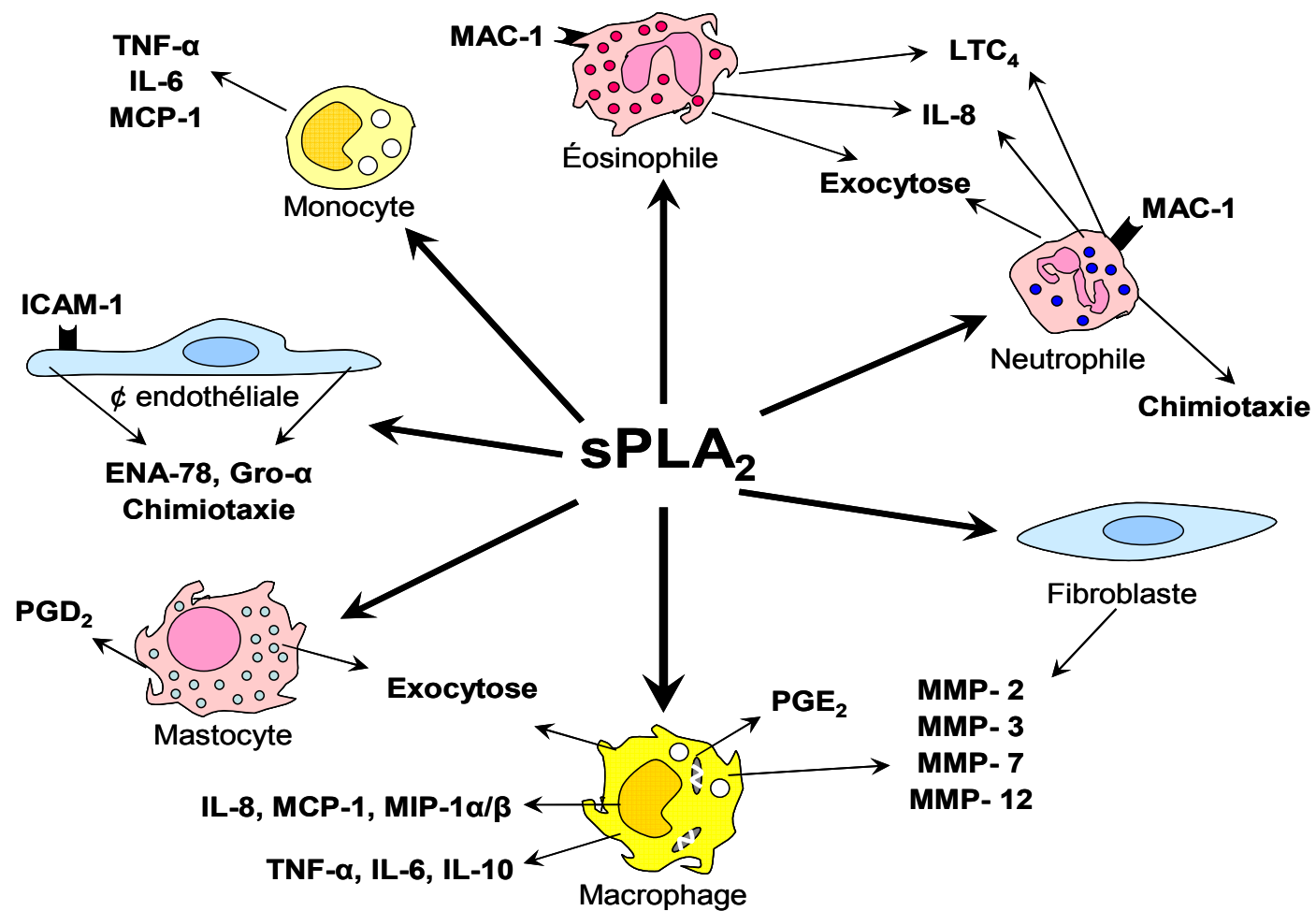


Figure 7 : Représentation des effets des sPLA₂ sur les différentes cellules inflammatoires. (Figure adaptée de [185]).

1.3.3.2.4 Le rôle spécifique de la sPLA₂-V dans l'inflammation

Les sPLA₂ sont associées depuis plusieurs années au processus inflammatoire mais malheureusement, encore peu de choses sont connues quant à la participation spécifique de chacune des sPLA₂. Initialement, la recherche sur le rôle des sPLA₂ dans l'inflammation se concentrait presque exclusivement sur la sPLA₂-IIA qui était considérée comme la sPLA₂ inflammatoire. Cependant, l'intérêt s'est récemment tourné vers la sPLA₂-V qui possède 40% d'homologie avec la sPLA₂-IIA en plus d'avoir une capacité supérieure à cette dernière pour hydrolyser les phospholipides membranaires. De plus, la sPLA₂-V est présente dans la majorité des leucocytes et est habituellement surexprimée suite à une stimulation par des molécules pro-inflammatoires incluant le LPS et plusieurs cytokines [189, 190].

La sPLA₂-V participe à la réponse inflammatoire en supportant la relâche d'AA nécessaire à la synthèse d'éicosanoïdes. Par exemple, l'ajout de sPLA₂-V exogène entraîne la biosynthèse de LTB₄ par les neutrophiles humains et de LTC₄ par les éosinophiles humains [191, 192]. Afin de produire la LTB₄, les neutrophiles ont besoin de la participation de la sPLA₂-V, mais également la collaboration de la cPLA₂. La synthèse de LTC₄ par les éosinophiles a, quant à elle, lieu indépendamment de la cPLA₂. Dans certaines conditions, la sPLA₂-V est donc essentielle à l'amplification de l'activité de la cPLA₂ et ce en stimulant davantage la libération d'AA. L'utilisation de souris génétiquement modifiées n'exprimant pas la sPLA₂-V (sPLA₂-V^{-/-}) a également permis de confirmer la participation de cette enzyme dans la production de médiateurs inflammatoires lipidiques. En effet, suite à une stimulation au zymosan, les macrophages de souris sPLA₂-V^{-/-} génèrent 50% moins de LTC₄ et de PGE₂ que les macrophages de souris témoins [147] en plus de présenter une réduction de 50% de leur capacité phagocytaire [193]. Les effets de la sPLA₂-V ne se limitent pas uniquement à

la synthèse de médiateurs lipidiques. Elle joue aussi un rôle dans la surexpression du CD11b (composante de l'intégrine MAC-1) à la surface des éosinophiles favorisant ainsi leur adhésion à l'endothélium [181]. Ceci pourrait expliquer le rôle clef de la sPLA₂-V dans la migration des éosinophiles et des lymphocytes observée durant l'hyperréactivité bronchique allergique induite par l'ovalbumine (allergène retrouvé dans le blanc d'œuf) [194].

1.3.3.3 Implication des sPLA₂ dans certaines pathologies

Tel qu'abordé précédemment, les sPLA₂ jouent un rôle important dans une grande variété de processus physiologiques. De plus, par leur capacité d'hydrolyse des phospholipides ainsi que leur implication dans la prolifération cellulaire, dans le processus apoptotique et la réponse inflammatoire, les sPLA₂ sont également associées à de nombreuses pathologies (Figure 8).

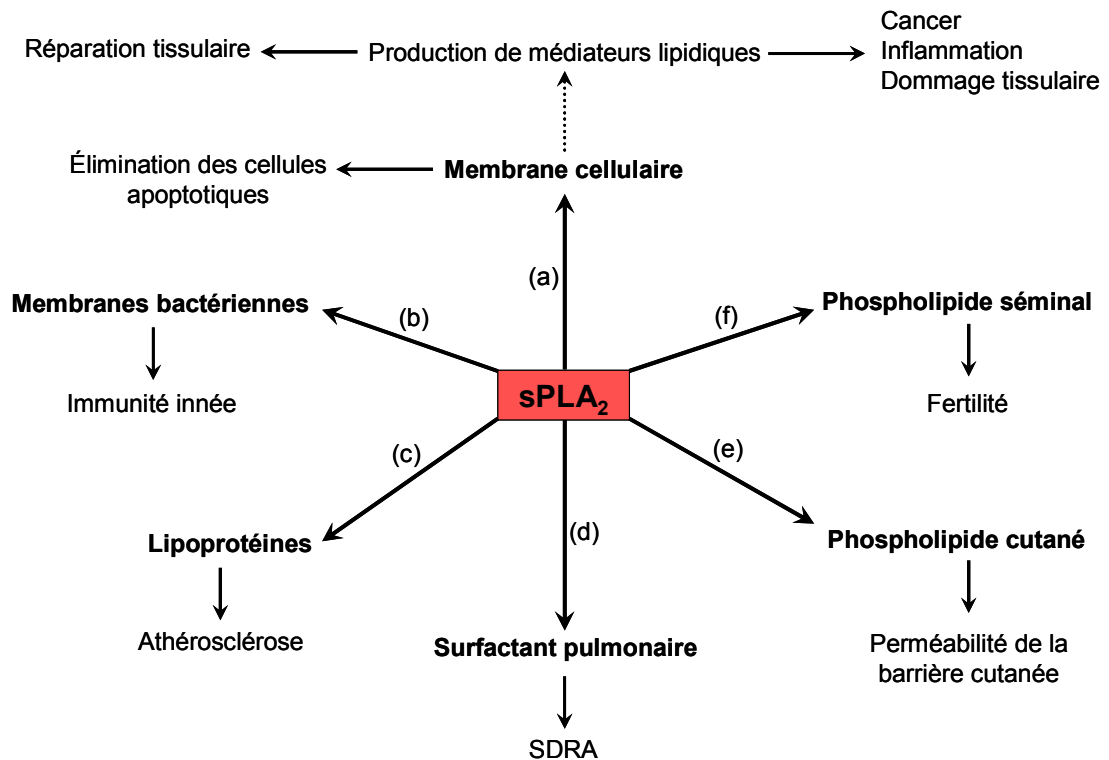


Figure 8 : Diverses fonctions des sPLA₂. (a) Les sPLA₂ hydrolysent les phospholipides membranaires afin d'initier la production de médiateurs lipidiques, ce qui déclenche une variété d'événements menant au cancer, à l'inflammation ainsi qu'à la réparation ou au dommage tissulaire. De par leur action sur les membranes cellulaires, les sPLA₂ participent aussi à l'élimination des cellules apoptotiques et (b) à la destruction bactérienne. (c) L'hydrolyse des lipoprotéines par les sPLA₂ contribue au développement de l'athérosclérose. (d) Dans les poumons, l'hydrolyse du surfactant entraîne le développement du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). (e) Au niveau de la peau, les sPLA₂ produisent des acides gras non polaires rendant cette dernière plus imperméable. (f) Chez l'homme, les sPLA₂ semblent réguler la spermatogenèse et la réaction acrosomiale. (image adaptée de [195])

1.3.3.3.1 Les sPLA₂ dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est une forme très sévère de défaillance pulmonaire, consécutive à une altération de la perméabilité capillaire. Cette atteinte lésionnelle est causée par un processus inflammatoire et est à l'origine d'une hypoxémie, d'une réduction de la compliance respiratoire (altération du surfactant) ainsi que d'une infiltration alvéolaire (œdème).

Le surfactant pulmonaire est un complexe protéine-lipide (10% de protéines et 90% de lipides) synthétisé par les cellules alvéolaires de type II afin de diminuer la tension de surface dans les alvéoles. Les sPLA₂ ont été impliquées dans le développement du SDRA de par leur capacité d'hydrolyser les phospholipides contenus en grande quantité dans le surfactant. L'altération de la composition de ce dernier cause une augmentation de la tension de surface et entraîne donc un collapsus alvéolaire nuisant ainsi aux échanges gazeux. De plus, la lysophosphatidylcholine (LPC), qui est un produit de dégradation du surfactant, cause une augmentation de la perméabilité capillaire et le recrutement de cellules inflammatoires dans les poumons [196, 197]. La sPLA₂-IIA était initialement considérée comme la principale sPLA₂ associée au développement du SDRA [198]. Cependant, il a été démontré que seules les sPLA₂-V et -X ont la capacité d'hydrolyser le surfactant [199] et que contrairement à la sPLA₂-IIA, ces deux enzymes sont exprimées dans les poumons humains [200]. Il semble toutefois que la sPLA₂-V soit la principale sPLA₂ impliquée dans le SDRA. En effet, il a récemment été démontré que les souris transgéniques surexprimant la sPLA₂-V mouraient peu de temps après la naissance dû à une altération de la composition du surfactant, ce qui n'était pas observable chez les souris surexprimant la sPLA₂-X [201].

1.3.3.3.2 Les sPLA₂ dans l'athérosclérose

L'athérosclérose se caractérise par la formation de plaques athéromateuses à l'intérieur de l'intima des artères. Ces plaques se développent suite à une lésion de l'endothélium et à l'accumulation sous-endothéliale de lipoprotéines oxydées, principalement les LDL (*low density lipoprotein*). Par la suite, il y a un appel important de phagocytes, une formation de cellules spumeuses, une prolifération des cellules musculaires lisses et une accumulation lipidiques.

Des dix sPLA₂ connues chez les mammifères, seules les sPLA₂-IIA, -V et -X ont été détectées au niveau des plaques d'athérosclérose chez l'humain [202, 203]. Ces dernières semblent localisées dans la paroi vasculaire et agissent localement pour favoriser l'athérogenèse. Les sPLA₂ sont impliquées à plusieurs niveaux de la formation des plaques athéromateuses. Premièrement, l'hydrolyse des phospholipides par les sPLA₂ entraîne la libération de médiateurs inflammatoires à l'origine d'une réponse inflammatoire causant des dommages à l'endothélium et provoquant localement un appel leucocytaire. Deuxièmement, les sPLA₂ peuvent hydrolyser les LDL, entraînant la relâche d'AA et de plus petites particules de LDL. Parmi les sPLA₂ associées au processus athéromateux, les sPLA₂-V et -X sont beaucoup plus efficaces que la sPLA₂-IIA pour hydrolyser les lipoprotéines [202]. De plus, la sPLA₂-V parvient également à hydrolyser les lipoprotéines dans le sérum complet, ce qui démontre l'absence d'inhibiteur naturel circulant [204]. Finalement, les plus petites particules de LDL oxydées ainsi formées s'accumulent plus aisément dans la région sous-endothéliale [205] et sont plus facilement phagocytées par les macrophages qui se transforment par la suite en cellules spumeuses [203].

L'implication des sPLA₂ dans plusieurs autres pathologies est résumée dans le Tableau IV qui suit.

Tableau IV : Rôle des phospholipases A₂ sécrétées dans certaines pathologies

Pathologies	sPLA ₂	Rôles rapportés	Réf.
Infarctus du myocarde	<ul style="list-style-type: none"> sPLA₂- IIA et -V ne sont pas exprimées dans les cardiomyocytes sains, mais leur expression ↑ dans ceux endommagés Légère ↑ de l'expression des sPLA₂-IID et -IIE dans les cardiomyocytes endommagés ↓ de la taille de l'infarctus chez les souris transgéniques n'exprimant pas la sPLA₂-X 	<ul style="list-style-type: none"> Attaque des cardiomyocytes autour de la région ischémique via la dégradation des phospholipides membranaires Élimination des membranes dégradées au foyer d'infarctus ↑ de la réponse inflammatoire au site d'infarctus Production de PGE₂ ayant un effet protecteur sur les cardiomyocytes 	[206-208]
Athérosclérose & MCAS	<ul style="list-style-type: none"> sPLA₂-IIA, -V et -X sont exprimées dans les plaques athéromateuses chez l'humain La concentration élevée de sPLA₂-IIA plasmatique est un facteur de risque cardiovasculaire important 	<ul style="list-style-type: none"> Hydrolyse les lipoprotéines Favorise l'accumulation sous-endothéliale et l'oxydation des LDL ainsi que leur capture par les macrophages Stimule la formation de cellules spumeuses Libération de médiateurs inflammatoires 	[150, 209-212]
Asthme	<ul style="list-style-type: none"> sPLA₂-V, -X et XIIA sont les principales sPLA₂ exprimées dans les voies respiratoires de gens asthmatiques Activité des sPLA₂ ↑ dans le fluide bronchoalvéolaire chez les asthmatiques 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ de la production d'écosanoïdes qui entraîne une hyperréactivité bronchique ↑ migration des éosinophiles et lymphocytes via l'induction de l'expression d'intégrines ↑ de la sécrétion mucoïde ↑ de la réponse inflammatoire 	[144, 196, 213, 214]

Pathologies	sPLA ₂	Rôles rapportés	Réf.
Atteintes hépatiques	<ul style="list-style-type: none"> sPLA₂-IIA et -V sont exprimées dans le foie et relâchées en grande quantité durant la nécrose 	<ul style="list-style-type: none"> Permet le nettoyage de la zone nécrotique Hydrolyse les HDL et favorise l'apport de cholestérol aux cellules hépatiques ↑ des dommages cellulaires via l'hydrolyse des phospholipides membranaires 	[206, 215-217]
Polyarthrite rhumatoïde (PR)	<ul style="list-style-type: none"> Expression de sPLA₂-IIA et -V dans le cartilage de gens atteints de PR, mais absence chez les gens sains Surexpression de toutes les sPLA₂ du groupe II, à l'exception de IIC, dans PR sPLA₂-IIA retrouvée en grande quantité dans le liquide synovial de gens atteints de PR 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ production de PGE₂ et donc ↑ de la perméabilité vasculaire (↑ œdème) Stimule la réponse inflammatoire via la synthèse de d'écossanoïdes ↑ la synthèse de cytokines et stimule l'expression de la COX-2 	[218-223]
Pancréatite	<ul style="list-style-type: none"> Expression de la sPLA₂-IB dans les cellules acinaires saines du pancréas et dans le liquide pancréatique Surexpression des sPLA₂-IB et -IIA dans la pancréatite aiguë Activité plasmatique des sPLA₂ corrèle avec la sévérité de la maladie 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Exsudation plasmatique causant un oedème interstitiel Infiltration de neutrophiles ↑ Dommages tissulaires 	[224-227]

Pathologies	sPLA ₂	Rôles rapportés	Réf.
Maladies inflammatoires de l'intestin (MII) (maladie de Crohn & colite ulcéreuse)	<ul style="list-style-type: none"> sPLA₂-IIA exprimée dans les macrophages intestinaux et les cellules de Paneth ↑ de l'expression de sPLA₂-IIA au niveau de la muqueuse des gens atteints de MII corrèle avec la sévérité de la maladie ↑ de l'expression sérique de sPLA₂-IIA chez les gens atteints de MII 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ de l'inflammation locale via la synthèse de médiateurs inflammatoires lipidiques Synthèse d'écosanoïdes (PGE₂ et LTD₄) qui entraîne ↑ des sécrétions intestinales, ↑ du flux sanguin et influence sur la musculature lisse Recrutement leucocytaire 	[228-232]
Cancers	<ul style="list-style-type: none"> Surexpression de la sPLA₂-IIA dans plusieurs types de cancers dont, entre autres : sein, prostate, côlon, etc. ↑ de l'expression de la sPLA₂-III et -X ainsi qu'une ↓ de l'expression de sPLA₂-IID et -V dans certains cancers du côlon 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ de la prolifération cellulaire via le relâchement de lysophospholipides et d'AA Implication dans la dissémination métastatique ↑ de l'angiogenèse nécessaire à la croissance tumorale 	[141, 233-237]

↑ : augmentation, ↓ : diminution, MCAS : maladie coronarienne athérosclérotique, LDL : lipoprotéine de faible densité (*low density lipoprotein*), HDL : Lipoprotéine de forte densité (*high density lipoprotein*), PGE₂ : prostaglandines E₂, COX-2 : cyclo-oxygénase-2, LTD₄ : leucotriène D₄

1.3.3.4 Les différents inhibiteurs des PLA₂

Le tableau V qui suit, se veut une liste non exhaustive des différents inhibiteurs des PLA₂ disponibles sur le marché. Dans notre étude, nous avons utilisé le 12-épi-sclaradial (SLD) puisqu'il est l'un des rares inhibiteurs de sPLA₂ capable de traverser la membrane cellulaire, en plus d'être spécifique aux sPLA₂ du group II.

Tableau V : Les inhibiteurs des phospholipases A₂

Inhibiteurs	Effets	Réf
Manoalide	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition des sPLA₂ de venin d'abeilles et de cobra • Inhibition de la phospholipase C • Bloqueur des canaux calciques • Ne pénètre pas la membrane cellulaire 	[238]
BEL	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition des iPLA₂β et γ (VIA et VIB) 	[239]
MAFP	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition des cPLA₂ α, β et γ (IVA, IVB et IVC) • Inhibition de la iPLA₂β (VIA) • Lie les récepteurs CB₁ des cannabinoïdes 	[240, 241]
AACOCF3	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition des cPLA₂ α, β et γ (IVA, IVB et IVC) • Inhibition des iPLA₂β et γ (VIA et VIB) 	[242, 243]
Me-Indoxam	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de toutes les sPLA₂ • Bloque la liaison de la sPLA₂-IB aux récepteurs de type-M • Ne pénètre pas la membrane cellulaire 	[244, 245]
LY311727	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de toutes les sPLA₂ • Ne pénètre pas la membrane cellulaire 	[246]
12-épi-sclaradial	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition des sPLA₂ du groupe II (sPLA₂-IIA, -IIC, -IID, -IIE, -IIF, -V) • Pénètre la membrane cellulaire 	[247]

BEL = *Bromoénol lactone*, MAFP = *Méthyl arachidonyle fluorophosphonate*, AACOCF3 = *Arachidonyle trifluorométhyle cétone* et LY311727 = *3-(3-acétamide-1-benzyle-2-éthyle-indole-5-oxy)propane phosphonique acide*.

1.4 But du projet de recherche

Un nombre grandissant d'études démontre l'implication des sPLA₂ dans le processus inflammatoire. Cependant, très peu d'entre elles permettent d'établir les rôles spécifiques de chacune des isoformes de sPLA₂. Parmi ces dernières, la sPLA₂-IIA fut longtemps considérée comme la principale sPLA₂ associée au processus inflammatoire. Toutefois, il a récemment été démontré que les inhibiteurs et anticorps, initialement considérés comme spécifiques à la sPLA₂-IIA, inhibent également l'activité de la sPLA₂-V. Des recherches supplémentaires s'avèrent donc nécessaires afin de s'assurer que les fonctions originalement attribuées à la sPLA₂-IIA ne soient pas, en fait, attribuables à d'autres isoformes de sPLA₂.

La sPLA₂-V partage une certaine homologie avec la sPLA₂-IIA, en plus d'avoir une capacité supérieure à cette dernière pour hydrolyser les phospholipides membranaires et ainsi, libérer les précurseurs essentiels à la synthèse de médiateurs inflammatoires lipidiques. À la lumière de ces informations, nous croyons donc que la sPLA₂-V est tout aussi, sinon plus, importante que la sPLA₂-IIA dans le développement d'une réponse inflammatoire. De ce fait, le but de ce travail de recherche visait donc à déterminer le rôle précis de la sPLA₂-V dans l'inflammation. Plus précisément, nous voulions définir l'implication de cette enzyme dans le recrutement tissulaire de leucocytes, une étape primordiale à l'initiation de toutes réponses inflammatoires. De plus, grâce à l'utilisation d'un inhibiteur non spécifique de sPLA₂, nous cherchions également à mettre en évidence l'implication potentielle des autres isoformes de sPLA₂ dans le recrutement leucocytaire au niveau du foyer inflammatoire. Sachant que cet appel leucocytaire est rendu possible grâce à l'expression de molécules d'adhérence à la surface cellulaire, nous avons également investigué l'effet de la sPLA₂-V dans la régulation de l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1.

1.5 Modèle expérimental

Afin de réaliser cette étude, nous avons utilisé des souris transgéniques n'exprimant pas la sPLA₂-V (sPLA₂-V^{-/-}) et des souris contrôles (WT) dans le modèle inflammatoire de la poche d'air sous-cutanée. Ce modèle permet d'investiguer l'effet de l'administration locale d'un agent pro-inflammatoire sans entraîner de répercussions systémiques majeures. De plus, il s'agit d'un excellent modèle pour étudier le recrutement leucocytaire, puisque les leucocytes ayant migré dans la poche d'air, suite à l'injection d'un agent inflammatoire, peuvent être recueillis, comptés et analysés plus en détail. En plus de permettre l'analyse quantitative des diverses sous-populations leucocytaires (neutrophiles, lymphocytes, macrophages, etc.), ce modèle rend aussi possible l'analyse des différentes cytokines et chimiokines libérées dans l'exsudat contenu dans la poche d'air.

En ce qui a trait à l'utilisation de souris génétiquement modifiées (sPLA₂-V^{-/-}), ces dernières nous offrent la possibilité d'étudier les rôles endogènes spécifiques de la sPLA₂-V, tout en s'assurant que les effets ainsi observés ne sont pas attribuables à d'autres isoformes de sPLA₂.

2.0 ARTICLE SCIENTIFIQUE



[home](#) [online submission instructions](#) [reviewer instructions](#) [contact Journal](#) [logout](#)

Manuscript #	J0708-408
Current Revision #	0
Submission Date	2008-07-09 11:32:12
Current Stage	Waiting for Revision
Title	Group V secretory phospholipase A ₂ contributes to LPS-induced leukocyte recruitment
Running Title	Role of sPLA ₂ -V on leukocyte emigration
Manuscript Type	Full Length Manuscript
Special Section	N/A
Corresponding Author	Martin G. Sirois (Montreal Heart Institute)
Contributing Authors	Stéphanie Lapointe , Alexandre Brkovic , Isabelle Cloutier , Jean-François Tanguay , Jonathan Arm
Abstract	<p>Secretory phospholipases A₂ (sPLA₂s) are well known for their contribution in the biosynthesis of inflammatory eicosanoids. These enzymes also participate in the inflammatory process by regulating chemokine production and protein expression of adhesion molecules. The majority of sPLA₂ isoforms are up-regulated by proinflammatory stimuli such as bacterial lipopolysaccharide (LPS), which predominantly increases the expression of group V sPLA₂ (sPLA₂-V). Furthermore, it has recently been shown that sPLA₂-V is a critical messenger in the regulation of cell migration during allergic airway responsiveness. Herein, we investigated the effect of sPLA₂-V on LPS-mediated leukocyte recruitment and its capacity to modulate adhesion molecule expression. We conducted our study in the murine air pouch model, using sPLA₂-V null mice (sPLA₂-V^{-/-}) and control wild-type (WT) littermates. We observed that LPS (1 µg/ml)-mediated leukocyte emigration in sPLA₂-V^{-/-} was attenuated by 52 and 86% upon 6 and 12 hours of treatment respectively, as compared to WT mice. In WT mice, treatment with the cell-permeable sPLA₂ inhibitor (12-epi-scalaradial; SLD) reduced LPS-mediated leukocyte recruitment by 67%, but had no additional inhibitory effect in sPLA₂-V^{-/-} mice. Protein analyses from the air pouch skin were carried out upon LPS-challenge, and the expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 were both significantly reduced in sPLA₂-V^{-/-} mice as compared to control WT mice. Together, our data demonstrate the role of sPLA₂-V in LPS-induced ICAM-1 and VCAM-1 protein overexpression and leukocyte recruitment, supporting the contribution of sPLA₂-V in the development of inflammatory innate immune responses.</p>
Section Editor	Assigned
Key Words	sPLA ₂ -V null mice, inflammation, adhesion molecules, air pouch model
Subject Areas	ADHESION, INFLAMMATION, LEUKOCYTES, LPS, NEUTROPHIL

Manuscript Items

1. Author Cover Letter File #1 PDF (17KB)
2. Article File #1 PDF (212KB)
3. Figure 1 PDF (868KB)
4. Figure 2 PDF (16KB)
5. Table - Table 1 - Effect of DMSO on inflammatory cell migration into the mouse air pouch. Air pouches were raised

on the backs of WT and sPLA₂-V^{-/-} mice before the injection of saline, LPS (1 µg/ml), or saline and LPS (1 µg/ml) respectively combined with 0.3% of DMSO. Exudates were harvested 6 hours after injection and leukocyte counts were determined. Values are means ± SEM (n ≥ 6). Treatment with DMSO had no significant effect on the migration of inflammatory cells mediated either by saline or LPS treatment in WT and sPLA₂-V^{-/-} mice. [PDF \(7KB\)](#)

6. [Figure 3 PDF \(16KB\)](#)
7. [Figure 4 PDF \(250KB\)](#)
8. [Figure 5 PDF \(111KB\)](#)
9. [Merged File containing manuscript text, 5 Figure files and 1 Table file. PDF \(1476KB\)](#)

Manuscript Tasks

[Send Manuscript Correspondence](#)

[Check Status](#)



[home](#) [author instructions](#) [reviewer instructions](#) [contact Journal](#) [logout](#)

Copyright © 2004 The Society of Leukocyte Biology
EJPress Version 7.0
[Terms and Conditions](#)

Group V secretory phospholipase A₂ contributes to LPS-induced leukocyte recruitment

Stéphanie Lapointe^{1,2}, Alexandre Brkovic^{1,2}, Isabelle Cloutier¹,
Jean-François Tanguay^{1,3,4}, Jonathan P. Arm⁵ and Martin G. Sirois^{1,2*}

¹Research Centre, Montreal Heart Institute, ²Département de Pharmacologie, ³Département des Sciences Biomédicales & ⁴Département de Médecine, Université de Montréal, Montreal, (QC), Canada

⁵Division of Rheumatology, Immunology, and Allergy and Partners Asthma Center, Brigham and Women's Hospital and the Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Running title: Role of sPLA₂-V on leukocyte emigration

Total word count: Abstract: 245, Total word count: 3 833

Key words: sPLA₂-V null mice, inflammation, adhesion molecules, air pouch model

*Correspondence should be addressed to:

Martin G. Sirois, Ph.D.

Research Center

Montreal Heart Institute

5000, Belanger Street

Montreal, Canada, H1T 1C8

Phone: (514) 376-3330 (ext: 3583)

Fax: (514) 376-1355

E-mail: martin.sirois@icm-mhi.org

2.1 Abstract

Secretory phospholipases A₂ (sPLA₂s) are well known for their contribution in the biosynthesis of inflammatory eicosanoids. These enzymes also participate in the inflammatory process by regulating chemokine production and protein expression of adhesion molecules. The majority of sPLA₂ isoforms are up-regulated by proinflammatory stimuli such as bacterial lipopolysaccharide (LPS), which predominantly increases the expression of group V sPLA₂ (sPLA₂-V). Furthermore, it has recently been shown that sPLA₂-V is a critical messenger in the regulation of cell migration during allergic airway responsiveness. Herein, we investigated the effect of sPLA₂-V on LPS-mediated leukocyte recruitment and its capacity to modulate adhesion molecule expression. We conducted our study in the murine air pouch model, using sPLA₂-V null mice (sPLA₂-V^{-/-}) and control wild-type (WT) littermates. We observed that LPS (1 µg/mL)-mediated leukocyte emigration in sPLA₂-V^{-/-} was attenuated by 52 and 86% upon 6 and 12 hours of treatment, respectively, as compared to WT mice. In WT mice, treatment with the cell-permeable sPLA₂ inhibitor (12-epi-scalaradial; SLD) reduced LPS-mediated leukocyte recruitment by 67%, but had no additional inhibitory effect in sPLA₂-V^{-/-} mice. Protein analyses from the air pouch skin were carried out upon LPS-challenge, and the expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 were both significantly reduced in sPLA₂-V^{-/-} mice as compared to control WT mice. Together, our data demonstrate the role of sPLA₂-V in LPS-induced ICAM-1 and VCAM-1 protein overexpression and leukocyte recruitment, supporting the contribution of sPLA₂-V in the development of inflammatory innate immune responses.

2.2 Introduction

Secretory phospholipases A₂ (sPLA₂s) are part of a large family of enzymes that catalyze the hydrolysis of the ester bond at the sn-2 position of membrane phospholipids leading to the release of free fatty acids [1]. This reaction is a key step in the production of inflammatory lipid mediators, such as prostaglandins (PGs), leukotrienes (LTs) and platelet-activating factor (PAF) [2]. So far, ten sPLA₂ isoforms (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X and XII) have been identified in mammalian cells [3]. They share common properties including low molecular weight (14 to 19 kDa), high disulfide bond content, and the requirement for high micromolar to millimolar calcium concentration to support their catalytic activities [4]. These enzymes are up-regulated under various inflammatory conditions and have been associated with many inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis [5-7], Crohn's disease [8], acute pancreatitis [9, 10], asthma [11] and gram-negative septic shock [12, 13].

In addition to their capacity to promote lipid mediator biosynthesis, sPLA₂s are able to upregulate chemokine production in monocytes [14] and macrophages [15, 16]. Moreover, stimulation of lung microvascular endothelial cells (LMVEC) with sPLA₂-IIA and IB induces chemokine synthesis and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 protein overexpression through the activation of the nuclear factor- κ B (NF- κ B) signalling pathway [17]. Other studies reported that type I, II and III sPLA₂ homologues isolated from bee and snake venoms are involved in *in vitro* neutrophil chemotaxis [18, 19], through the release of chemoattractant molecules such as PAF and LTB₄ [18]. Under *in vivo* conditions, the injection of a non specific sPLA₂ inhibitor, Scalaradial, together with zymosan into rat air pouches resulted in the inhibition of leukocyte infiltration, and decreased level of myeloperoxidase [20]. These observations were also supported by the study of Castro et al. demonstrating that intra-peritoneal administration of

type II sPLA₂ homologues isolated from snake venom led to pleural leukocyte infiltration [21].

Several studies investigating sPLA₂ proinflammatory activities focused their attention on sPLA₂-IIA, also referred to as the inflammatory-type sPLA₂. However, the findings that several inbred mouse strains including C57/BL6 have a natural sPLA₂-IIA gene disruption and exhibit normal inflammatory responses, led to the suggestion that other sPLA₂ isoforms might contribute to this physiological process [22].

The interest turned toward sPLA₂-V which shares 40% amino acid homology with sPLA₂-IIA, and has been shown to be better suited than sPLA₂-IIA for action on biological membranes, hence greater at promoting the release of free fatty acids and lysophospholipids from various mammalian cells [23]. Moreover, sPLA₂-V has been identified in many organs and leukocytes, namely, bone marrow-derived mast cells [24], the P388D1 macrophage cell line [25], mouse peritoneal macrophages [26] and human neutrophils [27]. sPLA₂-V protein expression is also up-regulated in a variety of cells exposed to proinflammatory stimuli including LPS and interleukins [28, 29]. Studies reported that sPLA₂-V is involved in the inflammatory process by its capacity to support the release of eicosanoid metabolites. For instance, stimulation with exogenous sPLA₂-V can elicit LTB₄ and LTC₄ biosyntheses in human neutrophils and eosinophils respectively [30, 31]. A recent study also revealed that resident peritoneal macrophages isolated from group V sPLA₂-null mice had a 50% reduced capacity to generate LTC₄ and PGE₂ upon zymosan stimulation [26]. In addition, we reported that sPLA₂-V is a key player in the signalling pathway leading to endothelial PAF synthesis [32, 33]. Beside the effect of sPLA₂-V on biosynthesis of lipid mediators, there is recent evidence suggesting that sPLA₂-V is critical in the regulation of cell migration (eosinophils and lymphocytes) during ovalbumin-induced allergic airway inflammation [11], possibly through the capacity of sPLA₂-V to

increase eosinophil CD11b surface expression, its focal clustering and binding to its endothelial counter-receptor, ICAM-1 [34].

Together, those data support the idea that sPLA₂-V might be a key enzyme in the development of inflammatory responses. Considering that sPLA₂ inhibitors may lack some specificity, we elected to use sPLA₂-V^{-/-} mice [26] to delineate the role of sPLA₂-V on leukocyte recruitment and its contribution to the expression of cell adhesion molecules.

2.3 Material & Methods

Reagents and antibodies

Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (0111:B4), bovine serum albumin, and proteinase K were purchased from Sigma (St-Louis, MO), the sPLA₂ inhibitor, 12-epi-scalaradial, was obtained from Biomol (Plymouth Meeting, PA). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated rat anti-mouse F4/80 antigen monoclonal IgG_{2a} was obtained from eBioscience (San Diego, CA), FITC-conjugated rat anti-mouse neutrophil monoclonal IgG_{2a} (clone 7/4), and FITC-conjugated rat IgG_{2a} isotype control were obtained from Serotec (Raleigh, NC). Goat polyclonal IgG anti-mouse ICAM-1, rabbit polyclonal IgG anti-mouse VCAM-1, goat polyclonal IgG anti-actin (I-19), donkey anti-goat IgG coupled with horseradish peroxidase (HRP), and goat anti-rabbit IgG-HRP were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

Mice interbreeding and genotyping

Heterozygous sPLA₂-V mice (sPLA₂-V^{+/-}) generated by target gene disruption [26] and backcrossed to a C57BL/6 background for 11 generations were interbred to generate homozygous sPLA₂-V null mice (sPLA₂-V^{-/-}) and sPLA₂-V^{+/+} wild type (WT) littermates, the latter being used as controls. The experiments were performed with mice being 6 to 8 weeks of age.

Mice genotyping was assessed by PCR reactions on DNA extracted from mice ear clips. Each ear clip was placed in 100 µL of digestion buffer (KCl 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, Tris-HCl 10 mM: pH 8.3, 0.45% NP-40, 0.45% Tween 20%, Proteinase K 1 mg/mL) at 65°C for 45 minutes and then boiled for 10 minutes to inactivate the proteinase K. The PCR reactions were performed as follows: DNA was denatured (94°C for 5 minutes), submitted to 34 cycles of amplification (94°C for 45 seconds, 56°C for 1 minute, and 72°C for 90 seconds), and submitted to a final elongation reaction (72°C for 10 minutes). Primers were used to amplify a 387-base pair (bp) fragment of sPLA₂-V (exon

4) (forward: 5'-AGAGGCAAGAGCTGCCGTCTGTT-3', and reverse: 5'-CTGACAGCACCTGTCTGAGGTGAG-3') or a 211-bp fragment of the inserted neomycin (*Neo*) resistance gene (forward: 5'-CACCTTGCTCCTGCCGAGAA-3', and reverse: 5'-CCTTGAGCCTGGCGAACAGT-3'). Products were resolved on 2% agarose gels and visualized with ethidium bromide. The generation of a single reaction product of 387 bp (sPLA₂-V exon 4) or 211 bp (neomycin insert), corresponds to WT (sPLA₂-V^{+/+}) and sPLA₂-V^{-/-} mice, respectively, whereas the dual amplification of the 211 bp and 387 bp fragments corresponds to heterozygous sPLA₂-V^{+/-} mice (Figure 1).

Air pouch experiments

The mice (sPLA₂-V^{-/-} and sPLA₂-V^{+/+}) were anesthetised using isofurane and subcutaneous (s.c.) air pouches were formed on their back, as previously described [35]. Briefly, on day 0 and 3, filtered air (3 mL/injection, filtered through a 0.2 µm Filtropur filter; Sarstedt, Montreal, QC, Canada) was injected s.c. in the back using a 26-gauge needle. On day 6, 1 mL of saline, LPS (1 µg/mL) or LPS (1 µg/mL) combined with 12-epi-scalaradial (4 µg/mL; 10 µM final concentration) was injected into the air pouches. 12-epi-scalaradial was solubilized in DMSO (0.3% v/v final concentration of DMSO). Mice were sacrificed by CO₂ inhalation at 6 or 12 hours after treatment and the pouches were washed with HBSS-EDTA (5 mM), once with 1 mL and twice with 2 mL. The exudate was centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes at 4°C. Cells were then resuspended in 1 mL of HBSS-EDTA (5 mM) for cell count with a haemocytometer.

Characterization by flow cytometry

Cells were centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes at 4°C and resuspended in PBS containing BSA 2%, EDTA 5 mM, and normal rat serum 5% for 20 minutes at 4°C. The cells were then probed, for 15 minutes at 4°C with a rat anti-mouse F4/80 antigen FITC- IgG_{2a} (100 µg/mL; 1:200 dilution), a rat anti-

mouse neutrophil FITC-IgG_{2a} (clone 7/4) (100 µg/mL; 1:200 dilution), or with a FITC-IgG_{2a}-conjugated rat isotypic control (100 µg/mL; 1:200 dilution). Cells were washed twice with PBS-EDTA (5 mM) and analyzed using an EPICS ALTRA flow cytometer (Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). For each experiment, the percentage of positive cells from the isotype-matched control was subtracted from the percentage of specific-labelled positive cells in the gated population. Afterwards, mean values for each experimental group was calculated.

Western blot analyses of ICAM-1 and VCAM-1 expression

Skin from the mouse air pouch sites (1 cm x 1 cm) was collected and homogenized with a Polytron (Brinkmann Polytron; Fisher, Nepean, ON, Canada) in RIPA lysis buffer (NP-40 1%, Sodium phosphate 50 mM: pH 7.2, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaF 50 mM, SDS 0.1%, sodium deoxycholate 0.5%, PMSF 1 mM, benzamidine 1 µg/mL, leupeptin 10 µg/mL, trypsin inhibitor 1 µg/mL, and microcystin LR 1 mM). Cell lysates were clarified by centrifugation, and supernatant protein concentrations determined using a protein assay kit (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Cell lysates (100 µg) were separated by SDS-PAGE (7.5 to 20% gradient gels) and transferred onto PVDF membrane. Membranes were probed overnight with an anti-mouse ICAM-1 IgG (200 µg/mL, 1:1000 dilution) or an anti-mouse VCAM-1 IgG (200 µg/mL, 1:1000 dilution), membranes were rinsed three times in 0.1% Tween-TBS, and incubated with anti-goat or anti-rabbit secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase, respectively. Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence (LumiGloTM; New England Biolabs, MA). Afterwards, membranes were stripped with re-Blot Plus (Chemicon, Temecula, CA) and reprobed with anti-actin IgG (200 µg/mL, 1:1000 dilution) as an internal loading control. Optical densities of the bands were determined using Quantity One software (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) and results are presented as the relative expression of ICAM-1 and VCAM-1 proteins normalized for the expression of actin.

Statistical analysis

Data are means \pm SEM. Comparisons were made by analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni *t*-test. Differences were considered significant at p values ≤ 0.05 .

2.4 Results

Role of sPLA₂-V on LPS-mediated recruitment of inflammatory cells

LPS inflammatory activities are mediated in part through its capacity to promote recruitment of inflammatory cells at injury sites. In addition, LPS promotes protein overexpression of various sPLA₂ subtypes including sPLA₂-V *in vivo* and in different cell types [29, 36]. Thus, we wanted to assess the contribution of sPLA₂-V on LPS-mediated leukocyte recruitment in a murine air pouch model.

Saline or LPS (1 µg/mL) was injected in the air pouches of sPLA₂-V^{-/-} mice and their control (WT) littermates. After 6 or 12 hours of treatment, exudates were collected from the air pouches. Administration of saline alone in the air pouches of WT and sPLA₂-V^{-/-} mice led to a mild recruitment of leukocytes after both incubation periods ($< 1.0 \times 10^6$ cells/pouch) (Figure 2). Treatment of WT mice with LPS (1 µg/mL) for 6 and 12 hours induced a marked increase in leukocyte recruitment ($3.7 \pm 0.6 \times 10^6$ cells and $3.8 \pm 0.8 \times 10^6$ cells/pouch) respectively. On the other hand, the LPS-mediated leukocyte emigration in the air pouch of sPLA₂-V^{-/-} mice was significantly reduced by 51.9 and 85.7% at 6 and 12 hours respectively, as compared to wild-type LPS-treated mice (Figure 2).

Previous studies reported that use of the non-specific sPLA₂s inhibitor, 12-epi-scalaradial (SLD) can prevent neutrophil adhesion mediated by N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) [37], and zymosan-induced infiltration of inflammatory cells in a rat air pouch model [20]. Although we observed a marked reduction of leukocyte recruitment in LPS-treated sPLA₂-V^{-/-} mice, there was still a significant recruitment of inflammatory cells at 6 hours post-treatment, thus, we wanted to assess the possible contribution of other sPLA₂ isoforms on the recruitment of leukocytes mediated by LPS. To do so, SLD (4 µg/mL; 10 µM) was combined with LPS (1 µg/mL) and injected in the air pouch of WT and

sPLA₂-V^{-/-} mice. The concentration of SLD to be used was set to 10 μM in order to avoid the possible inhibition of the cytosolic group IVa PLA₂ (gIVaPLA₂) activity [38]. Inflammatory cells accumulated in the air pouch were collected after 6 hours since there was still significant LPS-mediated leukocytes recruitment observable in the sPLA₂-V^{-/-} mice at that time (Figure 2).

Treatment with SLD reduced LPS-mediated leukocyte infiltration by 66.9% in WT mice, but was unable to further reduce leukocyte emigration in sPLA₂-V^{-/-} mice exposed to LPS (Figure 3). Previous studies reported that high DMSO concentrations can induce inflammatory cell infiltration [39], and have a cytotoxic effect on different cell types [40]. Thus, to insure that the DMSO concentration used to dissolve SLD had no influence by itself on the migration of inflammatory cells in our air pouch model, we performed a control study, in which DMSO (0.3% final concentration) was combined with saline or LPS (1 μg/mL) and injected for 6 hours into the air pouch of WT and sPLA₂-V^{-/-} mice. At this concentration DMSO did not influence leukocyte migration mediated either by saline or LPS in both WT and sPLA₂-V^{-/-} mice (Table I).

Identification of leukocyte subpopulations recruited in mice air pouch

Treatment with LPS promoted inflammatory cell emigration into the mice air pouch, and this was markedly reduced in sPLA₂-V^{-/-} mice as compared to control WT mice. However, it is unknown whether the reduction of leukocyte recruitment is specific for a subpopulation of inflammatory cells. To address this issue, we characterized by FACS analyses, the leukocyte subpopulations found in the air pouch of WT and sPLA₂-V^{-/-} mice, using specific FITC-conjugated antibodies against mouse neutrophils (clone 7/4) and against antigen F4/80 expressed on monocytes/macrophages.

Treatment with saline alone for 6 hours led to the recruitment of neutrophils and monocytes, which corresponded respectively to 14.6 and 6.1% in WT-mice and 25.6 and 12.5% in sPLA₂-V^{-/-} mice of the total cell contents of the

exudates (Figure 4A and B). Treatment with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 6 hours promoted a marked increase in neutrophil recruitment into the air pouch of WT and sPLA₂-V^{-/-} mice, which corresponded to 76.7 and 75.4% of the total exudate cell contents, whereas LPS-treatment did not affect the percentage of monocyte recruited (Figure 4A and B). In addition, we observed that a prolonged treatment for 12 hours under the same conditions provided similar results for migration of both neutrophils and mononuclear cells in mice air pouch exudates (Figure 4A and B).

Role of sPLA₂-V on LPS-mediated expression of adhesion molecules

Vasculature exposure to various endotoxins promotes protein overexpression of endothelial cell adhesion molecules [41, 42]. In addition, it has been reported that LPS promotes ICAM-1 overexpression in microvascular endothelial cells, and its expression was further upregulated by the combination of LPS with sPLA₂-IB or -IIA [17]. Since our results suggest that sPLA₂-V is implicated in LPS-mediated neutrophil emigration, we wanted to assess the contribution of sPLA₂-V to the expression of endothelial cell adhesion molecules upon LPS exposure. Western blot analyses were carried out to define the modulation of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 expression in mouse air pouch skin.

In WT and sPLA₂-V^{-/-}-mice treated with saline, we observed a basal constitutive expression of ICAM-1 and no or little expression of VCAM-1. The basal expression for each protein was set to 1 for comparative data analyses. Upon a 6 hours LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) treatment, ICAM-1 and VCAM-1 protein expression was increased by 2.8- and 2.3-fold, respectively, in WT mice. Under the same conditions, in sPLA₂-V^{-/-} mice, LPS-mediated protein expression of ICAM-1 and VCAM-1 was significantly reduced by 44% and 59.8% respectively, as compared to corresponding WT mice (Figure 5A and B).

However, when the treatment with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was prolonged for up to 12 hours, there was no longer a significant difference on ICAM-1 and VCAM-1 protein overexpression profile between WT and sPLA₂-V^{-/-} mice. In WT mice, ICAM-1 protein overexpression level was maintained with a 2.5-fold increase (plateau), whereas in sPLA₂-V^{-/-} mice, ICAM-1 protein expression (2.7-fold increase) was now equivalent to the one observed in WT mice (Figure 5A). Upon a 12-hour LPS treatment, the overexpression of VCAM-1 was similar in both WT and sPLA₂-V mice, with a respective 5.2- and 4.4-fold increase as compared to corresponding control saline-treated mice (Figure 5B).

2.5 Discussion

In the present study, we observed that LPS injection in a murine air pouch model promotes leukocytes migration, mainly neutrophils, and protein overexpression of ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules. These events were markedly reduced in sPLA₂-V^{-/-} mice as compared to their wild-type control littermates.

sPLA₂-V promotes LPS-mediated leukocyte recruitment

The sPLA₂-IIA was initially isolated from human arthritic synovial fluid [5] and was subsequently associated with other inflammatory disorders. The capacity of sPLA₂-IIA to promote inflammatory responses was outlined by studies in which the use of blocking antibodies and inhibitors reduced proinflammatory activities. The growing research on sPLA₂ led to the discovery of new sPLA₂ isoforms that share structural and enzymatic similarities with sPLA₂-IIA, thus leading to the suggestion that this enzyme might not be the only one involved in the inflammatory response. Furthermore, new studies on the blocking antibodies and inhibitors, initially thought to be “selective” for sPLA₂-IIA, demonstrated that the biological activities of sPLA₂-V are also reduced by those agents [43, 44].

The generation of sPLA₂-V null (sPLA₂-V^{-/-}) mice in a C57/BL6 background, which are not expressing the sPLA₂-IIA gene, provided the opportunity to assess the specific endogenous role of sPLA₂-V and to discard the potential contribution of sPLA₂-IIA. Using sPLA₂-V^{-/-} mice, it has been possible to demonstrate the implication of sPLA₂-V in eicosanoid generation, plasma exudation, macrophage phagocytosis and airway hyperresponsiveness [11, 26, 45]

In the current study, we observe that LPS injection in the air pouch of WT and sPLA₂-V^{-/-} mice led to maximal leukocyte recruitment after a 6-hour treatment,

which is consistent with previous kinetic experiments demonstrating maximal inflammatory cell emigration in the air pouch within 6 hours post LPS-treatment and a complete resolution after 24 hours [35, 46]. Furthermore, we demonstrated that LPS-mediated leukocyte recruitment was significantly reduced in sPLA₂-V^{-/-} mice as compared to control WT-littermates.

The reduction of leukocyte migration in sPLA₂-V^{-/-} mice can result from a reduced biosynthesis of chemotactic lipid mediators. For instance, Gambero *et al.*, reported that human neutrophil chemotaxis in response to sPLA₂ isoforms involves the release of leukotriene B₄ (LTB₄) and PAF [18]. In addition, it has been shown that sPLA₂-V is associated with LTB₄ and PAF synthesis in neutrophils and endothelial cells, respectively [30, 32]. The reduction of inflammatory cells recruited in the air pouch of sPLA₂-V^{-/-} might also be attributable to a decrease synthesis of other cytokines (IL-6 and TNF- α) and chemokines of the CC (MCP-1/ CCL2, MIP-1 α / CCL3 and MIP-1 β / CCL4) and CXC (IL-8/ CXCL8) families, since some sPLA₂ have been shown to induce their release in different cell types [14, 16].

Since there was still a significant recruitment of leukocytes in sPLA₂-V^{-/-} mice upon a 6-hour treatment period with LPS, we treated the mice with SLD, which is reported as a group II (IIA, IIC, IID, IIE, IIF and V) sPLA₂ inhibitor, in order to address the potential residual contribution of group II sPLA₂ isoforms. In addition, SLD was injected at a final concentration of 10 μ M to avoid non selective inhibition of the cytosolic high-molecular weight PLA₂ (cPLA₂) activity [38, 47]. We observed that the reduction of leukocyte migration in the air pouch of WT mice treated with SLD combined with LPS was similar to the diminution observed in sPLA₂-V^{-/-} mice treated with LPS alone. Furthermore, the administration of SLD in sPLA₂-V^{-/-} mice challenged with LPS had no additional inhibitory effect on inflammatory cell recruitment. Those results suggest that sPLA₂ group IIA, IIC, IID, IIE, and IIF are not involved in LPS-induced leukocyte recruitment and that sPLA₂-V is the principal sPLA₂

isoform implicated in this process. Our results are also in agreement with the study of Paya *et al.* which have shown the capacity of SLD to prevent zymosan-mediated neutrophil influx into the rat air pouch [20]. However, based on our current data, we cannot discard the possible contribution of group X and XII sPLA₂, cPLA₂ (IV) and the Ca²⁺-independent PLA₂ (iPLA₂; group VI). Knowing that sPLA₂-V has a role in amplifying the action of cPLA₂α in supplying arachidonic acid for eicosanoid production [48, 49], it is reasonable to presume that cPLA₂α and its associated lipid mediators might contribute to the residual leukocyte recruitment observed in sPLA₂-V^{-/-} mice.

Impact of sPLA₂-V on different inflammatory cell populations

Since there was a significant difference in inflammatory cell recruitment between WT and sPLA₂-V^{-/-} mice, we wanted to define the leukocyte subpopulations in the air pouch. Our results showed that LPS induced mainly neutrophil migration in both WT and sPLA₂-V^{-/-} mice, the difference between both groups being limited only to the number of cells recruited. This observation is consistent with reports demonstrating that LPS injection into the air pouch results in the attraction of several millions of cells, among which the majority are neutrophils [35, 50, 51].

Furthermore, since the total leukocyte count recruited at the inflammatory site (LPS) remained stable from 6 to 12 hours in WT mice, but decreased to basal levels after 12 hours in sPLA₂-V^{-/-} mice, we have supposed that this phenomenon was attributable to an increased number of phagocytes in sPLA₂-V^{-/-} mice. However, our results demonstrated that there was no significant difference in the percentage of monocytes/macrophages between WT and sPLA₂-V^{-/-} mice treated with LPS or saline. On the other hand, it has been reported that recombinant sPLA₂ appears to protect mast cells from apoptosis [52] and that sPLA₂ inhibitors promoted apoptosis [53]. Those observations may provide a possible explanation for the reduction of

leukocytes observed in sPLA₂-V^{-/-} mice but not in WT mice 6 to 12 hours post-treatment with LPS.

The sPLA₂-V promotes LPS-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression

A recent study reported that treatment of lung microvascular endothelial cells with LPS resulted in the induction of ICAM-1 expression, which was further upregulated when combined either with sPLA₂-IIA or -IB [17]. In another study, treatment of a keratinocyte cell line with sPLA₂ inhibitors, SLD or LY311727, markedly reduced the TNF α -mediated ICAM-1 expression [54]. Thus, we wanted to assess the potential role of sPLA₂-V on ICAM-1 and VCAM-1 expression, which are both promoting the initial attachment, adhesion and vascular migration of leukocytes in the murine skin air pouch. In the current study, we observed that LPS injection into the air pouch of WT mice resulted in an increased protein expression of ICAM-1 and VCAM-1, which is consistent with previous reports showing that LPS promotes a protein upregulation of these endothelial adhesion molecules [41, 55]. On the other hand, we observed a marked reduction of LPS-mediated ICAM-1 and VCAM-1 protein expression in sPLA₂-V^{-/-} mice after 6 hours, however, this difference was no longer observed upon a 12-hour LPS treatment, thus suggesting that absence of sPLA₂-V enzyme delays protein expression of both ICAM-1 and VCAM-1. These data propose that sPLA₂-V is implicated in the early onset of LPS-induced ICAM-1 and VCAM-1 protein expression, and that other sPLA₂-V-independent signalling pathways are taking over to support delayed expression of those adhesion molecules. The data also suggest that it is the early expression of ICAM-1 and VCAM-1 that is important in the recruitment of neutrophils to the LPS-treated air pouch, and that the later upregulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression in sPLA₂-V^{-/-} mice does not contribute to leukocyte emigration.

In summary, we observed that sPLA₂-V is involved in the initial phase of LPS-induced ICAM-1 and VCAM-1 overexpression, which is essential to trigger the

early onset of neutrophil migration. These data demonstrate the specific proinflammatory capacities of sPLA₂-V in the development of an inflammatory response independent of group II sPLA₂ isoforms.

2.6 Acknowledgements

Stéphanie Lapointe was recipient of a M.Sc. studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Dr. Sirois is recipient of a senior scholarship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-43919) and Heart and Stroke Foundation of Quebec to Dr. Sirois and the National Institutes of Health (HL070946) to Dr. Arm. We would like to thank Dr. Denis Girard for his technical assistance regarding the use of the murine air pouch model.

2.7 References

1. Dennis, E.A. (1994) Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* **269**, 13057-60.
2. Murakami, M., Nakatani, Y., Atsumi, G., Inoue, K., Kudo, I. (1997) Regulatory functions of phospholipase A2. *Crit Rev Immunol* **17**, 225-83.
3. Valentin, E., Lambeau, G. (2000) Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1488**, 59-70.
4. Scott, D.L., White, S.P., Otwinowski, Z., Yuan, W., Gelb, M.H., Sigler, P.B. (1990) Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A2. *Science* **250**, 1541-6.
5. Stefanski, E., Pruzanski, W., Sternby, B., Vadas, P. (1986) Purification of a soluble phospholipase A2 from synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J Biochem* **100**, 1297-303.
6. Kramer, R.M., Hession, C., Johansen, B., Hayes, G., McGray, P., Chow, E.P., Tizard, R., Pepinsky, R.B. (1989) Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. *J Biol Chem* **264**, 5768-75.
7. Seilhamer, J.J., Pruzanski, W., Vadas, P., Plant, S., Miller, J.A., Kloss, J., Johnson, L.K. (1989) Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J Biol Chem* **264**, 5335-8.
8. Haapamaki, M.M., Gronroos, J.M., Nurmi, H., Alanen, K., Nevalainen, T.J. (1999) Gene expression of group II phospholipase A2 in intestine in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **94**, 713-20.
9. Uhl, W., Schrag, H.J., Schmitter, N., Nevalainen, T.J., Aufenanger, J., Wheatley, A.M., Buchler, M.W. (1997) Pathophysiological role of secretory type I and II phospholipase A2 in acute pancreatitis: an experimental study in rats. *Gut* **40**, 386-92.
10. Camargo, E.A., Esquisatto, L.C., Esquisatto, M.A., Ribela, M.T., Cintra, A.C., Giglio, J.R., Antunes, E., Landucci, E.C. (2005) Characterization of

- the acute pancreatitis induced by secretory phospholipases A2 in rats. *Toxicol* **46**, 921-6.
11. Munoz, N.M., Meliton, A.Y., Arm, J.P., Bonventre, J.V., Cho, W., Leff, A.R. (2007) Deletion of secretory group V phospholipase A2 attenuates cell migration and airway hyperresponsiveness in immunosensitized mice. *J Immunol* **179**, 4800-7.
 12. Vadas, P., Stefanski, E., Pruzanski, W. (1986) Potential therapeutic efficacy of inhibitors of human phospholipase A2 in septic shock. *Agents Actions* **19**, 194-202.
 13. Hanasaki, K., Yokota, Y., Ishizaki, J., Itoh, T., Arita, H. (1997) Resistance to endotoxic shock in phospholipase A2 receptor-deficient mice. *J Biol Chem* **272**, 32792-7.
 14. Triggiani, M., Granata, F., Oriente, A., Gentile, M., Petraroli, A., Balestrieri, B., Marone, G. (2002) Secretory phospholipases A2 induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes. *Eur J Immunol* **32**, 67-76.
 15. Triggiani, M., Granata, F., Oriente, A., De Marino, V., Gentile, M., Calabrese, C., Palumbo, C., Marone, G. (2000) Secretory phospholipases A2 induce beta-glucuronidase release and IL-6 production from human lung macrophages. *J Immunol* **164**, 4908-15.
 16. Granata, F., Frattini, A., Loffredo, S., Del Prete, A., Sozzani, S., Marone, G., Triggiani, M. (2006) Signaling events involved in cytokine and chemokine production induced by secretory phospholipase A(2) in human lung macrophages. *Eur J Immunol*.
 17. Beck, G., Yard, B.A., Schulte, J., Haak, M., van Ackern, K., van der Woude, F.J., Kaszkin, M. (2003) Secreted phospholipases A2 induce the expression of chemokines in microvascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 731-7.
 18. Gambero, A., Landucci, E.C., Toyama, M.H., Marangoni, S., Giglio, J.R., Nader, H.B., Dietrich, C.P., De Nucci, G., Antunes, E. (2002) Human

- neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A2: a role for cell surface glycosaminoglycans. *Biochem Pharmacol* **63**, 65-72.
19. Gambero, A., Thomazzi, S.M., Cintra, A.C., Landucci, E.C., De Nucci, G., Antunes, E. (2004) Signalling pathways regulating human neutrophil migration induced by secretory phospholipases A2. *Toxicon* **44**, 473-81.
 20. Paya, M., Terencio, M.C., Ferrandiz, M.L., Alcaraz, M.J. (1996) Involvement of secretory phospholipase A2 activity in the zymosan rat air pouch model of inflammation. *Br J Pharmacol* **117**, 1773-9.
 21. de Castro, R.C., Landucci, E.C., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E. (2000) Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A(2) into the rat pleural cavity. *Toxicon* **38**, 1773-85.
 22. Kennedy, B.P., Payette, P., Mudgett, J., Vadas, P., Pruzanski, W., Kwan, M., Tang, C., Rancourt, D.E., Cromlish, W.A. (1995) A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. *J Biol Chem* **270**, 22378-85.
 23. Janssen, M.J., Vermeulen, L., Van der Helm, H.A., Aarsman, A.J., Slotboom, A.J., Egmond, M.R. (1999) Enzymatic properties of rat group IIA and V phospholipases A(2) compared. *Biochim Biophys Acta* **1440**, 59-72.
 24. Bingham, C.O., 3rd, Fijneman, R.J., Friend, D.S., Goddeau, R.P., Rogers, R.A., Austen, K.F., Arm, J.P. (1999) Low molecular weight group IIA and group V phospholipase A(2) enzymes have different intracellular locations in mouse bone marrow-derived mast cells. *J Biol Chem* **274**, 31476-84.
 25. Balboa, M.A., Balsinde, J., Winstead, M.V., Tischfield, J.A., Dennis, E.A. (1996) Novel group V phospholipase A2 involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D1 macrophages. *J Biol Chem* **271**, 32381-4.
 26. Satake, Y., Diaz, B.L., Balestrieri, B., Lam, B.K., Kanaoka, Y., Grusby, M.J., Arm, J.P. (2004) Role of group V phospholipase A2 in zymosan-

- induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. *J Biol Chem* **279**, 16488-94.
27. Degousee, N., Ghomashchi, F., Stefanski, E., Singer, A., Smart, B.P., Borregaard, N., Reithmeier, R., Lindsay, T.F., Lichtenberger, C., Reinisch, W., Lambeau, G., Arm, J., Tischfield, J., Gelb, M.H., Rubin, B.B. (2002) Groups IV, V, and X phospholipases A2s in human neutrophils: role in eicosanoid production and gram-negative bacterial phospholipid hydrolysis. *J Biol Chem* **277**, 5061-73.
 28. van der Helm, H.A., Aarsman, A.J., Janssen, M.J., Neys, F.W., van den Bosch, H. (2000) Regulation of the expression of group IIA and group V secretory phospholipases A(2) in rat mesangial cells. *Biochim Biophys Acta* **1484**, 215-24.
 29. Hamaguchi, K., Kuwata, H., Yoshihara, K., Masuda, S., Shimbara, S., Oh-ishi, S., Murakami, M., Kudo, I. (2003) Induction of distinct sets of secretory phospholipase A(2) in rodents during inflammation. *Biochim Biophys Acta* **1635**, 37-47.
 30. Han, S.K., Kim, K.P., Koduri, R., Bittova, L., Munoz, N.M., Leff, A.R., Wilton, D.C., Gelb, M.H., Cho, W. (1999) Roles of Trp31 in high membrane binding and proinflammatory activity of human group V phospholipase A2. *J Biol Chem* **274**, 11881-8.
 31. Munoz, N.M., Kim, Y.J., Meliton, A.Y., Kim, K.P., Han, S.K., Boetticher, E., O'Leary, E., Myou, S., Zhu, X., Bonventre, J.V., Leff, A.R., Cho, W. (2003) Human group V phospholipase A2 induces group IVA phospholipase A2-independent cysteinyl leukotriene synthesis in human eosinophils. *J Biol Chem* **278**, 38813-20.
 32. Bernatchez, P.N., Winstead, M.V., Dennis, E.A., Sirois, M.G. (2001) VEGF stimulation of endothelial cell PAF synthesis is mediated by group V 14 kDa secretory phospholipase A2. *Br J Pharmacol* **134**, 197-205.
 33. Marchand, C., Favier, J., Sirois, M.G. (2006) Role of MSK1 in the signaling pathway leading to VEGF-mediated PAF synthesis in endothelial cells. *J Cell Biochem* **98**, 1095-105.

34. Munoz, N.M., Meliton, A.Y., Lambertino, A., Boetticher, E., Learoyd, J., Sultan, F., Zhu, X., Cho, W., Leff, A.R. (2006) Transcellular secretion of group V phospholipase A2 from epithelium induces beta2-integrin-mediated adhesion and synthesis of leukotriene C4 in eosinophils. *J Immunol* **177**, 574-82.
35. Pelletier, M., Bouchard, A., Girard, D. (2004) In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol* **173**, 7521-30.
36. Sun, G.Y., Hu, Z.Y. (1995) Stimulation of phospholipase A2 expression in rat cultured astrocytes by LPS, TNF alpha and IL-1 beta. *Prog Brain Res* **105**, 231-8.
37. Barnette, M.S., Rush, J., Marshall, L.A., Foley, J.J., Schmidt, D.B., Sarau, H.M. (1994) Effects of scolaradial, a novel inhibitor of 14 kDa phospholipase A2, on human neutrophil function. *Biochem Pharmacol* **47**, 1661-7.
38. Marshall, L.A., Winkler, J.D., Griswold, D.E., Bolognese, B., Roshak, A., Sung, C.M., Webb, E.F., Jacobs, R. (1994) Effects of scolaradial, a type II phospholipase A2 inhibitor, on human neutrophil arachidonic acid mobilization and lipid mediator formation. *J Pharmacol Exp Ther* **268**, 709-17.
39. Sjogren, F., Anderson, C. (2000) The spectrum of inflammatory cell response to dimethyl sulfoxide. *Contact Dermatitis* **42**, 216-21.
40. Brayton, C.F. (1986) Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet* **76**, 61-90.
41. Chen, C.C., Rosenbloom, C.L., Anderson, D.C., Manning, A.M. (1995) Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I kappa B-alpha phosphorylation. *J Immunol* **155**, 3538-45.
42. Nooteboom, A., van der Linden, C.J., Hendriks, T. (2004) Modulation of adhesion molecule expression on endothelial cells after induction by lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Scand J Immunol* **59**, 440-8.

43. Chen, Y., Dennis, E.A. (1998) Expression and characterization of human group V phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* **1394**, 57-64.
44. Lucas, K.K., Dennis, E.A. (2005) Distinguishing phospholipase A2 types in biological samples by employing group-specific assays in the presence of inhibitors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **77**, 235-48.
45. Balestrieri, B., Hsu, V.W., Gilbert, H., Leslie, C.C., Han, W.K., Bonventre, J.V., Arm, J.P. (2006) Group V secretory phospholipase A2 translocates to the phagosome after zymosan stimulation of mouse peritoneal macrophages and regulates phagocytosis. *J Biol Chem* **281**, 6691-8.
46. Vandal, K., Rouleau, P., Boivin, A., Ryckman, C., Talbot, M., Tessier, P.A. (2003) Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* **171**, 2602-9.
47. Xie, Y., Liu, L., Huang, X., Guo, Y., Lou, L. (2005) Scalaradial inhibition of epidermal growth factor receptor-mediated Akt phosphorylation is independent of secretory phospholipase A2. *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 1210-7.
48. Murakami, M., Shimbara, S., Kambe, T., Kuwata, H., Winstead, M.V., Tischfield, J.A., Kudo, I. (1998) The functions of five distinct mammalian phospholipase A2S in regulating arachidonic acid release. Type IIa and type V secretory phospholipase A2S are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **273**, 14411-23.
49. Kim, Y.J., Kim, K.P., Han, S.K., Munoz, N.M., Zhu, X., Sano, H., Leff, A.R., Cho, W. (2002) Group V phospholipase A2 induces leukotriene biosynthesis in human neutrophils through the activation of group IVA phospholipase A2. *J Biol Chem* **277**, 36479-88.
50. Nakamura, H., Herzenberg, L.A., Bai, J., Araya, S., Kondo, N., Nishinaka, Y., Yodoi, J. (2001) Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15143-8.

51. Oshiro, T.M., Macedo, M.S., Macedo-Soares, M.F. (2005) Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm Res* **54**, 17-21.
52. Fonteh, A.N., Marion, C.R., Barham, B.J., Edens, M.B., Atsumi, G., Samet, J.M., High, K.P., Chilton, F.H. (2001) Enhancement of mast cell survival: a novel function of some secretory phospholipase A(2) isoforms. *J Immunol* **167**, 4161-71.
53. Longo, W.E., Grossmann, E.M., Erickson, B., Panesar, N., Mazuski, J.E., Kaminski, D.L. (1999) The effect of phospholipase A2 inhibitors on proliferation and apoptosis of murine intestinal cells. *J Surg Res* **84**, 51-6.
54. Thommesen, L., Sjørnsen, W., Gasvik, K., Hanssen, W., Brekke, O.L., Skattebol, L., Holmeide, A.K., Espevik, T., Johansen, B., Laegreid, A. (1998) Selective inhibitors of cytosolic or secretory phospholipase A2 block TNF-induced activation of transcription factor nuclear factor-kappa B and expression of ICAM-1. *J Immunol* **161**, 3421-30.
55. Jersmann, H.P., Hii, C.S., Ferrante, J.V., Ferrante, A. (2001) Bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha synergistically increase expression of human endothelial adhesion molecules through activation of NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Infect Immun* **69**, 1273-9.

2.8 Table

Treatment	Leukocytes (x 10 ⁶ per pouch)	
	WT mice	sPLA ₂ -V ^{-/-} mice
Saline	0.84 ± 0.14	0.64 ± 0.07
Saline + DMSO	0.49 ± 0.04	0.54 ± 0.09
LPS	3.67 ± 0.57	2.00 ± 0.30
LPS + DMSO	4.05 ± 0.72	1.84 ± 0.43

Table I. Effect of DMSO on inflammatory cell migration into the mouse air pouch. Air pouches were raised on the backs of WT and sPLA₂-V^{-/-} mice before the injection of saline, LPS (1 µg/mL), or saline and LPS (1 µg/mL) respectively combined with 0.3% of DMSO. Exudates were harvested 6 hours after injection and leukocyte counts were determined. Values are means ± SEM (n ≥ 6). Treatment with DMSO had no significant effect on the migration of inflammatory cells mediated either by saline or LPS treatment in WT and sPLA₂-V^{-/-} mice.

2.9. Figure Legends

Figure 1: Representative PCR genotyping of sPLA₂-V. Amplification of a single 387 bp fragment (sPLA₂-V exon 4) or a single 211bp (neomycin insert) corresponding to WT mice (+/+) and sPLA₂-V null mice (-/-) genotypes, respectively. When both DNA fragments are amplified, this corresponds to a heterozygous sPLA₂-V (+/-) mouse.

Figure 2: Effect of sPLA₂-V on leukocyte recruitment mediated by LPS injection into the mouse air pouch. Air pouches were raised on the back of WT and sPLA₂-V^{-/-} mice before the injection of saline or LPS (1 µg/mL). Exudates were harvested at 6 or 12 hours post-injection and leukocyte counts were determined with a haemocytometer. Values are means ± SEM (n ≥ 8). ** and *** denote p < 0.01 and p < 0.001 versus corresponding control saline-treated mice respectively; †† and ††† represent p < 0.01 and p < 0.001.

Figure 3: Inhibitory effect of 12-epi-scalaradial on LPS-mediated leukocyte recruitment into the mouse air pouch. 12-epi-scalaradial (SLD; 10 µM, 4 µg/mL; final concentration) was combined with LPS (1 µg/mL) and injected in WT and sPLA₂-V^{-/-} mice air pouches. After 6 hours, exudates were collected and leukocyte counts determined. Values are means ± SEM (n ≥ 7). *** denotes p < 0.001 versus corresponding control saline-treated mice, and † represent p < 0.05.

Figure 4: Characterization by flow cytometry of leukocyte subpopulations recruited into the mouse air pouch. Saline or LPS (1 µg/mL) were injected into the air pouch of WT and sPLA₂-V^{-/-} mice, and the exudates were collected at 6 or 12 hours post-treatment. Cells from the exudates were labelled with FITC-conjugated antibody specific for murine neutrophils (clone 7/4) or monocytes/macrophages (F4/80) antigen and

analyzed by flow cytometry. The data correspond to the percentage (%) of each cell type recruited to the air pouch and are calculated as the following: For each sample, the percentage of positive cells for the isotype-matched control was subtracted from the percentage of positive cells for the specific antibody, in the gated population. Values are means \pm SEM ($n \geq 3$). *** denotes $p < 0.001$ versus corresponding control saline-treated mice.

Figure 5: Contribution of sPLA₂-V on LPS-mediated ICAM-1 and VCAM-1 protein expression. Skin from the air pouch sites of WT and sPLA₂-V^{-/-} mice treated with saline or LPS (1 μ g/mL; for 6 and 12 hours) were isolated and homogenized. Protein lysates were used for the detection of ICAM-1 (A) and VCAM-1 (B) protein expression by Western blot analyses. Values are means \pm SEM ($n \geq 8$ per group) for each condition. The current Western blots correspond to representative images of the average data obtained by optical density for each group. ** and *** denote $p < 0.01$ and $p < 0.001$ versus corresponding control saline-treated mice, respectively. †† and ††† represent $p < 0.01$ and $p < 0.001$.

2.10 Figures

Figure 1

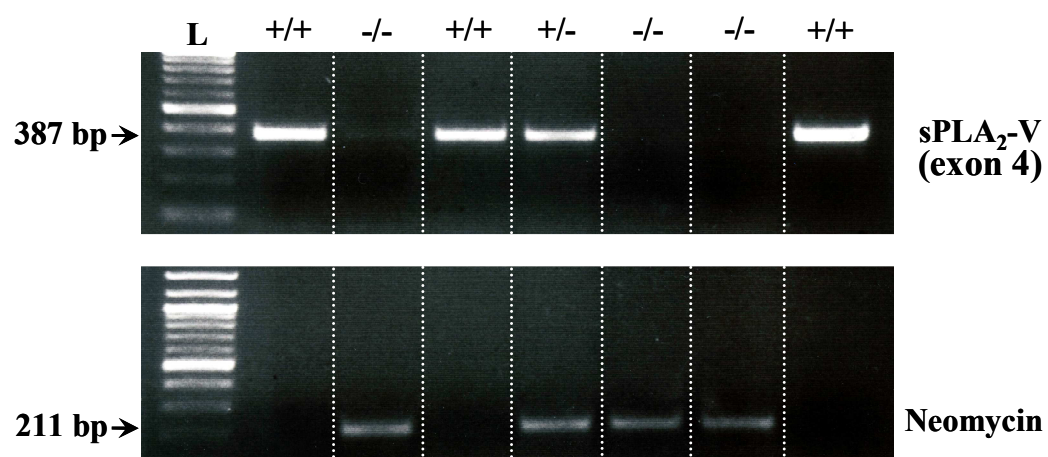


Figure 2

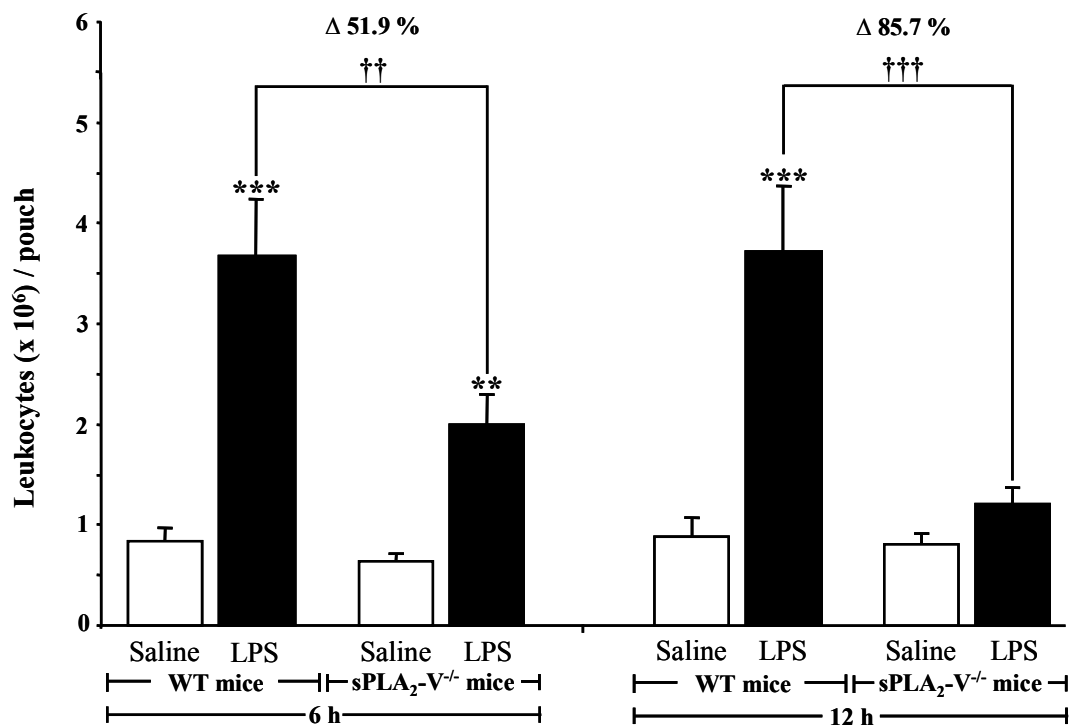


Figure 3

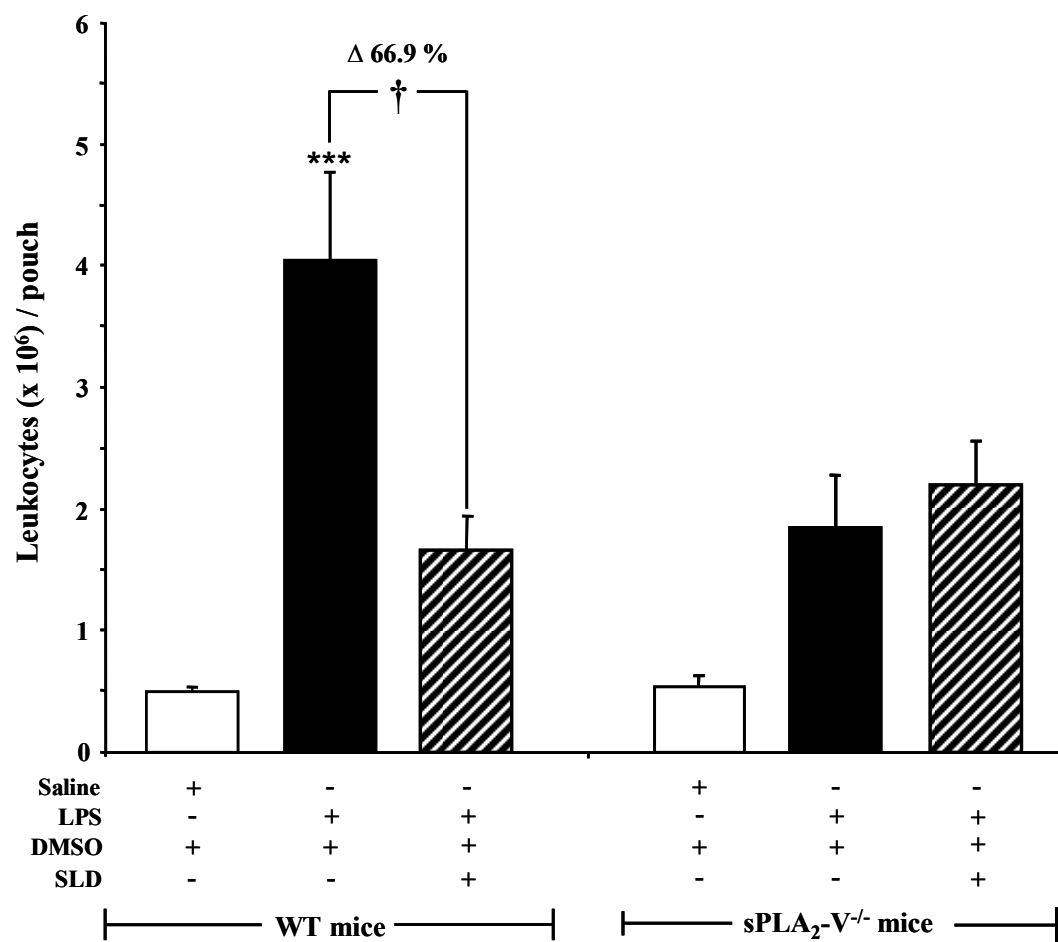


Figure 4

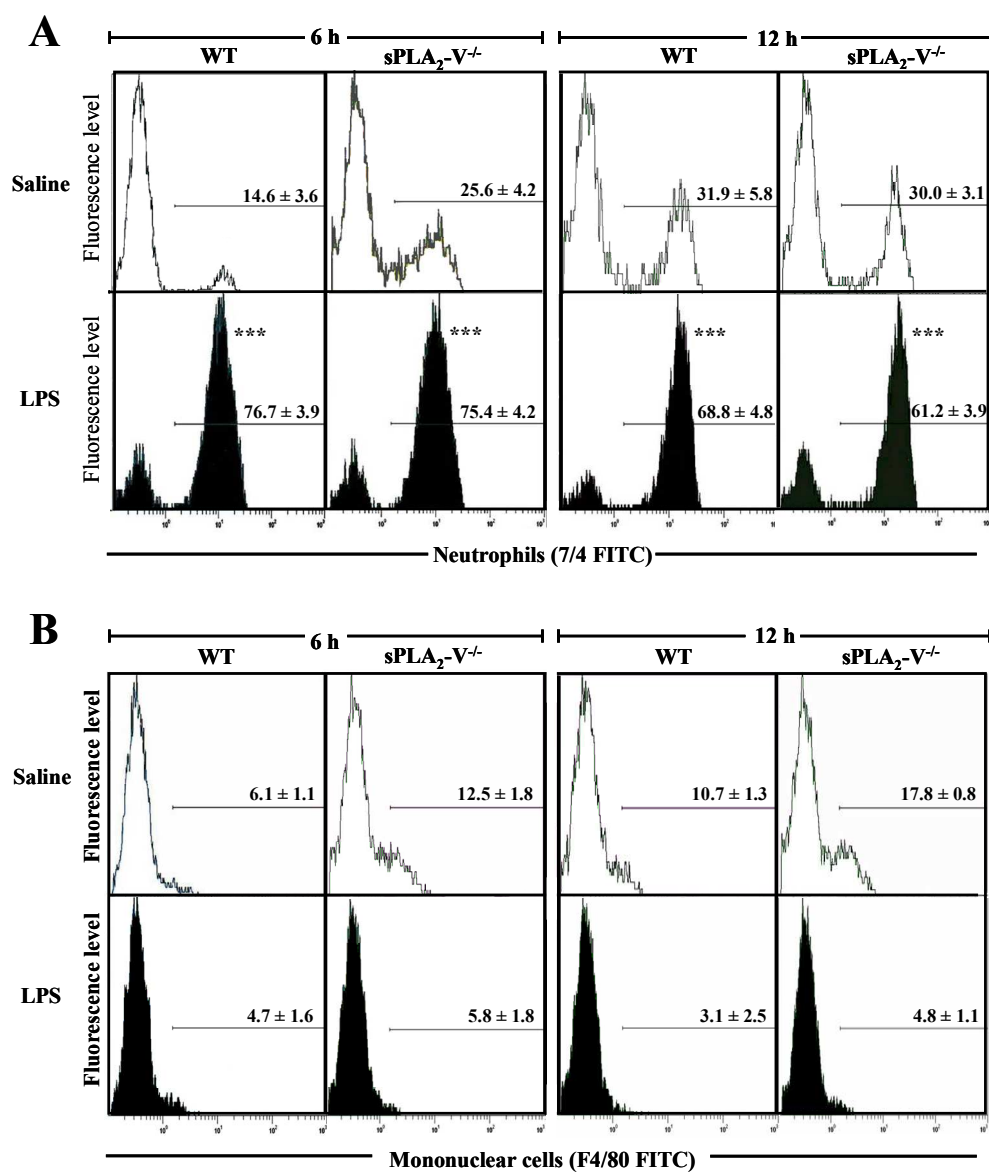
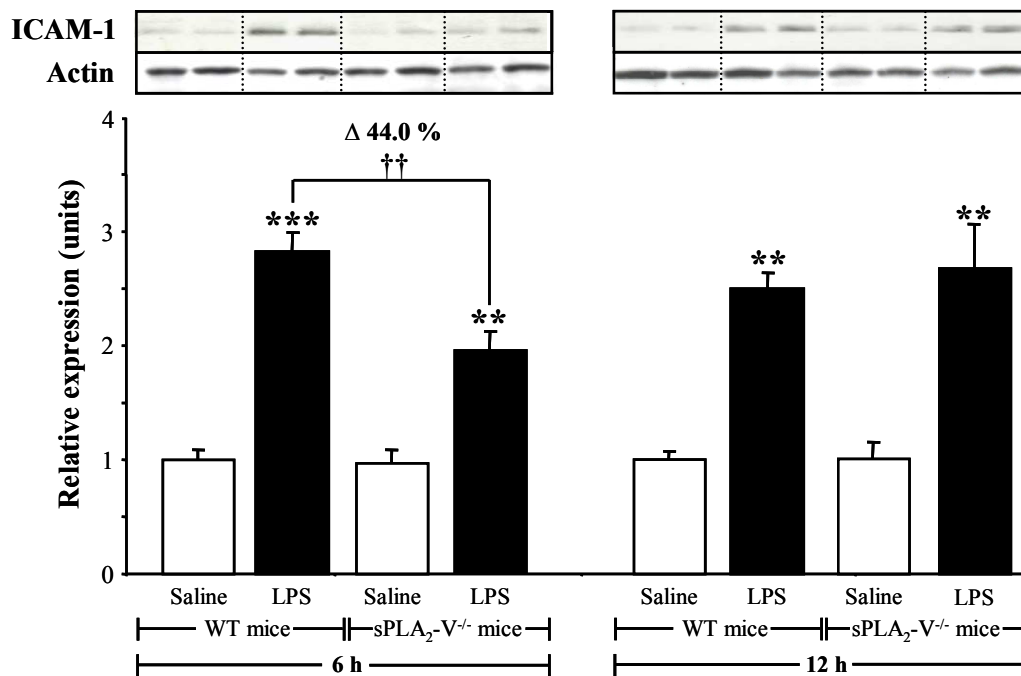
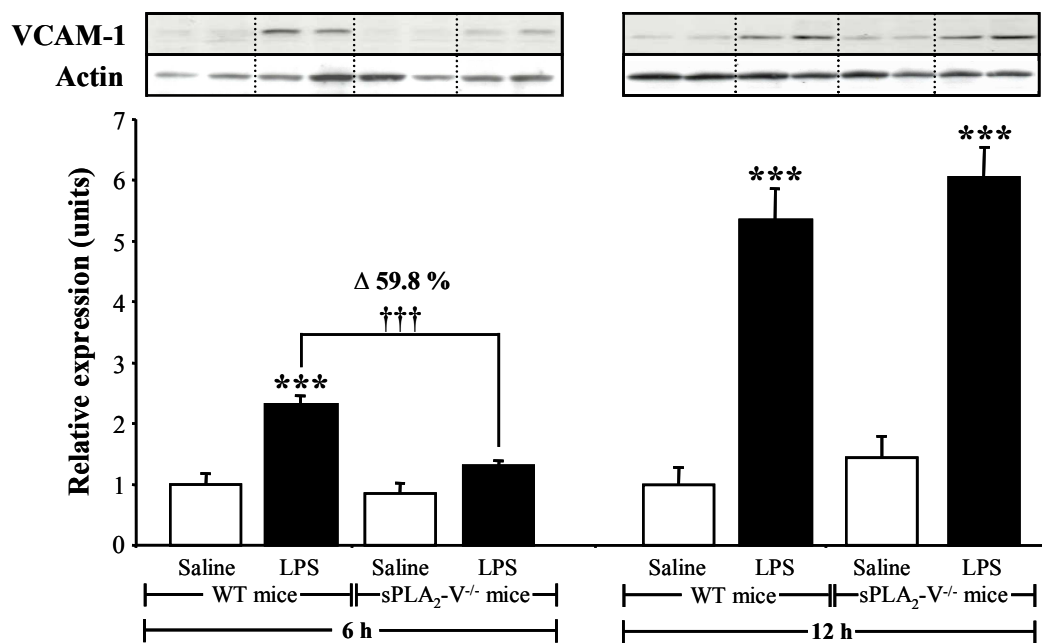


Figure 5

A



B



3.0 DISCUSSION

Dans la présente étude nous avons observé que l'administration de LPS dans le modèle murin de la poche d'air sous-cutanée entraîne un appel leucocytaire important, principalement constitué de neutrophiles polymorphonucléaires, ainsi qu'une surexpression des molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1. Nous avons également constaté que ces différentes étapes du processus inflammatoire étaient significativement réduites chez les souris *sPLA₂-V^{-/-}* comparativement aux souris WT soumises au même traitement. Il semble donc que la *sPLA₂-V* joue un rôle essentiel dans le développement d'une réponse inflammatoire innée et ce en partie grâce à son implication dans la régulation des molécules d'adhérence vasculaire.

3.1 Rôle de la *sPLA₂-V* dans le recrutement leucocytaire

Le recrutement de leucocytes au niveau des tissus enflammés est essentiel à la réponse inflammatoire. Cela permet un nettoyage du foyer lésionnel et par le fait même une réparation tissulaire adéquate. C'est dans cette optique que nous nous sommes donc intéressés au rôle de la *sPLA₂-V* dans le recrutement leucocytaire. Parmi les dix isoformes de *sPLA₂* (*sPLA₂-IB*, *-IIA*, *-IIC*, *-IID*, *-IIE*, *-IIF*, *-V*, *-X* et *-XII*) connues chez les mammifères, la *sPLA₂-IIA* fut la première associée au processus inflammatoire. Elle fut isolée à partir du liquide synovial de patients souffrant d'arthrite [133] et par la suite retrouvée en quantité importante dans d'autres pathologies inflammatoires. Les propriétés pro-inflammatoires de la *sPLA₂-IIA* ont été mises en évidence par de nombreuses études grâce à l'utilisation d'inhibiteurs et d'anticorps bloquants dirigés contre cette dernière. Durant de nombreuses années, les recherches sur le rôle des *sPLA₂* dans l'inflammation se sont principalement concentrées sur la *sPLA₂-IIA*. Toutefois, la découverte de nouvelles

isoformes de sPLA₂ possédant des caractéristiques structurales et enzymatiques similaires à celles de la sPLA₂-IIA a permis de soulever l'hypothèse voulant que d'autres isoformes de sPLA₂ soient impliquées dans l'inflammation. Ceci fut renforcé par la découverte de certaines souches de souris présentant une réponse inflammatoire appropriée mais ne possédant pas le gène codant pour la sPLA₂-IIA [153]. De plus, de nouvelles études ont démontré que les inhibiteurs et anticorps bloquants, initialement considérés comme spécifiques pour la sPLA₂-IIA, réduisent aussi de manière considérable les activités biologiques de la sPLA₂-V [248, 249]. À la suite de ces observations, de nombreux chercheurs se sont affairés à la production d'inhibiteurs spécifiques pour certaines isoformes de sPLA₂. Malheureusement, il n'y a encore aujourd'hui aucun inhibiteur spécifique à une seule sPLA₂. L'accessibilité à certaines souris transgéniques demeure donc la meilleure façon d'investiguer les fonctions individuelles de chacune des sPLA₂.

Les souris C57/BL6 génétiquement modifiées n'exprimant pas la sPLA₂-V (sPLA₂-V^{-/-}) offrent donc la possibilité d'élucider les fonctions spécifiques de la sPLA₂-V endogène tout en écartant la contribution potentielle de la sPLA₂-IIA, qui n'est naturellement pas exprimée dans cette souche de souris [153]. Cela est d'autant plus important, puisque la sPLA₂-V et la sPLA₂-IIA ont longtemps été considérées comme fonctionnellement redondantes. De récentes études utilisant les souris sPLA₂-V^{-/-} ont permis de démontrer l'implication de la sPLA₂-V dans l'exsudation plasmatique et la biosynthèse d'écosanoïdes (PGE₂ et LTC₄) induites par le zymosan [147]. De plus, il a également été établi que la sPLA₂-V joue un rôle important dans la migration d'éosinophiles lors d'hyperréactivité des voies respiratoires en condition allergique [194]. À la lumière de ces informations, nous avons donc voulu vérifier l'implication de la sPLA₂-V dans la migration de d'autres types de leucocytes et ce, suite à un traitement au LPS, un puissant agent pro-inflammatoire. Ce dernier fut choisi parmi un vaste choix de médiateurs pro-

inflammatoires puisqu'il induit l'expression de plusieurs isoformes de sPLA₂, mais de manière prédominante, celle de la sPLA₂-V.

Dans cette étude, nous avons observé que l'administration de LPS dans la poche d'air sous-cutanée de souris WT et sPLA₂-V^{-/-} cause un recrutement leucocytaire maximal après 6 h de traitement. Ces résultats coïncident avec des études de cinétique antérieures ayant démontré un recrutement leucocytaire maximal 6 h après l'injection de LPS dans la poche d'air de souris ainsi qu'une résolution complète après 24 h [250, 251]. De plus, nous avons également constaté que l'appel de cellules inflammatoires occasionné par un traitement au LPS est significativement atténué chez les souris sPLA₂-V^{-/-} comparativement aux souris témoins (WT). Il est possible que la réduction du recrutement leucocytaire chez les souris sPLA₂-V^{-/-} soit attribuable à une synthèse restreinte de médiateurs lipidiques chimiotactiques chez ces dernières. Cette hypothèse est appuyée par l'étude de Gambero *et coll.* qui a établi que l'effet chimiotactique des sPLA₂ sur les neutrophiles humains se fait principalement via la relâche de leucotriène B₄ (LTB₄) et de PAF [178]. De plus, il a été démontré que la sPLA₂-V est associée à la synthèse de LTB₄ dans les neutrophiles [252] et de PAF dans les cellules endothéliales [149]. Par conséquent, afin de vérifier si la réduction du recrutement leucocytaire observée chez les souris sPLA₂-V^{-/-} est bel et bien due à une synthèse diminuée de LTB₄ et de PAF, il aurait été intéressant de mesurer la quantité précise de ces médiateurs chimiotactiques contenus dans les exsudats recueillis dans les poches d'air de souris sPLA₂-V^{-/-} et de leurs contrôles WT. Nous aurions également pu utiliser un antagoniste du PAF tel que le nouveau LAU-0901, afin de déterminer de manière plus précise la contribution de ce dernier [253]. De plus, il aurait également été intéressant d'isoler et de mettre en culture des cellules endothéliales d'aorte de souris WT et sPLA₂-V^{-/-} afin de quantifier par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) la relâche de PAF induite par une stimulation au LPS.

Une autre cause possible de la diminution du recrutement leucocytaire chez les souris $sPLA_2-V^{-/-}$ est la réduction de la synthèse d'autres agents chimiotactiques comprenant entre autres plusieurs membres de la famille des cytokines. Ces dernières sont des molécules importantes au développement et au maintien d'une réponse inflammatoire. Parmi les cytokines on retrouve un sous-groupe de molécules; les chimiokines. Ces molécules sont toutes en mesure d'induire une migration cellulaire selon un gradient de concentration. Il a récemment été démontré que la stimulation de macrophages humains par la $sPLA_2$ -IIA et la $sPLA_2$ -IB entraîne la production de TNF- α , IL-6 et IL-10 (cytokines), ainsi que de CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP- 1 α), CCL4 (MIP- 1 β) et CXCL8 (IL-8) (chimiokines) [186, 254]. Les résultats de cette étude s'avèrent donc intéressants dans le contexte de notre travail de recherche, puisque cela met en évidence la contribution de certaines $sPLA_2$ dans la synthèse et relâche de médiateurs chimiotactiques. Il nous est donc possible de croire que la $sPLA_2$ -V est impliquée dans la synthèse de chimiokines et cela expliquerait, du moins en partie, l'effet positif de cette enzyme sur le recrutement leucocytaire. Afin de confirmer cette hypothèse, nous effectuons présentement dans le laboratoire des analyses par ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) du contenu en chimiokines de chacun des exsudats collectés dans les poches d'air de souris WT et $sPLA_2-V^{-/-}$ traitées au LPS ou au salin. De plus, il serait également bon de vérifier plus directement l'implication de ces chimiokines dans le recrutement leucocytaire dans notre modèle et ce, en administrant des anticorps spécifiques contre ces dernières.

Malgré le fait que la migration leucocytaire soit diminuée chez les souris $sPLA_2-V^{-/-}$ comparativement aux souris WT, un traitement de 6 h au LPS entraîne tout de même un recrutement significatif de leucocytes par rapport au traitement témoin (salin). De ce fait, nous avons administré aux souris un inhibiteur non spécifique des $sPLA_2$ du groupe II (IIA, IIC, IID, IIE, IIF et V), le SLD, afin de déterminer la contribution potentielle des autres isoformes de $sPLA_2$ dans l'appel de cellules inflammatoires. Nous avons choisi de

travailler avec le SLD puisqu'il s'agit d'un des seuls inhibiteurs de sPLA₂ capable de franchir la paroi cellulaire. Toutefois, dans le but d'éviter l'inhibition non-spécifique de l'activité de la phospholipase A₂ cytosolique (cPLA₂), le SLD fut administré à une concentration finale de 10 µM [255, 256]. Nous avons observé que l'administration combinée de SLD et de LPS chez les souris WT entraîne une réduction du recrutement leucocytaire similaire à celle observable chez les souris sPLA₂-V^{-/-} traitées au LPS seul. De plus, l'injection de SLD chez les souris sPLA₂-V^{-/-} traitées au LPS, n'inhibe pas davantage la migration de leucocytes. Ces données suggèrent que les sPLA₂-IIA, -IIC, -IID, -IIE et -IIF ne sont pas impliquées dans le recrutement de cellules inflammatoires induit par le LPS et que la sPLA₂-V est la principale isoforme de sPLA₂ impliquée dans ce phénomène. Ces résultats abondent dans le même sens que l'étude de Paya *et coll.* qui a démontré la capacité du SLD à prévenir la migration leucocytaire induite par le zymosan dans le modèle de la poche d'air sous-cutanée chez le rat [176]. Cependant, nos résultats ne nous permettent pas d'éliminer la contribution potentielle des sPLA₂-X et XII, de la cPLA₂ (IV), ainsi que de la PLA₂ indépendante du calcium (iPLA₂; VI) dans le recrutement leucocytaire. Il demeure toutefois peu probable que la sPLA₂-X soit impliquée puisqu'il a récemment été démontré que sa surexpression dans les macrophages entraînait une diminution de leur activation en plus d'activer la réponse anti-inflammatoire [145]. De plus, il semble également peu probable que les iPLA₂ soient associées au recrutement leucocytaire, puisque de nombreuses études montrent que ces enzymes interviennent principalement dans l'homéostasie des membranes cellulaires. Sachant que la sPLA₂-V amplifie l'action de la cPLA₂ en lui fournissant l'AA nécessaire à la production d'écosanoïdes [255, 256], il est raisonnable de croire que la cPLA₂ et ses médiateurs lipidiques puissent contribuer à la migration résiduelle observée chez les souris sPLA₂-V^{-/-} traitées au LPS. Cette hypothèse pourrait être vérifiée grâce à l'administration d'un inhibiteur spécifique de la cPLA₂ dans la poche d'air de

souris sPLA₂-V^{-/-} et de souris WT traitées au LPS et l'analyse de son effet sur le recrutement leucocytaire.

3.2 Rôle de la sPLA₂-V sur les sous-populations de leucocytes

Nos premières études ont permis de démontrer qu'il y avait une différence significative dans le nombre de leucocytes recrutés chez les souris sPLA₂-V^{-/-} comparativement aux souris WT. Sachant qu'il existe plusieurs types de leucocytes, nous avons donc voulu déterminer quelles étaient les sous-populations leucocytaires rencontrées dans notre modèle inflammatoire de la poche d'air sous-cutanée. Parmi les différentes sous-populations de leucocytes, on retrouve entre autre des granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles) ainsi que des cellules mononuclées (lymphocytes, mastocytes et macrophages). Dans notre étude, nous avons observé que l'administration de LPS entraîne un recrutement leucocytaire majoritairement constitué de neutrophiles et ce, tant chez les souris WT que chez les souris sPLA₂-V^{-/-}. Ceci n'est pas surprenant puisque les neutrophiles à eux seuls représentent 50 à 70% des cellules inflammatoires circulantes, en plus d'être les premiers à migrer au niveau du foyer inflammatoire. De plus, nos résultats vont de pair avec certaines études antérieures ayant démontré que l'administration de LPS dans le modèle de la poche d'air sous-cutanée cause l'attraction de plusieurs millions de cellules, dont la majorité sont des neutrophiles [251, 257, 258]. La différence entre nos deux groupes expérimentaux (souris sPLA₂-V^{-/-} et WT) repose donc uniquement sur le nombre et non sur le type de cellules inflammatoires recrutées.

Le nombre total de leucocytes accumulés au site inflammatoire (LPS) demeure constant de 6 à 12 h chez les souris WT, mais retourne aux valeurs de base à 12 h chez les souris sPLA₂-V^{-/-}. Nous avons donc supposé que ce phénomène était attribuable à une augmentation du nombre de cellules phagocytaires chez les souris sPLA₂-V^{-/-}. Ces cellules ont la capacité d'éliminer les agents pathogènes, mais également de détruire les cellules apoptotiques. Les neutrophiles ayant donc enclenché leur processus de mort cellulaire seraient éliminés plus rapidement et ne s'accumuleraient pas au site inflammatoire. Nos résultats montrent que le pourcentage de monocytes / macrophages ne diffère pas significativement chez les souris sPLA₂-V^{-/-} comparativement aux souris WT et ce, peu importe le traitement (LPS ou salin). Cette hypothèse voulant que la diminution plus rapide du nombre de leucocytes chez les souris sPLA₂-V^{-/-} soit attribuable à une augmentation de la phagocytose fut également infirmée par une récente étude. Cette dernière démontra une réduction de 50% de la capacité phagocytaire chez les macrophages de souris sPLA₂-V^{-/-} comparativement aux macrophages de souris WT [193].

Dans un autre ordre d'idée, il a été établi que certaines isoformes de sPLA₂ protègent les cellules mastocytaires contre l'apoptose [174], tandis que les inhibiteurs de sPLA₂ l'induisent [173]. Ces observations fournissent donc une explication potentielle en ce qui a trait à la réduction du nombre de leucocytes accumulés au site inflammatoire chez les souris sPLA₂-V^{-/-} comparativement aux souris WT, après 12h de traitement au LPS. Pour vérifier cette hypothèse il aurait été intéressant de quantifier les cellules apoptotiques recueillies dans les poches d'air de souris WT et sPLA₂-V^{-/-}. Pour ce faire, la meilleure technique à utiliser dans notre modèle aurait été de procéder à un double marquage des leucocytes avec l'annexine V (marqueur d'apoptose précoce) et iodure de propidium (marqueur de nécrose et d'apoptose tardive) suivi d'une analyse par FACS.

3.3 Rôle de la sPLA₂-V sur l'expression de ICAM-1 et VCAM-1

Ayant démontré que la sPLA₂-V est impliquée dans le recrutement de leucocytes, nous nous sommes donc intéressés aux mécanismes par lesquels cette enzyme entraîne cet appel de cellules inflammatoires. Le recrutement leucocytaire est minutieusement régulé et requiert la participation de plusieurs molécules d'adhérence exprimées à la surface des cellules endothéliales et des leucocytes. Une étude récente a démontré que la stimulation de cellules endothéliales de la microcirculation pulmonaire (LMVEC) par le LPS induit l'expression de ICAM-1 et que cette surexpression est encore plus importante lorsque le LPS est combiné avec la sPLA₂-IIA ou sPLA₂-IB [179]. Il a également été démontré que l'expression de ICAM-1 induite par le TNF- α , à la surface membranaire de kératinocytes en culture, est réduite de manière importante par un traitement avec des inhibiteurs de sPLA₂; soit le SLD ou le LY311727 [259]. De ce fait, nous nous sommes intéressés à l'implication potentielle de la sPLA₂-V dans l'induction des molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1. Ces molécules d'adhérence permettent l'attachement initial, l'adhésion et la migration des leucocytes activés à travers l'endothélium soutenant ainsi le recrutement leucocytaire aux sites d'inflammation. Nos résultats montrent que l'injection de LPS dans la poche d'air sous-cutanée de souris WT entraîne une augmentation de l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 au niveau de la peau formant la poche. Ces observations viennent appuyer certaines études antérieures ayant démontré la capacité du LPS à promouvoir l'expression de molécules d'adhérence et ce via l'activation du facteur de transcription NF- κ B [260].

Nous avons aussi constaté une réduction marquée de l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 chez les souris sPLA₂-V^{-/-}, comparativement aux souris WT, à la suite d'un traitement de 6 h au LPS. Cette différence n'est cependant plus observable après 12 h de traitement, suggérant ainsi que l'absence de

sPLA₂-V retarde l'expression de ICAM-1 et VCAM-1. Ces résultats laissent supposer que la sPLA₂-V est impliquée dans la phase précoce d'induction de ICAM-1 et VCAM-1 et que par la suite, il y a activation de d'autres voies de signalisation, indépendantes de la sPLA₂-V, nécessaires au support de la phase tardive d'expression de ces molécules d'adhérence. Nos résultats proposent également que la phase précoce d'expression de ICAM-1 et VCAM-1 est importante pour le recrutement de leucocytes dans les poches d'air de souris traitées au LPS, mais que l'expression tardive n'a, quant à elle, aucun effet sur l'appel leucocytaire chez les souris sPLA₂-V^{-/-}. Afin de confirmer davantage l'implication de ces molécules d'adhérence sur le recrutement de cellules inflammatoires nous aurions pu administrer des anticorps bloquants dirigés spécifiquement contre ICAM-1 et VCAM-1 en combinaison avec le LPS et quantifier par la suite le total de leucocytes recueillis dans les poches d'air de souris sPLA₂-V^{-/-} et WT. Il a récemment été démontré que l'administration exogène de sPLA₂-V cause une surexpression de CD11b (intégrine de la famille β₂) à la surface des éosinophiles et ainsi la fixation de cette intégrine à son contre-récepteur ICAM-1 [181]. Sachant cela, il aurait été également intéressant de vérifier les niveaux d'expression de MAC-1 (CD11b/CD18) à la surface des leucocytes recrutés dans les poches d'air de souris WT et sPLA₂-V^{-/-} avec et sans traitement au LPS.

4.0 CONCLUSION

En somme, nous avons établi que la sPLA₂-V est essentielle au recrutement de neutrophiles induits par le LPS, en plus d'être impliquée dans l'expression précoce des molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1. L'utilisation combinée d'un inhibiteur non spécifique des sPLA₂ et de souris transgéniques n'exprimant pas la sPLA₂-V, nous a également permis de nous assurer que les effets observés sont bel et bien attribuables à la sPLA₂-V et non à d'autres sPLA₂ du groupe II (-IIA, -IIC, -IID, -IIE et -IIF). L'ensemble de ces résultats met donc en évidence l'activité pro-inflammatoire spécifique de la sPLA₂-V endogène ainsi que son implication dans la réponse immunitaire innée.

Cette étude est l'une des premières à clarifier le rôle spécifique de la sPLA₂-V dans l'inflammation. De toute évidence, une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels cette enzyme contribue au processus inflammatoire est primordiale, puisque la sPLA₂-V est étroitement associée à plusieurs pathologies inflammatoires. De ce fait, il serait intéressant de vérifier, plus spécifiquement, l'implication de la sPLA₂-V dans la régulation de l'expression des molécules d'adhérence leucocytaires, ainsi que son influence sur la perméabilité vasculaire (œdème). De plus, il est bien établi que la réponse inflammatoire et la réponse angiogénique agissent de concert dans une grande variété de maladies inflammatoires. Puisque nous avons démontré que la sPLA₂-V joue un rôle clé dans le recrutement leucocytaire, et sachant que cette enzyme participe à la synthèse de PAF, un médiateur direct du processus angiogénique, il serait donc intéressant de vérifier l'implication de la sPLA₂-V dans le processus angiogénique. L'ensemble de ces recherches contribuerait donc au développement de meilleures approches thérapeutiques en ce qui a trait aux maladies inflammatoires chroniques.

5.0 BIBLIOGRAPHIE

1. Kobayashi, S.D., Voyich, J.M., DeLeo, F.R. (2003) Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* **5**, 1337-44.
2. Trivedi, S.G., Lloyd, C.M. (2007) Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cell Mol Life Sci* **64**, 1269-89.
3. Gibbs, B.F. (2005) Human basophils as effectors and immunomodulators of allergic inflammation and innate immunity. *Clin Exp Med* **5**, 43-9.
4. van Furth, R., Cohn, Z.A. (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* **128**, 415-35.
5. Hume, D.A. (2006) The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol* **18**, 49-53.
6. Larosa, D.F., Orange, J.S. (2008) 1. Lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* **121**, S364-9; quiz S412.
7. Libby, P. (2007) Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* **65**, S140-6.
8. Lentsch, A.B., Ward, P.A. (2000) Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol* **190**, 343-8.
9. Min, W., Pober, J.S. (1997) TNF initiates E-selectin transcription in human endothelial cells through parallel TRAF-NF-kappa B and TRAF-RAC/CDC42-JNK-c-Jun/ATF2 pathways. *J Immunol* **159**, 3508-18.
10. Pober, J.S., Lapierre, L.A., Stolpen, A.H., Brock, T.A., Springer, T.A., Fiers, W., Bevilacqua, M.P., Mendrick, D.L., Gimbrone, M.A., Jr. (1987) Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *J Immunol* **138**, 3319-24.
11. Stenberg, P.E., McEver, R.P., Shuman, M.A., Jacques, Y.V., Bainton, D.F. (1985) A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* **101**, 880-6.

12. Bonfanti, R., Furie, B.C., Furie, B., Wagner, D.D. (1989) PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* **73**, 1109-12.
13. Hattori, R., Hamilton, K.K., Fugate, R.D., McEver, R.P., Sims, P.J. (1989) Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* **264**, 7768-71.
14. Hartwell, D.W., Mayadas, T.N., Berger, G., Frenette, P.S., Rayburn, H., Hynes, R.O., Wagner, D.D. (1998) Role of P-selectin cytoplasmic domain in granular targeting in vivo and in early inflammatory responses. *J Cell Biol* **143**, 1129-41.
15. Kishimoto, T.K., Jutila, M.A., Berg, E.L., Butcher, E.C. (1989) Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* **245**, 1238-41.
16. Diaz-Gonzalez, F., Gonzalez-Alvaro, I., Campanero, M.R., Mollinedo, F., del Pozo, M.A., Munoz, C., Pivel, J.P., Sanchez-Madrid, F. (1995) Prevention of in vitro neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Clin Invest* **95**, 1756-65.
17. Tedder, T.F., Penta, A.C., Levine, H.B., Freedman, A.S. (1990) Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens. *J Immunol* **144**, 532-40.
18. Moore, K.L., Stults, N.L., Diaz, S., Smith, D.F., Cummings, R.D., Varki, A., McEver, R.P. (1992) Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol* **118**, 445-56.
19. Sako, D., Chang, X.J., Barone, K.M., Vachino, G., White, H.M., Shaw, G., Veldman, G.M., Bean, K.M., Ahern, T.J., Furie, B., et al. (1993) Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* **75**, 1179-86.

20. Steegmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H.P., Kleuser, B., Vestweber, D. (1995) The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* **373**, 615-20.
21. Gallatin, W.M., Weissman, I.L., Butcher, E.C. (1983) A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* **304**, 30-4.
22. Kikuta, A., Rosen, S.D. (1994) Localization of ligands for L-selectin in mouse peripheral lymph node high endothelial cells by colloidal gold conjugates. *Blood* **84**, 3766-75.
23. Humphries, M.J. (2000) Integrin structure. *Biochem Soc Trans* **28**, 311-39.
24. Arnaout, M.A., Goodman, S.L., Xiong, J.P. (2007) Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 495-507.
25. Turner, D.C., Flier, L.A., Carbonetto, S. (1989) Identification of a cell-surface protein involved in PC12 cell-substratum adhesion and neurite outgrowth on laminin and collagen. *J Neurosci* **9**, 3287-96.
26. Santoro, S.A., Zutter, M.M. (1995) The alpha 2 beta 1 integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost* **74**, 813-21.
27. Dickeson, S.K., Mathis, N.L., Rahman, M., Bergelson, J.M., Santoro, S.A. (1999) Determinants of ligand binding specificity of the alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins. *J Biol Chem* **274**, 32182-91.
28. Diamond, M.S., Springer, T.A. (1994) The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol* **4**, 506-17.
29. Lynn, W.A., Raetz, C.R., Qureshi, N., Golenbock, D.T. (1991) Lipopolysaccharide-induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils. Evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid A-based antagonists. *J Immunol* **147**, 3072-9.

30. Takami, M., Terry, V., Petruzzelli, L. (2002) Signaling pathways involved in IL-8-dependent activation of adhesion through Mac-1. *J Immunol* **168**, 4559-66.
31. Etzioni, A. (2007) Leukocyte adhesion deficiencies: molecular basis, clinical findings, and therapeutic options. *Adv Exp Med Biol* **601**, 51-60.
32. Rothlein, R., Dustin, M.L., Marlin, S.D., Springer, T.A. (1986) A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* **137**, 1270-4.
33. Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A., Springer, T.A. (1986) Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* **137**, 245-54.
34. Pober, J.S., Bevilacqua, M.P., Mendrick, D.L., Lapierre, L.A., Fiers, W., Gimbrone, M.A., Jr. (1986) Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J Immunol* **136**, 1680-7.
35. Pober, J.S., Gimbrone, M.A., Jr., Lapierre, L.A., Mendrick, D.L., Fiers, W., Rothlein, R., Springer, T.A. (1986) Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* **137**, 1893-6.
36. Siegel, G., Malmsten, M. (1997) The role of the endothelium in inflammation and tumor metastasis. *Int J Microcirc Clin Exp* **17**, 257-72.
37. Smith, C.W. (1993) Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* **71**, 76-87.
38. Staunton, D.E., Dustin, M.L., Springer, T.A. (1989) Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* **339**, 61-4.

39. de Fougerolles, A.R., Stacker, S.A., Schwarting, R., Springer, T.A. (1991) Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med* **174**, 253-67.
40. McLaughlin, F., Hayes, B.P., Horgan, C.M., Beesley, J.E., Campbell, C.J., Randi, A.M. (1998) Tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interleukin (IL)-1beta down-regulate intercellular adhesion molecule (ICAM)-2 expression on the endothelium. *Cell Adhes Commun* **6**, 381-400.
41. Shattil, S.J., Ginsberg, M.H. (1997) Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* **100**, 1-5.
42. Newman, P.J. (1997) The biology of PECAM-1. *J Clin Invest* **100**, S25-9.
43. Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X., Phillips, D.M. (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* **178**, 449-60.
44. Liao, F., Huynh, H.K., Eiroa, A., Greene, T., Polizzi, E., Muller, W.A. (1995) Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J Exp Med* **182**, 1337-43.
45. Nakada, M.T., Amin, K., Christofidou-Solomidou, M., O'Brien, C.D., Sun, J., Gurubhagavatula, I., Heavner, G.A., Taylor, A.H., Paddock, C., Sun, Q.H., Zehnder, J.L., Newman, P.J., Albelda, S.M., DeLisser, H.M. (2000) Antibodies against the first Ig-like domain of human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) that inhibit PECAM-1-dependent homophilic adhesion block in vivo neutrophil recruitment. *J Immunol* **164**, 452-62.
46. Gouwy, M., Struyf, S., Proost, P., Van Damme, J. (2005) Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**, 561-80.

47. Dinarello, C.A. (2002) The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* **20**, S1-13.
48. Roth, J., De Souza, G.E. (2001) Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. *Braz J Med Biol Res* **34**, 301-14.
49. Collart, M.A., Belin, D., Vassalli, J.D., de Kossodo, S., Vassalli, P. (1986) Gamma interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin 1, and urokinase genes, which are controlled by short-lived repressors. *J Exp Med* **164**, 2113-8.
50. Chomarat, P., Rissoan, M.C., Banchereau, J., Miossec, P. (1993) Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J Exp Med* **177**, 523-7.
51. Donnelly, R.P., Freeman, S.L., Hayes, M.P. (1995) Inhibition of IL-10 expression by IFN-gamma up-regulates transcription of TNF-alpha in human monocytes. *J Immunol* **155**, 1420-7.
52. Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., Kohler, G. (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* **368**, 339-42.
53. Baggiolini, M., Walz, A., Kunkel, S.L. (1989) Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J Clin Invest* **84**, 1045-9.
54. Takashiba, S., Takigawa, M., Takahashi, K., Myokai, F., Nishimura, F., Chihara, T., Kurihara, H., Nomura, Y., Murayama, Y. (1992) Interleukin-8 is a major neutrophil chemotactic factor derived from cultured human gingival fibroblasts stimulated with interleukin-1 beta or tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* **60**, 5253-8.
55. Bickel, M. (1993) The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J Periodontol* **64**, 456-60.
56. Baggiolini, M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* **392**, 565-8.

57. Mackay, C.R. (2001) Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* **2**, 95-101.
58. Butcher, E.C., Picker, L.J. (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* **272**, 60-6.
59. Murphy, P.M. (1994) The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* **12**, 593-633.
60. Schall, T.J., Bacon, K., Toy, K.J., Goeddel, D.V. (1990) Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* **347**, 669-71.
61. Brieland, J.K., Jones, M.L., Clarke, S.J., Baker, J.B., Warren, J.S., Fantone, J.C. (1992) Effect of acute inflammatory lung injury on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in rat pulmonary alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* **7**, 134-9.
62. Wang, J.M., Sherry, B., Fivash, M.J., Kelvin, D.J., Oppenheim, J.J. (1993) Human recombinant macrophage inflammatory protein-1 alpha and -beta and monocyte chemoattractant and activating factor utilize common and unique receptors on human monocytes. *J Immunol* **150**, 3022-9.
63. Bischoff, S.C., Krieger, M., Brunner, T., Dahinden, C.A. (1992) Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med* **175**, 1271-5.
64. Fujisawa, T., Kato, Y., Nagase, H., Atsuta, J., Terada, A., Iguchi, K., Kamiya, H., Morita, Y., Kitaura, M., Kawasaki, H., Yoshie, O., Hirai, K. (2000) Chemokines induce eosinophil degranulation through CCR-3. *J Allergy Clin Immunol* **106**, 507-13.
65. Biffl, W.L., Moore, E.E., Moore, F.A., Carl, V.S., Franciose, R.J., Banerjee, A. (1995) Interleukin-8 increases endothelial permeability independent of neutrophils. *J Trauma* **39**, 98-102; discussion 102-3.
66. Fukumoto, T., Matsukawa, A., Yoshimura, T., Edamitsu, S., Ohkawara, S., Takagi, K., Yoshinaga, M. (1998) IL-8 is an essential mediator of

- the increased delayed-phase vascular permeability in LPS-induced rabbit pleurisy. *J Leukoc Biol* **63**, 584-90.
67. Samanta, A.K., Oppenheim, J.J., Matsushima, K. (1990) Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J Biol Chem* **265**, 183-9.
 68. Huber, A.R., Kunkel, S.L., Todd, R.F., 3rd, Weiss, S.J. (1991) Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* **254**, 99-102.
 69. Pan, Y., Lloyd, C., Zhou, H., Dolich, S., Deeds, J., Gonzalo, J.A., Vath, J., Gosselin, M., Ma, J., Dussault, B., Woolf, E., Alperin, G., Culpepper, J., Gutierrez-Ramos, J.C., Gearing, D. (1997) Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* **387**, 611-7.
 70. Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., Schall, T.J. (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385**, 640-4.
 71. Garton, K.J., Gough, P.J., Blobel, C.P., Murphy, G., Greaves, D.R., Dempsey, P.J., Raines, E.W. (2001) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* **276**, 37993-8001.
 72. Chapman, G.A., Moores, K.E., Gohil, J., Berkhout, T.A., Patel, L., Green, P., Macphee, C.H., Stewart, B.R. (2000) The role of fractalkine in the recruitment of monocytes to the endothelium. *Eur J Pharmacol* **392**, 189-95.
 73. Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J., et al. (1994) Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* **266**, 1395-9.
 74. Kennedy, J., Kelner, G.S., Kleyensteuber, S., Schall, T.J., Weiss, M.C., Yssel, H., Schneider, P.V., Cocks, B.G., Bacon, K.B., Zlotnik, A. (1995)

- Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol* **155**, 203-9.
75. Sharma, J.N., Yusof, A.P. (1998) Pro-inflammatory properties of the kallikrein-kinin system: Potential for new drug therapy. *Inflammopharmacology* **6**, 289-96.
76. Stecher, V.J., Sorkin, E. (1972) The chemotactic activity of fibrin lysis products. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **43**, 879-86.
77. Skogen, W.F., Senior, R.M., Griffin, G.L., Wilner, G.D. (1988) Fibrinogen-derived peptide B beta 1-42 is a multidomained neutrophil chemoattractant. *Blood* **71**, 1475-9.
78. Markiewski, M.M., Lambris, J.D. (2007) The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol* **171**, 715-27.
79. DiScipio, R.G., Daffern, P.J., Jagels, M.A., Broide, D.H., Sriramarao, P. (1999) A comparison of C3a and C5a-mediated stable adhesion of rolling eosinophils in postcapillary venules and transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Immunol* **162**, 1127-36.
80. Hsu, M.H., Wang, M., Browning, D.D., Mukaida, N., Ye, R.D. (1999) NF-kappaB activation is required for C5a-induced interleukin-8 gene expression in mononuclear cells. *Blood* **93**, 3241-9.
81. Venkatesha, R.T., Berla Thangam, E., Zaidi, A.K., Ali, H. (2005) Distinct regulation of C3a-induced MCP-1/CCL2 and RANTES/CCL5 production in human mast cells by extracellular signal regulated kinase and PI3 kinase. *Mol Immunol* **42**, 581-7.
82. Sirois, M.G., Jancar, S., Braquet, P., Plante, G.E., Sirois, P. (1988) PAF increases vascular permeability in selected tissues: effect of BN-52021 and L-655,240. *Prostaglandins* **36**, 631-44.
83. Brkovic, A., Sirois, M.G. (2007) Vascular permeability induced by VEGF family members in vivo: role of endogenous PAF and NO synthesis. *J Cell Biochem* **100**, 727-37.

84. Okuda, Y., Tsuyuguchi, I., Yamatodani, A. (1988) Histamine release from human leukocytes by platelet-activating factor. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **85**, 341-5.
85. Zoratti, E.M., Sedgwick, J.B., Vrtis, R.R., Busse, W.W. (1991) The effect of platelet-activating factor on the generation of superoxide anion in human eosinophils and neutrophils. *J Allergy Clin Immunol* **88**, 749-58.
86. Nilsson, G., Metcalfe, D.D., Taub, D.D. (2000) Demonstration that platelet-activating factor is capable of activating mast cells and inducing a chemotactic response. *Immunology* **99**, 314-9.
87. Thivierge, M., Rola-Pleszczynski, M. (1992) Platelet-activating factor enhances interleukin-6 production by alveolar macrophages. *J Allergy Clin Immunol* **90**, 796-802.
88. Huang, Y.H., Schafer-Elinder, L., Owman, H., Lorentzen, J.C., Ronnelid, J., Frostegard, J. (1996) Induction of IL-4 by platelet-activating factor. *Clin Exp Immunol* **106**, 143-8.
89. Bruynzeel, P.L., Koenderman, L., Kok, P.T., Hameling, M.L., Verhagen, J. (1986) Platelet-activating factor (PAF-acether) induced leukotriene C4 formation and luminol dependent chemiluminescence by human eosinophils. *Pharmacol Res Commun* **18 Suppl**, 61-9.
90. Shindo, K., Koide, K., Hirai, Y., Sumitomo, M., Fukumura, M. (1996) Priming effect of platelet activating factor on leukotriene C4 from stimulated eosinophils of asthmatic patients. *Thorax* **51**, 155-8.
91. Sneddon, A.A., McLeod, E., Wahle, K.W., Arthur, J.R. (2006) Cytokine-induced monocyte adhesion to endothelial cells involves platelet-activating factor: suppression by conjugated linoleic acid. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 793-801.
92. McMeekin, S.R., Dransfield, I., Rossi, A.G., Haslett, C., Walker, T.R. (2006) E-selectin permits communication between PAF receptors and TRPC channels in human neutrophils. *Blood* **107**, 4938-45.

93. Serhan, C.N., Hamberg, M., Samuelsson, B. (1984) Trihydroxytetraenes: a novel series of compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **118**, 943-9.
94. Claesson, H.E., Haeggstrom, J. (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.
95. Sjostrom, M., Jakobsson, P.J., Heimbürger, M., Palmblad, J., Haeggstrom, J.Z. (2001) Human umbilical vein endothelial cells generate leukotriene C₄ via microsomal glutathione S-transferase type 2 and express the CysLT(1) receptor. *Eur J Biochem* **268**, 2578-86.
96. Parish, W.E. (1967) Release of histamine and slow reacting substance with mast cell changes after challenge of human lung sensitized passively with reagin in vitro. *Nature* **215**, 738-9.
97. Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.V., Shipley, M.E., Smith, M.J. (1980) Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* **286**, 264-5.
98. Faccioli, L.H., Nourshargh, S., Moqbel, R., Williams, F.M., Sehmi, R., Kay, A.B., Williams, T.J. (1991) The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammatory mediators, in vivo. *Immunology* **73**, 222-7.
99. Goodarzi, K., Goodarzi, M., Tager, A.M., Luster, A.D., von Andrian, U.H. (2003) Leukotriene B₄ and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. *Nat Immunol* **4**, 965-73.
100. McCain, R.W., Holden, E.P., Blackwell, T.R., Christman, J.W. (1994) Leukotriene B₄ stimulates human polymorphonuclear leukocytes to synthesize and release interleukin-8 in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* **10**, 651-7.
101. Serhan, C.N., Maddox, J.F., Petasis, N.A., Akritopoulou-Zanze, I., Papayianni, A., Brady, H.R., Colgan, S.P., Madara, J.L. (1995) Design

- of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry* **34**, 14609-15.
102. Papayianni, A., Serhan, C.N., Brady, H.R. (1996) Lipoxin A4 and B4 inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells. *J Immunol* **156**, 2264-72.
 103. Maddox, J.F., Serhan, C.N. (1996) Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. *J Exp Med* **183**, 137-46.
 104. Godson, C., Mitchell, S., Harvey, K., Petasis, N.A., Hogg, N., Brady, H.R. (2000) Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol* **164**, 1663-7.
 105. Simon, L.S. (1999) Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med* **106**, 37S-42S.
 106. Parkington, H.C., Coleman, H.A., Tare, M. (2004) Prostacyclin and endothelium-dependent hyperpolarization. *Pharmacol Res* **49**, 509-14.
 107. Bunting, S., Gryglewski, R., Moncada, S., Vane, J.R. (1976) Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins* **12**, 897-913.
 108. Moncada, S., Vane, J.R. (1979) The role of prostacyclin in vascular tissue. *Fed Proc* **38**, 66-71.
 109. Huang, J.S., Ramamurthy, S.K., Lin, X., Le Breton, G.C. (2004) Cell signalling through thromboxane A2 receptors. *Cell Signal* **16**, 521-33.
 110. Pakala, R., Willerson, J.T., Benedict, C.R. (1997) Effect of serotonin, thromboxane A2, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* **96**, 2280-6.
 111. Larsen, G.L., Henson, P.M. (1983) Mediators of inflammation. *Annu Rev Immunol* **1**, 335-59.

112. Brown, W.J., Chambers, K., Doody, A. (2003) Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* **4**, 214-21.
113. Pickard, R.T., Striffler, B.A., Kramer, R.M., Sharp, J.D. (1999) Molecular cloning of two new human paralogs of 85-kDa cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* **274**, 8823-31.
114. Hazen, S.L., Loeb, L.A., Gross, R.W. (1991) Purification and characterization of cytosolic phospholipase A2 activities from canine myocardium and sheep platelets. *Methods Enzymol* **197**, 400-11.
115. Kim, D.K., Kudo, I., Inoue, K. (1991) Purification and characterization of rabbit platelet cytosolic phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* **1083**, 80-8.
116. Hirabayashi, T., Shimizu, T. (2000) Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2). *Biochim Biophys Acta* **1488**, 124-38.
117. Balsinde, J., Bianco, I.D., Ackermann, E.J., Conde-Frieboes, K., Dennis, E.A. (1995) Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 8527-31.
118. Winstead, M.V., Balsinde, J., Dennis, E.A. (2000) Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1488**, 28-39.
119. Roshak, A.K., Capper, E.A., Stevenson, C., Eichman, C., Marshall, L.A. (2000) Human calcium-independent phospholipase A2 mediates lymphocyte proliferation. *J Biol Chem* **275**, 35692-8.
120. Sanchez, T., Moreno, J.J. (2002) Calcium-independent phospholipase A2 through arachidonic acid mobilization is involved in Caco-2 cell growth. *J Cell Physiol* **193**, 293-8.
121. Atsumi, G., Tajima, M., Hadano, A., Nakatani, Y., Murakami, M., Kudo, I. (1998) Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca²⁺-

- independent phospholipase A2 but not cytosolic phospholipase A2, which undergoes proteolytic inactivation. *J Biol Chem* **273**, 13870-7.
122. Atsumi, G., Murakami, M., Kojima, K., Hadano, A., Tajima, M., Kudo, I. (2000) Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. Proteolytic fragment of type IVA cytosolic phospholipase A2 α inhibits stimulus-induced arachidonate release, whereas that of type VI Ca²⁺-independent phospholipase A2 augments spontaneous fatty acid release. *J Biol Chem* **275**, 18248-58.
 123. Mancuso, D.J., Jenkins, C.M., Gross, R.W. (2000) The genomic organization, complete mRNA sequence, cloning, and expression of a novel human intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2). *J Biol Chem* **275**, 9937-45.
 124. Davidson, F.F., Dennis, E.A. (1990) Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. *J Mol Evol* **31**, 228-38.
 125. Kini, R.M., Evans, H.J. (1989) A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. *Toxicon* **27**, 613-35.
 126. Dennis, E.A. (1997) The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* **22**, 1-2.
 127. Bingham, C.O., 3rd, Fijneman, R.J., Friend, D.S., Goddeau, R.P., Rogers, R.A., Austen, K.F., Arm, J.P. (1999) Low molecular weight group IIA and group V phospholipase A(2) enzymes have different intracellular locations in mouse bone marrow-derived mast cells. *J Biol Chem* **274**, 31476-84.
 128. Triggiani, M., Granata, F., Giannattasio, G., Marone, G. (2005) Secretory phospholipases A2 in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes. *J Allergy Clin Immunol* **116**, 1000-6.
 129. Taketo, M.M., Sonoshita, M. (2002) Phospholipase A2 and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1585**, 72-6.

130. Verheij, H.M., Slotboom, A.J., de Haas, G.H. (1981) Structure and function of phospholipase A2. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **91**, 91-203.
131. Tojo, H., Ono, T., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H., Okamoto, M. (1988) A phospholipase A2 in the supernatant fraction of rat spleen. Its similarity to rat pancreatic phospholipase A2. *J Biol Chem* **263**, 5724-31.
132. Lambeau, G., Lazdunski, M. (1999) Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 162-70.
133. Stefanski, E., Pruzanski, W., Sternby, B., Vadas, P. (1986) Purification of a soluble phospholipase A2 from synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J Biochem* **100**, 1297-303.
134. Hidi, R., Vargaftig, B.B., Touqui, L. (1993) Increased synthesis and secretion of a 14-kDa phospholipase A2 by guinea pig alveolar macrophages. Dissociation from arachidonic acid liberation and modulation by dexamethasone. *J Immunol* **151**, 5613-23.
135. Chock, S.P., Schmauder-Chock, E.A., Cordella-Miele, E., Miele, L., Mukherjee, A.B. (1994) The localization of phospholipase A2 in the secretory granule. *Biochem J* **300 (Pt 3)**, 619-22.
136. Rosenthal, M.D., Gordon, M.N., Buescher, E.S., Slusser, J.H., Harris, L.K., Franson, R.C. (1995) Human neutrophils store type II 14-kDa phospholipase A2 in granules and secrete active enzyme in response to soluble stimuli. *Biochem Biophys Res Commun* **208**, 650-6.
137. Chen, J., Engle, S.J., Seilhamer, J.J., Tischfield, J.A. (1994) Cloning and characterization of novel rat and mouse low molecular weight Ca(2+)-dependent phospholipase A2s containing 16 cysteines. *J Biol Chem* **269**, 23018-24.
138. Ishizaki, J., Suzuki, N., Higashino, K., Yokota, Y., Ono, T., Kawamoto, K., Fujii, N., Arita, H., Hanasaki, K. (1999) Cloning and characterization of novel mouse and human secretory phospholipase A(2)s. *J Biol Chem* **274**, 24973-9.

139. Suzuki, N., Ishizaki, J., Yokota, Y., Higashino, K., Ono, T., Ikeda, M., Fujii, N., Kawamoto, K., Hanasaki, K. (2000) Structures, enzymatic properties, and expression of novel human and mouse secretory phospholipase A(2)s. *J Biol Chem* **275**, 5785-93.
140. Valentin, E., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Lazdunski, M., Lambeau, G. (2000) Novel human secreted phospholipase A(2) with homology to the group III bee venom enzyme. *J Biol Chem* **275**, 7492-6.
141. Mounier, C.M., Wendum, D., Greenspan, E., Flejou, J.F., Rosenberg, D.W., Lambeau, G. (2008) Distinct expression pattern of the full set of secreted phospholipases A2 in human colorectal adenocarcinomas: sPLA2-III as a biomarker candidate. *Br J Cancer* **98**, 587-95.
142. Cupillard, L., Koumanov, K., Mattei, M.G., Lazdunski, M., Lambeau, G. (1997) Cloning, chromosomal mapping, and expression of a novel human secretory phospholipase A2. *J Biol Chem* **272**, 15745-52.
143. Morioka, Y., Saiga, A., Yokota, Y., Suzuki, N., Ikeda, M., Ono, T., Nakano, K., Fujii, N., Ishizaki, J., Arita, H., Hanasaki, K. (2000) Mouse group X secretory phospholipase A2 induces a potent release of arachidonic acid from spleen cells and acts as a ligand for the phospholipase A2 receptor. *Arch Biochem Biophys* **381**, 31-42.
144. Hallstrand, T.S., Chi, E.Y., Singer, A.G., Gelb, M.H., Henderson, W.R., Jr. (2007) Secreted phospholipase A2 group X overexpression in asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* **176**, 1072-8.
145. Curfs, D.M., Ghesquiere, S.A., Vergouwe, M.N., van der Made, I., Gijbels, M.J., Greaves, D.R., Verbeek, J.S., Hofker, M.H., de Winther, M.P. (2008) Macrophage secretory phospholipase A2 group X enhances anti-inflammatory responses, promotes lipid accumulation, and contributes to aberrant lung pathology. *J Biol Chem*.
146. Chen, J., Engle, S.J., Seilhamer, J.J., Tischfield, J.A. (1994) Cloning and recombinant expression of a novel human low molecular weight Ca(2+)-dependent phospholipase A2. *J Biol Chem* **269**, 2365-8.

147. Satake, Y., Diaz, B.L., Balestrieri, B., Lam, B.K., Kanaoka, Y., Grusby, M.J., Arm, J.P. (2004) Role of group V phospholipase A2 in zymosan-induced eicosanoid generation and vascular permeability revealed by targeted gene disruption. *J Biol Chem* **279**, 16488-94.
148. Degousee, N., Ghomashchi, F., Stefanski, E., Singer, A., Smart, B.P., Borregaard, N., Reithmeier, R., Lindsay, T.F., Lichtenberger, C., Reinisch, W., Lambeau, G., Arm, J., Tischfield, J., Gelb, M.H., Rubin, B.B. (2002) Groups IV, V, and X phospholipases A2s in human neutrophils: role in eicosanoid production and gram-negative bacterial phospholipid hydrolysis. *J Biol Chem* **277**, 5061-73.
149. Bernatchez, P.N., Winstead, M.V., Dennis, E.A., Sirois, M.G. (2001) VEGF stimulation of endothelial cell PAF synthesis is mediated by group V 14 kDa secretory phospholipase A2. *Br J Pharmacol* **134**, 197-205.
150. Rosengren, B., Jonsson-Rylander, A.C., Peilot, H., Camejo, G., Hurt-Camejo, E. (2006) Distinctiveness of secretory phospholipase A2 group IIA and V suggesting unique roles in atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 1301-8.
151. Sawada, H., Murakami, M., Enomoto, A., Shimbara, S., Kudo, I. (1999) Regulation of type V phospholipase A2 expression and function by proinflammatory stimuli. *Eur J Biochem* **263**, 826-35.
152. Capper, E.A., Marshall, L.A. (2001) Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. *Prog Lipid Res* **40**, 167-97.
153. Kennedy, B.P., Payette, P., Mudgett, J., Vadas, P., Pruzanski, W., Kwan, M., Tang, C., Rancourt, D.E., Cromlish, W.A. (1995) A natural disruption of the secretory group II phospholipase A2 gene in inbred mouse strains. *J Biol Chem* **270**, 22378-85.
154. Kudo, I., Murakami, M. (2002) Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 3-58.

155. Lambeau, G., Barhanin, J., Schweitz, H., Qar, J., Lazdunski, M. (1989) Identification and properties of very high affinity brain membrane-binding sites for a neurotoxic phospholipase from the taipan venom. *J Biol Chem* **264**, 11503-10.
156. Lambeau, G., Schmid-Alliana, A., Lazdunski, M., Barhanin, J. (1990) Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A2 in skeletal muscle. *J Biol Chem* **265**, 9526-32.
157. Valentin, E., Lambeau, G. (2000) Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A(2) and their receptors and binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1488**, 59-70.
158. Nicolas, J.P., Lin, Y., Lambeau, G., Ghomashchi, F., Lazdunski, M., Gelb, M.H. (1997) Localization of structural elements of bee venom phospholipase A2 involved in N-type receptor binding and neurotoxicity. *J Biol Chem* **272**, 7173-81.
159. Ancian, P., Lambeau, G., Mattei, M.G., Lazdunski, M. (1995) The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem* **270**, 8963-70.
160. Fuentes, L., Hernandez, M., Fernandez-Aviles, F.J., Crespo, M.S., Nieto, M.L. (2002) Cooperation between secretory phospholipase A2 and TNF-receptor superfamily signaling: implications for the inflammatory response in atherogenesis. *Circ Res* **91**, 681-8.
161. Silliman, C.C., Moore, E.E., Zallen, G., Gonzalez, R., Johnson, J.L., Elzi, D.J., Meng, X., Hanasaki, K., Ishizaki, J., Arita, H., Ao, L., England, K.M., Banerjee, A. (2002) Presence of the M-type sPLA(2) receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1102-13.
162. Granata, F., Petraroli, A., Boilard, E., Bezzine, S., Bollinger, J., Del Vecchio, L., Gelb, M.H., Lambeau, G., Marone, G., Triggiani, M. (2005) Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in

- human lung macrophages expressing the M-type receptor. *J Immunol* **174**, 464-74.
163. Hanasaki, K., Arita, H. (1999) Biological and pathological functions of phospholipase A(2) receptor. *Arch Biochem Biophys* **372**, 215-23.
 164. Hanasaki, K., Yokota, Y., Ishizaki, J., Itoh, T., Arita, H. (1997) Resistance to endotoxic shock in phospholipase A2 receptor-deficient mice. *J Biol Chem* **272**, 32792-7.
 165. Weiss, J., Inada, M., Elsbach, P., Crowl, R.M. (1994) Structural determinants of the action against *Escherichia coli* of a human inflammatory fluid phospholipase A2 in concert with polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* **269**, 26331-7.
 166. Laine, V.J., Grass, D.S., Nevalainen, T.J. (1999) Protection by group II phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* **162**, 7402-8.
 167. Laine, V.J., Grass, D.S., Nevalainen, T.J. (2000) Resistance of transgenic mice expressing human group II phospholipase A2 to *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **68**, 87-92.
 168. Nevalainen, T.J., Graham, G.G., Scott, K.F. (2008) Antibacterial actions of secreted phospholipases A2. Review. *Biochim Biophys Acta* **1781**, 1-9.
 169. Koduri, R.S., Gronroos, J.O., Laine, V.J., Le Calvez, C., Lambeau, G., Nevalainen, T.J., Gelb, M.H. (2002) Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). *J Biol Chem* **277**, 5849-57.
 170. Hernandez, M., Fuentes, L., Fernandez Aviles, F.J., Crespo, M.S., Nieto, M.L. (2002) Secretory phospholipase A(2) elicits proinflammatory changes and upregulates the surface expression of fas ligand in monocytic cells: potential relevance for atherogenesis. *Circ Res* **90**, 38-45.
 171. DeCoster, M.A., Lambeau, G., Lazdunski, M., Bazan, N.G. (2002) Secreted phospholipase A2 potentiates glutamate-induced calcium

- increase and cell death in primary neuronal cultures. *J Neurosci Res* **67**, 634-45.
172. Zhang, Y., Lemasters, J., Herman, B. (1999) Secretory group IIA phospholipase A(2) generates anti-apoptotic survival signals in kidney fibroblasts. *J Biol Chem* **274**, 27726-33.
173. Longo, W.E., Grossmann, E.M., Erickson, B., Panesar, N., Mazuski, J.E., Kaminski, D.L. (1999) The effect of phospholipase A2 inhibitors on proliferation and apoptosis of murine intestinal cells. *J Surg Res* **84**, 51-6.
174. Fonteh, A.N., Marion, C.R., Barham, B.J., Edens, M.B., Atsumi, G., Samet, J.M., High, K.P., Chilton, F.H. (2001) Enhancement of mast cell survival: a novel function of some secretory phospholipase A(2) isotypes. *J Immunol* **167**, 4161-71.
175. Bomalaski, J.S., Lawton, P., Browning, J.L. (1991) Human extracellular recombinant phospholipase A2 induces an inflammatory response in rabbit joints. *J Immunol* **146**, 3904-10.
176. Paya, M., Terencio, M.C., Ferrandiz, M.L., Alcaraz, M.J. (1996) Involvement of secretory phospholipase A2 activity in the zymosan rat air pouch model of inflammation. *Br J Pharmacol* **117**, 1773-9.
177. de Castro, R.C., Landucci, E.C., Toyama, M.H., Giglio, J.R., Marangoni, S., De Nucci, G., Antunes, E. (2000) Leucocyte recruitment induced by type II phospholipases A(2) into the rat pleural cavity. *Toxicon* **38**, 1773-85.
178. Gambero, A., Landucci, E.C., Toyama, M.H., Marangoni, S., Giglio, J.R., Nader, H.B., Dietrich, C.P., De Nucci, G., Antunes, E. (2002) Human neutrophil migration in vitro induced by secretory phospholipases A2: a role for cell surface glycosaminoglycans. *Biochem Pharmacol* **63**, 65-72.
179. Beck, G., Yard, B.A., Schulte, J., Haak, M., van Ackern, K., van der Woude, F.J., Kaszkin, M. (2003) Secreted phospholipases A2 induce

- the expression of chemokines in microvascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 731-7.
180. Takasaki, J., Kawauchi, Y., Yasunaga, T., Masuho, Y. (1996) Human type II phospholipase A2-induced Mac-1 expression on human neutrophils. *J Leukoc Biol* **60**, 174-80.
 181. Munoz, N.M., Meliton, A.Y., Lambertino, A., Boetticher, E., Learoyd, J., Sultan, F., Zhu, X., Cho, W., Leff, A.R. (2006) Transcellular secretion of group V phospholipase A2 from epithelium induces beta2-integrin-mediated adhesion and synthesis of leukotriene C4 in eosinophils. *J Immunol* **177**, 574-82.
 182. Triggiani, M., Granata, F., Balestrieri, B., Petraroli, A., Scalia, G., Del Vecchio, L., Marone, G. (2003) Secretory phospholipases A2 activate selective functions in human eosinophils. *J Immunol* **170**, 3279-88.
 183. Murakami, M., Hara, N., Kudo, I., Inoue, K. (1993) Triggering of degranulation in mast cells by exogenous type II phospholipase A2. *J Immunol* **151**, 5675-84.
 184. Choi, Y.A., Lim, H.K., Kim, J.R., Lee, C.H., Kim, Y.J., Kang, S.S., Baek, S.H. (2004) Group IB secretory phospholipase A2 promotes matrix metalloproteinase-2-mediated cell migration via the phosphatidylinositol 3-kinase and Akt pathway. *J Biol Chem* **279**, 36579-85.
 185. Triggiani, M., Granata, F., Frattini, A., Marone, G. (2006) Activation of human inflammatory cells by secreted phospholipases A2. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 1289-300.
 186. Triggiani, M., Granata, F., Oriente, A., Gentile, M., Petraroli, A., Balestrieri, B., Marone, G. (2002) Secretory phospholipases A2 induce cytokine release from blood and synovial fluid monocytes. *Eur J Immunol* **32**, 67-76.
 187. Jo, E.J., Lee, H.Y., Lee, Y.N., Kim, J.I., Kang, H.K., Park, D.W., Baek, S.H., Kwak, J.Y., Bae, Y.S. (2004) Group IB secretory phospholipase

- A2 stimulates CXC chemokine ligand 8 production via ERK and NF-kappa B in human neutrophils. *J Immunol* **173**, 6433-9.
188. Granata, F., Frattini, A., Loffredo, S., Del Prete, A., Sozzani, S., Marone, G., Triggiani, M. (2006) Signaling events involved in cytokine and chemokine production induced by secretory phospholipase A2 in human lung macrophages. *Eur J Immunol* **36**, 1938-50.
189. van der Helm, H.A., Aarsman, A.J., Janssen, M.J., Neys, F.W., van den Bosch, H. (2000) Regulation of the expression of group IIA and group V secretory phospholipases A(2) in rat mesangial cells. *Biochim Biophys Acta* **1484**, 215-24.
190. Hamaguchi, K., Kuwata, H., Yoshihara, K., Masuda, S., Shimbara, S., Oh-ishi, S., Murakami, M., Kudo, I. (2003) Induction of distinct sets of secretory phospholipase A(2) in rodents during inflammation. *Biochim Biophys Acta* **1635**, 37-47.
191. Han, S.K., Kim, K.P., Koduri, R., Bittova, L., Munoz, N.M., Leff, A.R., Wilton, D.C., Gelb, M.H., Cho, W. (1999) Roles of Trp31 in high membrane binding and proinflammatory activity of human group V phospholipase A2. *J Biol Chem* **274**, 11881-8.
192. Munoz, N.M., Kim, Y.J., Meliton, A.Y., Kim, K.P., Han, S.K., Boetticher, E., O'Leary, E., Myou, S., Zhu, X., Bonventre, J.V., Leff, A.R., Cho, W. (2003) Human group V phospholipase A2 induces group IVA phospholipase A2-independent cysteinyl leukotriene synthesis in human eosinophils. *J Biol Chem* **278**, 38813-20.
193. Balestrieri, B., Hsu, V.W., Gilbert, H., Leslie, C.C., Han, W.K., Bonventre, J.V., Arm, J.P. (2006) Group V secretory phospholipase A2 translocates to the phagosome after zymosan stimulation of mouse peritoneal macrophages and regulates phagocytosis. *J Biol Chem* **281**, 6691-8.
194. Munoz, N.M., Meliton, A.Y., Arm, J.P., Bonventre, J.V., Cho, W., Leff, A.R. (2007) Deletion of secretory group V phospholipase A2

- attenuates cell migration and airway hyperresponsiveness in immunosensitized mice. *J Immunol* **179**, 4800-7.
195. Murakami, M., Kudo, I. (2004) Secretory phospholipase A2. *Biol Pharm Bull* **27**, 1158-64.
 196. Chilton, F.H., Averill, F.J., Hubbard, W.C., Fonteh, A.N., Triggiani, M., Liu, M.C. (1996) Antigen-induced generation of lyso-phospholipids in human airways. *J Exp Med* **183**, 2235-45.
 197. Touqui, L., Arbibe, L. (1999) A role for phospholipase A2 in ARDS pathogenesis. *Mol Med Today* **5**, 244-9.
 198. Arbibe, L., Koumanov, K., Vial, D., Rougeot, C., Faure, G., Havet, N., Longacre, S., Vargaftig, B.B., Bereziat, G., Voelker, D.R., Wolf, C., Touqui, L. (1998) Generation of lyso-phospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type-II phospholipase A2 and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A2 protein interaction. *J Clin Invest* **102**, 1152-60.
 199. Chabot, S., Koumanov, K., Lambeau, G., Gelb, M.H., Balloy, V., Chignard, M., Whitsett, J.A., Touqui, L. (2003) Inhibitory effects of surfactant protein A on surfactant phospholipid hydrolysis by secreted phospholipases A2. *J Immunol* **171**, 995-1000.
 200. Seeds, M.C., Jones, K.A., Duncan Hite, R., Willingham, M.C., Borgerink, H.M., Woodruff, R.D., Bowton, D.L., Bass, D.A. (2000) Cell-specific expression of group X and group V secretory phospholipases A(2) in human lung airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**, 37-44.
 201. Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Arata, S., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Takanezawa, Y., Aoki, J., Arai, H., Yamamoto, K., Kudo, I., Murakami, M. (2006) Transgenic expression of group V, but not group X, secreted phospholipase A2 in mice leads to neonatal lethality because of lung dysfunction. *J Biol Chem* **281**, 36420-33.
 202. Hanasaki, K., Yamada, K., Yamamoto, S., Ishimoto, Y., Saiga, A., Ono, T., Ikeda, M., Notoya, M., Kamitani, S., Arita, H. (2002) Potent

- modification of low density lipoprotein by group X secretory phospholipase A2 is linked to macrophage foam cell formation. *J Biol Chem* **277**, 29116-24.
203. Wooton-Kee, C.R., Boyanovsky, B.B., Nasser, M.S., de Villiers, W.J., Webb, N.R. (2004) Group V sPLA2 hydrolysis of low-density lipoprotein results in spontaneous particle aggregation and promotes macrophage foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 762-7.
204. Rosengren, B., Peilot, H., Umaerus, M., Jonsson-Rylander, A.C., Mattsson-Hulten, L., Hallberg, C., Cronet, P., Rodriguez-Lee, M., Hurt-Camejo, E. (2006) Secretory phospholipase A2 group V: lesion distribution, activation by arterial proteoglycans, and induction in aorta by a Western diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1579-85.
205. Flood, C., Gustafsson, M., Pitas, R.E., Arnaboldi, L., Walzem, R.L., Boren, J. (2004) Molecular mechanism for changes in proteoglycan binding on compositional changes of the core and the surface of low-density lipoprotein-containing human apolipoprotein B100. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 564-70.
206. Masuda, S., Murakami, M., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kudo, I. (2005) Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A2 enzymes in several human tissues. *Biochim Biophys Acta* **1736**, 200-10.
207. Ishikawa, Y., Komiyama, K., Masuda, S., Murakami, M., Akasaka, Y., Ito, K., Akishima-Fukasawa, Y., Kimura, M., Fujimoto, A., Kudo, I., Ishii, T. (2005) Expression of type V secretory phospholipase A in myocardial remodelling after infarction. *Histopathology* **47**, 257-67.
208. Fujioka, D., Saito, Y., Kobayashi, T., Yano, T., Tezuka, H., Ishimoto, Y., Suzuki, N., Yokota, Y., Nakamura, T., Obata, J.E., Kanazawa, M., Kawabata, K., Hanasaki, K., Kugiyama, K. (2008) Reduction in myocardial ischemia/reperfusion injury in group X secretory phospholipase A2-deficient mice. *Circulation* **117**, 2977-85.

209. Kugiyama, K., Ota, Y., Takazoe, K., Moriyama, Y., Kawano, H., Miyao, Y., Sakamoto, T., Soejima, H., Ogawa, H., Doi, H., Sugiyama, S., Yasue, H. (1999) Circulating levels of secretory type II phospholipase A(2) predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* **100**, 1280-4.
210. Murakami, M., Kudo, I. (2003) New phospholipase A(2) isozymes with a potential role in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **14**, 431-6.
211. Webb, N.R. (2005) Secretory phospholipase A2 enzymes in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* **16**, 341-4.
212. Bostrom, M.A., Boyanovsky, B.B., Jordan, C.T., Wadsworth, M.P., Taatjes, D.J., de Beer, F.C., Webb, N.R. (2007) Group v secretory phospholipase A2 promotes atherosclerosis: evidence from genetically altered mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 600-6.
213. Bowton, D.L., Seeds, M.C., Fasano, M.B., Goldsmith, B., Bass, D.A. (1997) Phospholipase A2 and arachidonate increase in bronchoalveolar lavage fluid after inhaled antigen challenge in asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 421-5.
214. Henderson, W.R., Jr., Chi, E.Y., Bollinger, J.G., Tien, Y.T., Ye, X., Castelli, L., Rubtsov, Y.P., Singer, A.G., Chiang, G.K., Nevalainen, T., Rudensky, A.Y., Gelb, M.H. (2007) Importance of group X-secreted phospholipase A2 in allergen-induced airway inflammation and remodeling in a mouse asthma model. *J Exp Med* **204**, 865-77.
215. Collet, X., Perret, B.P., Simard, G., Vieu, C., Douste-Blazy, L. (1990) Behaviour of phospholipase-modified HDL towards cultured hepatocytes. I. Enhanced transfers of HDL sterols and apoproteins. *Biochim Biophys Acta* **1043**, 301-10.
216. Tietge, U.J., Nijstad, N., Havinga, R., Baller, J.F., van der Sluijs, F.H., Bloks, V.W., Gautier, T., Kuipers, F. (2008) Secretory phospholipase A2 increases SR-BI-mediated selective uptake from HDL but not biliary cholesterol secretion. *J Lipid Res* **49**, 563-71.

217. Ito, M., Ishikawa, Y., Kiguchi, H., Komiyama, K., Murakami, M., Kudo, I., Akasaka, Y., Ishii, T. (2004) Distribution of type V secretory phospholipase A2 expression in human hepatocytes damaged by liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* **19**, 1140-9.
218. Seilhamer, J.J., Pruzanski, W., Vadas, P., Plant, S., Miller, J.A., Kloss, J., Johnson, L.K. (1989) Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J Biol Chem* **264**, 5335-8.
219. Hara, S., Kudo, I., Chang, H.W., Matsuta, K., Miyamoto, T., Inoue, K. (1989) Purification and characterization of extracellular phospholipase A2 from human synovial fluid in rheumatoid arthritis. *J Biochem* **105**, 395-9.
220. Lin, M.K., Farewell, V., Vadas, P., Bookman, A.A., Keystone, E.C., Pruzanski, W. (1996) Secretory phospholipase A2 as an index of disease activity in rheumatoid arthritis. Prospective double blind study of 212 patients. *J Rheumatol* **23**, 1162-6.
221. Bidgood, M.J., Jamal, O.S., Cunningham, A.M., Brooks, P.M., Scott, K.F. (2000) Type IIA secretory phospholipase A2 up-regulates cyclooxygenase-2 and amplifies cytokine-mediated prostaglandin production in human rheumatoid synoviocytes. *J Immunol* **165**, 2790-7.
222. Leistad, L., Feuerherm, A.J., Ostensen, M., Faxvaag, A., Johansen, B. (2004) Presence of secretory group IIA and V phospholipase A2 and cytosolic group IVA phospholipase A2 in chondrocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med* **42**, 602-10.
223. Masuda, S., Murakami, M., Komiyama, K., Ishihara, M., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kudo, I. (2005) Various secretory phospholipase A2 enzymes are expressed in rheumatoid arthritis and augment prostaglandin production in cultured synovial cells. *Febs J* **272**, 655-72.
224. Buchler, M., Malfertheiner, P., Schadlich, H., Nevalainen, T.J., Friess, H., Beger, H.G. (1989) Role of phospholipase A2 in human acute pancreatitis. *Gastroenterology* **97**, 1521-6.

225. Makela, A., Sternby, B., Kuusi, T., Puolakkainen, P., Schroder, T. (1990) Phospholipase A2 activity and concentration in several body fluids in patients with acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* **25**, 944-50.
226. Uhl, W., Schrag, H.J., Schmitter, N., Nevalainen, T.J., Aufenanger, J., Wheatley, A.M., Buchler, M.W. (1997) Pathophysiological role of secretory type I and II phospholipase A2 in acute pancreatitis: an experimental study in rats. *Gut* **40**, 386-92.
227. Camargo, E.A., Esquisatto, L.C., Esquisatto, M.A., Ribela, M.T., Cintra, A.C., Giglio, J.R., Antunes, E., Landucci, E.C. (2005) Characterization of the acute pancreatitis induced by secretory phospholipases A2 in rats. *Toxicon* **46**, 921-6.
228. Minami, T., Tojo, H., Shinomura, Y., Komatsubara, T., Matsuzawa, Y., Okamoto, M. (1993) Elevation of phospholipase A2 protein in sera of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* **88**, 1076-80.
229. Minami, T., Tojo, H., Shinomura, Y., Matsuzawa, Y., Okamoto, M. (1994) Increased group II phospholipase A2 in colonic mucosa of patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **35**, 1593-8.
230. Haapamaki, M.M., Gronroos, J.M., Nurmi, H., Soderlund, K., Peuravuori, H., Alanen, K., Nevalainen, T.J. (1998) Elevated group II phospholipase A2 mass concentration in serum and colonic mucosa in Crohn's disease. *Clin Chem Lab Med* **36**, 751-5.
231. Haapamaki, M.M., Gronroos, J.M., Nurmi, H., Irjala, K., Alanen, K.A., Nevalainen, T.J. (1999) Phospholipase A2 in serum and colonic mucosa in ulcerative colitis. *Scand J Clin Lab Invest* **59**, 279-87.
232. Lilja, I., Gustafson-Svard, C., Franzen, L., Sjodahl, R., Andersen, S., Johansen, B. (2000) Presence of group IIa secretory phospholipase A2 in mast cells and macrophages in normal human ileal submucosa and in Crohn's disease. *Clin Chem Lab Med* **38**, 1231-6.

233. Yamashita, S., Yamashita, J., Ogawa, M. (1994) Overexpression of group II phospholipase A2 in human breast cancer tissues is closely associated with their malignant potency. *Br J Cancer* **69**, 1166-70.
234. Graff, J.R., Konicek, B.W., Deddens, J.A., Chedid, M., Hurst, B.M., Colligan, B., Neubauer, B.L., Carter, H.W., Carter, J.H. (2001) Expression of group IIA secretory phospholipase A2 increases with prostate tumor grade. *Clin Cancer Res* **7**, 3857-61.
235. Jiang, J., Neubauer, B.L., Graff, J.R., Chedid, M., Thomas, J.E., Roehm, N.W., Zhang, S., Eckert, G.J., Koch, M.O., Eble, J.N., Cheng, L. (2002) Expression of group IIA secretory phospholipase A2 is elevated in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. *Am J Pathol* **160**, 667-71.
236. Sved, P., Scott, K.F., McLeod, D., King, N.J., Singh, J., Tsatralis, T., Nikolov, B., Boulas, J., Nallan, L., Gelb, M.H., Sajinovic, M., Graham, G.G., Russell, P.J., Dong, Q. (2004) Oncogenic action of secreted phospholipase A2 in prostate cancer. *Cancer Res* **64**, 6934-40.
237. Tribler, L., Jensen, L.T., Jorgensen, K., Brunner, N., Gelb, M.H., Nielsen, H.J., Jensen, S.S. (2007) Increased expression and activity of group IIA and X secretory phospholipase A2 in peritumoral versus central colon carcinoma tissue. *Anticancer Res* **27**, 3179-85.
238. Potts, B.C., Faulkner, D.J., Jacobs, R.S. (1992) Phospholipase A2 inhibitors from marine organisms. *J Nat Prod* **55**, 1701-17.
239. Fuentes, L., Perez, R., Nieto, M.L., Balsinde, J., Balboa, M.A. (2003) Bromoenol lactone promotes cell death by a mechanism involving phosphatidate phosphohydrolase-1 rather than calcium-independent phospholipase A2. *J Biol Chem* **278**, 44683-90.
240. Lio, Y.C., Reynolds, L.J., Balsinde, J., Dennis, E.A. (1996) Irreversible inhibition of Ca(2+)-independent phospholipase A2 by methyl arachidonyl fluorophosphonate. *Biochim Biophys Acta* **1302**, 55-60.
241. Deutsch, D.G., Omeir, R., Arreaza, G., Salehani, D., Prestwich, G.D., Huang, Z., Howlett, A. (1997) Methyl arachidonyl fluorophosphonate: a

- potent irreversible inhibitor of anandamide amidase. *Biochem Pharmacol* **53**, 255-60.
242. Bartoli, F., Lin, H.K., Ghomashchi, F., Gelb, M.H., Jain, M.K., Apitz-Castro, R. (1994) Tight binding inhibitors of 85-kDa phospholipase A2 but not 14-kDa phospholipase A2 inhibit release of free arachidonate in thrombin-stimulated human platelets. *J Biol Chem* **269**, 15625-30.
243. Ackermann, E.J., Conde-Frieboes, K., Dennis, E.A. (1995) Inhibition of macrophage Ca(2+)-independent phospholipase A2 by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones. *J Biol Chem* **270**, 445-50.
244. Yokota, Y., Hanasaki, K., Ono, T., Nakazato, H., Kobayashi, T., Arita, H. (1999) Suppression of murine endotoxic shock by sPLA2 inhibitor, indoxam, through group IIA sPLA2-independent mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1438**, 213-22.
245. Smart, B.P., Pan, Y.H., Weeks, A.K., Bollinger, J.G., Bahnson, B.J., Gelb, M.H. (2004) Inhibition of the complete set of mammalian secreted phospholipases A(2) by indole analogues: a structure-guided study. *Bioorg Med Chem* **12**, 1737-49.
246. Schevitz, R.W., Bach, N.J., Carlson, D.G., Chirgadze, N.Y., Clawson, D.K., Dillard, R.D., Draheim, S.E., Hartley, L.W., Jones, N.D., Mihelich, E.D., et al. (1995) Structure-based design of the first potent and selective inhibitor of human non-pancreatic secretory phospholipase A2. *Nat Struct Biol* **2**, 458-65.
247. de Carvalho, M.S., Jacobs, R.S. (1991) Two-step inactivation of bee venom phospholipase A2 by scalaradial. *Biochem Pharmacol* **42**, 1621-6.
248. Chen, Y., Dennis, E.A. (1998) Expression and characterization of human group V phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta* **1394**, 57-64.
249. Lucas, K.K., Dennis, E.A. (2005) Distinguishing phospholipase A2 types in biological samples by employing group-specific assays in the presence of inhibitors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **77**, 235-48.

250. Vandal, K., Rouleau, P., Boivin, A., Ryckman, C., Talbot, M., Tessier, P.A. (2003) Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J Immunol* **171**, 2602-9.
251. Pelletier, M., Bouchard, A., Girard, D. (2004) In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J Immunol* **173**, 7521-30.
252. Kim, Y.J., Kim, K.P., Han, S.K., Munoz, N.M., Zhu, X., Sano, H., Leff, A.R., Cho, W. (2002) Group V phospholipase A2 induces leukotriene biosynthesis in human neutrophils through the activation of group IVA phospholipase A2. *J Biol Chem* **277**, 36479-88.
253. Belayev, L., Khoutorova, L., Atkins, K., Gordon, W.C., Alvarez-Builla, J., Bazan, N.G. (2008) LAU-0901, a novel platelet-activating factor antagonist, is highly neuroprotective in cerebral ischemia. *Exp Neurol*.
254. Granata, F., Frattini, A., Loffredo, S., Del Prete, A., Sozzani, S., Marone, G., Triggiani, M. (2006) Signaling events involved in cytokine and chemokine production induced by secretory phospholipase A(2) in human lung macrophages. *Eur J Immunol*.
255. Marshall, L.A., Winkler, J.D., Griswold, D.E., Bolognese, B., Roshak, A., Sung, C.M., Webb, E.F., Jacobs, R. (1994) Effects of scalaradial, a type II phospholipase A2 inhibitor, on human neutrophil arachidonic acid mobilization and lipid mediator formation. *J Pharmacol Exp Ther* **268**, 709-17.
256. Xie, Y., Liu, L., Huang, X., Guo, Y., Lou, L. (2005) Scalaradial inhibition of epidermal growth factor receptor-mediated Akt phosphorylation is independent of secretory phospholipase A2. *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 1210-7.
257. Nakamura, H., Herzenberg, L.A., Bai, J., Araya, S., Kondo, N., Nishinaka, Y., Yodoi, J. (2001) Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15143-8.

258. Oshiro, T.M., Macedo, M.S., Macedo-Soares, M.F. (2005) Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm Res* **54**, 17-21.
259. Thommesen, L., Sjursen, W., Gasvik, K., Hanssen, W., Brekke, O.L., Skattebol, L., Holmeide, A.K., Espevik, T., Johansen, B., Laegreid, A. (1998) Selective inhibitors of cytosolic or secretory phospholipase A2 block TNF-induced activation of transcription factor nuclear factor-kappa B and expression of ICAM-1. *J Immunol* **161**, 3421-30.
260. Jersmann, H.P., Hii, C.S., Ferrante, J.V., Ferrante, A. (2001) Bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha synergistically increase expression of human endothelial adhesion molecules through activation of NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Infect Immun* **69**, 1273-9.

