

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
Laboratoire HP2 INSERM ESPRI EA3745

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : **PHYSIOLOGIE-PHYSIOPATHOLOGIES-PHARMACOLOGIE**

Présentée et soutenue publiquement

Par **Gaëlle HARDY**

Le 8 février 2005

**Leucotriènes et pathologies cardiovasculaires :
diabète et hypertension artérielle**

Directeur de thèse : Madame le Docteur Françoise STANKE-LABESQUE

Jury :

Monsieur le Professeur Daniel BENZONI, Rapporteur

Monsieur le Professeur Germain BESSARD, Président

Monsieur le Professeur Philippe DEVILLIER, Rapporteur

Madame le Docteur Françoise STANKE-LABESQUE, Directeur

Monsieur le Professeur Philippe ZAOUI, Examineur

Je tiens à adresser mes remerciements sincères aux membres du jury,

A Monsieur le Professeur Daniel BENZONI, qui me fait l'honneur à nouveau de juger mon travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude et de ma profonde considération.

A Monsieur le Professeur Germain BESSARD, qui m'a accueillie au sein du Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie durant mon internat et aujourd'hui en tant qu'Assistante Hospitalo-Universitaire, et qui m'a ainsi accordé sa confiance. Qu'il trouve ici le témoignage de ma très grande reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Philippe DEVILLIER, qui me fait l'honneur de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude et de ma profonde considération.

A Madame le Docteur Françoise STANKE-LABESQUE, qui par la qualité de son encadrement et sa rigueur scientifique m'a guidée tout au long de ce travail. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde considération, de toute ma reconnaissance et de mon amitié.

A Monsieur le Professeur Philippe ZAOUI, qui me fait l'honneur de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude et de ma profonde reconnaissance.

Je souhaite remercier également l'ensemble du personnel des Laboratoires et du Service clinique dans lesquels ce travail a été réalisé :

- Le Laboratoire de Pharmacologie de la Faculté de Médecine, HP2 INSERM ESPRI EA3745, et en particulier le Monsieur le Docteur Jean-Luc Cracowski, Madame Françoise Caron et Mademoiselle Blandine Lefebvre,
- Le Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie du CHU de Grenoble,
- Le Laboratoire de Biochimie de l'ADN du CHU de Grenoble, et en particulier Monsieur le Professeur Joël Lunardi et Madame le Docteur Nicole Monnier,
- Le Laboratoire d'Enzymologie du CHU de Grenoble, et en particulier Madame le Professeur Françoise Morel et Madame le Docteur Sabrina Vergnaud.
- Le Service d'Endocrinologie-Diabétologie-Nutrition du CHU de Grenoble, et en particulier Monsieur le Professeur Serge Halimi et Monsieur le Docteur Robert Boizel.

Leur disponibilité et leur gentillesse m'ont permis de mener à terme de travail.

J'aimerais dédier ce travail

à Pierrick et Axelle,

à ma famille,

à mes amis,

pour leur soutien sans faille et leur confiance rassurante.

TABLE DES MATIERES

Abréviations	5
Sommaire des figures et des tableaux	7
Introduction	9
<i>Première partie : Données de la littérature</i>	11
1^{er} Chapitre : Pharmacologie des leucotriènes	12
I. Voie métabolique des leucotriènes	13
I.1. Métabolisme général des eicosanoïdes	13
I.2. Les phospholipases A ₂	15
I.3. Voie de la 5-lipoxygénase	17
I.3.1. Synthèse des leucotriènes	17
I.3.2. La 5-lipoxygénase	18
I.3.2.1. Structure	18
I.3.2.2. Polymorphisme génétique de la 5-lipoxygénase	20
I.3.2.3. Localisation	22
I.3.2.4. Régulation	25
I.3.2.5. Inhibition	26
I.3.3. La Five-Lipoxygenase Activating Protein	27
I.3.4. La LTA ₄ hydrolase	29
I.3.5. La LTC ₄ synthase	30
II. Récepteurs des leucotriènes	32
II.1. Récepteurs du LTB ₄	32
II.2. Récepteurs des cystéinyl leucotriènes	32
III. Propriétés pharmacologiques des leucotriènes	36
III.1. Effets vasculaires du leucotriène B ₄	36
III.2. Effets vasculaires des cystéinyl leucotriènes <i>in vitro</i>	36
III.3. Effets vasculaires des cystéinyl leucotriènes <i>in vivo</i>	38

2^{ème} Chapitre : Leucotriènes et pathologies cardiovasculaires 40

I. Athérosclérose et Inflammation.....	41
I.1. Données issues des souris transgéniques	41
I.2. Données issues des polymorphismes génétiques de la 5-lipoxygénase et de la FLAP	42
I.3. Implications des leucotriènes dans les mécanismes de l'athérosclérose et de l'inflammation	43
I.4. Le système rénine-angiotensine et l'athérosclérose.....	48
I.4.1. Synthèse de l'angiotensine II.....	48
I.4.2. Réceptologie de l'angiotensine II	49
I.4.3. Effets vasculaires de l'angiotensine II.....	51
II. Leucotriènes et diabète.....	55
II.1. Le diabète.....	55
II.2. Complications cardiovasculaires associées au diabète	56
II.3. Modèles animaux	57
II.4. Leucotriènes et diabète	60
II.5. Angiotensine II et diabète	62
III. Leucotriènes et hypertension artérielle essentielle	64
III.1. L'hypertension artérielle essentielle.....	64
III.1.1. Définition	64
III.1.2. Données d'épidémiologie.....	65
III.2. Modulation des effets vasculaires de l'angiotensine II par les dérivés des lipoxygénases.....	66

Deuxième partie : Travaux de la thèse 68

Présentation de la thèse..... 69

1^{er} Chapitre : Matériel et méthodes..... 71

I. Modèles animaux.....	72
I.1. Rats Streptozotocine: modèle de diabète de type 1	72
I.2. Rats Fructose: modèle de rat insulino-résistant.....	73
I.3. Rat transgénique (mRen-2) ²⁷ ; modèle d'hypertension monogénique.....	74

I.4. Rat L-NAME ; modèle d'hypertension.....	75
II. Etudes fonctionnelles sur aorte isolée	75
III. Dosage immunoenzymatique des cystéinyl leucotriènes vasculaires	76
IV. Dosage immunoenzymatique du leucotriène E ₄ urinaire.....	77
V. Dosage en LC/MS-MS du leucotriène E ₄ urinaire	77
VI. Etudes immunohistochimiques.....	78
VII. Western Blot.....	79
VIII. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	80
IX. Expression des résultats et analyse statistique.....	81

2^{ème} Chapitre : Résultats et publications 83

Publication n°1 84

Cysteinyl leukotrienes modulate angiotensin II constrictor effects on aortas from streptozotocin-induced diabetic rats.

Hardy G, Stanke-Labesque F, Peoc'h M, Hakim A, Devillier P, Caron F, Morel S, Faure P, Halimi S, Bessard G.

Arterioscler Thromb Vasc Biol (2001). 21: 1751-8.

Publication n°2 95

5-lipoxygenase expression and activity in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats.

Hardy G, Vergnaud S, Lunardi J, Peoc'h M, Bessard G, Stanke-Labesque F.

Prostaglandins Other Lipid Mediat, sous presse.

Publication n°3 112

Increased leukotriene E₄ urinary excretion in type 1 diabetic patients.

Hardy G, Boizel R, Bessard J, Cracowski JL, Bessard G, Halimi G, Stanke-Labesque F.

Soumis.

Publication n°4 133

Involvement of cysteinyl leukotrienes in angiotensin II-induced contraction in isolated aortas from transgenic (mRen-2)²⁷ rats.

Stanke-Labesque F, Hardy G, Vergnaud S, Devillier P, Peoc'h M, Randon J, Bricca G, Caron F, Cracowski JL, Bessard G.

J Hypertens (2002). 20: 263-72.

Publication n°5 146

Inhibition of leukotriene synthesis with MK-886 prevents a rise in blood pressure and reduces noradrenaline-evoked contraction in L-NAME-treated rats.

Stanke-Labesque F, Hardy G, Caron F, Cracowski JL, Bessard G.

Br J Pharmacol (2003). 140: 186-94.

Discussion générale..... 158

- I. Rôle des cystéinyl leucotriènes dans les effets vasoconstricteurs de l'angiotensine II 159
- II. Rôle des cystéinyl leucotriènes dans les effets vasoconstricteurs de la noradrénaline..... 162
- III. Effets des cystéinyl leucotriènes sur le tonus de base et sur aorte pré-contractée 164
- IV. Localisation et mécanismes d'activation de la 5-lipoxygénase..... 166
- V. Production systémique de cystéinyl leucotriènes 168

Conclusions 170

Références bibliographiques..... 172

Résumés..... 191

Abréviations

5-HPETE	acide 5(S)-hydroperoxy-6,8,11,14-eicosatétraénoïque
12-HPETE	acide 12(S)-hydroperoxy-eicosatétraénoïque
12-HETE	acide 12(S)-hydroxy-eicosatétraénoïque
15-HPETE	acide 15(S)-hydroperoxy-eicosatétraénoïque
ATP	adénosine triphosphate
Ang II	angiotensine II
Ca ²⁺	ion calcium
CML	cellules musculaires lisses
COX	cyclooxygénase
CysLTs	cystéinyl leucotriènes
ECA	enzyme de conversion de l'angiotensine I
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
FLAP	five lipoxygenase activating protein
IEC	inhibiteur de l'enzyme de conversion (de l'angiotensine I)
kb	kilo base (1000 paires de bases)
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginine methyl ester
LOX	lipoxygénase
LTs	leucotriènes
LTA ₄	leucotriène A ₄
LTB ₄	leucotriène B ₄
LTC ₄	leucotriène C ₄
LTD ₄	leucotriène D ₄
LTE ₄	leucotriène E ₄
MCP-1	monocyte chemotatic protein-1

pb	paire de bases
PL	phospholipide
PLA ₂	phospholipase A ₂
rats F	rats fructose
rats FC	rats fructose contrôle
rats SHR	spontaneously hypertensive rat
rats SI	rats streptozotocine-insuline
rats SD	rats Sprague-Dawley
rats SS	rats streptozotocine-sérum physiologique
rats TG	rats transgéniques (mRen-2) ²⁷
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction

Sommaire des figures et des tableaux

Figure 1, p 14 : Métabolisme général des eicosanoïdes.

Figure 2, p 18 : Voie de synthèse des leucotriènes d'après Brink *et al.* (Brink *et al.*, 2003).

Figure 3, p 19 : Structure secondaire de la 15-LOX de lapin d'après Perters-Golden *et al.* (Peters-Golden *et al.*, 2003).

Figure 4, p 20 : Représentation schématique de la région promotrice du gène de la 5-lipoxygénase d'après Fowler *et al.* (Fowler *et al.*, 2002).

Figure 5, p 24 : Compartimentalisation intracellulaire des étapes successives de la synthèse des leucotriènes d'après Perters-Golden *et al.* (Peters-Golden *et al.*, 2001).

Figure 6, p 28 : Modèles d'interaction entre la FLAP (F) et la LTC₄ synthase (L) d'après Mandal *et al.* (Mandal *et al.*, 2004).

Figure 7, p 33 : Représentation schématique du récepteur CysLT₁ humain. Comparaison de la séquence d'acides aminés avec le récepteur CysLT₂ d'après Brink *et al.* (Brink *et al.*, 2003).

Figure 8, p 35 : Représentation schématique des récepteurs CysLT₁, CysLT₂ et d'un troisième récepteur (« novel » CysLT) pour lequel il n'y a pas d'antagoniste connu, d'après Norel *et al.* (Norel *et al.*, 2004).

Figure 9, p 44 : Modèle d'initiation de l'activation et du recrutement des monocytes puis de leur adhésion à l'endothélium et transmigration dans l'intima d'après Mehrabian *et al.* (Mehrabian *et al.*, 2004).

Figure 10, p 46 : Rôle des leucotriènes dans les différentes étapes de l'athérosclérose d'après Jala *et al.* (Jala *et al.*, 2004).

Figure 11, p 48 : Formation de l'angiotensine II à partir de l'angiotensinogène.

Figure 12, p 52 : Effets de l'angiotensine II via la stimulation du récepteur AT₁, et points d'impact des principales familles antihypertensives.

Figure 13, p 54 : Schéma de la contribution de la voie de la 5-lipoxygénase dans les multiples processus de l'athérosclérose d'après Mehrabian *et al.* (Mehrabian *et al.*, 2003).

Figure 14, p 73 : Modèle du rat Streptozotocine.

Figure 15, p 73 : Modèle du rat Fructose.

Figure 16, p 97 : Immunomarquage de la 5-lipoxygénase sur coupe d'aortes thoraciques de rats Contrôle (A) et streptozotocine (B). Témoin négatif (C). (agrandissement : x 400).

Tableau 1, p 15 : Caractéristiques des phospholipases A₂ d'après Gijon *et al.* (Gijon *et al.*, 1997).

Tableau 2, p 22 : Types cellulaires dans lesquels la 5-lipoxygénase a été localisée.

Tableau 3, p 34 : Caractéristiques des récepteurs des leucotriènes d'après Jala *et al.* (Jala *et al.*, 2004).

Tableau 4, p 37 : Effets *in vitro* des cystéinyl leucotriènes sur le tonus de base de différents territoires vasculaires humains.

Tableau 5, p 50 : Principales caractéristiques des sous types AT₁ et AT₂ des récepteurs de l'angiotensine II.

Tableau 6, p 65 : Principaux facteurs et indicateurs de risque cardiovasculaire et maladies associées pris en compte dans la prise en charge d'un patient atteint d'une hypertension artérielle (adapté de WHO/ISH 1999).

Tableau 7, p 164 : Effet des leucotriènes C₄ et D₄ sur le tonus de base d'aortes de rat.

Tableau 8, p 165 : Effets des leucotriènes C₄ et D₄ sur les aortes intactes précontractées par la phényléphrine.

Introduction

Les leucotriènes sont les métabolites de l'acide arachidonique formés via la voie de la 5-lipoxygénase. Comme de nombreux autres eicosanoïdes, ils sont, de par leurs propriétés pharmacologiques, impliqués en physiopathologie cardiovasculaire.

Historiquement, les leucotriènes ont dans un premier temps été mis en cause dans l'inflammation et la bronchoconstriction associées à l'asthme et aux pathologies bronchopulmonaires, ainsi que dans les mécanismes de l'allergie. Cependant, depuis quelques années, la recherche scientifique s'est tournée vers les implications des leucotriènes dans les pathologies cardiovasculaires. De nouvelles données concernant la biochimie des leucotriènes, l'identification et le clonage de récepteurs ainsi que les observations issues des études pharmacologiques et génétiques ont renouvelé l'intérêt pour les leucotriènes en tant qu'acteurs de l'inflammation et des pathologies cardiovasculaires. Les leucotriènes et les enzymes de leur voie de synthèse pourraient constituer à ce titre de nouvelles cibles pharmacologiques dans la prise en charge et le traitement de la première cause de mortalité dans les pays occidentaux.

Dans cette thèse, une partie bibliographique est consacrée à la pharmacologie cardiovasculaire des leucotriènes. Leurs implications dans les pathologies cardiovasculaires sont ensuite abordées, plus particulièrement, dans le cadre du diabète et de l'hypertension artérielle. Les effets propres des leucotriènes sont détaillés ainsi que leur rôle modulateur des effets vasculaires de l'angiotensine II et de la noradrénaline, médiateurs également impliqués dans l'initiation et le développement des pathologies cardiovasculaires.

Première partie : Données de la littérature

1^{er} Chapitre : Pharmacologie des leucotriènes

I. Voie métabolique des leucotriènes

I.1. Métabolisme général des eicosanoïdes

Les eicosanoïdes constituent une famille de molécules à 20 atomes de carbone dérivées de l'acide arachidonique (acide eicosatétraénoïque) par voie enzymatique (Figure 1, page 14). L'acide arachidonique est un acide gras polyinsaturé présent surtout sous forme estérifiée au glycérol dans les membranes cellulaires. L'acide arachidonique est formé par désaturation de l'acide linoléique, un acide gras essentiel, et dans une moindre proportion à partir des phospholipides (PLs) alimentaires. L'hydrolyse des PLs par des phospholipases A₂, C et D induisent la libération d'acide arachidonique.

Les eicosanoïdes sont issus de trois grandes voies enzymatiques :

- les cyclooxygénases (COX) 1 et 2 sont à l'origine de la formation des prostaglandines (PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂) et du thromboxane B₂ (TXB₂). La COX-1 est exprimée de façon constitutive dans la plupart des cellules tandis que la COX-2 est habituellement exprimée à des niveaux très faibles ou indétectables mais peut être significativement induite par des stimuli tels que des facteurs de croissance et des cytokines (Vane *et al.*, 1998).
- les 5-, 12-, et 15-lipoxygénases (LOX) donnent naissance aux acides 5-, 12- et 15-hydroperoxy-eicosatétraénoïques (HPETE).
- les cytochromes P-450 catalysent la formation d'acides époxyeicosatriénoïques (EETs) et d'acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETEs).

Les cyclooxygénases et les lipoxygénases sont des enzymes qui catalysent l'insertion stéréospécifique de l'oxygène moléculaire à différents niveaux de l'acide arachidonique.

Les lipoxygénases forment une famille d'enzymes de peroxydation lipidique que l'on retrouve chez les végétaux comme chez les animaux (Kuhn *et al.*, 1999). Selon la nomenclature actuelle, c'est le site d'oxygénation sur l'acide arachidonique qui est utilisé pour nommer les enzymes. Il existe chez l'homme une homologie de séquence d'environ 70 % entre la 12-LOX et la 15-LOX et d'environ 40 % entre la 5-LOX et les 12- et 15-LOX.

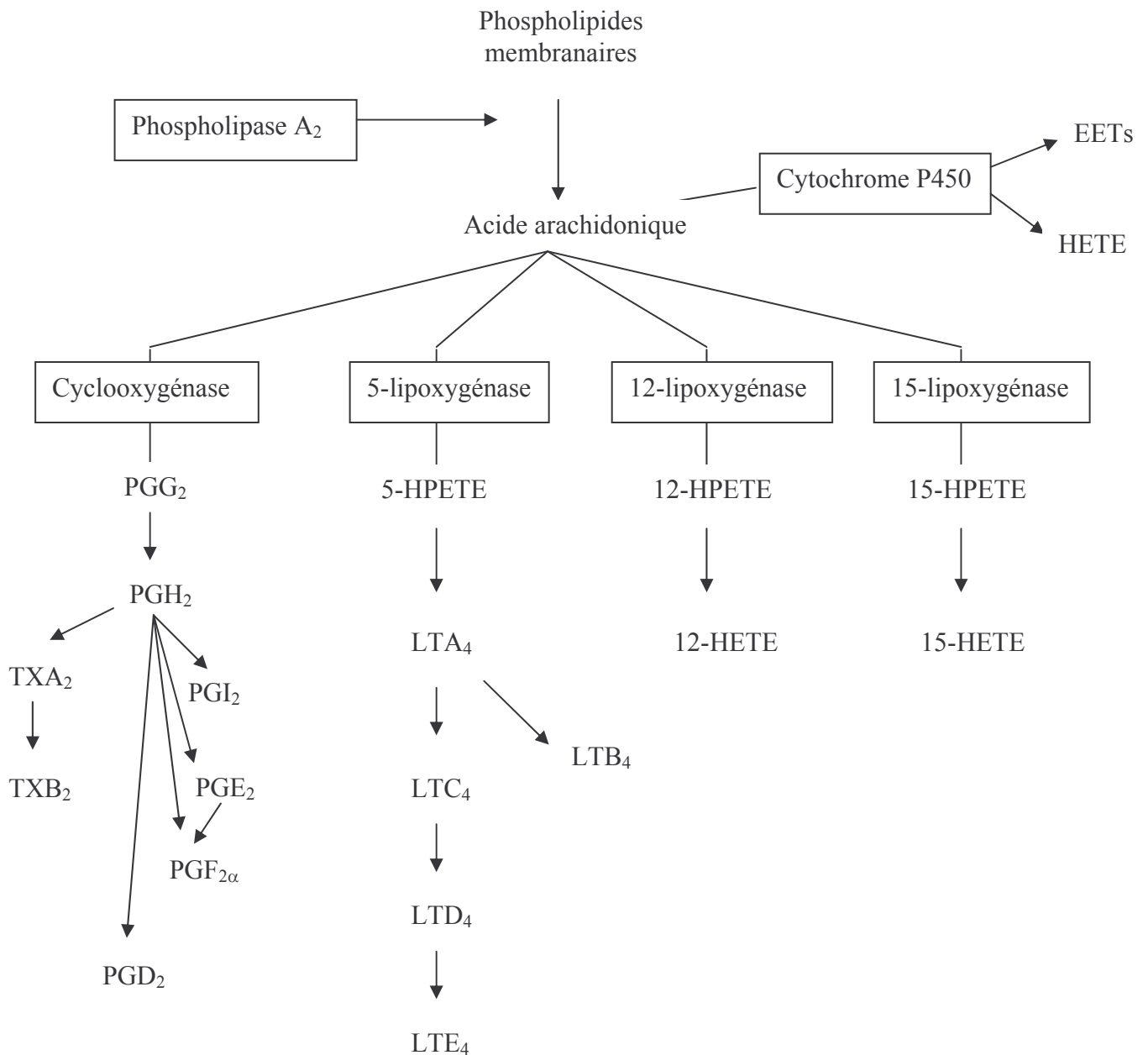


Figure 1 : Métabolisme général des eicosanoïdes.

I.2. Les phospholipases A₂

Il existe plusieurs sortes de phospholipases A₂ (PLA₂) : les PLA₂ sécrétées, les PLA₂ cytosoliques (cPLA₂) et les PLA₂ calcium-indépendantes. Leurs caractéristiques en terme de poids moléculaire, localisation, substrat, concentration optimale de calcium et mécanisme de régulation sont détaillées dans le tableau 1.

	Poids moléculaire	Localisation	Spécificité de substrat	Calcium	Régulation
PLA₂ sécrétées					
Groupe I	14 kDa	Pancréas	Non PLs alimentaires	μm-mM	Post-traduction
Groupe II	14 kDa	Ubiquitaire Plaquettes, Liquide synovial	PLs contenant de l'éthanolamine	μM-mM	Transcription
PLA₂ cytosolique					
	85 kDa	Ubiquitaire	PL contenant de l'AA	nM-μM	Phosphorylation Translocation Transcription
PLA₂ calcium-indépendante					
	40 kDa	Myocarde CML	PL contenant de l'AA (sarcoleme)	Non	Formation d'un complexe avec la phosphofructokinase ATP
	80 kDa	Macrophage		Non	ATP
	28 kDa	Reins	PL contenant de l'AA (plasmalogene)	Non	

Tableau 1 : Caractéristiques des phospholipases A₂ d'après Gijon *et al.* (Gijon *et al.*, 1997).

AA, acide arachidonique.

La cPLA₂ est spécifique des PLs contenant l'acide arachidonique, et est considérée comme étant l'enzyme clé de la libération de l'acide arachidonique pour la synthèse des eicosanoïdes. La cPLA₂ est présente dans le cytoplasme des cellules inactivées. Son activation est calcium-dépendante et fait intervenir la phosphorylation d'un ou plusieurs sites (Ser-505, Ser-727, Ser-515) et la fixation du calcium sur un domaine « calcium-dependent lipid binding » (Gijon *et al.*, 1997). La cPLA₂ subit alors une redistribution vers les membranes cellulaires (Channon *et al.*, 1990) : golgi, reticulum endoplasmique et membrane nucléaire. L'acide arachidonique libéré par l'action de la cPLA₂ est préférentiellement issu des PLs de la membrane nucléaire (Peters-Golden *et al.*, 1996).

Les PLA₂ sécrétées du groupe I sont issues du pancréas et sont impliquées dans l'hydrolyse des PLs alimentaires, tandis que les PLA₂ sécrétées du groupe II (non-pancréatiques) possèdent une distribution ubiquitaire avec une prédominance pour les plaquettes et les exudats inflammatoires. Bien que leur rôle physiologique soit encore méconnu, les PLA₂ sécrétées du groupe II pourraient être à l'origine de la libération d'acide arachidonique et de la production d'eicosanoïdes dans certains types cellulaires tels que les mastocytes.

Les PLA₂ calcium-indépendantes pourraient quant à elles jouer un rôle dans le turnover des acides gras et la régulation de l'estérification de l'acide arachidonique dans les PL.

I.3. Voie de la 5-lipoxygénase

I.3.1. Synthèse des leucotriènes

Les leucotriènes (LTs) sont les métabolites issus de la voie de la 5-LOX (Figure 2, page 18). La 5-LOX catalyse dans un premier temps l'oxygénation de l'acide arachidonique en acide 5(S)-hydroperoxy-6,8,11,14-(E,Z,Z,Z)-eicosatétraénoïque (5-HPETE) puis dans un deuxième temps la déshydratation du 5-HPETE en acide 5(S),6(S)-oxido-7,9,11,15-(E,E,Z,Z)-eicosatétraénoïque, appelé leucotriène A₄ (LTA₄).

Le LTA₄ est un métabolite électrophile instable qui est rapidement converti selon deux voies enzymatiques :

1/ la voie de la LTA₄ hydrolase conduit à la formation de l'acide 5(S),12(R)-dihydroxy-6,8,10,14-(Z,E,E,Z)-eicosatétraénoïque ou leucotriène B₄ (LTB₄) par addition d'une molécule d'eau.

2/ la voie de la LTC₄ synthase (ou glutathion S-transférase II) convertit le LTA₄ en acide 5(S)-hydroxy-6(R)-glutathionyl-7,9,11,14-(E,E,Z,Z)-eicosatétraénoïque ou leucotriène C₄ (LTC₄) par ajout d'un glutathion.

Le clivage du glutathion peut, par la suite, être effectué via l'action d'une γ -glutamyltransférase pour conduire à la formation du leucotriène D₄ (LTD₄). Le métabolite final, le leucotriène E₄ (LTE₄), est obtenu par perte de la glycine sous l'action d'une dipeptidase.

Les leucotriènes C₄, D₄, et E₄ ont en commun une cystéine, acide aminé apporté par le glutathion, et trois doubles liaisons conjuguées. Ils sont regroupés sous le terme général de cystéinyl leucotriènes (CysLTs).

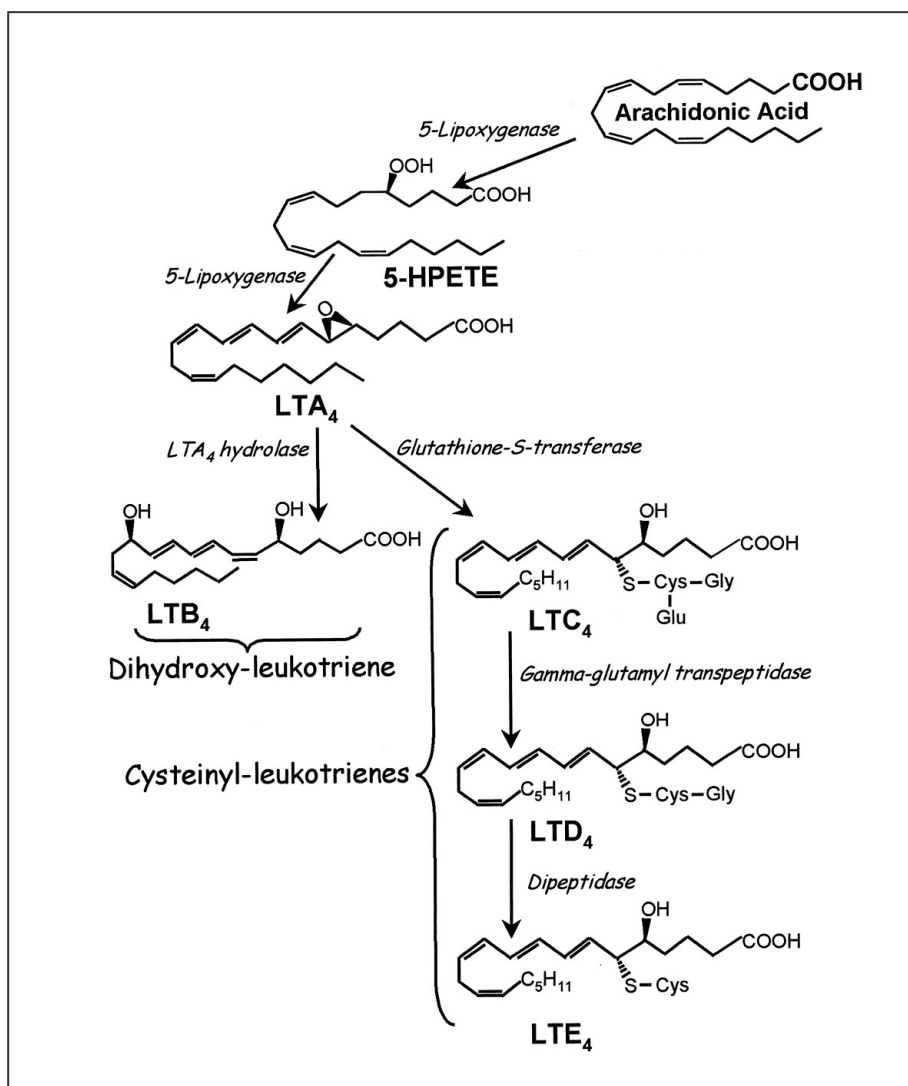


Figure 2 : Voie de synthèse des leucotriènes d'après Brink *et al.* (Brink *et al.*, 2003).

I.3.2. La 5-lipoxygénase

I.3.2.1. Structure

La protéine 5-LOX comporte 673 acides aminés et un atome de fer. Son poids moléculaire est de 77,839 kDa (Dixon *et al.*, 1988; Matsumoto *et al.*, 1988). La 5-LOX n'a pas été cristallographiée à l'heure actuelle, mais les travaux entrepris sur les lipoxygénases végétales et animales ont identifié deux domaines communs : une structure en cylindre (« β -barrel »)

sur la partie amino-terminale et une structure en hélices α sur la partie carboxy-terminale. La figure 3 illustre un exemple de structure secondaire, celui de la 15-LOX de lapin.

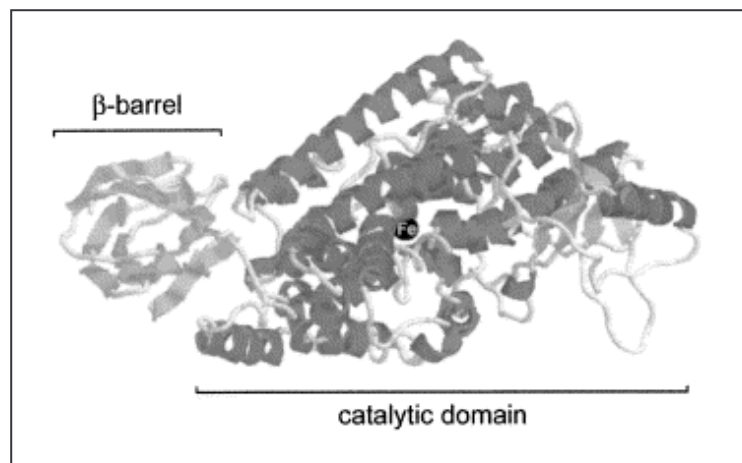


Figure 3 : Structure secondaire de la 15-LOX de lapin d'après Perters-Golden *et al.* (Peters-Golden *et al.*, 2003).

Le motif « β -barrel » peut lier le calcium et est nécessaire à la fixation de la 5-LOX à la membranaire. La partie carboxy-terminale contient l'atome de fer essentiel à l'activité catalytique, ainsi que des sites nécessaires à la migration vers le noyau, la fixation de l'ATP et la phosphorylation par les kinases.

Le gène codant pour la 5-LOX a été isolé et cloné dans les années 80. Il a une taille d'environ 82 kb et est composé de 14 exons de 82 à 613 pb tandis que les introns ont une taille plus importante, de 200 pb à plus de 26 kb (Funk *et al.*, 1989). Le gène a par la suite été localisé sur le chromosome 10 en position 10q11.12 (Funk *et al.*, 1989). L'étude des ADNc de la 5-LOX de diverses espèces animales indique une grande conservation entre les espèces, surtout au niveau carboxy-terminal.

I.3.2.2. Polymorphisme génétique de la 5-lipoxygénase

Lors de la caractérisation du promoteur du gène de la 5-LOX (Hoshiko *et al.*, 1990), des régions de régulation positive et négative ont été identifiées, ainsi que des régions d'ancrage de facteurs de régulation de la transcription (type Sp1 et Egr-1). C'est à ce niveau qu'ont ensuite été identifiés plusieurs mutants. Cette région en amont de l'initiation de la traduction (-212 pb à -88 pb) présente en temps normal 5 motifs GGGCGG en série, et on a pu observer dans certains cas la délétion d'un motif (- 6 pb) ou de deux motifs (- 12 pb) ou encore l'addition d'un motif (+ 6 pb) (In *et al.*, 1997) (Figure 4).

Selon des études sur des constructions gène-rapporteur *in vitro*, chacun de ces mutants induirait une diminution de la transcription du gène codant pour la 5-LOX par diminution de la fixation des facteurs de régulation de la transcription (In *et al.*, 1997).

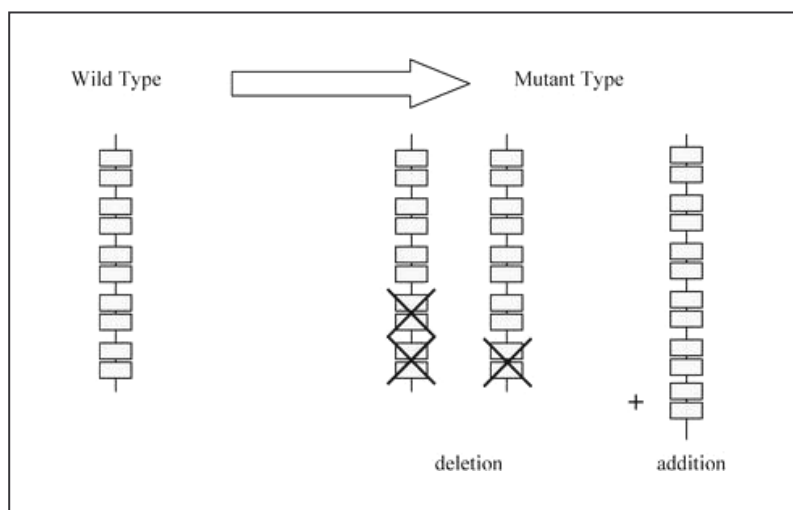


Figure 4 : Représentation schématique de la région promotrice du gène de la 5-lipoxygénase d'après Fowler *et al.* (Fowler *et al.*, 2002). Le type sauvage possède 5 motifs de liaison des facteurs de transcription Sp1/Egr-1. Les mutants en possèdent 3, 4 ou 6.

Ces mutations sont relativement courantes mais leur prévalence est variable en fonction des groupes ethniques : 19,4 % de porteurs de 2 allèles mutés chez les asiatiques, 24 % chez les sujets noirs, 3,6 % chez les hispaniques et 3,1 % chez les sujets blancs non-hispaniques selon une étude américaine (Dwyer *et al.*, 2004).

I.3.2.3. Localisation

La 5-LOX est une enzyme soluble qui, dans les cellules inactivées, est localisée dans le cytoplasme et le noyau. Elle a été caractérisée chez plusieurs espèces animales, et dans un premier temps dans un nombre restreint de cellules : polynucléaire neutrophile, macrophage, monocyte, lymphocyte. La présence de la 5-LOX a ensuite été étendue à d'autres types cellulaires (Tableau 2).

Type cellulaire ou origine tissulaire	Espèce	Référence
Macrophage péritonéal	Rat	(Peters-Golden <i>et al.</i> , 1993)
Macrophage alvéolaire	Homme	(Woods <i>et al.</i> , 1995)
Monocyte	Homme	(Riddick <i>et al.</i> , 1997)
Polynucléaires neutrophiles	Homme	(Rouzer <i>et al.</i> , 1988)
Polynucléaires éosinophiles	Homme	(Brock <i>et al.</i> , 1999)
Polynucléaires basophiles	Rat	(Brock <i>et al.</i> , 1994)
Lymphocytes B	Homme	(Jakobsson <i>et al.</i> , 1995)
Cellules épithéliales	Homme	(Luo <i>et al.</i> , 2003)
Mastocytes	Souris	(Chen <i>et al.</i> , 1995)
Système nerveux central	Rat	(Lindgren <i>et al.</i> , 1984)
Veines et artères intrapulmonaires	Agneau	(Ibe <i>et al.</i> , 1997)
Kératinocytes de la peau	Homme	(Janssen-Timmen <i>et al.</i> , 1995)
Cellules musculaires lisses en culture	Lapin	(Larrue <i>et al.</i> , 1983)
Cellules endothéliales d'artère pulmonaire*	Homme	(Zhang <i>et al.</i> , 2002)

Tableau 2 : Types cellulaires dans lesquels la 5-lipoxygénase a été localisée. * Localisation contestée par certains auteurs.

La 5-LOX peut être activée par différents signaux tels que l'ATP, la phosphatidylcholine et le calcium. L'activation de l'enzyme nécessite une translocation depuis le cytosol et le noyau vers la membrane nucléaire (Figure 5, page 24), où elle interagit avec une protéine membranaire appelée Five Lipoxygenase Activating Protein (FLAP). Cette translocation a été mise en évidence sur des leucocytes humains stimulés par le ionophore calcique A23187 (Rouzer *et al.*, 1988). Le complexe formé avec la FLAP facilite le transfert de l'acide arachidonique vers la 5-LOX. Ce phénomène de translocation calcium-dépendante serait lié à la présence sur la protéine 5-LOX de motifs spécifiques (Peters-Golden *et al.*, 2001) :

- un domaine de liaison du calcium et des lipides dans la région N-terminale
- un domaine en C-terminal qui interagirait avec les protéines du cytosquelette
- des sites de phosphorylation par les kinases

L'activation maximale de la 5-LOX est obtenue avec des concentrations en calcium de l'ordre de 4 à 10 μM . Sa translocation vers la membrane nucléaire induit d'une part une meilleure accessibilité du substrat acide arachidonique présenté par la FLAP, et d'autre part, un meilleur couplage avec les enzymes intervenant par la suite dans la synthèse des LTs.

Paradoxalement, des enzymes clés (cPLA₂, FLAP, 5-LOX et LTC₄ synthase) pour la synthèse des LTs sont co-localisées au niveau nucléaire, alors que les LTs sont ensuite excrétés hors de la cellule (Figure 5, page 24) et ont donc des effets autocrines et paracrines. Cette distribution subcellulaire suggère que les LTs aient d'autres rôles, encore inconnus, dans ou aux alentours du noyau cellulaire. En effet, la 5-LOX a été identifiée au niveau de l'euchromatine (zone de transcription des gènes) et étroitement associée à la chromatine, suggérant un rôle de l'enzyme dans la régulation de la transcription dans le noyau (Peters-Golden *et al.*, 2001). Il a également été décrit que le LTA₄ pouvait se lier de façon covalente à l'ADN et à l'ARN (Hankin *et al.*, 2003).

La 5-LOX est également capable d'aller et venir par les pores nucléaires entre le compartiment cytoplasmique et le noyau dans certaines conditions (Figure 5, flèche en pointillée). Ces mouvements sont indépendants de l'activation calcium-dépendante (Peters-Golden *et al.*, 2001). On a, par exemple, pu observer que le passage de la 5-LOX du compartiment cytosolique vers le noyau lors de l'adhésion des monocytes à l'endothélium avait pour conséquence une augmentation de la capacité de synthèse du LTB₄ par les cellules (Peters-Golden *et al.*, 2000).

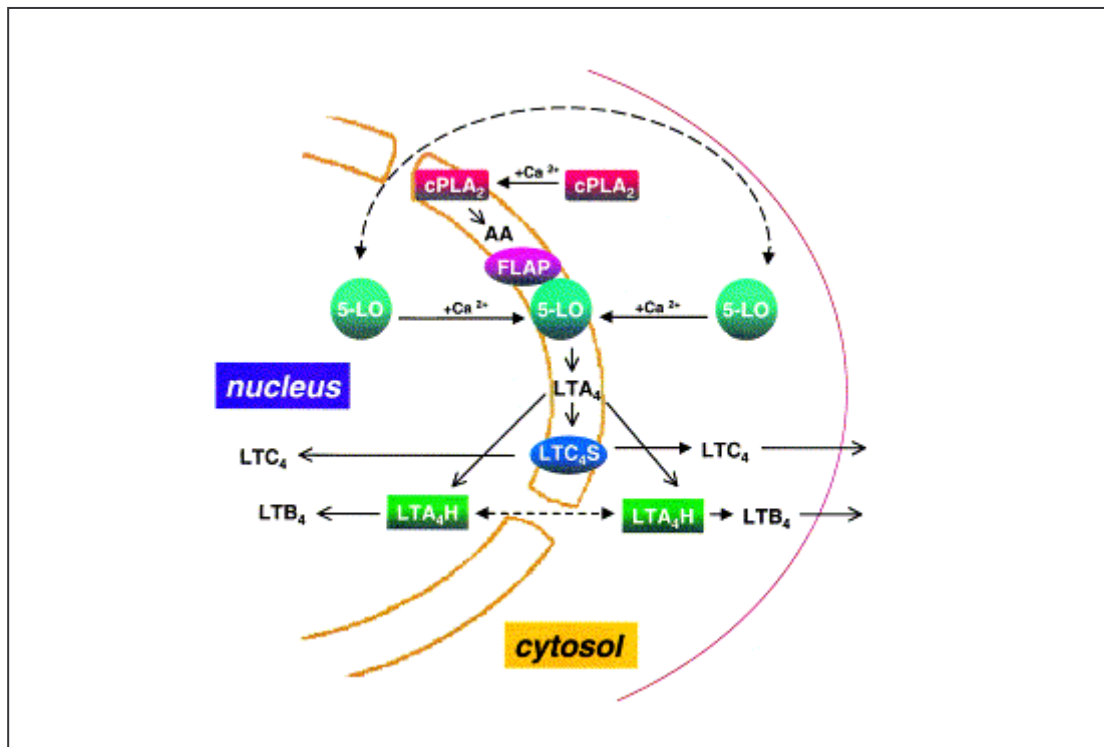


Figure 5 : Compartimentalisation intracellulaire des étapes successives de la synthèse des leucotriènes d'après Peters-Golden *et al.* (Peters-Golden *et al.*, 2001).

Il semble que la localisation subcellulaire de la 5-LOX soit déterminante pour la capacité de la cellule à synthétiser les leucotriènes. La 5-LOX nucléaire agirait au niveau de la membrane

nucléaire tandis que la 5-LOX cytosolique agirait au niveau de la membrane cytoplasmique et périnucléaire. Les travaux de Luo *et al.* ont montré que la 5-LOX possédait des séquences de localisation nucléaire et des sites de phosphorylation indispensables pour la synthèse de LTB₄, et que leur mutation réduisait de 90 % la synthèse de LTB₄ (Luo *et al.*, 2003). Ces séquences correspondent à des séquences riches en résidus basiques vers la région C-terminale et à des motifs riches en leucine tout au long de la protéine. Ces résultats suggèrent que la localisation nucléaire semblerait prépondérante pour la synthèse de LTB₄.

Il existe de plus une voie alternative de synthèse des leucotriènes par mécanisme transcellulaire pour les cellules ne possédant pas la 5-LOX. Il s'agit de l'exportation du LTA₄ produit par les leucocytes vers d'autres types cellulaires, tels que les cellules endothéliales, où il est converti en LTB₄ ou LTC₄ par la LTA₄ hydrolase ou la LTC₄ synthase présentes dans ces cellules. Ce phénomène a été mis en évidence *in vitro* pour les cellules endothéliales notamment (Feinmark *et al.*, 1986) et *in vivo* avec des lignées murines déficientes en 5-LOX et LTA₄ hydrolase (Fabre *et al.*, 2002).

I.3.2.4. Régulation

En résumé, plusieurs niveaux de régulation de la synthèse des CysLTs peuvent être proposés (Peters-Golden *et al.*, 2000) :

- 1/ les concentrations respectives des enzymes nécessaires à la libération de l'acide arachidonique et au métabolisme de la voie de la 5-LOX,
- 2/ les modifications post-traductionnelles (telles que la phosphorylation) qui peuvent altérer l'activité catalytique de ces protéines,

3/ les concentrations des petites molécules ou ions (Ca^{2+} , ATP, glutathion) qui servent de cofacteurs à certaines enzymes (glutathion transférase, 5-LOX,...),

4/ les polymorphismes génétiques des enzymes de la voie de la 5-LOX (5-LOX, FLAP, LTC₄ synthase),

5/ la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur de la 5-LOX. En effet, le traitement de lignées de macrophages qui n'exprimaient pas la 5-LOX par un agent déméthylant induit une augmentation de la synthèse d'ARN messagers de la 5-LOX (Uhl *et al.*, 2002),

6/ la compartimentalisation subcellulaire de la 5-LOX.

I.3.2.5. Inhibition

La synthèse des CysLTs peut être inhibée à différents niveaux de la cascade enzymatique, et plusieurs molécules ont été développées dans ce sens. Outre les inhibiteurs intervenant de façon non spécifique au niveau de la PLA₂ (par exemple les corticoïdes) pour inhiber la synthèse de l'ensemble des eicosanoïdes, certaines molécules sont plus spécifiques des trois lipoxgénases (phénidone, baïcaléine) ou encore de la 5-LOX (le AA861) (Yoshimoto *et al.*, 1982). Le zileuton (Zyflo[®], Abbott), commercialisé aux Etats Unis depuis 1997, est comme le AA861 un inhibiteur direct de la 5-LOX par un mécanisme redox catalysé par le fer.

I.3.3. La Five-Lipoxygenase Activating Protein

La FLAP est une protéine de 18 kDa localisée au niveau de la membranaire nucléaire (3 domaines transmembranaires) et du réticulum endoplasmique périnucléaire (Woods *et al.*, 1993). Elle a pour rôle d'« ancrer » l'acide arachidonique de façon à faciliter l'action de la 5-LOX. Elle a été mise en évidence lors de travaux utilisant le MK-886, qui bloquait la synthèse de leucotriènes mais n'avait que peu ou pas d'effet sur les enzymes impliquées dans la synthèse des leucotriènes (Dixon *et al.*, 1990). Le MK-886 (qui peut être administré par voie orale) inhibe en effet la FLAP et donc la synthèse des LTs. Selon certains auteurs, la FLAP, la LTC₄ synthase et la PGE synthase membranaire sont les trois protéines qui composent la superfamille des MAPEG (« membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism ») (Peters-Golden *et al.*, 2003).

Le gène codant pour la FLAP (31 kb) est composé de 5 exons de petite taille (71 à 478 pb) et de 4 grands introns (4,2 à 9 kb).

Des travaux plus récents se sont intéressés à l'organisation des enzymes de la synthèse des leucotriènes au niveau membranaire et ont mis en évidence la présence de deux multimères distincts incluant la FLAP et la LTC₄ synthase (Mandal *et al.*, 2004) (Figure 6, page 28).

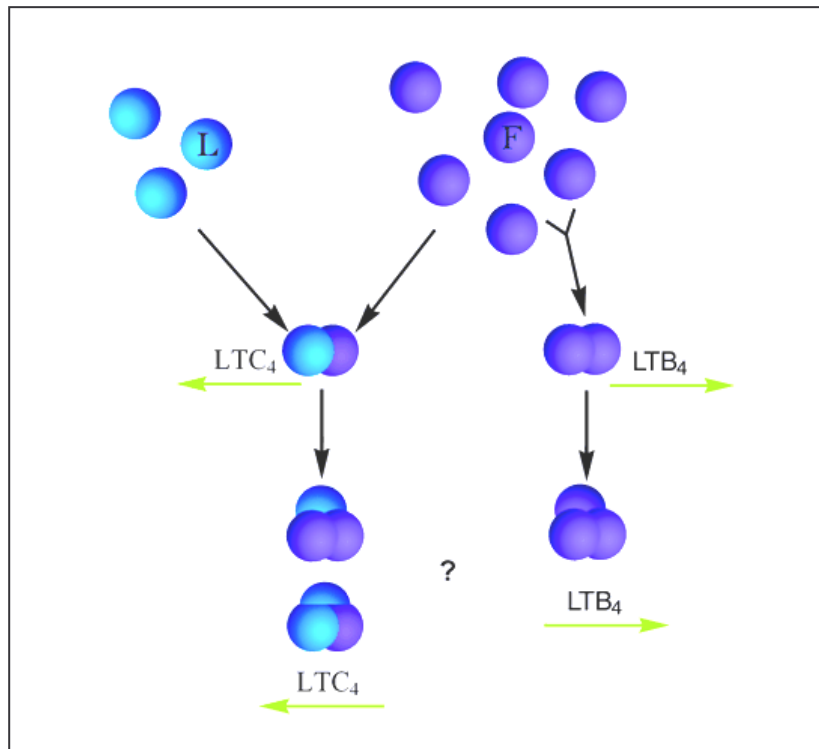


Figure 6 : Modèles d'interaction entre la FLAP (F) et la LTC₄ synthase (L) d'après Mandal *et al.* (Mandal *et al.*, 2004).

L'un des multimères, correspondant à l'association de la LTC₄ synthase et de la FLAP, serait dédié à la synthèse du LTA₄ et du LTC₄, tandis que l'autre multimère, formé de plusieurs FLAP, serait orienté vers la synthèse de LTA₄ et de LTB₄.

I.3.4. La LTA₄ hydrolase

La LTA₄ hydrolase est une protéine monomère soluble dont la distribution est ubiquitaire. Elle est présente dans le cytosol et le noyau, et possède deux sites catalytiques : une activité epoxyde hydrolase zinc-dépendante et une activité aminopeptidase. C'est cette dernière propriété qui la classe dans la famille des zinc-métallopeptidases (Haeggstrom, 2004). L'activité aminopeptidase interviendrait dans le clivage de peptides en relation avec l'inflammation et l'immunité.

L'activité epoxyde hydrolase est hautement spécifique du LTA₄. La LTA₄ hydrolase catalyse la synthèse de LTB₄ dans les cellules possédant la 5-LOX ou dans les cellules ne possédant pas de 5-LOX par transfert transcellulaire de LTA₄.

Compte tenu du rôle du LTB₄ dans l'inflammation aiguë et chronique, la LTA₄ hydrolase est une cible potentielle pour le développement de médicaments anti-inflammatoires. La bestatine (inhibiteur des aminopeptidases) et le captopril (inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I) inhibent également la LTA₄ hydrolase (Orning *et al.*, 1991). Plusieurs molécules plus sélectives et plus efficaces ont été développées par la suite. Le SC-57461A est par exemple capable de bloquer (IC₅₀ = 49 nM) *ex vivo* la production de LTB₄ induite par le calcium dans le sang total. Un traitement par voie orale chez le rat diminue également l'œdème induit par application d'acide archidonique sur l'oreille (Kachur *et al.*, 2002).

I.3.5. La LTC₄ synthase

La LTC₄ synthase est une protéine de la membrane nucléaire spécifiquement responsable de la conjugaison du LTA₄ avec le glutathion pour former le LTC₄. Elle appartient à la famille des glutathion transférases, qui comprend également deux glutathion S-transférases microsomales (mGST-II et mGST-III). La LTC₄ synthase est une enzyme de 18 kDa localisée dans les cellules hématopoïétiques qui possèdent (éosinophiles, basophiles, macrophages/monocytes) ou pas (plaquettes) de la 5-LOX (Lam, 2003), ainsi que dans les cellules musculaires lisses (CML) et les cellules endothéliales.

Les glutathion transférases catalysent quant à elles la conjugaison du glutathion avec le LTA₄ mais également avec des xénobiotiques dans les cellules ne possédant pas la 5-LOX. Leur localisation hépatique et la nécessité d'un transfert transcellulaire du LTA₄ suggèrent un rôle dans les mécanismes de détoxification tandis que leur localisation dans les cellules endothéliales vasculaires et les CML serait dévolue à la conversion du LTA₄ en LTC₄.

La LTC₄ synthase est une protéine de 18 kDa fonctionnant sous forme d'homodimère, dont l'activité est augmentée par les ions Mg²⁺ et inhibée par les ions Co²⁺. Le gène codant pour la LTC₄ synthase se situe sur le chromosome 5 et possède 5 exons et 4 introns (2,5 kb au total).

Plusieurs éléments indiquent une grande homologie entre la LTC₄ synthase et la FLAP :

- les jonctions intron/exon et l'organisation des gènes sont les mêmes,
- il existe une homologie de séquence de 31 % sur l'ensemble des acides aminés et de 44% dans la région N-terminale qui inclu un domaine de fixation de l'inhibiteur de la FLAP,
- leur structure secondaire est similaire : 3 domaines transmembranaires et 2 boucles hydrophiles,

- le MK-886 inhibe à la fois la LTC₄ synthase (IC₅₀ = 11 μM) et la FLAP (IC₅₀ = 100 nM) (Peters-Golden *et al.*, 2003).

Les acides aminés Arg-51 et Tyr-93 sont essentiels à l'activité de la LTC₄ synthase. Ils sont impliqués respectivement dans l'ouverture du cycle epoxyde du LTA₄ et dans le formation de l'anion thiolate du glutathion. Le résidu Tyr-93 est présent à la fois chez mGST-II, mGST-III et la FLAP, tandis que Arg-51 n'est retrouvé que chez les glutathion transférases.

Un polymorphisme génétique au niveau de la région promotrice (-444A→C) a été observé avec une fréquence augmentée par rapport à la population générale chez des patients polonais souffrant d'asthme déclenché par l'aspirine (Sanak *et al.*, 1997), mais pas dans deux études réalisées aux Etats-Unis (Van Sambeek *et al.*, 2000) et au Japon (Kawagishi *et al.*, 2002). Ces dernières n'ont pas observé de conséquences fonctionnelles (niveau de transcription et activité enzymatique) de ce polymorphisme.

II. Récepteurs des leucotriènes

Plusieurs types de récepteurs ont été jusqu'à présent caractérisés chez l'homme. Il existe deux récepteurs spécifiques du LTB₄ (les récepteurs BLT₁ et BLT₂), et trois récepteurs spécifiques des CysLTs (le CysLT₁, le CysLT₂ et un récepteur « non CysLT₁-non CysLT₂ »). Une synthèse des données de la littérature concernant les récepteurs et les propriétés des leucotriènes a été publiée dans « Pharmacological Reviews » en 2003 (Brink *et al.*, 2003).

II.1. Récepteurs du LTB₄

Les récepteurs BLT₁ et BLT₂ sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires, couplés à une protéine G. Ils sont à l'origine des propriétés de chimiotactisme, d'adhésion des leucocytes et de dégranulation des polynucléaires neutrophiles. Le BLT₁ est majoritairement exprimé au niveau des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, et dans une bien moindre quantité dans la rate, le thymus, le cœur et le muscle squelettique (Tager *et al.*, 2003). Il a été cloné en 1997 par Yokomizo *et al.* (Yokomizo *et al.*, 1997). Il est activé à la fois par le LTB₄ et par le 12-HETE.

Le BLT₂ est exprimé de façon beaucoup plus ubiquitaire notamment dans les leucocytes, la rate et le foie, et dans une moindre quantité dans certains tissus tels que le cœur, le muscle et le poumon. Il a été cloné en 2000 par Kamohara *et al.* (Kamohara *et al.*, 2000). Les principales caractéristiques des récepteurs BLT sont détaillées dans le tableau 3 de la page 34.

II.2. Récepteurs des cystéinyl leucotriènes

Ce sont également des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (Figure 7, page 33). Le développement d'antagonistes puissants et spécifiques des CysLTs a permis, sur la base

Les récepteurs CysLT₁ sont localisés notamment au niveau des leucocytes, de la rate, des CML bronchiques et de l'intestin ainsi qu'au niveau de l'endothélium vasculaire. Les récepteurs CysLT₂ ont été caractérisés au niveau des leucocytes, de la rate, des CML et de l'endothélium des veines et artères pulmonaires, des CML du cœur, et des CML et de l'endothélium vasculaire (Walch *et al.*, 2000).

Parmi les antagonistes du récepteur CysLT₁ seul le montélukast, Singulair® (MSD Chibret) est commercialisé en France dans l'asthme persistant léger à modéré insuffisamment contrôlé par corticothérapie et en traitement préventif de l'asthme induit par l'effort. Le BAY-u9773 est un antagoniste mixte des récepteurs CysLT₁ et CysLT₂.

	BLT ₁	BLT ₂	CysLT ₁	CysLT ₂
Affinité des ligands	LTB ₄ > 20(OH)-LTB ₄ ≥ 12-(R)-HETE	LTB ₄ >12(S)-HETE >12(S)-HPETE >15(S)- HETE >20(OH)-LTB ₄	LTD ₄ ≥ LTC ₄ > LTE ₄	LTD ₄ = LTC ₄ > LTE ₄
Gène et chromosome	14q11.2-q12	14q11.2-q12	Xq13-q12	13q14.2
Couplage	G ₁₆ , G _{i2}	G _q -like, G _i -like, G _z -like	G _{αq}	G _{αq}
Antagonistes	CP105696, U75302, CP195543, ONO4057, ZK158252	CP195543, ONO4057, ZK158252, LY244283	Montelukast, zafirlukast, pranlukast, BAY-u9773, pobilukast, ICI 198615, MK571	BAY-u9773
Acides aminés	352 aa	358 aa	337 aa	346 aa
Homologie	45,2 %		37,3%	

Tableau 3: Caractéristiques des récepteurs des leucotriènes d'après Jala *et al.* (Jala *et al.*, 2004).

L'existence d'un troisième récepteur pour les CysLTs a été suggérée par des études fonctionnelles sur artère pulmonaire humaine et porcine (Back *et al.*, 2000; Back *et al.*, 2000).

En effet, ces études montrent que la contraction au LTC₄ est résistante au MK571, au BAY-u9773 ainsi qu'au LTE₄ (Figure 8). L'ensemble des études fonctionnelles suggérant l'existence d'un troisième récepteur pour les CysLTs a récemment été détaillé par Norel *et al.* (Norel *et al.*, 2004).

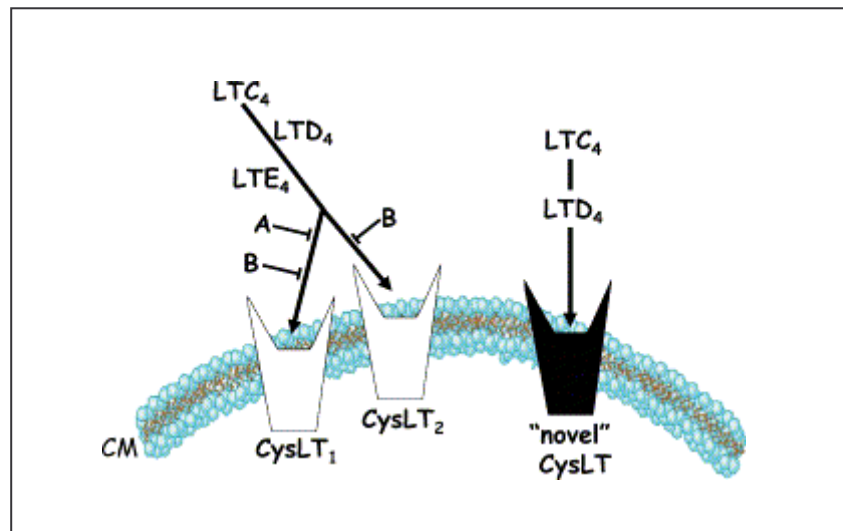


Figure 8 : Représentation schématique des récepteurs CysLT₁, CysLT₂ et d'un troisième récepteur (« novel » CysLT) pour lequel il n'y a pas d'antagoniste connu, d'après Norel *et al.* (Norel *et al.*, 2004). La fixation des LTC₄, LTD₄ et LTE₄ est bloquée par des antagonistes spécifiques du récepteur CysLT₁ (A) ou par un antagoniste mixte CysLT₁-CysLT₂ (B).

III. Propriétés pharmacologiques des leucotriènes

III.1. Effets vasculaires du leucotriène B₄

Le LTB₄ n'a pas d'effet sur le tonus de base de diverses préparations vasculaires telles que les veines saphènes et les artères mammaires internes humaines (Allen *et al.*, 1994). En revanche, il provoque la contraction de l'artère pulmonaire de cochon d'Inde via la stimulation des récepteurs BLT₁ (Sakata *et al.*, 2004).

Ce sont ses propriétés de chimiotactisme envers les leucocytes qui ont été dans un premier temps mises en évidence (Ford-Hutchinson *et al.*, 1980). Le LTB₄ stimule également la dégranulation des polynucléaires neutrophiles et favorise l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire. Il participe ainsi aux phénomènes d'allergie et aux réactions inflammatoires ainsi qu'à l'initiation du processus d'athérosclérose.

Le LTB₄ est, de plus, un ligand des PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptors) ; récepteurs nucléaires hormonaux qui contrôlent l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie lipidique tels que ceux du métabolisme des acides gras (Devchand *et al.*, 1996). L'activation des PPAR α par le LTB₄ pourrait activer la réponse inflammatoire, notamment au niveau des cellules endothéliales où les PPAR α sont fortement exprimés (Lee *et al.*, 2000).

III.2. Effets vasculaires des cystéinyl leucotriènes *in vitro*

Les effets vasculaires des CysLTs sont très variables selon l'espèce, le territoire vasculaire et le contexte physiopathologique étudié (Walch *et al.*, 2000; Brink *et al.*, 2003). En fonction de la concentration et du niveau de pré-contraction du vaisseau, on peut observer l'absence d'effet, une contraction ou une relaxation. Les LTC₄ et LTD₄ induisent des contractions

similaires en terme de puissance et d'efficacité tandis que le LTE₄ est moins puissant et se comporte comme un agoniste partiel des récepteurs CysLT₂ (Labat *et al.*, 1992).

Sur le tonus de base des préparations vasculaires animales, les leucotriènes C₄ et D₄ n'induisent soit pas d'effet (aorte de rat et de lapin), soit une contraction (aorte de rat spontanément hypertendu (SHR), veine rénale de lapin, aorte de cobaye). Sur le tonus de base des préparations humaines, les CysLTs sont susceptibles d'induire une contraction ou pas d'effet comme résumé dans le tableau 4.

Préparations vasculaires	LTC ₄	LTD ₄	LTE ₄	Références
Artère pulmonaire	Contraction	Contraction	Contraction	(Labat <i>et al.</i> , 1992)
Veine pulmonaire	Contraction	Contraction	Contraction	(Labat <i>et al.</i> , 1992)
Veine saphène	Contraction	Contraction	Contraction faible	(Allen <i>et al.</i> , 1994)
Artère mammaire interne	Pas d'effet Contraction faible	Contraction faible Contraction	Pas d'effet Pas d'effet	(Allen <i>et al.</i> , 1994) (Stanke-Labesque <i>et al.</i> , 2000)
Artère coronaire saine	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	(Allen <i>et al.</i> , 1998)
Artère athéromateuse	Contraction	Contraction	Non déterminé	(Allen <i>et al.</i> , 1998)

Tableau 4 : Effets *in vitro* des cystéinyl leucotriènes sur le tonus de base de différents territoires vasculaires chez l'homme.

En revanche, lorsque les préparations vasculaires sont précontractées (par la phényléphrine par exemple), les CysLTs peuvent provoquer une relaxation suivie d'une contraction transitoire. Cet effet biphasique a été observé sur des vaisseaux d'origine animale (Walch *et al.*, 2000) ou humaine (Allen *et al.*, 1992; Stanke-Labesque *et al.*, 2000). Sur artères rénales canines précontractées par la phényléphrine, le LTD₄ et le LTC₄ entraînent une relaxation

endothélium-dépendante (Secrest *et al.*, 1988). Les résultats de cette étude suggèrent que la relaxation médiée par le LTD₄ et le LTC₄ pourrait être due à la libération de NO.

Les LTC₄ et LTD₄ sont des médiateurs importants de l'allergie et des réactions inflammatoires. Ils augmentent la perméabilité vasculaire et participent avec d'autres médiateurs à la formation de l'œdème.

Le LTE₄ possède des propriétés chimiotactiques pour les éosinophiles et les neutrophiles (Henrotin *et al.*, 2001).

Plusieurs études *in vitro* ont montré la capacité des CysLTs à stimuler la prolifération de divers types cellulaires tels que les CML (Palmberg *et al.*, 1987) et les cellules épithéliales (Leikauf *et al.*, 1990). Sur les CML en culture de rat, l'effet mitogénique du LTD₄ semble plus puissant que celui du LTC₄, tandis que le LTE₄ apparaît sans effet sur la prolifération cellulaire (Porreca *et al.*, 1996). Cet effet sur la prolifération cellulaire est inhibé par le MK571, ce qui suggère une médiation via les récepteurs CysLT₁ (Porreca *et al.*, 1996).

III.3. Effets vasculaires des cystéinyl leucotriènes *in vivo*

L'injection intraveineuse de LTC₄ ou de LTD₄ (0,5-10 µg/kg) chez le rat induisent des modifications des paramètres hémodynamiques : baisse du débit de perfusion rénal et de la fréquence cardiaque, accompagnée d'une augmentation des résistances vasculaires systémiques et rénales ainsi que de la pression artérielle moyenne (Allen *et al.*, 1990). L'administration chez l'animal d'antagonistes des récepteurs des CysLTs a mis à jour une grande variabilité dans la distribution des récepteurs d'une espèce à une autre mais également dans les différents territoires vasculaires (Brink *et al.*, 2003).

Récemment, les travaux de Hui *et al.* ont conduit à la mise au point d'un modèle de souris transgéniques avec une surexpression au niveau des cellules endothéliales du récepteur CysLT₂ des cellules endothéliales humaines. La réponse vasopressive secondaire à l'administration intraveineuse de LTC₄ était réduite chez les souris transgéniques en parallèle d'une augmentation de la production de NO. Ces résultats suggèrent un rôle vasorelaxant des récepteurs CysLT₂, via la libération de NO, et un rôle modulateur de la pression artérielle systémique (Hui *et al.*, 2004).

**2^{ème} Chapitre : Leucotriènes et pathologies
cardiovasculaires**

De plus en plus d'arguments sont en faveur d'un rôle des LTs dans l'initiation et l'évolution des pathologies cardiovasculaires, en raison de leurs effets pro-inflammatoires, vasomoteurs sur les petits et les gros vaisseaux, stimulants de la prolifération cellulaire et de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire (Folco *et al.*, 2000).

I. Athérosclérose et Inflammation

De nombreux travaux indépendants les uns des autres ont mis en exergue depuis ces dernières années l'implication des LTs dans le développement et la progression de l'athérosclérose.

I.1. Données issues des souris transgéniques

Dans un premier temps, un locus sur le chromosome 6 de la souris a été identifié, qui conférait une résistance presque totale à l'athérogénèse, même sur un modèle d'hypercholestérolémie, les souris knock-out pour le récepteur aux LDL (LDLR^{-/-}). Mehrabian *et al.* ont démontré par la suite qu'au sein de ce locus, le gène de la 5-LOX contribuait de façon majeure à la susceptibilité vis à vis de l'athérosclérose chez la souris (Mehrabian *et al.*, 2002). En effet, en croisant des souris knock-out hétérozygotes pour le gène de la 5-LOX (5-LOX^{+/-}) et des souris LDLR^{-/-}, ils ont obtenu des animaux dont les lésions aortiques d'athérosclérose étaient considérablement réduites (de 95 %) par rapport aux souris LDLR^{-/-}, et ce malgré le même régime hypercholestérolémiant que les souris LDLR^{-/-}. Le niveau d'expression de l'ARN messager de la 5-LOX et de la protéine 5-LOX était de l'ordre de 15 % chez les souris 5-LOX^{+/-} par rapport aux souris 5-LOX^{+/+}, et il n'était pas altéré chez les souris LDLR^{-/-}. De plus, l'étude des lésions d'athérosclérose mettait en évidence l'expression de la 5-LOX, surtout dans les régions riches en macrophages.

En utilisant les mêmes souris LDLR^{-/-} mais aussi un modèle de souris knock-out pour l'apolipoprotéine E (apoE^{-/-}), Aiello *et al.* ont obtenu une diminution de l'accumulation des lipides, de l'infiltration des monocytes et de la taille des lésions d'athérosclérose par traitement par un antagoniste spécifique du récepteur BLT₁, le CP-105696 (Aiello *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces travaux suggère que les dérivés de la 5-LOX sont impliqués dans le développement et la progression des lésions d'athérosclérose chez l'animal.

I.2. Données issues des polymorphismes génétiques de la 5-lipoxygénase et de la FLAP

Les conséquences *in vivo* du polymorphisme génétique de la région promotrice de la 5-LOX ont initialement été observées dans le domaine de l'asthme. Une étude a en effet montré que les sujets porteurs de 2 allèles mutés ne répondaient pas à un traitement par inhibiteur de la 5-LOX (pas d'amélioration du volume expiratoire maximal/seconde), suggérant que chez ces patients, les LTs ne seraient pas une composante essentielle de leur asthme du fait d'une diminution de la production de la 5-LOX et de ses dérivés (Drazen *et al.*, 1999).

D'autres travaux, réalisés sur une cohorte de volontaires sains, ont par la suite mis en évidence un lien entre mutation sur la région promotrice de la 5-LOX et augmentation de l'épaisseur intima-média carotidienne, marqueur prédictif d'athérosclérose (Dwyer *et al.*, 2004). Les sujets porteurs de 2 allèles mutés présentent un risque athérogène aussi important que le diabète, et ce risque est augmenté chez ceux qui ont un régime alimentaire riche en acides gras omega-6 (acide arachidonique et son précurseur l'acide linoléique). Les auteurs suggèrent que l'augmentation du risque d'athérosclérose est liée à une augmentation de la

production de LTs via une augmentation de l'expression ou de l'activité de la 5-LOX chez les sujets porteurs de 2 allèles mutés.

Ces résultats sont en contradiction avec les résultats obtenus *in vitro* avec les constructions gène-rapporteur, qui indiquaient une diminution de l'expression de la 5-LOX comme conséquence des mutations sur la région promotrice (In *et al.*, 1997; Silverman *et al.*, 1998). Les résultats obtenus *in vitro* ont cependant des limites. Il se peut en effet que les constructions promoteur-gène rapporteur utilisées *in vitro* ne reflètent pas les processus de l'inflammation vasculaire *in vivo*, et que les effets des mutations au niveau des motifs Sp1 sur la production de LTs ne puissent être détectés que dans certains types cellulaires et dans certaines conditions.

D'autre part, un haplotype variant du gène de la FLAP (haplotype HapA) a été associé à un doublement du risque d'infarctus du myocarde et à une augmentation significative de la production de LTB₄ par les polynucléaires neutrophiles stimulés chez les patients ayant présentés un infarctus du myocarde par rapport à des patients ne présentant pas cet haplotype variant (Helgadottir *et al.*, 2004).

I.3. Implications des leucotriènes dans les mécanismes de l'athérosclérose et de l'inflammation

Les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les CML sont trois acteurs déterminants dans le processus inflammatoire de l'athérosclérose. Certaines étapes essentielles sont illustrées par la figure 10 (page 46) et détaillées ici.

- L'adhésion des monocytes par chimiotactisme et la migration dans la paroi vasculaire.

L'accumulation des LDL oxydés et la synthèse par les cellules endothéliales de molécules d'adhésion, de chemokines et de facteurs de croissance pour recruter les monocytes et les lymphocytes sont des éléments initiateurs de l'athérosclérose auxquels les dérivés de la voie de la 5-LOX participent (Figure 9).

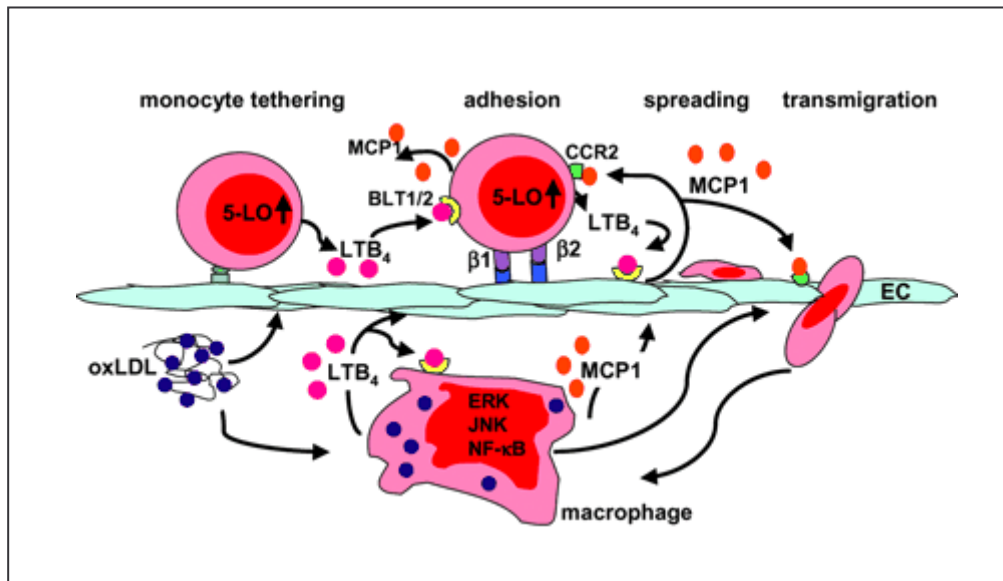


Figure 9 : Modèle d'initiation de l'activation et du recrutement des monocytes, puis de leur adhésion à l'endothélium et transmigration dans l'intima d'après Mehrabian *et al.* (Mehrabian *et al.*, 2004). LDL, Low-Density Lipoprotein ; MCP-1, Monocyte Chemotatic Protein-1; CCR2, CC-chemokine Receptor-2 ; ERK, Extracellular signal Regulated Kinase ; JNK, Jun N-terminal Kinase.

Le LTB₄ induit l'expression de molécules d'adhésion telles que MCP-1 (monocyte chemotatic protein-1) via les récepteurs BLT₁, et l'augmentation de l'expression de protéines kinases (ERK, JNK) et de NF-κB (Figure 9)(Huang *et al.*, 2004). Les travaux de Aiello *et al.* ont montré que le blocage des récepteurs BLT₁ diminuait non seulement l'activité chimiotactique du LTB₄ mais également son rôle dans l'adhésion à l'endothélium et dans la

transmigration des monocytes dans l'espace sous-endothélial (Aiello *et al.*, 2002). Cette étude montrait également que le blocage des récepteurs BLT₁ induisait une réduction des taux de MCP-1 suggérant à nouveau que les récepteurs BLT₁ sont impliqués dans la synthèse des molécules d'adhésion.

Après adhésion à l'endothélium, les monocytes possèdent une localisation intranucléaire de la 5-LOX et une capacité de synthèse de LTB₄ après stimulation par le calcium cinq fois plus importante en comparaison des monocytes ayant une 5-LOX cytosolique (Woods *et al.*, 1995; Peters-Golden *et al.*, 2000).

Les LTC₄ et D₄ induisent l'expression de P-sélectine par les cellules endothéliales via des récepteurs non-CysLT₁ (Pedersen *et al.*, 1997). De plus, le prétraitement des cellules endothéliales par des inhibiteurs de la 5-LOX réduit significativement l'expression de gènes codant pour des protéines d'adhésion vasculaire induits par les cytokines (Lee *et al.*, 1997).

- La différenciation et prolifération cellulaire

Divers facteurs de croissance stimulent la prolifération et la différenciation des macrophages dans l'intima (Figure 10, page 46). Le GM-CSF, facteur de croissance des granulocytes-macrophages, augmente l'activité de la PLA₂, active la transcription du gène de la 5-LOX et l'expression de la protéine (Krump *et al.*, 1994) et augmente l'expression de la FLAP. L'ensemble de ces effets conduit à une augmentation de la synthèse de LTB₄ (Krump *et al.*, 1994). De plus, les métabolites de la 5-LOX, et en particulier le 5-HETE, ont un effet direct sur le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (Romano *et al.*, 2001), qui participe à la progression de la plaque d'athérosclérose.

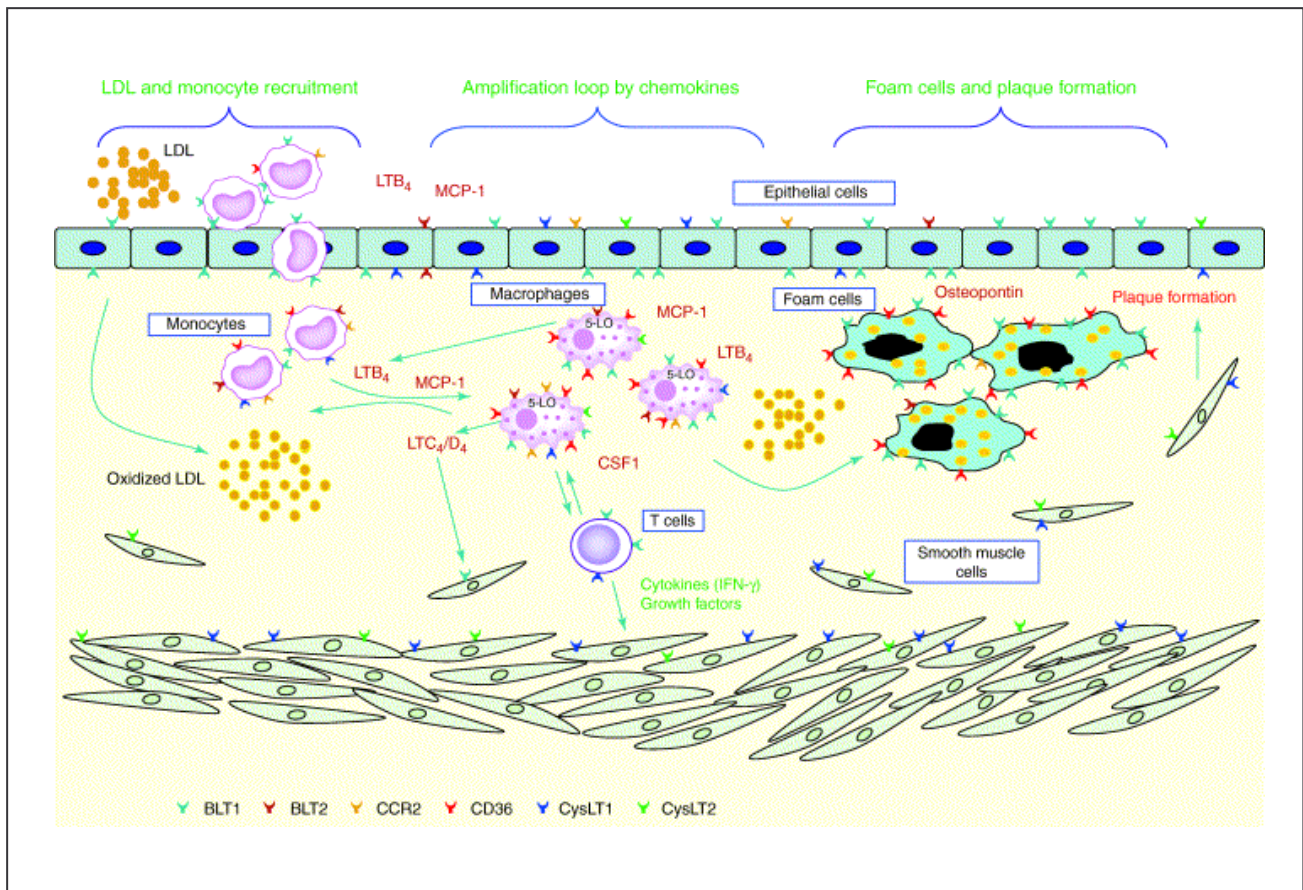


Figure 10 : Rôle des leucotriènes dans les différentes étapes de l'athérosclérose, d'après Jala *et al.* (Jala *et al.*, 2004). LDL, low-density lipoprotein ; MCP-1, monocyte chemotatic protein-1; CSF, colony-stimulating factor ; CCR2, CC-chemokine receptor-2.

- L'hyperplasie de l'intima

L'accumulation des lipides sur la paroi vasculaire et la prolifération des CML contribuent à la production de la matrice extracellulaire et à la croissance de la plaque d'athérome. Un grand nombre de cytokines pro-inflammatoires sont exprimées dans les lésions d'athérosclérose. L'interleukine-1 β et le TNF- α ont par exemple un rôle direct dans l'hyperplasie et la prolifération des CML. Le LTB₄ induit la sécrétion par les monocytes humains d'interleukine-1 β tandis que l'inhibition de la 5-LOX ou de la FLAP en diminue la production par les monocytes activés (Devaraj *et al.*, 1999).

Chez l'homme, des études récentes ont mis en évidence au niveau de lésions d'athérosclérose de l'aorte et des artères coronaires et carotidiennes chez l'homme, une expression abondante, augmentant avec la sévérité des lésions, des acteurs de la voie de la 5-LOX (Spanbroek *et al.*, 2003). Les transcrits de la 5-LOX y étaient particulièrement abondants (600 fois plus que pour la 15-LOX), et la protéine était également retrouvée par western blot. La présence des autres constituants de la cascade étaient observée : LTA₄ hydrolase, FLAP, LTC₄ synthase, BLT₁, BLT₂, CysLT₁ et CysLT₂.

La production systémique de CysLTs peut être estimée par la mesure dans les urines du LTE₄, métabolite final stable de la voie de la 5-LOX (Kumlin, 2000).

La mesure de l'excrétion urinaire du LTE₄ est augmentée dans plusieurs pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose (Allen *et al.*, 1993) et l'infarctus du myocarde (Carry *et al.*, 1992). Ces données sont en faveur de l'intérêt d'une évaluation plus approfondie de la mesure du LTE₄ urinaire comme bio-marqueur non invasif de l'inflammation et des pathologies cardiovasculaires.

Au vu de ces données, il apparaît que la voie de la 5-LOX constitue une nouvelle cible thérapeutique potentielle (enzymes de la voie de synthèse et récepteurs) dans la prise en charge des maladies inflammatoires cardiovasculaires telles que l'athérosclérose.

I.4. Le système rénine-angiotensine et l'athérosclérose

I.4.1. Synthèse de l'angiotensine II

L'angiotensinogène est une glycoprotéine principalement synthétisée dans le foie, et qui est catabolisée par la rénine en angiotensine I. La rénine est elle-même synthétisée dans le rein sous forme de prorénine qui donne la rénine mature au niveau des granules de sécrétion des cellules myoépithélioïdes des artérioles afférentes aux glomérules rénaux (appareil juxta-glomérulaire). La libération de rénine mature peut être contrôlée par les neurotransmetteurs du système sympathique, par la barosensibilité, par la macula densa adjacente aux cellules juxta-glomérulaires ainsi que par un rétrocontrôle négatif exercé par l'Ang II sur les récepteurs AT₁ et AT₂ (Siragy *et al.*, 2004)(Figure 11).

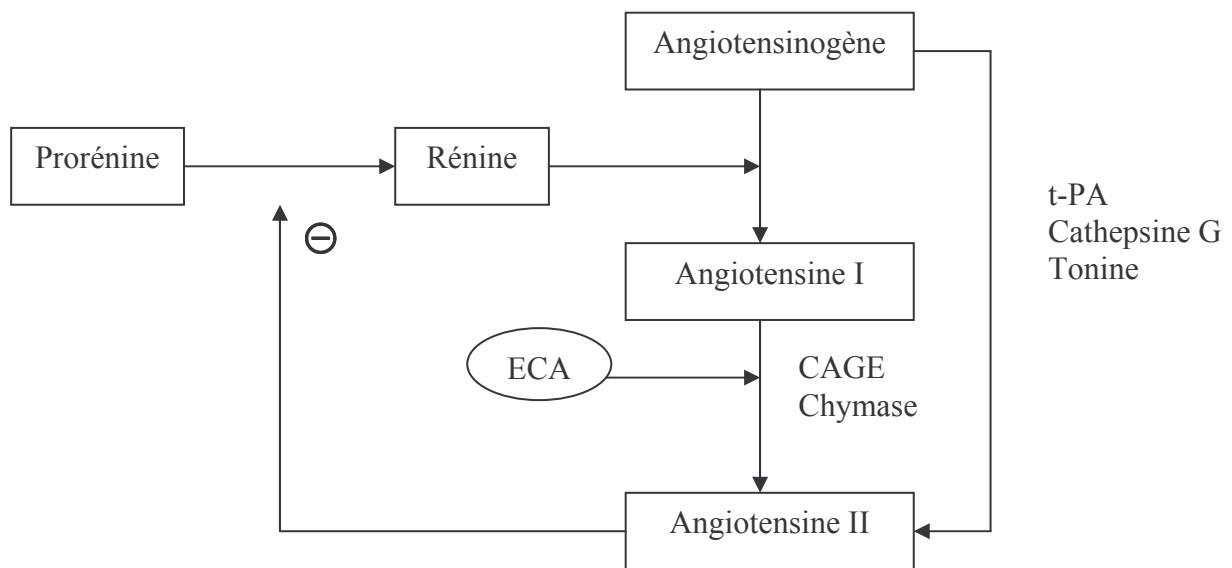


Figure 11 : Formation de l'angiotensine II à partir de l'angiotensinogène.

L'angiotensine I est un décapeptide biologiquement inactif. Il doit subir le clivage des deux acides aminés terminaux par l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) pour donner l'Ang II. L'ECA est également active sur d'autres substrats tels que les bradykinines. La distribution de l'ECA est ubiquitaire : dans le plasma (en tant qu'enzyme circulante), dans les organes (cœur, cerveau, reins, foie) et dans l'endothélium et l'adventice des vaisseaux.

D'autres enzymes sont capables de transformer l'angiotensine I en Ang II active. Il s'agit d'un groupe d'enzymes tissulaires présent notamment au niveau aortique (adventice), les Chymostatin sensitive Angiotensin II Generating Enzyme (CAGE), ainsi que la chymase présente notamment chez l'homme au niveau du cœur, des vaisseaux et des cellules endothéliales. Enfin, d'autres enzymes tissulaires (t-PA, cathepsine G et tonine) transforment directement l'angiotensinogène en Ang II (Figure 11, page 48).

I.4.2. Réceptologie de l'angiotensine II

L'Ang II est l'effecteur principal de l'activité du système rénine-angiotensine et de sa régulation. Deux types de récepteurs tissulaires de l'Ang II ont actuellement été caractérisés et clonés : AT₁ et AT₂. Le récepteur AT₁ est le récepteur principalement impliqué dans les effets physiologiques actuellement connus de l'Ang II. La fixation de l'Ang II sur le récepteur AT₁ entraîne l'activation de différentes voies de transduction du signal dont la phospholipase C et D qui aboutissent à la formation de seconds messagers : inositol triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (Tableau 5, page 50) (De Gasparo, 2002).

L'IP₃ va provoquer l'ouverture des canaux calciques du réticulum sarcoplasmique et simultanément une entrée massive de calcium du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. L'augmentation rapide de la concentration en calcium libre intracellulaire active la kinase de la chaîne légère de myosine, favorisant l'interaction actine-myosine qui

aboutit à la contraction de la cellule musculaire lisse. Le clivage du diacylglycérol par une lipase va produire de l'arachidonate.

L'augmentation du calcium intracellulaire peut également être à l'origine de l'activation de la phospholipase A₂, induisant ainsi la libération d'acide arachidonique à partir des PLs. Les caractéristiques des sous types AT₁ et AT₂ sont résumées dans le tableau 5.

	AT ₁	AT ₂
Structure	7 domaines transmembranaires 359 acides aminés	7 domaines transmembranaires 363 acides aminés
Isoformes	AT _{1A} et AT _{1B} (chez les rongeurs)	
Distribution	vaisseaux, rein, glande surrénale, cœur, foie, cerveau, poumon	tissus fœtaux, cerveau, ovaire, utérus, glande surrénale, cœur
Voies de signalisation	adényl cyclase ↑ phospholipase C ↑ phospholipase D ↑ phospholipase A ₂ ↑ phosphorylation de tyrosine	↑ phospholipase A ₂ ? ↑ synthèse des prostaglandines ? ↑↓ GMPc ? ↑ tyrosine phosphatase ? ↑ courant K ⁺ ?
Effets	vasoconstriction, contractilité cardiaque, sécrétion d'aldostérone, hypertrophie et hyperplasie cellulaire	inhibition de la prolifération cellulaire, apoptose cellulaire, différenciation cellulaire vasorelaxation

Tableau 5 : Principales caractéristiques des sous types AT₁ et AT₂ des récepteurs de l'angiotensine II.

I.4.3. Effets vasculaires de l'angiotensine II

Le système rénine-angiotensine est un système endocrine qui joue un rôle majeur dans la régulation de la pression artérielle, de la volémie et de l'équilibre hydroélectrolytique via la stimulation des récepteurs AT₁ (Figure 12, page 52). L'Ang II exerce également des effets de type paracrine/autocrine sur le remodelage vasculaire en favorisant la prolifération des CML, ainsi qu'une stimulation sympathique entraînant la libération de catécholamines. La stimulation des récepteurs AT₂ entraîne des effets opposés à ceux médiés par les récepteurs AT₁ (Touyz *et al.*, 2000).

L'activation des récepteurs AT₁ par l'Ang II est également à l'origine d'effets pharmacologiques avec des conséquences potentiellement délétères :

- augmentation de la synthèse et de la sécrétion d'aldostérone et facilitation de la réabsorption tubulaire proximale du sodium → augmentation de la volémie par rétention hydrosodée,
- vasoconstriction artériolaire rénale → augmentation de la pression intraglomérulaire, augmentation de la filtration glomérulaire, réduction du débit sanguin rénal avec augmentation de la fraction filtrée,
- effet vasopresseur : artériel, veineux, rénal et splanchnique, par contraction des fibres musculaires lisses des vaisseaux → augmentation des résistances artérielles périphériques, augmentation de la pré-charge, redistribution des flux sanguins régionaux,
- stimulation du système nerveux sympathique et libération de catécholamines → effet cardiaque inotrope positif, induction d'arythmies,

- effet stimulant sur la croissance cellulaire de fibres musculaires lisses cardiaques et vasculaires → hypertrophie myocardique et remodelage cardiaque, dépôt de collagène interstitiel myocardique et vasculaire, hypertrophie de la paroi artérielle.

Ces effets sont résumés dans la figure 12, ainsi que les points d'impact des principales familles antihypertensives.

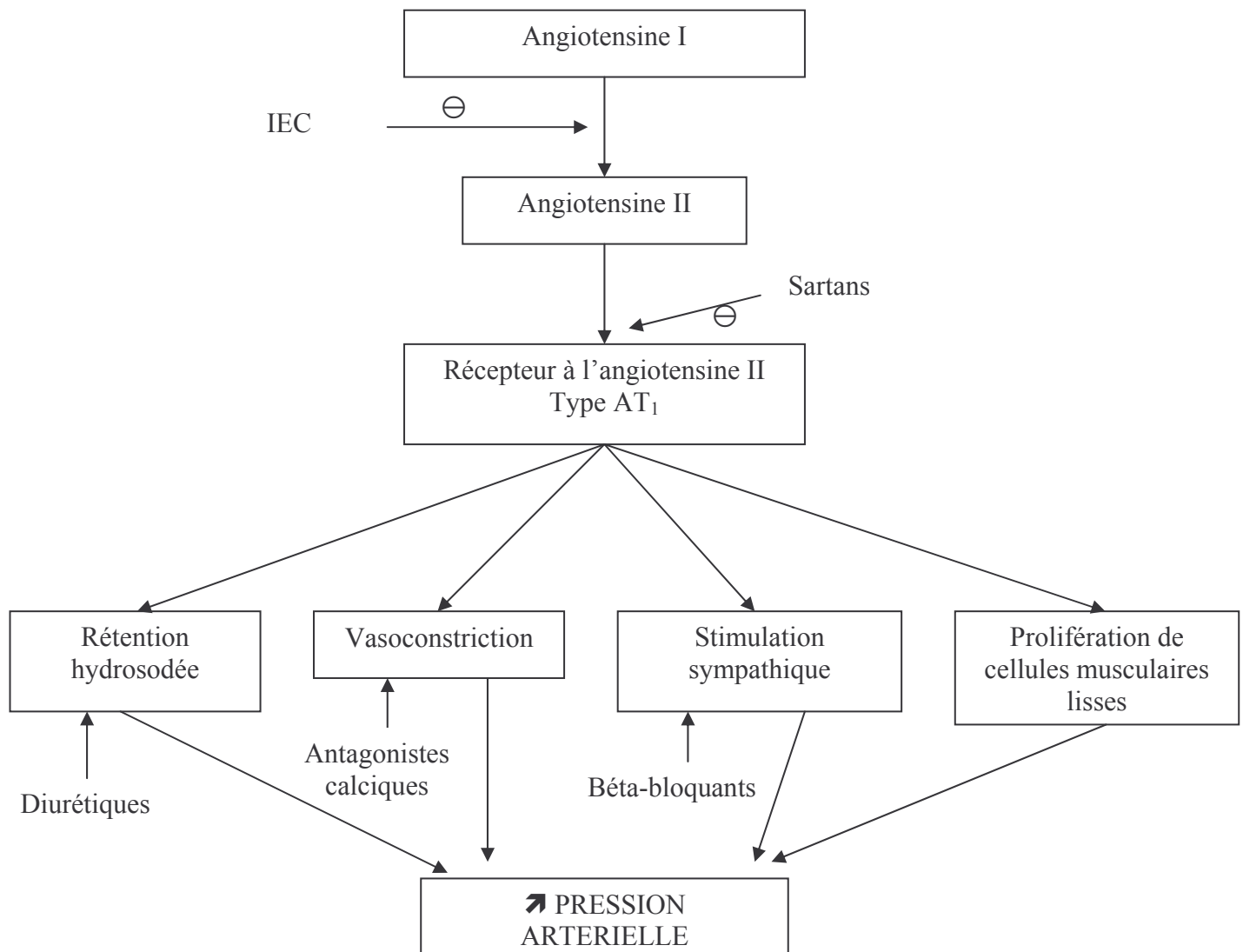


Figure 12 : Effets de l'angiotensine II via la stimulation du récepteur AT₁, et points d'impact des principales familles antihypertensives.

En résumé, l'implication de la 5-LOX dans les multiples processus contribuant à l'athérosclérose est schématisée dans la figure 13 de la page 54. Le rôle de l'angiotensine II (Ang II) apparaît clairement dans ces mécanismes de la physiopathologie cardiovasculaire.

L'Ang II pourrait contribuer au développement de l'athérosclérose aussi bien à travers ses effets hémodynamiques que via la stimulation de la production d'anions superoxydes par la NADPH oxydase des CML (Figure 13, page 54). Ces effets pro-inflammatoires sont bloqués par prétraitement des animaux par le losartan et interviendrait donc via la stimulation des récepteurs AT₁ (Cooper, 2004).

La stimulation des récepteurs de l'Ang II induit une augmentation de la libération d'acide arachidonique par l'intermédiaire des phospholipase A₂, C et D ou par la formation du second messenger diacylglycérol clivé en arachidonate. Les eicosanoïdes produits à partir de cette source d'acide arachidonique peuvent moduler les effets vasculaires de l'Ang II. La contribution des dérivés des lipoxygénases dans les effets vasculaires de l'Ang II fait l'objet de deux chapitres détaillés en relation avec le diabète et l'hypertension artérielle essentielle.

De plus, des travaux menés sur monocytes humains ont montrés que des antagonistes des récepteurs AT₁ (irbésartan et losartan) inhibaient de façon dose dépendante la production basale de MCP-1 par les monocytes ainsi que la production de MCP-1 après stimulation par des LDL ou par le PAF (platelet-activating factor) (Proudfoot *et al.*, 2003).

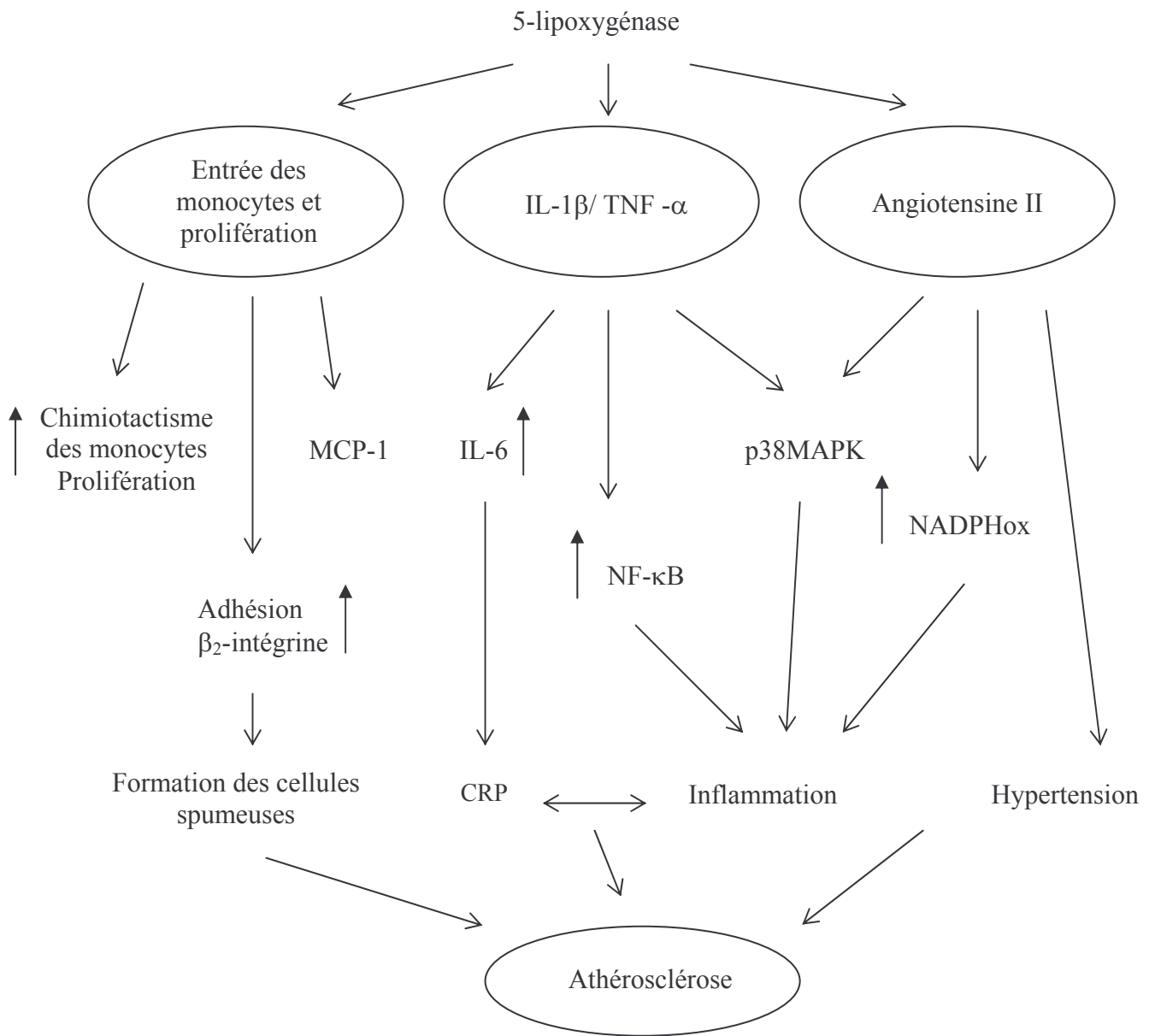


Figure 13 : Schéma de la contribution de la voie de la 5-lipoxygénase dans les multiples processus de l'athérosclérose d'après Mehrabian *et al.* (Mehrabian *et al.*, 2003).

II. Leucotriènes et diabète

II.1. Le diabète

Le diabète se caractérise par une incapacité de l'organisme à réguler le métabolisme du glucose (Duhault *et al.*, 1997). Que ce soit dans le cas du diabète de type 1 (ou insulino-dépendant) ou dans le cas du diabète de type 2 (ou non insulino-dépendant), glycosurie et hyperglycémie sont diagnostiquées. Les causes principales sont :

- une absence ou un défaut de la production d'insuline,
- un défaut de sécrétion ou de stockage de l'insuline,
- une non réponse des tissus cibles à l'insuline,
- un changement structurel d'origine génétique de l'insuline.

Traditionnellement, le diabète de type 1 pouvait s'expliquer par l'effet d'un agent environnemental chez un sujet génétiquement prédisposé. Les études récentes tendent à associer plusieurs facteurs pour expliquer l'apparition et l'évolution du diabète de type 1 (Atkinson *et al.*, 2001) :

- la transmission et l'expression d'anomalies immunitaires héréditaires,
- des déficiences innées de certains organes cibles,
- l'influence tout au long de la vie de multiples facteurs environnementaux tels que les agents infectieux, les facteurs diététiques, les toxines environnementales mais aussi de nouvelles variables (vaccination, accès au soin, hygiène...).

Ainsi on a pu observer que de multiples infections dans les premières années de la vie étaient associées avec une diminution du risque de diabète de type 1.

La prévalence de ces deux types de diabète est très variable d'un groupe ethnique à un autre. La prévalence du diabète de type 1 est de l'ordre de 0,38 % en France et de 0,74 % en

Allemagne (Passa, 1998). En France, le nombre de diabétiques de type 2 prenant des antidiabétiques oraux ou traités par insuline était en 1998 de l'ordre de 1 200 000 ; il a doublé entre 1986 et 1996. A ce chiffre il faut ajouter environ 400 000 patients traités par régime seul et 500 000 diabétiques de type 2 méconnus et non traités (Passa, 1998). Ces chiffres sont en augmentation dans les pays industrialisés. La gravité des complications associées au diabète justifie son classement comme problème de santé publique majeur.

II.2. Complications cardiovasculaires associées au diabète

Les conséquences les plus dramatiques de la pathologie diabétique sont ses complications cardiovasculaires qui représentent la cause majeure de morbi-mortalité (Morrish *et al.*, 2001). L'incidence des pathologies cardiovasculaires est trois à six fois plus importante chez les patients diabétiques que chez les sujets sains (Garcia *et al.*, 1974). On distingue la microangiopathie (rétinopathie, néphropathie et neuropathie) dont les lésions sont spécifiques du diabète et indiscutablement corrélées avec la durée et la sévérité de l'hyperglycémie, et la macroangiopathie (maladie coronaire, artérite des membres inférieurs et accidents vasculaires cérébraux) dont l'incidence est certes modulée par l'hyperglycémie mais aussi et surtout par d'autres facteurs de risque fréquemment associés à celle-ci : hypertension, hypercholestérolémie, tabac, surcharge pondérale, sédentarité.

- Rétinopathie : Le risque de cécité est 20 fois plus élevé chez les patients diabétiques. Environ 10 à 15 % des patients diabétiques de type 1 deviennent aveugles alors que les patients diabétiques de type 2 ont un risque deux fois moindre.

- Néphropathie : L'insuffisance rénale terminale est une cause importante de surmorbidity, en particulier au cours du diabète de type 1, où elle affecte 30 à 35 % des patients (15 à 20 % dans le diabète de type 2). Les inhibiteurs de l'ECA sont particulièrement

intéressants dans le traitement de la néphropathie diabétique, permettant de retarder la protéinurie, indépendamment de leur effet antihypertenseur.

- Neuropathie : Près de 50 % des patients diabétiques sont atteints de neuropathie symptomatique, potentiellement invalidante.

- Athérosclérose et hypertension : L'athérosclérose qui touche les artères coronaires, cérébrales et des membres inférieurs est la principale cause de décès chez les patients diabétiques. Elle est plus fréquente, plus précoce et plus grave que chez les non-diabétiques. Elle est proportionnelle à l'importance des facteurs de risque cardiovasculaires associés.

II.3. Modèles animaux

Les modèles animaux reflétant la pathologie humaine sont indispensables pour élucider les mécanismes physiopathologiques du diabète. A cet égard, il existe de nombreux modèles animaux de diabète de type 1 dont voici quelques exemples (Duhault *et al.*, 1997) :

- modèles obtenus par des manipulations chirurgicales ou toxiques : pancréatectomie, injection d'alloxane ou de streptozotocine, infection virale (coxsackie, rubéole),

- modèles spontanément diabétiques : rats BB (Biobreeding) et souris NOD (Non-Obese Diabetic Mice).

La streptozotocine est un antibiotique, extrait de *Streptomyces achromogenes*, sélectivement toxique pour les cellules β du pancréas. Cette propriété a été décrite dès 1963 par Rakieta *et al.* (Rakieta *et al.*, 1963) et est depuis largement utilisée pour induire un diabète insulino-dépendant chez le rat. L'injection de doses intermédiaires de streptozotocine (55 à 65 mg par kg) provoque une augmentation de la glycémie jusqu'à 3 à 4 fois la normale et empêche la

prise de poids (Tomlinson *et al.*, 1992). C'est ce modèle de diabète qui a été utilisé dans deux études de cette thèse.

Le diabète de type 2 est plus difficile à reproduire chez l'animal. Parmi les modèles animaux identifiés, aucun ne regroupe à lui seul l'ensemble des caractéristiques de la pathologie humaine, mais chacun en reproduit différents aspects. Plusieurs modèles sont détaillés par Duhault *et al.* (Duhault *et al.*, 1997) dont quelques exemples sont reportés ici :

- manipulations chirurgicales ou toxiques : pancréatectomie partielle, injection d'alloxane ou d'insuline à faible dose, hyperglycémie de la rate gestante → hyperglycémie avec insulino-déficience,

- modification du régime alimentaire : rat Fructose → insulino-résistance,

- animaux spontanément diabétiques :

- souris ob/ob → hyperphagie et hyperinsulinémie puis secondairement hyperglycémie et insulino-résistance,
- souris obèses « agouti » → obésité par hyperphagie, hyperinsulinémie, hyperglycémie par intolérance au glucose,

- modèles transgéniques :

- souris knock-out pour le gène du transporteur du glucose GLUT₄ → glycémie et tolérance au glucose normale, augmentation des transporteurs GLUT₂ (foie) et GLUT₁ (cœur), hypertrophie cardiaque et lipoatrophie,
- gène de l'insuline humaine transfecté chez la souris → hyperinsulinémie, insulino-résistance, intolérance au glucose.

Le rat Fructose est un modèle de prédiabète obtenu chez des rats Wistar par une alimentation enrichie en fructose (33 % des hydrates totaux) durant 60 jours. Ces animaux développent

alors une résistance à l'insuline, une hypertriglycéridémie mais pas d'hyperglycémie ni de perte de poids (Faure *et al.*, 1999). Ce modèle a été utilisé dans une des études présentées dans cette thèse.

II.4. Leucotriènes et diabète

Les mécanismes impliqués dans le développement des complications cardiovasculaires associées au diabète sont multiples et encore imparfaitement connus. Nous avons développé dans le chapitre précédent les rôles des LTs dans l'inflammation et l'athérosclérose, composantes des complications cardiovasculaires du diabète. Cependant peu d'études ont évalué le rôle des LTs plus spécifiquement dans le diabète.

Sur cœur isolé perfusé de rats streptozotocine, il a été décrit que les leucotriènes étaient impliqués dans la vasoconstriction coronaire en réponse à l'acide arachidonique (Takiguchi *et al.*, 1989). De plus, le LTD₄ (Takiguchi *et al.*, 1989) et le LTC₄ (Roth *et al.*, 1984) induisent une contraction coronaire plus intense chez les rats diabétiques par rapport aux rats non-diabétiques. Enfin, l'inhibition de la FLAP diminue la protéinurie chez les rats streptozotocine (Valdivielso *et al.*, 2003).

L'équipe de Natarajan *et al.* s'est plus particulièrement intéressé au rôle des dérivés des 12- et 15-LOX dans le diabète, montrant sur des CML et endothéliales en culture d'origine porcine une augmentation de la production de 12- et 15-HETEs en milieu hyperglycémique, potentialisée en présence d'Ang II (Natarajan *et al.*, 1993).

Chez l'homme, les complications vasculaires du diabète ont été reliées à des anomalies de la cascade de l'acide arachidonique (Natarajan *et al.*, 2004), aussi bien via les cyclooxygénases (Hishinuma *et al.*, 1999) que via les lipoxygénases (Antonipillai *et al.*, 1996) ou la voie radicalaire (Davi *et al.*, 1999; Davi *et al.*, 2003). Il a ainsi été décrit une diminution du taux urinaire de prostacycline et une augmentation de l'excrétion urinaire de 12-HETE chez des patients diabétiques ayant une néphropathie (Antonipillai *et al.*, 1996). Une augmentation significative de la production, sans stimulation ou en réponse au ionophore calcique, de LTB₄

par les polynucléaires neutrophiles de patients diabétiques a été observée *in vitro*, corrélée avec le taux d'hémoglobine glyquée (Parlapiano *et al.*, 1999).

Les données de la littérature suggèrent le rôle potentiel des dérivés des lipoxygénases dans la pathogénèse des complications cardiovasculaires associées au diabète en raison de leurs propriétés vasoactives, chimiotactiques, pro-inflammatoires et prolifératives. Cependant, peu de travaux se sont intéressés plus précisément aux dérivés de la 5-lipoxygénase sur des modèles expérimentaux comme chez l'homme diabétique.

Dans cette thèse, 3 études sont présentées et discutées concernant l'activation de la voie de la 5-LOX dans le diabète, sur le modèle du rat streptozotocine et chez des patients diabétiques de type 1.

II.5. Angiotensine II et diabète

L'hypothèse du rôle de l'Ang II dans les complications cardiovasculaires spécifiquement dans le diabète, a fait l'objet de quelques travaux.

Une augmentation de l'activité plasmatique de l'ECA a été décrite dans le modèle du rat streptozotocine (Funakawa *et al.*, 1983). De plus, la réactivité vasculaire en réponse à l'Ang II est augmentée dans le modèle du rat alloxane (Christlieb, 1974).

Plusieurs études chez l'animal ont montré que le blocage du système rénine-angiotensine diminuait le développement des lésions d'athérosclérose dans le diabète. Candido *et al.* ont étudié l'effet d'un traitement par inhibiteur de l'enzyme de conversion (IEC) de l'angiotensine I (périndopril) sur le développement des plaques d'athérosclérose chez des souris rendues diabétiques par la streptozotocine et déficiente en apoE. Chez les animaux traités par cet IEC, le développement des plaques d'athérosclérose était inhibé, la surexpression de l'ECA et des molécules d'adhésion aux cellules vasculaires (VCAM-1) induites par le diabète était diminuées au niveau de l'aorte (Candido *et al.*, 2002). La même équipe a ensuite montré sur ce même modèle animal qu'un antagoniste des récepteurs AT₁ de l'Ang II (irbésartan) atténuait également au niveau aortique le développement des lésions d'athérosclérose, la prolifération cellulaire et l'infiltration des macrophages. Ce sartan avait de plus un effet inhibiteur sur la surexpression induite par le diabète des récepteurs AT₁, des MCP-1 et des VCAM-1 au niveau aortique (Candido *et al.*, 2004). Malgré une diminution de la pression artérielle similaire, un inhibiteur calcique, l'amlodipine, n'induisait pas ces effets bénéfiques, suggérant un rôle pivot des récepteurs AT₁ dans le développement de l'athérosclérose dans le cadre du diabète.

Chez l'homme, une augmentation de l'ECA a également été mise en évidence chez des patients diabétiques souffrant de complications vasculaires (Schernthaner *et al.*, 1984) et l'effet presseur de l'Ang II est augmenté chez des patients diabétiques de type 1 (Drury *et al.*, 1984; Weidmann *et al.*, 1985).

Plusieurs études cliniques ont mis en évidence l'effet bénéfique de l'utilisation précoce des IEC dans la prévention et le traitement de la néphropathie diabétique, au-delà du bénéfice lié à la normalisation de la pression artérielle (Parving *et al.*, 2001). Dans l'étude LIFE (Losartan Intervention For Endpoint Reduction in Hypertension study) menée chez des sujets hypertendus, le traitement par le losartan, un antagoniste des récepteurs AT₁ de l'Ang II, a induit une réduction de 25 % du nombre de patients initiant un diabète au cours de l'étude indépendamment des facteurs de risque associés (Lindholm *et al.*, 2002). Ces données inattendues ont mis en exergue les relations entre Ang II et homéostasie du glucose.

En effet, en plus de la circulation générale, le système rénine-angiotensine est localisé au niveau tissulaire et notamment dans le pancréas. Une augmentation des différents acteurs du système rénine-angiotensine, dont les récepteur AT₁ et l'enzyme de l'ECA, a été observée dans les îlots pancréatiques des rats diabétiques Zucker par rapport aux rats témoins (Tikellis *et al.*, 2004). Une augmentation de la fibrose, de l'apoptose et du stress oxydatif dans les îlots des rats diabétiques était observée. Les modifications dans la morphologie des îlots étaient atténuées chez les rats traités par périndopril ou irbésartan.

Les résultats de cette étude proposent un mécanisme pouvant expliquer la diminution des nouveaux cas de diabète dans les études cliniques utilisant des antihypertenseurs bloquant le système rénine-angiotensine.

Dans cette thèse, une étude a porté sur la modulation, par les leucotriènes, des effets vasculaires de l'Ang II chez le rat streptozotocine.

III. Leucotriènes et hypertension artérielle essentielle

III.1. L'hypertension artérielle essentielle

III.1.1. Définition

Par définition, on parle d'hypertension artérielle (HTA) chez l'adulte lorsque la pression artérielle systolique est, à plusieurs reprises, égale ou supérieure à 140 mmHg et/ou la pression artérielle diastolique est égale ou supérieure à 90 mmHg au cabinet médical. Cependant de nombreuses études de population ont montré une relation positive et continue entre l'élévation de la pression artérielle et la survenue de maladies cardiovasculaires, et cette continuité doit pondérer la valeur de tout seuil de définition de l'HTA.

Par ailleurs, le niveau tensionnel n'est que l'une des composantes du risque cardiovasculaire, dont la stratégie de prise en charge nécessite une approche globale. La pression artérielle systolique est un meilleur prédicteur du risque (événements graves cardiovasculaires, cérébraux-vasculaires et rénaux, et mortalité de toute cause) que la pression artérielle diastolique, et ce d'autant plus que le sujet est âgé. Les principaux facteurs de risque cardiovasculaires sont résumés dans le tableau 6 de la page 65.

Age supérieur à 45 ans chez l'homme et à 55 ans chez la femme
Tabagisme
Consommation excessive d'alcool
Obésité abdominale
Absence d'activité physique
Catégories à risque particulier (notamment groupes socio-économiques défavorisés)
Antécédents familiaux de maladies cardiovasculaires à un âge précoce (avant 55 ans chez le père ou 65 ans chez la mère)
HDL-cholestérol < 0,35 g/l (0,9 mmol/l), LDL > 1,9 g/l (4,9 mmol/l)
Diabète
Atteinte d'un organe cible

Tableau 6 : Principaux facteurs et indicateurs de risque cardiovasculaire et maladies associées (adapté de WHO/ISH 1999). Cette liste n'est ni hiérarchique, ni exhaustive.

III.1.2. Données d'épidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la seconde moitié du XX^{ème} siècle a vu une diminution progressive de la mortalité cardiovasculaire en Amérique du Nord, Europe de l'Ouest, Japon et Australie, au fur et à mesure de l'amélioration du contrôle de l'HTA dans ces régions (WHO/ISH). Cependant, les maladies cardiaques et les accidents vasculaires cérébraux restent, respectivement, la première et la troisième cause de décès aux Etats-Unis, et imposent une énorme charge financière et sociale aux citoyens américains. Plus encore, une « seconde vague » épidémique de maladies cardiovasculaires et cérébro-vasculaires s'étend rapidement dans les pays en voie de développement et les anciennes républiques de l'Est.

Les données épidémiologiques françaises vont dans le même sens : les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité en France. La prévalence de l'hypertension chez les plus de 20 ans était de 16,5 % en 1999.

III.2. Modulation des effets vasculaires de l'angiotensine II par les dérivés des lipoxygénases

L'inhibition non spécifique des lipoxygénases par la phénidone provoque une diminution de la pression artérielle de plus grande intensité chez les rats spontanément hypertendus par rapport aux rats normotendus (Stern *et al.*, 1993). La phénidone induit de la même façon une diminution de la pression artérielle sur un modèle d'hypertension chez le rat par sténose de l'artère rénale (Nozawa *et al.*, 1990). De plus, la phénidone diminue l'effet presseur de l'Ang II *in vivo* et la contraction à l'Ang II *in vitro* sur artère fémorale de rat normotendu (Stern *et al.*, 1989).

Plus récemment, des travaux ont montré que l'inhibition de la synthèse des leucotriènes par le AA861 ou le blocage des récepteurs CysLT₁ par le MK571 diminuait la contraction induite par l'Ang II sur des aortes (Stanke-Labesque *et al.*, 2001) et des artères mésentériques (Shastri *et al.*, 2001) de rats spontanément hypertendus. De plus, sur aortes de rats spontanément hypertendus, l'Ang II induit la libération de CysLTs via la stimulation de récepteurs AT₁ (Stanke-Labesque *et al.*, 2001).

Ces travaux suggèrent que la stimulation des récepteurs AT₁ par l'Ang II induit la libération de CysLTs qui contribuent aux effets vasculaires de l'Ang II, via la stimulation de récepteurs CysLT₁. L'ensemble de ces données est en faveur d'un rôle des dérivés de la voie de la 5-LOX dans la modulation des effets de l'Ang II dans l'hypertension artérielle.

D'autre part l'inhibition spécifique de la Five Lipoxygenase Activating Protein (FLAP), nécessaire au fonctionnement de la 5-LOX, réduit l'effet pulmonaire presseur de l'Ang II chez des rats hypoxiques (Voelkel *et al.*, 1996).

Dans cette thèse, une étude a exploré la contribution des CysLTs dans les effets vasoconstricteurs de l'Ang II dans un modèle d'hypertension chez le rat.

Deuxième partie : Travaux de la thèse

Présentation de la thèse

Comme nous l'avons présenté dans la partie consacrée aux données de la littérature, les LTs sont d'importants modulateurs du tonus vasculaire et du processus inflammatoire dans des contextes pathologiques tels que le diabète et l'hypertension artérielle essentielle.

De plus, les travaux précédemment réalisés au sein du Laboratoire ont mis en évidence l'implication des LTs dans la contraction à l'Ang II chez les rats SHR.

De ce fait, nous avons étudié, sur deux modèles expérimentaux de diabète la contribution des LTs dans les effets vasculaires de l'Ang II et de la noradrénaline. Ces travaux ont mis en évidence un rôle majeur des CysLTs dans les effets vasoconstricteurs de ces deux médiateurs sur les aortes des rats diabétiques. La localisation de la 5-LOX faisant l'objet d'une controverse, nous avons souhaité explorer sa présence au niveau de l'aorte.

La mise en évidence d'une activation de la voie de la 5-LOX chez les rats diabétiques nous a ensuite conduit à en explorer les mécanismes possibles au niveau de l'aorte ; à travers l'étude de l'expression de la 5-LOX, la production de CysLTs après stimulation par l'acide arachidonique et la sensibilité des aortes aux effets vasoconstricteurs des CysLTs.

Nous avons ensuite testé la pertinence clinique de cette activation de la voie de la 5-LOX chez l'homme en comparant l'excrétion urinaire de LTE₄ de patients diabétiques à celle de sujets témoins.

L'étude de deux modèles d'hypertension artérielle chez le rat nous a permis de confirmer l'implication des LTs dans la contraction à l'Ang II et à la noradrénaline également chez les rats hypertendus.

Après une description du matériel et des méthodes mis en œuvre dans cette thèse, les résultats sont présentés et discutés sous forme de 5 publications réalisées de 2001 à 2004.

1^{er} Chapitre : Matériel et méthodes

I. Modèles animaux

I.1. Rats Streptozotocine: modèle de diabète de type 1

La streptozotocine est un antibiotique sélectivement toxique pour les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas (Tomlinson *et al.*, 1992). L'injection de streptozotocine chez le rat permet de reproduire une partie des caractéristiques du diabète de type 1 telles que l'hyperglycémie, la polydipsie, la polyurie et la perte de poids.

Après anesthésie au pentobarbital (50 mg/kg), des rats Wistar (laboratoire IFFA CREDO) âgés de 8 semaines (220 à 240 g) ont subi de façon aléatoire une injection unique de Streptozotocine (Sigma, L'Isle d'Abeau, France) à la dose de 55 mg/kg ou de son solvant, un tampon citrate, 4,5 mM (rats TC) via la veine du pénis (Figure 14, page 73).

Préparation du tampon citrate :

- solution A : 2,1 g d'acide citrique dans 100 mL d'eau distillée
- solution B : 2,94 g de citrate de sodium dans 100 mL d'eau distillée
- solution C : 27 mL de la solution A ajouté à 23 mL de la solution B
- ajuster le pH à 4,5
- filtrer sur membrane de 0,22 μ m (conservation 3 mois, + 4°C)
- solution D : solution C diluée au 1/10^{ème} dans de l'eau distillée (conservation 3 mois, + 4°C)
- préparer une solution de streptozotocine à 30 mg/mL.

Deux semaines après l'injection de Streptozotocine, l'état diabétique était confirmé par l'apparition d'une glycosurie, d'une polyurie, et d'une polydipsie. De façon aléatoire, une partie des rats devenus diabétiques était alors traitée par une injection journalière sous-cutanée de 5 UI d'insuline Insulatard NPH 40 UI/mL (rats SI) et l'autre par une injection journalière sous-cutanée de sérum physiologique (rats SS) pendant 21 jours.

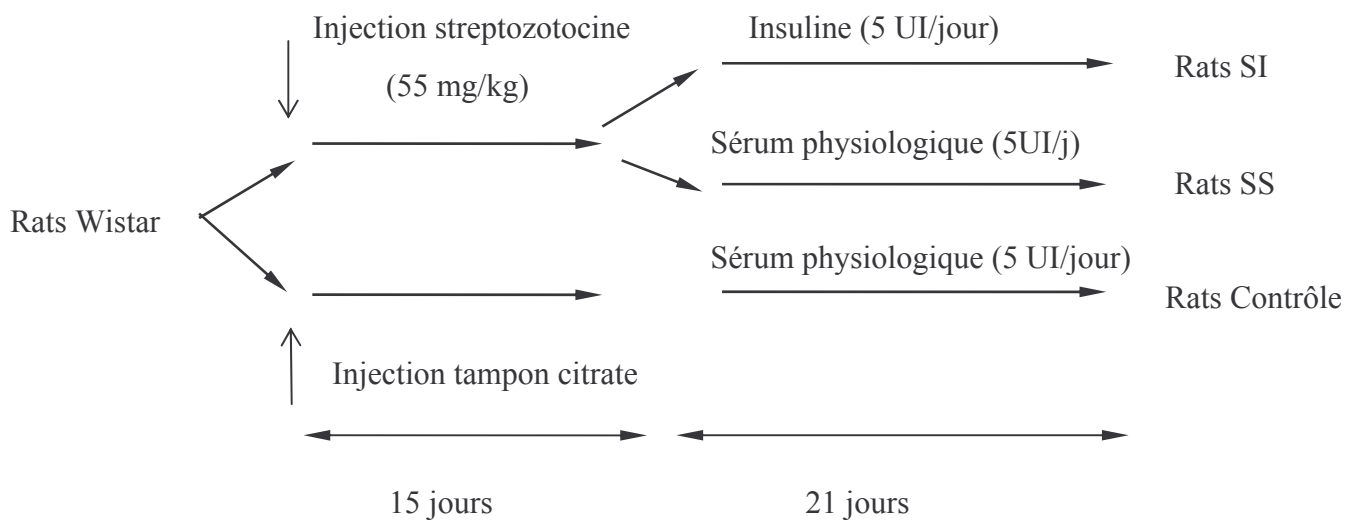


Figure 14 : Modèle du rat Streptozotocine.

I.2. Rats Fructose: modèle de rat insulino-résistant (Figure 15)

De façon aléatoire, des rats Wistar âgés de 4 semaines étaient répartis en deux groupes. Un groupe recevait une alimentation contrôle E210 (rats FC) contenant 38 % de glucose, 20 % d'amidon de maïs et 0 % de fructose et l'autre groupe (rats F) une alimentation contenant 15 % de glucose, 8 % d'amidon de maïs et 33 % de fructose (Laboratoires UAR) durant 60 jours.

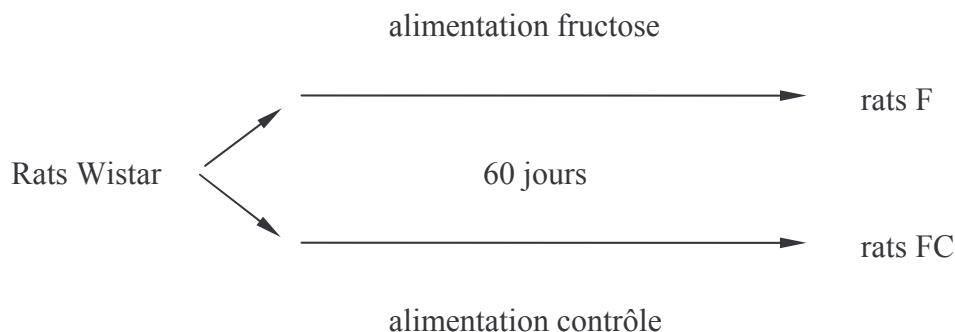


Figure 15 : Modèle du rat Fructose.

Chaque rat était placé dans une cage à métabolisme la veille de l'expérience afin de recueillir ses urines sur 24 heures. La glycosurie était déterminée par l'utilisation d'une bandelette réactive (Keto-Diabur-Test 5000, Roche) et les urines étaient congelées à -80°C pour le dosage ultérieur du leucotriène E₄. Chaque rat était pesé puis anesthésié par l'injection intrapéritonéale de pentobarbital (50 mg/kg).

La pression artérielle moyenne était mesurée par introduction au niveau de la carotide d'un cathéter en polyéthylène relié via un transducteur (Statham) à un système enregistreur (Windograph, Gould instrument). La glycémie était mesurée à l'aide d'un lecteur (lecteur Accu-Chek Easy, Boehringer Mannheim). Pour les rats FC et F, l'insulinémie était mesurée, lors du sacrifice, par une technique radioimmunologique (Trousse Insuline CT, CIS-BIO) sur un prélèvement sanguin réalisé au niveau de la cage thoracique lors du prélèvement de l'aorte.

I.3. Rat transgénique (mRen-2)²⁷ ; modèle d'hypertension monogénique

Il s'agit de rat Sprague-Dawley (SD) chez lesquels le gène ren-2 de la rénine de la souris a été transfecté. Ces animaux développent une hypertension précoce et sévère du fait d'une augmentation de l'expression de l'Ang II dans divers tissus dont les vaisseaux sanguins (Hilgers *et al.*, 1992). Une diminution de la rénine plasmatique et rénale est également observée. L'efficacité antihypertensive des IEC et des antagonistes des récepteurs de l'Ang II suggère que l'hypertension dans ce modèle est bien médiée par l'Ang II. Les caractéristiques et les aspects fonctionnels de ces animaux sont détaillés par Langheinrich *et al.* (Langheinrich *et al.*, 1996).

I.4. Rat L-NAME ; modèle d'hypertension

Des rats Wistar adultes ont été traités durant 3 semaines par un inhibiteur de la synthèse du NO, le N^o-nitro-L-arginine méthyle ester (L-NAME) ajouté dans l'eau de boisson à la concentration de 1 mg/ml soit 30-40 mg par jour (75-100 mg/kg/j). Cette dose a été choisie parce qu'elle induisait des modifications inflammatoires au niveau cardiovasculaire. Plusieurs études ont en effet montré chez le rat L-NAME une augmentation de l'infiltration des monocytes et de MCP-1 au niveau des coronaires (Katoh *et al.*, 1998; Usui *et al.*, 2000).

II. Etudes fonctionnelles sur aorte isolée

Après mesure de la pression artérielle moyenne, les rats étaient sacrifiés et l'aorte thoracique prélevée puis coupée en anneaux d'environ 4 mm de long. Sur certains anneaux, une dénudation endothéliale était réalisée par introduction puis rotation d'une tige en bois dans la lumière du vaisseau.

Les anneaux vasculaires étaient montés entre 2 étriers à bords parallèles dans une cuve à organe isolé de 10 mL contenant 6 mL de solution physiologique de Krebs et thermostatée à 37°C. La composition de la solution physiologique de Krebs était la suivante : NaCl (118.0 mM), KCl (4.7 mM), CaCl₂ (25mM), MgSO₄ (1.0 mM), KH₂PO₄ (1.0 mM), NaHCO₃ (25 mM) et glucose (11 mM). L'étrier supérieur était relié à un capteur de force isométrique (UF-1, Pioden) et connecté à un amplificateur (EMKA) puis à un enregistreur (Linseis 200). Les anneaux étaient soumis à une force passive de 1.5 g, force déterminée comme étant optimale pour l'étude de la réactivité vasculaire par des expériences préliminaires. La première étape de chaque expérience a consisté à provoquer une contraction maximale par du KCl 90 mM. Après rinçage et retour à l'état basal, les anneaux artériels étaient contractés par de la

phényléphrine (10^{-7} - 10^{-8} M). Lorsque la contraction avait atteint un plateau stable, de l'acétylcholine (10^{-9} à 10^{-4} M) était ajoutée afin d'évaluer la présence ou non d'un endothélium fonctionnel. Puis, une autre période de stabilisation de 60 minutes était imposée aux anneaux vasculaires avec rinçage de la solution de Krebs toutes les 15 minutes.

Des courbes concentration-réponse aux différents agonistes ont été réalisées par addition cumulée de concentrations croissantes dans les cuves à organe isolé. Une seule courbe concentration-réponse (en présence ou en absence d'antagonistes ou d'inhibiteurs) à un seul agoniste a été réalisée sur chaque anneau artériel. Toutes les expériences ont été réalisées à l'abri de la lumière.

Le protocole expérimental et les substances utilisées sont précisées dans chaque publication.

III. Dosage immunoenzymatique des cystéinyl leucotriènes vasculaires

Les anneaux artériels préparés comme décrit précédemment pour les études fonctionnelles, étaient placés dans des tubes contenant 1 mL de solution de Krebs, bullés par du carbogène et thermostatés à 37 °C. La solution de Krebs était renouvelée toutes les 15 min pendant 1 heure. Divers agents pharmacologiques ont ensuite été ajoutés de façon à provoquer ou inhiber la synthèse de CysLTs et leur libération dans la solution de Krebs. Toutes les expériences ont été réalisées à l'abri de la lumière.

La solution de Krebs était ensuite stockée à -80 °C en deux aliquots pour une quantification ultérieure des CysLTs libérés. Les anneaux étaient séchés en étuve et pesés. Le taux de CysLTs a été mesuré sans extraction par une méthode ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) à l'aide de réactifs provenant de chez Cayman. Les coefficients de variation intra- et interdosage étaient inférieurs ou égaux à 10 %, l' EC_{50} (50% B/B₀) était de 53.1

pg/mL et la limite de détection de 11.8 pg/mL. Les résultats étaient exprimés en pg de CyLTs par mg d'aorte séchée.

IV. Dosage immunoenzymatique du leucotriène E₄ urinaire

L'extraction du leucotriène E₄ urinaire était réalisée selon la méthode décrite par Qiu *et al.* (Qiu *et al.*, 1996) sur cartouches C18 (EC) 100 mg/10 mL (International Sorbent Technology) à partir de 4 mL d'urine centrifugée dont le pH était ajusté à 6. Les 4 mL d'urine étaient ensuite dilués dans 6 mL de tampon phosphate à pH 6. Les cartouches étaient activées avec les solutions suivantes : méthanol (2 mL), tampon phosphate pH 6 (5 mL), tampon phosphate-EDTA 0.1 % (5 mL). Une fois les échantillons déposés, les cartouches étaient lavées avec 5 mL de tampon phosphate à pH 6 et 5 mL d'éther de pétrole. L'élution s'effectuait à deux reprises par 2 mL et 1,5 mL de méthanol pur. Les éluats étaient évaporés à sec sous azote et les résidus repris par 1 mL de tampon EIA. Trois points de gamme interne constitués d'urines surchargées avec du LTE₄ étaient extraits dans les mêmes conditions. Le rendement de l'extraction était de 80 %.

Le dosage du LTE₄ a été réalisé par méthode immunoenzymatique (ELISA) à l'aide de réactifs provenant de chez Cayman. Les coefficients de variation intra- et interdosage étaient inférieurs ou égaux à 10 %, l'EC₅₀ (50 % B/B₀) était de 222.9 pg/mL et la limite de détection de 36.1 pg/mL.

V. Dosage en LC/MS-MS du leucotriène E₄ urinaire

Une première étape d'extraction en phase solide a été réalisée selon la méthode décrite par Qiu *et al.* (Qiu *et al.*, 1996) : brièvement, un échantillon de 4 ml d'urine dilué dans 4 ml d'eau

à pH 5 et contenant 4 ng de standard interne LTE₄d₃ est déposé sur une cartouche C18 (EC) 100 mg/10 mL (International Sorbent Technology, UK) préconditionnée par 2 ml de méthanol et 4 ml d'eau à pH 5, la cartouche est ensuite lavée par 4 ml d'eau pH 5 et 4 ml d'éther de pétrole avant l'élution finale par 1 ml d'éthanol à deux reprises. Les éluats sont évaporés à sec sous azote et les résidus secs sont repris par 40 µl de la phase mobile utilisée pour la LC/MS-MS (formate d'ammonium 20 %/méthanol 80 %). Le rendement de l'extraction est de 82 %. Après centrifugation, le surnageant est injecté dans la LC/MS-MS avec un débit de 200 µl/minute. La séparation chromatographique des composés est réalisée grâce à une colonne Kromasil C8 125/2 5 µm (Macherey-Nagel) thermostatée à 30°C.

La détection en spectrométrie de masse en tandem est effectuée par un API 3000 SCIEX avec une source TurboIonSpray. La quantification du LTE₄ est réalisée sur la transition m/z 438.2/333.0 et celle du LTE₄d₃ sur la transition m/z 441.1/336.1 en mode Multiple Reaction Monitoring.

La mesure de la concentration en LTE₄ de l'échantillon se fait par lecture du rapport LTE₄/LTE₄d₃ sur une gamme de calibration extraite dans les mêmes conditions que les échantillons. Le taux urinaire de créatinine est mesuré pour chaque échantillon et la concentration finale de LTE₄ est exprimée en pg/mg de créatinine urinaire.

Les études de répétabilité et de reproductibilité ont permis de valider cette méthode avec un coefficient de variation < 6 % aux concentrations 60, 150 et 300 pg/mL pour la répétabilité et < 8% pour la reproductibilité. La limite de quantification était de 10 pg/mL.

VI. Etudes immunohistochimiques

Une fois prélevée, l'aorte était nettoyée des tissus graisseux l'entourant, placée dans un cryotube et immédiatement congelée dans de l'azote liquide et conservée à -80°C jusqu'au

marquage. Les aortes étaient découpées en fines lamelles au microtome et marquées avec un anticorps anti-CD68 (Dako) pour les macrophages/monocytes, ou un anticorps anti facteur de Willebrand (clone F8/86, Dako) pour les cellules endothéliales, ou un anticorps anti 5-LOX de rat dilué au 1/250 provenant du laboratoire Cayman. L'anticorps secondaire était couplé à la peroxydase.

VII. Western Blot

Un morceau d'aorte d'environ 15 mg était prélevé et coupé en morceaux, puis mis dans un potter avec 0.5 mL de tampon de lyse (HEPES 50 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, pH 7.5 avec un mélange d'inhibiteurs de protéases (CompleteTM EDTA-free, Roche)). Deux cycles de 3 minutes de potter automatique étaient effectués dans la glace avant une sonication de 3 fois 10 secondes toujours dans la glace. L'homogénat obtenu était centrifugé 15 minutes à 1000 g à 4°C. Le surnageant était à nouveau centrifugé 1 heure à 200000 g à 4°C. Ce nouveau surnageant correspondait au cytosol qui était conservé à - 80°C. La concentration en protéines était mesurée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) avec l'albumine bovine comme protéine standard. Chaque échantillon de cytosol (20 µg de protéines) était mélangé avec du Sample Buffer (SDS 2 % (m/v), Tris-HCl 300 mmol/L, bleu de bromophénol 0.02 %, EDTA 20 mmol/L et DTT 1.5 % (m/v)) et incubé 5 minutes à 100°C. Les échantillons étaient déposés sur un gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide 10 % et soumis à un courant de 30 mA pendant 3 heures. Les protéines étaient ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose avec un tampon de transfert (Tris 25 mmol/L, glycine 129 mmol/L, SDS 0.1 % (m/v) et méthanol 20 %, pH 8.3). La saturation des sites de fixation non spécifiques a été effectuée pendant 1 heure à température ambiante dans du tampon TBS (Tris 50 mmol/L, NaCl 200 mmol/L, pH7.5) avec 0.05 % de Tween 20 et 1 % de lait en poudre

lyophilisé. Les membranes étaient ensuite rincées pendant 1 heure avec du tampon TBS-Tween puis incubée durant la nuit avec un anticorps anti-5-LOX (Cayman) dilué au 1/2000. Après 1 heure et demi de rinçage par du tampon TBS-Tween, les membranes étaient incubées durant 1 heure avec un anticorps secondaire anti-immunoglobuline de lapin marqué à la peroxydase. Les membranes étaient à nouveau rincées durant 4 heures par du tampon TBS-Tween avant de pouvoir effectuer la révélation par les réactifs de chimiluminescence (Amersham Life Science) et l'exposition à un film de photographie. Les bandes de protéines ont été visualisées et leur densité a été quantifiée par une caméra vidéo Sony reliée à un logiciel de digitalisation Minichromax.

VIII. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Les ARN totaux ont été extraits des aortes congelées dans l'azote liquide selon la méthode de Chomczynski (Chomczynski *et al.*, 1987). L'ADN complémentaire était synthétisé avec la Long Expand Reverse Transcriptase (Roche) et un mélange d'une amorce spécifique de la 5-LOX (R 5'-GAAGATCACCACCGTCAGGTACTC-3') et d'oligo(dT) à 48°C pendant 1 heure. Les amorces spécifiques utilisées pour l'amplification de l'ADN complémentaire étaient les suivantes : F 5'-AAAGAACTGGAAACACGTCAGAAA-3' et R5'-AACTGGTGTGTACAGGGGTCAGTT-3' pour la 5-LOX (Uz *et al.*, 1997), F5'-CCCATCACCATCTTCCAGGAG-3' et R5'-GTTGTCATGGATGACCTTGGC-3' pour la GAPDH (Natarajan *et al.*, 1993) une enzyme ubiquitaire présente dans tous les types cellulaires. Ces deux paires d'amorces permettent l'amplification de 2 fragments de 515 et 284 paires de bases respectivement. L'amplification du fragment de la 5-LOX a été effectué par Hot-start PCR dans un volume final de 25 µl avec 0.5 U de Taq Polymérase Plus Precision (Statagene), 0.5 µM d'amorces spécifiques, 200 µM de dNTPs et 1.5 mM de

MgCl₂. La PCR était effectuée sur 40 cycles avec une température d'amorçage à 55°C pendant 30 secondes. L'amplification du fragment de la GAPDH était effectué dans les mêmes conditions avec une Taq Polymérase (Appligene) sur 30 cycles et avec une température d'amorçage à 60°C pendant 30 secondes. Les produits d'amplification marqués au bromure d'éthidium étaient ensuite mis à migrer sur un gel d'électrophorèse à 2 % d'agarose et observés sous une lampe UV.

IX. Expression des résultats et analyse statistique

Les résultats présentés sont les moyennes \pm l'erreur standard à la moyenne.

Les réponses contractiles des anneaux aortiques sont exprimées en pourcentage de la contraction maximale induite par le KCl 90 mM. La réponse maximale (E_{max}) obtenue pour chaque agoniste permet d'apprécier l'efficacité du composé. L'EC₅₀ représente la concentration d'agoniste qui produit 50 % de l'effet maximal. La puissance d'un agoniste est déterminée par la valeur de pD₂ (- log EC₅₀).

Les taux de CysLTs libérés par les anneaux vasculaires sont exprimés en pg/mg de tissu aortique sec.

Les taux urinaires de LTE₄ sont exprimés en pg de LTE₄ par 24 heures chez le rat et en pg de LTE₄ par mg de créatinine chez l'homme.

L'intensité des bandes observées en Western Blot est exprimée pour les rats diabétiques en pourcentage par rapport à l'intensité des bandes obtenues pour les rats Contrôle.

L'analyse de l'ensemble des points de 2 courbes concentration-réponse a été réalisée par une analyse de variance (ANOVA), adaptée aux mesures répétées, suivie d'un test de Bonferroni.

La comparaison de deux moyennes de E_{max} et de pD₂ a été réalisée à l'aide d'un test de « t » de Student sur séries non appariées. L'analyse des corrélations a été effectuée par un test de

rang de Spearman. Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme statistiquement significative.

2^{ème} Chapitre : Résultats et publications

Publication n°1

Cysteinyl leukotrienes modulate angiotensin II constrictor effects on aortas from streptozotocin-induced diabetic rats.

Hardy G, Stanke-Labesque F, Peoc'h M, Hakim A, Devillier P, Caron F, Morel S, Faure P,

Halimi S, Bessard G.

Arterioscler Thromb Vasc Biol (2001). 21: 1751-8.

Cette étude est la première d'une série de trois consacrées au diabète de type 1 chez l'animal et chez l'homme. Comme il est rappelé dans les données de la littérature, les complications cardiovasculaires sont la première cause de morbi-mortalité chez les sujets diabétiques. De par ses effets dans la régulation de la pression artérielle, le remodelage vasculaire et l'inflammation, l'Ang II joue un rôle important dans la survenue des complications cardiovasculaires associées au diabète.

Plusieurs études utilisant des inhibiteurs de la 5-LOX ou de la FLAP (Voelkel *et al.*, 1996; Stanke-Labesque *et al.*, 2001) ou des antagonistes des récepteurs des CysLTs (Stanke-Labesque *et al.*, 2001), indiquent que les dérivés de la 5-LOX participent aux effets vasculaires de l'Ang II. De plus, les leucotriènes seraient également impliqués dans les complications cardiovasculaires du diabète en raison de leurs propriétés vasoactives, chimiotactiques et pro-inflammatoires (Natarajan *et al.*, 2004).

Les effets modulateurs des leucotriènes dans la contraction à l'Ang II ont donc été étudiés sur les aortes de deux modèles de diabète chez le rat : le rat streptozotocine qui est un modèle de diabète de type 1 avec absence de production d'insuline, et le rat fructose qui est un modèle de pré-diabète avec insulino-résistance.

Ce travail montre que, sur les aortes avec et sans endothélium des rats streptozotocine, et seulement sur celles-ci, l'inhibition spécifique de la 5-LOX par le AA861 (Yoshimoto *et al.*, 1982) diminue la contraction à l'Ang II, tandis qu'un antagoniste mixte CysLT₁-CysLT₂ n'a pas d'effet sur la contraction. Ces résultats suggèrent la contribution des LTs dans les effets vasoconstricteurs de l'Ang II via la stimulation de récepteurs non-CysLT₁ et non-CysLT₂.

De plus, la stimulation des anneaux aortiques des rats streptozotocine par l'Ang II induit une augmentation significative du relargage de CysLTs par rapport aux rats Contrôle et aux rats traités par insuline. Cet effet était inhibé par le AA861. Ces résultats sont en faveur à nouveau

de la participation des CysLTs dans les effets vasoconstricteurs de l'Ang II. En revanche, les CysLTs ne semblent pas impliqués dans les effets vasoconstricteurs de l'Ang II chez les rats Contrôle et chez les rats fructose.

Le LTC₄ et le LTD₄ provoquent directement la vasoconstriction des aortes uniquement chez les rats streptozotocine, suggérant une sensibilité augmentée des aortes des rats diabétiques aux effets vasoconstricteurs du LTC₄ et du LTD₄.

Enfin, l'excrétion urinaire de LTE₄ est significativement augmentée chez les rats streptozotocine par rapport aux autres groupes de rats et est corrélée à la glycémie. Il semble donc que la synthèse de CysLTs soit augmentée dans ce modèle expérimental de diabète. De plus, le traitement des rats diabétiques par l'insuline semble inhiber la production de CysLTs par les aortes après stimulation par l'Ang II ainsi qu'au niveau systémique.

En résumé ces résultats suggèrent une activation de la voie de la 5-LOX dans ce modèle animal de diabète de type 1, et un rôle des CysLTs dans la modulation des effets vasoconstricteurs de l'Ang II.

Publication n°2

**5-lipoxygenase expression and activity in aorta from
streptozotocin-induced diabetic rats.**

Hardy G, Vergnaud S, Lunardi J, Peoc'h M, Bessard G, Stanke-Labesque F.

Prostag Oth Lipid M, sous presse

Ce travail a fait suite aux résultats obtenus lors de l'étude n°1. Il a eu pour objectif d'explorer l'activation de la voie de la 5-LOX mise en évidence précédemment chez le rat streptozotocine, ainsi que la localisation de la 5-LOX au niveau vasculaire.

Nous avons donc étudié :

1/ l'expression de la 5-LOX au niveau des aortes des rats streptozotocine et des rats Contrôle par immunohistochimie et western blot pour la protéine, et par RT-PCR pour l'ARN messenger,

2/ la capacité des aortes à produire des CysLTs en présence d'acide arachidonique et/ou du ionophore calcique,

3/ l'effet des CysLTs sur le tonus basal et sur les aortes précontractées des rats streptozotocine et des rats Contrôle.

Le marquage de la 5-LOX par immunohistochimie suggère une localisation de l'enzyme au niveau des CML des aortes des rats diabétiques comme des rats Contrôle (Figure 16, page 97). Ces études indiquent également l'absence de monocytes/macrophages infiltrés dans l'aorte. La mise en évidence de la présence de la 5-LOX au niveau de l'aorte est confirmée par western blot et par RT-PCR.

Cependant l'analyse semi-quantitative des western blot semble indiquer un niveau d'expression de la 5-LOX similaire entre les rats diabétiques et les rats Contrôle. Ces résultats suggèrent que l'activation de la voie de la 5-LOX observée dans ce modèle de diabète n'est pas liée à une augmentation de l'expression de la 5-LOX.

La stimulation des aortes par le ionophore calcique et l'acide arachidonique démontre à nouveau la capacité du tissu aortique à produire *in vitro* des CysLTs, dans les mêmes proportions pour les rats diabétiques et les rats Contrôle. Il apparaît que, comme suggéré par d'autres travaux (Cole *et al.*, 1986), l'acide arachidonique est le facteur limitant de cette

synthèse, puisqu'il potentialise de façon concentration-dépendante l'effet du ionophore calcique. Il semble donc qu'il n'y ait pas d'augmentation de l'activité intrinsèque de la 5-LOX au niveau de l'aorte des rats diabétiques.

Enfin, sur les aortes des rats diabétiques, précontractées par la phényléphrine, le LTC₄ et le LTD₄ induisent une contraction significativement augmentée par rapport aux rats Contrôle. Ces observations sont en faveur d'une augmentation de la sensibilité des aortes aux effets vasoconstricteurs des CysLTs dans ce modèle de diabète.

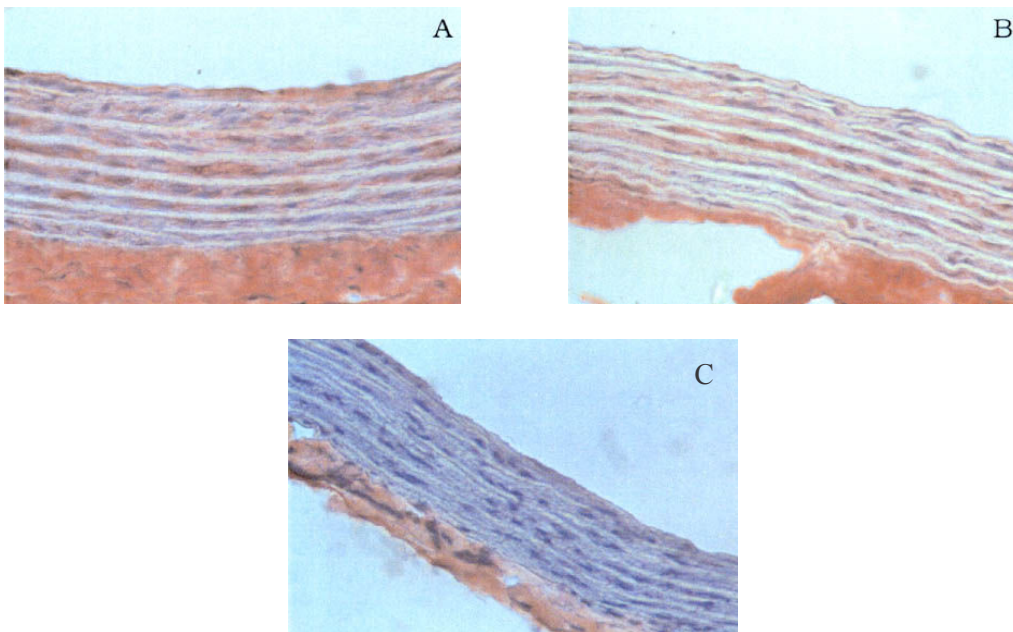


Figure 16 : Immunomarkage de la 5-lipoxygénase sur coupe d'aortes de rats Contrôle (A) et streptozotocine (B). Témoin négatif (C). (agrandissement : x 400).

En résumé, les résultats de cette étude n°2 suggèrent que l'activation de la voie de la 5-LOX chez le rat streptozotocine est liée à une augmentation de la sensibilité du tissu aortique au LTC₄ et LTD₄ plutôt qu'à une augmentation de l'expression ou de l'activité de la 5-LOX. De plus, nos résultats sont en faveur de l'expression de la 5-LOX au niveau des CML vasculaires.

Publication n°3

Increased leukotriene E₄ urinary excretion in type 1 diabetic patients.

Hardy G, Boizel R, Bessard J, Cracowski JL, BessardG, Halimi S, Stanke-Labesque F.

Soumis

Dans ce troisième article consacré au diabète de type 1, nous avons souhaité vérifier chez l'homme les résultats obtenus précédemment chez le rat streptozotocine (publications n°1 et n°2), concernant l'activation de la voie de la 5-LOX. Le LTE₄ étant le métabolite urinaire stable majoritaire de la voie de la 5-LOX, la mesure de son excrétion urinaire reflète la production endogène systémique de CysLTs. Plusieurs études ont observé une corrélation entre une augmentation de la synthèse de LTs dans l'asthme spontané ou provoqué et une augmentation de l'excrétion urinaire de LTE₄ (Kumlin, 2000). De plus, une augmentation de l'excrétion urinaire de LTE₄ a également été observée chez des patients présentant une ischémie myocardique (Carry *et al.*, 1992) ou une atteinte athérosclérotique des coronaires (Allen *et al.*, 1993). Chez des patients diabétiques de type 1 et de type 2, une augmentation de la synthèse de LTB₄ par les polynucléaires neutrophiles a été observée et corrélée à l'hémoglobine glyquée (Parlapiano *et al.*, 1999).

Ce projet d'étude clinique a été réalisé en collaboration avec le service d'Endocrinologie-Diabétologie du CHU de Grenoble (Pr Halimi, Dr Boizel), avec pour objectif principal de comparer l'excrétion urinaire de LTE₄ chez des patients diabétiques de type 1 à celle de sujets témoins.

Cette publication montre pour la première fois une augmentation de l'excrétion urinaire de LTE₄ chez des patients diabétiques de type 1 par rapport à des sujets témoins, sans corrélation entre les taux de LTE₄ et l'hémoglobine glyquée chez les patients diabétiques. Cependant, lorsque les patients étaient stratifiés selon leur hémoglobine glyquée (bon équilibre glycémique : HbA1C ≤ 7,5 % et mauvais équilibre glycémique HbA1C ≥ 9 %), ceux qui avaient un mauvais équilibre glycémique présentaient une excrétion urinaire de LTE₄ significativement plus élevée que les sujets témoins.

Ces résultats sont donc en accord avec les données observées chez le rat (publication n°1), suggérant que l'augmentation de l'excrétion urinaire de LTE_4 pourrait être le reflet de l'activation de la voie de la 5-LOX dans le diabète. Le bon équilibre glycémique semble avoir un effet freinateur sur la synthèse des CysLTs. Similairement, l'amélioration du contrôle glycémique chez des patients diabétiques de type 2 a réduit leur excrétion urinaire de 8-iso-PGF_{2 α} et de thromboxane B₂ (Davi *et al.*, 1999). Cet effet peut, dans une certaine mesure, être mis en parallèle avec l'inhibition de la synthèse des CysLTs chez les rats streptozotocine traités par insuline.

D'autre part, l'excrétion urinaire de LTE_4 est similaire chez les patients traités par IEC par rapport aux patients non traités par IEC. Bien que cette comparaison ait été réalisée sur un petit nombre de patients (n = 6), ce résultat suggère que l'augmentation de l'excrétion de LTE_4 chez les patients diabétiques n'est pas médiée par l'Ang II.

Ces observations soulèvent l'intérêt potentiel de la mesure du LTE_4 urinaire comme biomarqueur non-invasif, dans l'exploration de la physiopathologie des complications cardiovasculaires des patients diabétiques, ainsi que dans le suivi des interventions pharmacologiques susceptibles d'influer sur le développement et évolution de ces pathologies.

Increased urinary leukotriene E₄ excretion in type 1 diabetic patients.

Gaëlle Hardy, PharmD^{1,3}, Robert Boizel, MD², Janine Bessard, PhD³, Jean-Luc Cracowski, MD, PhD^{1,3}, Germain Bessard, MD^{1,3}, Serge Halimi, MD, PhD², Françoise Stanke-Labesque, PharmD, PhD^{1,3}.

Short title: Increased leukotriene E₄ in diabetic patients.

¹ Laboratory HP2 INSERM ESPRI EA3745, University of Medicine, F-38706 La Tronche Cedex, France.

² Department of Endocrinology-Diabetology-Nutrition, Grenoble University Hospital, BP217, F-38043 Grenoble Cedex 09, France.

³ Laboratory of Pharmacology, Grenoble University Hospital, BP217, F-38043 Grenoble Cedex 09, France.

Corresponding author: Françoise Stanke-Labesque

Laboratory of Pharmacology, Laboratory HP2 INSERM ESPRI EA3745, University of Medicine, F-38706 La Tronche Cedex. France.

Tel: 33.4.76.63.71.59. Fax: 33.4.76.51.86.67.

E-mail: FStanke@chu-grenoble.fr

Total word count: 3303

Journal Subject Heads pertaining: [90] lipid and lipoprotein metabolism, [189] type 1 diabetes,

Abstract

Background: Cardiovascular complications are the major cause of morbidity/mortality in people with both types of diabetes. In addition, it is now well established that diabetes mellitus is associated with inflammatory state. Leukotrienes are arachidonic acid metabolites derived from the 5-lipoxygenase pathway that possess vasoactive, chemotactic and proinflammatory properties. The aim of this study was to evaluate 1/ the urinary excretion of leukotriene E₄ (LTE₄), the end product of the 5- lipoxygenase pathway, in type 1 diabetic subjects (n = 34) and age- and sex-matched healthy volunteers (n = 28), and 2/ the influence of glycemic control attested by HbA_{1C} on LTE₄ excretion.

Methods and Results: Urinary excretion of LTE₄ (pg/mg creatinine), measured by liquid chromatography tandem mass spectrometry, was significantly (P = 0.033) increased in diabetic patients (median (10th-90th percentiles): 42.1 pg/mg creatinine (16.7-71.4), n = 34) compared to healthy subjects (median (10th-90th percentiles): 25.5 pg/mg creatinine (13.9-54.1), n = 28). Predetermined subgroup analysis validated increased LTE₄ excretion in patients with a poor glycemic control (HbA_{1C} ≥ 9 %) (median (10th-90th percentiles): 43.3 pg/mg creatinine (21.6-70.5), n = 14) in comparison to healthy subjects (P = 0.031). No difference was observed between patients with good metabolic control (HbA_{1C} ≤ 7.5 %) (median (10th-90th percentiles): 36.4 pg/mg creatinine (14.8-65.9), n = 20) and healthy subjects and within the 2 subgroups of diabetic subjects (P = 0.58).

Conclusions: This study suggested that increased LTE₄ excretion in type 1 diabetic state might reflect systemic activation of the 5-lipoxygenase pathway, that could participate and aggravate underlying inflammatory and vascular events.

Key Words: diabetes mellitus, inflammation, lipids,

Abbreviations: 5-LOX, 5-lipoxygenase; ACE inhibitor, angiotensin converting enzyme inhibitor; LTE₄, leukotriene E₄; LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, GMC, diabetic patients with good metabolic control; PMC, diabetic patients with poor metabolic control;

Introduction

Cardiovascular complications are the major cause of morbidity and mortality in people with both types of diabetes ¹. It is now well established that cardiovascular diseases are associated with inflammatory state, however there existed an active debate over whether inflammation was a cause or a result of cardiovascular diseases ². In this context, numerous biomarkers of inflammation in cardiovascular risk prediction are emerging ³.

Cysteinyl leukotrienes (CysLTs: LTC₄, LTD₄ and LTE₄) are metabolites of arachidonic acid derived from the 5-lipoxygenase (5-LOX) pathway. LTE₄, the major end product of this enzymatic pathway, is excreted in urine and provides the best target for analysis in order to appreciate *in vivo* CysLT production ⁹. Indeed, an increased urinary excretion of LTE₄ was previously reported in patients with coronary artery disease ²¹ and cardiac ischemia ²².

Cardiovascular complications in diabetes are linked in part to abnormalities in the arachidonic cascade ⁴ to either the free radical ^{5,6}, the cyclooxygenase ⁷ or the lipoxygenase pathways ⁸.

Compelling evidences suggest that CysLTs could play a major role in the onset of cardiovascular changes associated with diabetes mellitus. Indeed CysLTs do have pro-inflammatory, vasomotor ¹⁰ and proliferative ¹¹ properties. They modulate the vascular tone of coronary artery ¹² and aorta ¹³ from animal model of diabetes mellitus, whereas they possess no vascular effect on vessels from control rats. Furthermore, the urinary excretion of LTE₄ is higher in streptozotocin-induced diabetic rats compared to control rats ^{13,14} suggesting an activation of the 5-LOX pathway in this experimental model of type 1 diabetes mellitus. In line with these findings, an increased production of LTB₄ in response to the calcium ionophore A23187 has been reported in polymorphonuclear neutrophils from diabetic patients ¹⁵. However, the production of CysLTs in diabetic patients remained to be investigated.

Therefore, the main objective of the present study was to determine whether the urinary excretion of LTE₄ in type 1 diabetic patients was different from that of gender- and age-paired

healthy controls. The secondary objectives were to study the influence of glycemic control and angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor treatment on LTE_4 excretion.

Methods

Subjects

The protocol was approved by the ethical committee of the University Hospital of Grenoble (France) and written informed consent was obtained from each participating subject.

Patients were included as outpatients at the Department of Endocrinology-Diabetology-Nutrition, while healthy volunteers were included at the Grenoble Inserm Clinical Research Center.

Thirty-four patients and twenty-eight healthy subjects (C group) age- and sex-matched with the diabetic patients (D group) were included. All were Caucasians. Diabetes was defined according to the American Diabetes Association criteria ¹⁶. Patients with renal insufficiency, heart failure, asthma, infectious disease were excluded as well as patients treated with steroids. Both diabetic patients and healthy subjects were non-smokers.

One patient had a history of coronary heart disease and twelve patients had diabetic retinopathy (determined by direct ophthalmoscopy through a dilated pupil). Four patients had a urinary albumin excretion rate $\geq 20 \mu\text{g}/\text{min}$ (measured by immunonephelometry, Dade Behring). Among the 34 diabetic patients, predetermined subgroups were good metabolic control (GMC) defined as glycohemoglobin ($\text{HbA}_{1\text{C}}$) $\leq 7.5 \%$ ($n = 20$) and poor metabolic control (PMC) defined as $\text{HbA}_{1\text{C}} \geq 9 \%$ ($n = 14$) when the urine collection was done. Insulin was administered by an external pump in 14/20 GMC patients and six patients were treated with ACE inhibitors. The characteristics of diabetic patients and healthy subjects are detailed in Table 1.

Each patient performed an overnight urine collection. Urine samples were stored at - 80 °C until analysis.

Measurement of LTE₄ urinary excretion by liquid chromatography- tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

Measurement of LTE₄ was performed on 4-mL centrifuged urine. LTE₄-d₃ (4 ng) was added on each urine sample as an internal standard. Solid phase extraction was performed by using C18 (EC) cartridge, (100 mg/10 ml), purchased from International Sorbent Technology (UK). LTE₄ was eluted with methanol. Extracts were dried under nitrogen flow at room temperature as previously described^{17,13} and reconstituted in 40 µL mobile phase: methanol-10 mM ammonium formate (80:20, v/v). After centrifugation 10 µL were injected into the LC-MS/MS system. The LC system consisted of an Agilent 1100 series binary pumps, a vacuum degasser, a column temperature controller, an Agilent 1100 autosampler (Agilent, Germany) and a Kromasil C8, 5µm (125x2 mm) column (Macherey-Nagel, France) maintained at 30°C. The mobile phase consisted of 10 mM ammonium formate (phase A) and methanol (phase B) delivered at a flow rate of 200 µl/min as follows: initial percentage of B = 58 % maintained 1 min, increased in a linear gradient to 70 % in 9 min, maintained 4 min at 70 %, then increased to 95 % in 1 min, maintained 2 min and finally decreased to 58 % in 1 min. The detection was performed in negative mode on an API-3000 tandem mass-spectrometer (Applied Biosystems/ MDS SCIEX, Canada) equipped with a TurboIonSpray[®] source. Acquisition was made in the multiple reaction monitoring mode using the following transition: m/z 438.2 → 333.0 for LTE₄ and m/z 441.1 → 336.1 for LTE₄-d₃¹⁸. Calibration curves were constructed using weighted (1/x) linear least-square regression. The levels of LTE₄ were corrected to urinary level of creatinine measured with a Jaffe kinetic-based assay (Modular, Roche Diagnostic, France).

Statistical analysis

LTE₄ concentrations were expressed as pg per mg of creatinine¹⁹. All quantitative data were presented as the median, 10th and 90th percentiles. Qualitative data were presented as number and percentage.

The data were analyzed by non-parametric method to avoid assumption about distribution of LTE₄ levels. For comparison of LTE₄ excretion among the 3 groups, a Kruskal-Wallis test was performed; subsequent pairwise comparisons were made with the non-parametric Mann-Whitney test. Correlations were analyzed using the Spearman rank test. $P < 0.05$ was considered as significant.

Results

Main objective

Urinary LTE₄ excretion was significantly ($P = 0.033$) increased in diabetic subjects (median (10th-90th percentiles): 42.1 pg/mg creatinine (16.7-71.4), $n = 34$) as compared with control subjects (median (10th-90th percentiles): 25.5 pg/mg creatinine (13.9-54.1), $n = 28$).

Secondary objectives

The excretion of urinary LTE₄ was significantly ($P = 0.03$) increased in diabetic subjects with poor metabolic control as compared with healthy subjects (Figure 1); however there was no significant difference between diabetic subjects with good metabolic control and healthy subjects ($P = 0.14$), and within the 2 groups of diabetic subjects ($P = 0.576$) (Figure 1). No correlation was found between urinary LTE₄ excretion and HbA_{1C}. Among the diabetic patients, urinary LTE₄ excretion was similar ($P = 0.857$) between those treated with ACE inhibitors (median (10th-90th percentiles): 42.2 pg/mg creatinine (23.5-69.1), $n = 6$) and those

not treated with ACE inhibitors (median (10th-90th percentiles): 41.6 pg/mg creatinine (16.3-71.0), n = 28).

Discussion

In the present study, the urinary levels of LTE_4 were measured by a validated LC/MS-MS method that provided highly selectivity and specificity for LTE_4 . Our data provided first evidence that urinary excretion of LTE_4 was increased in diabetic patients compared to healthy control subjects. This result was in agreement with previous experimental studies showing an increased urinary excretion of LTE_4 in streptozotocin-induced diabetic rats compared to control rats^{13,14}. In addition to the activation of the cyclooxygenase^{6,20} and the free radical pathways^{5,6} previously reported, these data suggested that the 5-lipoxygenase pathway was also activated in type 1 diabetes mellitus. These results were consistent with the growing body of evidence suggesting the involvement of leukotrienes in cardiovascular diseases. Indeed, an increased urinary excretion of LTE_4 was previously reported in patients with coronary artery disease²¹ and cardiac ischemia²². Moreover, recent human genetic studies showed that polymorphisms in the 5-LO promoter and certain 5-LOX-activating protein (FLAP) haplotypes have been linked to myocardial infarction or stroke risk^{23,24}. In addition, when patients were stratified according to their metabolic control, the urinary excretion of LTE_4 was significantly higher in patients with poor metabolic control compared to that of healthy subjects. Interestingly, improved metabolic control was associated with a significant reduction in 8-iso-prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ and 11-dehydro-thromboxane B_2 excretion in non-insulin-dependent diabetic patients⁶ suggesting, as the present study, that hyperglycemia might activate arachidonic acid metabolism in oxidized lipids. Similarly, the urinary excretion of LTE_4 was lower in patients with good metabolic control than in patients with poor metabolic control (present study) although the difference did not reach statistical significance. In line with this observation, the urinary excretion of LTE_4 was significantly decreased in streptozotocin-induced diabetic rats treated with insulin¹³.

Consistent with these data, Natarajan et al. showed that hyperglycemic conditions increased 12-LOX activity and expression in cultured porcine aortic vascular smooth muscle cells ²⁵. Therefore, one could hypothesize that diabetic condition can lead to enhanced 5-LOX expression and aggravate underlying inflammatory and vascular events. However urinary levels of LTE₄ were not correlated with HbA_{1C}, which reflected glycemia during the last three months. Although no diurnal variation of LTE₄ urinary excretion was observed in healthy subjects ¹⁹ little is known about its synthesis kinetic. Therefore, a potential influence of glucose excursions on short-term increase in LTE₄ production cannot be ruled out in well-controlled diabetes. This might account for the lack of correlation of LTE₄ excretion with HbA_{1C} in our study.

We previously reported in aorta from experimental models of diabetes mellitus ¹³ and hypertension ^{26,27}, as well as in human internal mammary artery ²⁸ that angiotensin II stimulated the release of CysLTs. With regards to the benefic effects of ACE inhibitor on vascular morbidity and mortality beyond blood pressure reduction ²⁹, the evaluation of ACE inhibitor effect on LTE₄ urinary excretion was of particular interest. In the present study, among the diabetic patients, the urinary excretion of LTE₄ was similar between those treated with ACE inhibitors and those not treated with ACE inhibitors. Although they were preliminary and need to be confirmed, these data were not in favor with a benefic effect of ACE inhibitors through inhibition of CysLT release.

In conclusion, the present study demonstrated that the urinary excretion of LTE₄ was increased in type 1 diabetic patients. With regard to recent human genetic studies showing that polymorphisms in the 5-LO promoter and 5-LOX-activating protein (FLAP) haplotypes have been linked to cardiovascular disease susceptibility ^{23,24}, our data suggested that urinary LTE₄ could be an interesting non invasive biomarker candidate for the evaluation of cardiovascular risk.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the “Délégation régionale à la Recherche Clinique du CHU de Grenoble” and by the Clinical Research Center of Grenoble.

References

1. Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia*. 2001;44:S14-21.
2. Tracy RP. Inflammation in cardiovascular disease: cart, horse or both--revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1514-5.
3. Ridker PM, Brown NJ, Vaughan DE, Harrison DG, Mehta JL. Established and emerging plasma biomarkers in the prediction of first atherothrombotic events. *Circulation*. 2004;109:IV6-19.
4. Natarajan R, Nadler JL. Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1542-8.
5. Davi G, Chiarelli F, Santilli F, Pomilio M, Vigneri S, Falco A, Basili S, Ciabattone G, Patrono C. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation*. 2003;107:3199-203.
6. Davi G, Ciabattone G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F, Capani F, Patrono C. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F_{2alpha} and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*. 1999;99:224-9.
7. Hishinuma T, Koseki Y, Murai Y, Yamazaki T, Suzuki K, Mizugaki M. Urinary thromboxane A₂/prostacyclin balance reflects the pathological state of a diabetic. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 1999;58:263-71.

8. Antonipillai I, Nadler J, Vu EJ, Bughi S, Natarajan R, Horton R. A 12-lipoxygenase product, 12-hydroxyeicosatetraenoic acid, is increased in diabetics with incipient and early renal disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81:1940-5.
9. Kumlin M. Measurement of leukotrienes in humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:S102-6.
10. Folco G, Rossoni G, Buccellati C, Berti F, Maclouf J, Sala A. Leukotrienes in cardiovascular diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161:S112-6.
11. Porreca E, Di Febbo C, Di Sciullo A, Angelucci D, Nasuti M, Vitullo P, Reale M, Conti P, Cuccurullo F, Poggi A. Cysteinyl leukotriene D4 induced vascular smooth muscle cell proliferation: a possible role in myointimal hyperplasia. *Thromb Haemost.* 1996;76:99-104.
12. Roth DM, Reibel DK, Lefer AM. Vascular responsiveness and eicosanoid production in diabetic rats. *Diabetologia.* 1983;24:372-6.
13. Hardy G, Stanke-Labesque F, Peoc'h M, Hakim A, Devillier P, Caron F, Morel S, Faure P, Halimi S, Bessard G. Cysteinyl leukotrienes modulate angiotensin II constrictor effects on aortas from streptozotocin-induced diabetic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1751-8.
14. Valdivielso JM, Montero A, Badr KF, Munger KA. Inhibition of 5-lipoxygenase activating protein decreases proteinuria in diabetic rats. *J Nephrol.* 2003;16:85-94.
15. Parlapiano C, Danese C, Marangi M, Campana E, Pantone P, Giovanniello T, Zavattaro E, Sanguigni S. The relationship between glycated hemoglobin and polymorphonuclear leukocyte leukotriene B₄ release in people with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 1999;46:43-5.
16. American Diabetes Association: clinical practice recommendations 1997. *Diabetes Care.* 1997;20:S1-70.

17. Qiu DW, Hui KP, Lee CW, Lim TK, Tan WC. Simplified method for measuring urinary leukotriene E₄. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1996;677:152-5.
18. Wu Y, Li LY, Henion JD, Krol GJ. Determination of LTE₄ in human urine by liquid chromatography coupled with ionspray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 1996;31:987-93.
19. Kumlin M, Stensvad F, Larsson L, Dahlen B, Dahlen SE. Validation and application of a new simple strategy for measurements of urinary leukotriene E₄ in humans. *Clin Exp Allergy.* 1995;25:467-79.
20. Shanmugam N, Gaw Gonzalo IT, Natarajan R. Molecular mechanisms of high glucose-induced cyclooxygenase-2 expression in monocytes. *Diabetes.* 2004;53:795-802.
21. Allen SP, Sampson AP, Piper PJ, Chester AH, Ohri SK, Yacoub MH. Enhanced excretion of urinary leukotriene E₄ in coronary artery disease and after coronary artery bypass surgery. *Coron Artery Dis.* 1993;4:899-904.
22. Carry M, Korley V, Willerson JT, Weigelt L, Ford-Hutchinson AW, Tagari P. Increased urinary leukotriene excretion in patients with cardiac ischemia. In vivo evidence for 5-lipoxygenase activation. *Circulation.* 1992;85:230-6.
23. Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, Fan J, Wu H, Mar R, Lusis AJ, Mehrabian M. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med.* 2004;350:29-37.
24. Helgadottir A, Manolescu A, Thorleifsson G, Gretarsdottir S, Jonsdottir H, Thorsteinsdottir U, Samani NJ, Gudmundsson G, Grant SF, Thorgeirsson G, Sveinbjornsdottir S, Valdimarsson EM, Matthiasson SE, Johannsson H, Gudmundsdottir O, Gurney ME, Sainz J, Thorhallsdottir M, Andresdottir M, Frigge ML, Topol EJ, Kong A, Gudnason V, Hakonarson H, Gulcher JR, Stefansson K. The

gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet.* 2004;36:233-9.

25. Natarajan R, Gu JL, Rossi J, Gonzales N, Lanting L, Xu L, Nadler J. Elevated glucose and angiotensin II increase 12-lipoxygenase activity and expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:4947-51.
26. Stanke-Labesque F, Devillier P, Veitl S, Caron F, Cracowski JL, Bessard G. Cysteinyl leukotrienes are involved in angiotensin II-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2001;49:152-60.
27. Stanke-Labesque F, Hardy G, Vergnaud S, Devillier P, Peoc'h M, Randon J, Bricca G, Caron F, Cracowski JL, Bessard G. Involvement of cysteinyl leukotrienes in angiotensin II-induced contraction in isolated aortas from transgenic (mRen-2)²⁷ rats. *J Hypertens.* 2002;20:263-72.
28. Stanke-Labesque F, Devillier P, Bedouch P, Cracowski JL, Chavanon O, Bessard G. Angiotensin II-induced contractions in human internal mammary artery: effects of cyclooxygenase and lipoxygenase inhibition. *Cardiovasc Res.* 2000;47:376-83.
29. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in people with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *Lancet.* 2000;355:253-9.

Figure 1: Urinary excretion rates of LTE_4 in 28 healthy subjects (C), 20 diabetic subjects with good metabolic control (GMC) and 14 diabetic subjects with poor metabolic control (PMC).

*: $P = 0.031$ vs. C.

The line drawn through the middle of the boxes represents the median. The top and the bottom of each box are the 75th and the 25th centiles respectively. The top and the bottom of each bar are the 90th and the 10th centiles respectively

Table 1, Clinical characteristics of healthy subjects (C) and diabetic patients (D) with good metabolic control (GMC) or poor metabolic control (PMC).

	Healthy subjects	Diabetics subjects GMC	Diabetics subjects PMC
Number	28	20	14
Median age, years (10 th -90 th percentiles)	38.5 (23.0-59.4)	39.0 (23.5-62.5)	41.0 (20.9-57.5)
Sex (M/F)	12/16	11/9	7/7
Median body mass index, kg/m ² (10 th -90 th percentiles)	22.7 (18.9-26.5)	22.6 (19.9-29.5)	27.5 (22.1-29.3)*
Median diabetes duration, years (10 th -90 th percentiles)	NA	15.0 (6.5-42.0)	18.0 (3.6-29.3)
Median HbA _{1C} , %, (10 th -90 th percentiles)	NA	7.1 (5.9-7.5)	9.1 (8.1-10.1)†
Median fasting plasma glucose, mmol/L (10 th -90 th percentiles)	4.9 (4.13-5.49)	-	-
Median plasma creatinine, µmol/L (10 th -90 th percentiles)	84.0 (68.1-98.6)	80.5 (69-102)	86.0 (59.8-107.4)
Systolic BP, mm Hg (10 th -90 th percentiles)	120.0 (105.5-139.5)	125.0 (110.0-130.0)	120.0 (99.2-140)
Diastolic BP, mm Hg (10 th -90 th percentiles)	70.5 (61.0-84.5)	78.0 (65.0-83.8)	75.0 (63.0-87)
BP>140/90 (n)	0	0	0
Microvascular complications:			
- Retinopathy (n (%))	0	6 (30.0)	6 (42.8)
- UAE ≥ 20 µg/min (n)	0	2	2
Macrovascular complications (n):	0	1	0
ACE inhibitor (n (%))	0	4 (20.0)	2 (14.3)

NA: not applicable; BP: blood pressure; UAE: urinary albumin excretion, n = number of patients. The individual UAE values were 20 and 69 µg/min, and 30 and 247 µg/min for the GMC and PMC subgroups respectively.

*: $P = 0.002$ versus C and $P = 0.045$ versus DG; †: $P < 0.0001$ versus DG

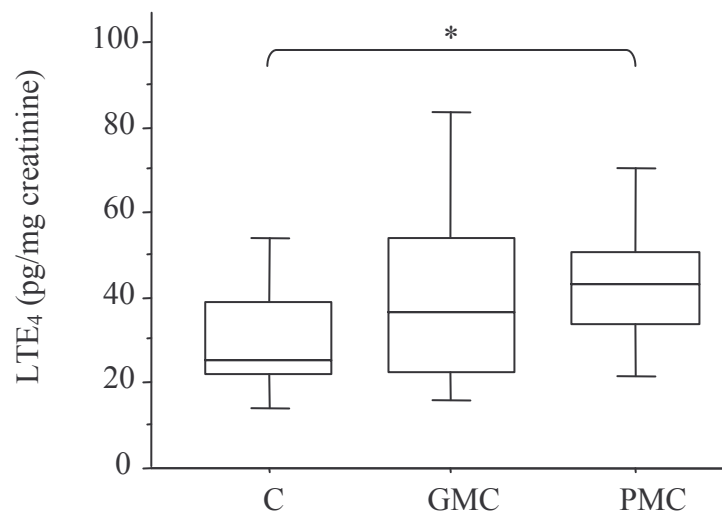


Figure 1

Publication n°4

Involvement of cysteinyl leukotrienes in angiotensin II-induced contraction in isolated aortas from transgenic (mRen-2)²⁷ rats.

Stanke-Labesque F, Hardy G, Vergnaud S, Devillier P, Peoc'h M, Randon J, Bricca G,
Caron F, Cracowski JL, Bessard G.

J Hypertens (2002). 20: 263-72.

Comme nous l'avons rappelé dans les données de la littérature, l'Ang II est un acteur majeur de la régulation de la pression artérielle, et est impliquée dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle essentielle dans plusieurs modèles animaux ou chez l'homme. De plus l'Ang II stimule la synthèse d'eicosanoïdes en induisant une activation des phospholipases et donc la libération d'acide arachidonique (Nasjletti, 1998). Ainsi, plusieurs travaux suggèrent un rôle des dérivés des lipoxygénases dans les mécanismes de l'hypertension artérielle induite par l'Ang II. La phénidone, inhibiteur non spécifique des lipoxygénases, diminue l'effet presseur de l'Ang II *in vivo* et la contraction à l'Ang II *in vitro* sur artère fémorale de rat (Stern *et al.*, 1989). De plus, les travaux menés au sein du laboratoire sur le modèle des rats hypertendus SHR indiquent que chez les rats SHR et pas chez les rats Contrôle : 1/ les CysLTs contribuent aux effets vasoconstricteurs de l'Ang II et 2/ que l'Ang II induit la synthèse de CysLTs par les aortes (Stanke-Labesque *et al.*, 2001). Dans la poursuite de ces travaux, l'étude n°4 s'est intéressée au rôle des LTs dans la modulation du tonus vasculaire sur un modèle d'hypertension artérielle dépendante de l'Ang II, le rat transgénique (mRen-2)27.

Les résultats de cette étude montrent que le pré-traitement des aortes par un inhibiteur sélectif de la 5-LOX, le AA861, ou par un antagoniste des récepteurs CysLT₁, le MK571, réduit significativement la contraction à l'Ang II chez les rats transgéniques (TG) uniquement. Ces observations mettent en évidence pour la première fois la contribution des CysLTs dans les effets vasoconstricteurs de l'Ang II chez les rats TG présentant une hypertension dépendante de l'Ang II, et pas chez les rats Contrôles normotendus.

De plus, l'Ang II induit une augmentation de la synthèse de CysLTs par les aortes des rats TG. Cet effet est bloqué par le losartan. Ces résultats suggèrent que l'Ang II induit la synthèse

de CysLTs via la stimulation des récepteurs AT₁, et sont en accord avec ceux précédemment publiés dans le laboratoire (Stanke-Labesque *et al.*, 2001).

Le marquage immunohistochimique de coupes d'aortes localise la 5-LOX au niveau de la média, et la protéine 5-LOX est identifiée par western blot sur les aortes des rats TG et des rats Contrôle. Le niveau d'expression de la 5-LOX semble identique entre les deux groupes de rats, suggérant que l'augmentation de la production de CysLTs chez les rats TG n'est pas due à une augmentation de l'expression de la 5-LOX mais plutôt à une modification de la transduction du signal dans les effets vasculaires de l'Ang II.

Enfin, sur les aortes précontractées à la phényléphrine des rats TG, le LTC₄ et le LTD₄ induisent une réaction biphasique : une relaxation aux faibles concentrations puis une contraction à la plus forte concentration (0,1 µM). Cette contraction, qui n'était pas observée chez les rats Contrôle, était inhibée par le MK571. Ces résultats sont en faveur d'une augmentation de la sensibilité des aortes des rats TG aux effets vasoconstricteurs des CysLTs.

Publication n°5

Inhibition of leukotriene synthesis with MK-886 prevents a rise in blood pressure and reduces noradrenaline-evoked contraction in L-NAME-treated rats.

Stanke-Labesque F, Hardy G, Caron F, Cracowski JL, Bessard G.

Br J Pharmacol (2003). 140: 186-94.

La publication n°5 est la deuxième étude consacrée à l'hypertension artérielle dans cette thèse. Comme les travaux précédents l'ont montré, les CysLTs ne semblent impliqués dans les effets vasoconstricteurs de l'Ang II que dans un contexte pathologique tel que l'hypertension artérielle monogénique (publication n°4) ou multigénique (Stanke-Labesque *et al.*, 2001) ou le diabète (publication n°1 et n°2).

Il était cependant intéressant d'étudier le rôle potentiel des CysLTs dans la modulation d'un autre médiateur vasoactif important dans la pathogenèse de l'hypertension, la noradrénaline. Nous avons choisi pour cela le modèle du rat L-NAME, pour lequel la voie adrénergique joue un rôle important dans l'augmentation de la pression artérielle et pour lequel il existe une inflammation vasculaire importante. De plus, une étude sur l'artère de la queue de rat montre que la noradrénaline stimule le métabolisme de l'acide arachidonique via l'activation des cPLA2 des CML (LaBelle *et al.*, 1998).

Nous avons donc souhaité étudier le rôle des LTs *in vivo* dans la régulation de la pression artérielle et *in vitro* dans les effets vasoconstricteurs de la noradrénaline .

La publication n°5 montre pour la première fois que l'inhibition de la voie de la 5-LOX, par administration orale d'un inhibiteur de la FLAP, a eu pour conséquence de prévenir l'hypertension artérielle induite par le L-NAME. Ces résultats suggèrent chez les rats L-NAME un rôle des dérivés de la 5-LOX dans la régulation de la pression artérielle.

De plus, le prétraitement des aortes par le MK-886, le MK571 ou le BAY-u9773, diminue la contraction à la noradrénaline uniquement des aortes avec endothélium des rats L-NAME, et pas des autres groupes de rats. Ces résultats suggèrent le rôle de récepteurs CysLT₁ et CysLT₂ localisés au niveau endothélial. Il semble donc que les CysLTs soient impliqués dans les effets vasoconstricteurs de la noradrénaline sur ce modèle d'hypertension artérielle.

Enfin, la noradrénaline induit chez les rats L-NAME une augmentation du relargage des CysLTs par les aortes avec endothélium, via la stimulation de récepteurs α adrénergiques endothéliaux. Ces résultats sont à nouveau en faveur de la contribution des CysLTs dans la contraction à la noradrénaline des aortes avec endothélium.

L'ensemble de ces observations suggère que les CysLTs interviennent également dans les effets vasoconstricteurs de la noradrénaline et confirme le rôle des LTs dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle essentielle. Ces données renforcent l'intérêt potentiel de l'inhibition de la voie de la 5-LOX dans de traitement de cette pathologie.

Discussion générale

Parmi les études présentées dans cette thèse, 4 ont été réalisées sur des modèles animaux. Comme évoqué précédemment, ces modèles permettent d'étudier en détail des mécanismes pharmacologiques dans des contextes pathologiques, mais il n'en demeure pas moins que l'extrapolation à l'homme, entre espèces ou entre souches de rats par exemple, peut s'avérer délicate. Une étude clinique a été réalisée et a permis de transposer chez l'homme certains résultats observés chez l'animal.

I. Rôle des cystéinyl leucotriènes dans les effets vasoconstricteurs de l'angiotensine II

L'étude de la modulation des effets vasculaires de l'Ang II par les CysLTs a été réalisée sur aorte de rats diabétiques (étude n°1), et sur aorte de rats TG hypertendus (étude n° 4). Ces deux études indiquent que les CysLTs participent à la contraction à l'Ang II sur aortes de rats malades mais pas chez les rats Contrôle.

Nous avons choisi d'étudier la contraction à l'Ang II chez le rat streptozotocine au vu des données de la littérature qui suggèrent que l'Ang II est impliquée dans la pathogenèse des complications cardiovasculaires du diabète (Drury *et al.*, 1984; Cooper, 2004). Il était également intéressant de confronter ce modèle de diabète insulino-déficient avec un modèle de pré-diabète, le rat Fructose.

De plus, les précédentes études menées au sein du laboratoire ont mis en évidence le rôle des dérivés de la 5-LOX dans la contraction à l'Ang II sur aortes de rats SHR (Stanke-Labesque *et al.*, 2001) et sur artères mammaires internes humaines provenant de patients opérés pour un pontage aorto-coronarien (Stanke-Labesque *et al.*, 2000). Le modèle du rat TG (mRen-2)27 est un modèle d'hypertension artérielle essentielle qui présente la particularité d'avoir une

hyperexpression tissulaire de l'Ang II. Il était donc également intéressant d'y étudier le rôle des CysLTs dans la contraction à l'Ang II.

Les résultats des études n°1 et n°4 sont en accord avec les travaux antérieurs et confirment l'implication des dérivés de la 5-LOX dans la modulation de la contraction à l'Ang II sur les aortes des rats malades mais pas chez les rats Contrôle. Chez les rats diabétiques, le rôle des dérivés de la 5-LOX semble endothélium-indépendant puisque le AA861 diminue la contraction à l'Ang II aussi bien sur les aortes intactes que sans endothélium. Ni un antagoniste des récepteurs CysLT₁ (le MK571), ni un antagoniste mixte CysLT₁-CysLT₂ (le BAY-u9773) n'ont modifié la contraction à l'Ang II sur les aortes avec et sans endothélium des rats streptozotocine, suggérant le rôle d'un récepteur non-CysLT₁ et non-CysLT₂ dont la localisation est encore inconnue. L'hypothèse de l'existence d'un récepteur aux CysLTs autre que les CysLT₁ et CysLT₂ actuellement clonés a également été proposée à la suite d'autres études fonctionnelles (Norel *et al.*, 2004). En revanche, l'effet des CysLTs semble médié via les récepteurs CysLT₁ chez les rats TG. Chez les rats SHR, le rôle des CysLTs dans la contraction à l'Ang II était, de même, médié via les récepteur CysLT₁ endothéliaux (Stanke-Labesque *et al.*, 2001).

De même que sur les aortes des rats SHR (Stanke-Labesque *et al.*, 2001), l'Ang II induit une augmentation de la production de CysLTs par les aortes des rats diabétiques indépendamment de la présence d'endothélium. Cet effet semble médié via la stimulation des récepteurs AT₁ de l'Ang II car il est inhibé par un antagoniste des récepteurs AT₁, le losartan, et pas par le PD123319, un antagoniste des récepteurs AT₂. Chez les rats TG, l'Ang II induisait également la synthèse de CysLTs par les aortes via la stimulation de récepteurs AT₁.

Les CysLTs semblent donc n'être impliqués dans les effets vasculaires de l'Ang II sur aorte isolée que dans un contexte pathologique tel que le diabète (étude n°1) et l'hypertension artérielle (Stanke-Labesque *et al.*, 2001), (étude n°4). L'activation de la voie de la 5-LOX dans ces circonstances pathologiques pourrait contribuer aux processus inflammatoires sous-jacents au niveau vasculaire ainsi qu'au développement de lésions d'athérosclérose chez l'homme, comme nous l'avons évoqué précédemment (Mehrabian *et al.*, 2003).

Dans l'étude n°1, un groupe de rats diabétiques était traité par une injection sous-cutanée journalière d'insuline durant 21 jours. Ce traitement a permis de corriger certaines caractéristiques biologiques du diabète (perte de poids, polyurie, hyperglycémie, glycosurie), mais a eu également une incidence sur la réactivité vasculaire de ces animaux. En effet, la contraction à l'Ang II des aortes avec endothélium des rats traités par insuline était significativement diminuée par rapport aux rats Contrôle. L'hypothèse proposée est un rôle inhibiteur de l'insuline sur la contraction à l'Ang II via une augmentation de l'expression de la NO synthase endothéliale (Kuboki *et al.*, 2000). De plus, l'inhibition de la voie de la 5-LOX ne modifiait pas la contraction à l'Ang II, et la stimulation des aortes par l'Ang II n'induisait pas le relargage de CysLTs, suggérant que l'insuline inhiberait la production de CysLTs induite par l'Ang II dans ce modèle de diabète. Cet effet de l'insuline interviendrait via l'activation de la voie des tyrosines kinases et l'inhibition du relargage de calcium intracellulaire par l'Ang II (Touyz *et al.*, 1996).

Un modèle de pré-diabète avec insulino-résistance et hyper-insulinémie, le rat fructose (Faure *et al.*, 1999), était également étudié dans la publication n°1. Les CysLTs ne semblent pas impliqués dans la contraction à l'Ang II dans ce modèle, et l'Ang II n'a pas induit d'augmentation de la production de CysLTs au niveau aortique. Ces résultats sont en accord

avec l'effet inhibiteur de l'insuline évoqué précédemment. Il semble donc que les modèles du rat streptozotocine et du rat Fructose ne possèdent pas les mêmes voies de transduction du signal en ce qui concerne l'implication des LTs.

II. Rôle des cystéinyl leucotriènes dans les effets vasoconstricteurs de la noradrénaline

Le rôle modulateur des LTs dans la contraction de l'aorte à la noradrénaline a été étudié chez le rat streptozotocine (publication n°1) et chez le rat L-NAME (publication n°5). Les résultats de ces travaux indiquent que les CysLTs contribuent également aux effets vasoconstricteurs de la noradrénaline chez les rats diabétiques et chez les rats hypertendus.

En effet, l'inhibition sélective de la voie de la 5-LOX par le AA861 diminue la contraction à la noradrénaline des aortes intactes, à la fois chez les rats L-NAME (étude n°5) et chez les rats streptozotocine (étude n°1) mais pas chez les rats Contrôle. Cet effet modulateur des LTs interviendrait via des récepteurs CysLT₁ et CysLT₂ endothéliaux chez les rats L-NAME.

L'implication des CysLTs a été confirmée dans l'étude n°5 par l'augmentation du relargage de CysLTs par les anneaux aortiques avec endothélium des rats L-NAME après stimulation par la noradrénaline. Ce résultat suggère la stimulation de récepteurs α adrénergiques endothéliaux par la noradrénaline.

De plus, les résultats de l'étude n°5 montrent pour la première fois que le blocage de la FLAP par le MK-886 prévient la hausse de la pression artérielle, et suggèrent donc un rôle des dérivés de la 5-LOX dans la régulation de la pression artérielle chez les rats L-NAME et pas chez les rats Contrôle. En accord avec ce résultat, l'inhibition non spécifique des

lipoxigénases par la phénidone réduisait la pression artérielle des rats SHR (Stern *et al.*, 1993).

Il semble donc que le rôle modulateur des LTs ne soit pas spécifique de la contraction de l'aorte à l'Ang II mais intervienne également dans les effets vasoconstricteurs de la noradrénaline. L'ensemble de ces observations est en faveur de l'implication des LTs dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle essentielle et des complications cardiovasculaires du diabète par l'intermédiaire de deux médiateurs vasoactifs tels que l'Ang II et la noradrénaline.

III. Effets des cystéinyl leucotriènes sur le tonus de base et sur aorte pré-contractée

L'effet des CysLTs sur le tonus de base des aortes ainsi qu'après contraction par la phényléphrine a été étudié chez les rats streptozotocine (publication n°1 et 2), les rats TG (publication n°4) et les rats L-NAME (publication n°5).

Comme résumé dans le tableau 7, le LTC₄ et le LTD₄ ont peu ou pas d'effet sur le tonus de base des rats Contrôle. Il en est de même pour le LTE₄. En revanche le LTC₄ et le LTD₄ induisent une contraction des aortes des rats streptozotocine et des rats L-NAME.

	LTC ₄	LTD ₄
Rat streptozotocine	Contraction (0,1 µM)	Contraction (0,1 µM)
Rat Contrôle wistar	Pas ou peu d'effet	Pas ou peu d'effet
Rat transgénique	Pas d'effet	Pas d'effet
Rat Contrôle SD	Pas d'effet	Pas d'effet
Rat L-NAME	Pas d'effet	Contraction (0,1 µM)
Rat Contrôle wistar Méthocel	Pas d'effet	Pas d'effet

Tableau 7 : Effet des leucotriènes C₄ et D₄ sur le tonus de base d'aortes de rat.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Roth *et al.* (Roth *et al.*, 1984) qui montraient une augmentation de la réponse vasopressive au LTC₄ et au LTD₄ des coronaires de rats diabétiques alloxane par rapport aux rats Contrôle, et avec les travaux de Stanke-Labesque *et al.* (Stanke-Labesque *et al.*, 2001) qui décrivait une contraction au LTD₄ des aortes des rats SHR et pas des rats normotendus. Chez l'homme, le LTC₄ et le LTD₄ contractent les artères coronaires présentant de l'athérosclérose mais n'ont pas d'effet sur des artères n'en possédant pas (Allen *et al.*, 1998).

Sur les aortes précontractées par la phényléphrine, le LTE₄ n'induit pas d'effet. En revanche le LTC₄ et le LTD₄ induisent soit une relaxation concentration dépendante, soit une relaxation suivie d'une contraction à 0,1 µM. Les effets sont résumés dans le tableau 8.

	LTC ₄	LTD ₄
Rat streptozotocine	Relaxation (10 pM-10 nM) Contraction (0,1 µM)	Relaxation (10 pM-10 nM) Contraction (0,1 µM) *
Rat Contrôle wistar	Relaxation (10 pM-0,1 µM)	Relaxation (10 pM-10 nM) Contraction (0,1 µM)
Rat transgénique	Relaxation (10 pM-10 nM) Contraction (0,1 µM) inhibée par le MK571	Relaxation (10 pM-10 nM) † Contraction (0,1 µM) inhibée par le MK571
Rat Contrôle SD	Relaxation (10 pM-0,1 µM) Pas d'effet du MK571	Relaxation (10 pM-0,1 µM) Pas d'effet du MK571
Rat L-NAME	Non déterminé	Relaxation (10 pM-10 nM) † Contraction (0,1 µM) * inhibée par le MK571
Rat Contrôle wistar Méthocel	Non déterminé	Relaxation (10 pM-10 nM) Contraction (0,1 µM)

Tableau 8 : Effets des leucotriènes C₄ et D₄ sur les aortes intactes précontractées par la phényléphrine. * : significativement augmentée par rapport au groupe Contrôle correspondant. † : significativement diminuée par rapport au groupe Contrôle correspondant.

Ces résultats sont à nouveau en accord avec ceux rapportés notamment par Walch *et al.* (Walch *et al.*, 2000) concernant un effet biphasique des CysLTs sur certaines préparations vasculaires. Ils indiquent, de plus, que chez les rats malades, la sensibilité des aortes aux CysLTs est augmentée par rapport aux rats Contrôle correspondants. Ce phénomène se traduit soit par une relaxation moindre, soit par une contraction augmentée à 0,1 µM.

Chez les rats TG, la relaxation moindre des aortes en réponse au LTC₄ et au LTD₄ peut être expliquée par la dysfonction endothéliale décrite dans ce modèle d'hypertension. En effet, la relaxation au LTC₄ et LTD₄ (Secrest *et al.*, 1985) est médiée par le NO. De plus, un antagoniste des récepteurs CysLT₁ inhibe la contraction au LTC₄ et au LTD₄, confirmant le rôle des récepteurs CysLT₁ dans les effets vasoconstricteurs de ces LTs. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour explorer la localisation des récepteurs CysLT₁ dans ce modèle d'hypertension.

Chez les rats L-NAME, la relaxation moindre des aortes en réponse au LTD₄ peut être expliquée similairement par l'inhibition de la synthèse du NO induite par le traitement des animaux par le L-NAME. L'inhibition de la contraction au LTD₄ par le MK571 confirme également le rôle des récepteurs CysLT₁ dans la contraction médiée par le LTD₄.

Ces résultats sont en faveur de l'activation de la voie de la 5-LOX au niveau de l'aorte dans ces modèles de diabète et d'hypertension et donc probablement plus généralement en faveur de l'implication des LTs dans la modulation du tonus vasculaire en situation pathologique.

IV. Localisation et mécanismes d'activation de la 5-lipoxygénase

Nous avons souhaité chez les rats diabétiques (étude n°2) et chez les rats TG hypertendus (étude n° 4) explorer la localisation de la 5-LOX au niveau de l'aorte et les mécanismes possibles de l'activation de la 5-LOX. En effet, bien que certaines études aient montré la capacité de CML de lapin mises en culture à produire des dérivés de la 5-LOX (Larrue *et al.*, 1983), et la présence de la 5-LOX dans des aortes de rat (Luchtefeld *et al.*, 2003), la présence de la 5-LOX au niveau vasculaire restait très contestée.

Les résultats des études n°2 et n°4 montrent :

1/ la présence de la protéine 5-LOX mise en évidence par western blot au niveau des aortes des rats malades comme des rats Contrôle,

2/ la présence de l'ARN messager de la 5-LOX mis en évidence par RT-PCR dans l'aorte des rats diabétiques et des rats Contrôle ,

3/ la présence de la 5-LOX par immunohistochimie dans la média des aortes des rats TG, des rats diabétiques et des rats Contrôle, ainsi que l'absence de marquage des cellules endothéliales et de monocytes/macrophages infiltrés,

4/ la capacité pour les aortes de tous les groupes de rats a synthétiser des CysLTs en réponse à l'acide arachidonique et au ionophore calcique, ainsi qu'après stimulation par l'Ang II et à la noradrénaline chez les rats malades.

L'ensemble de ces données permet de confirmer la présence de la 5-LOX au niveau de l'aorte et plus précisément au niveau des CML. Cependant, l'évaluation semi-quantitative lors de l'identification de la 5-LOX par western blot montre l'absence de différence entre les rats diabétiques ou hypertendus et leurs contrôles respectifs. En effet, l'augmentation de la production de LTs n'est pas forcément associée à une modification de l'expression de la 5-LOX, mais peut être le fait par exemple de la translocation de la 5-LOX du cytosol vers le noyau et vers la membrane nucléaire (Peters-Golden *et al.*, 2000). Seul le contenu en 5-LOX du cytosol a été étudié dans les publications n°2 et n°4, et il est donc possible que ce ne soit pas le meilleur reflet du niveau d'activation ou d'expression de la 5-LOX. Une étude plus détaillée de chaque fraction subcellulaire (noyau, membrane nucléaire, cytosol) semble donc nécessaire pour apprécier l'état d'activation de la 5-LOX en situation pathologique.

Cependant, la capacité des aortes à produire des CysLTs en réponse à l'acide arachidonique et au ionophore calcique semble équivalente entre les rats streptozotocine et les rats Contrôle

(publication n°2). Il est donc possible que l'activité intrinsèque de la 5-LOX soit équivalente chez les rats malades et chez les rats Contrôle mais que chez les rats malades la production de CysLTs puisse être stimulée par des médiateurs vasoactifs tels que l'Ang II et la noradrénaline.

Il apparaît de ce fait que l'activation de la voie de la 5-LOX observée dans les conditions pathologiques ne soit pas liée à une augmentation de l'expression cytosolique de la protéine, ni à une augmentation de l'activité intrinsèque de l'enzyme, mais plutôt à une augmentation de la sensibilité des aortes aux effets vasoconstricteurs du LTC₄ et du LTD₄, ainsi qu'à une modification des mécanismes de transduction des effets vasculaires de l'Ang II et de la noradrénaline, faisant intervenir les CysLTs en situation pathologique.

V. Production systémique de cystéinyl leucotriènes

Le LTE₄ étant un métabolite stable urinaire de la voie de la 5-LOX, sa quantification au niveau urinaire permet d'évaluer la production systémique de CysLTs. De nombreux travaux ont utilisé ce dosage comme reflet de la production *in vivo* de CysLTs notamment dans l'asthme spontané ou provoqué (Kumlin, 2000).

L'augmentation de la production urinaire de LTE₄ observée chez les rats streptozotocine (publication n°1) a été confirmée par la suite par Vadivielso *et al.* chez des rats streptozotocine (Valdivielso *et al.*, 2003), et chez des patients diabétiques de type 1 (étude n°3). Ces résultats sont en accord avec une activation de la voie de la 5-LOX évoquée précédemment au vu des résultats des études fonctionnelles.

Une augmentation de l'excrétion urinaire de LTE₄ a également été mise en évidence chez des patients présentant une ischémie myocardique (Carry *et al.*, 1992) ou atteints d'athérosclérose

au niveau des coronaires (Allen *et al.*, 1993), confirmant une activation de la voie de la 5-LOX dans les pathologies cardiovasculaires.

Lorsque l'on s'intéresse à l'effet de l'équilibre glycémique sur l'excrétion urinaire de LTE₄, il semblerait qu'un bon équilibre glycémique soit associé à une diminution de l'excrétion urinaire de LTE₄, bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre les deux groupes de patients diabétiques. Cette observation rejoint dans une certaine mesure l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'excrétion urinaire de LTE₄ et sur la production de CysLTs mis en évidence chez les rats streptozotocine (publication n°1).

Il serait par exemple intéressant d'explorer plus en détail la localisation subcellulaire de la 5-LOX dans les polynucléaires neutrophiles circulant de sujets diabétiques, pour déterminer dans quelle mesure ils seraient également impliqués dans l'activation systémique de la voie de la 5-LOX.

Les résultats de l'étude n°3 suggèrent que la mesure du LTE₄ urinaire pourrait être le reflet d'une activation systémique de la 5-LOX, en lien avec un processus inflammatoire pathologique, partie prenante dans le développement de pathologies cardiovasculaires. Il serait donc intéressant par la suite de corrélérer l'excrétion urinaire de LTE₄ à la sévérité de l'atteinte cardiovasculaire des patients pour évaluer l'intérêt de ce paramètre comme biomarqueur du risque cardiovasculaire.

Conclusions

Des découvertes récentes dans le domaine de la pharmacologie et de la génétique ont fait évoluer les connaissances à propos du rôle des leucotriènes dans les pathologies cardiovasculaires. Nous avons mis en évidence dans cette thèse :

1/ une localisation vasculaire de la 5-LOX chez les rats,

2/ des effets intrinsèques vasoconstricteurs des CysLTs sur les aortes des rats diabétiques ou hypertendus, suggérant une augmentation de la sensibilité des aortes aux effets vasoconstricteurs dans ces conditions pathologiques,

3/ la modulation de la contraction à l'Ang II et à la noradrénaline par les CysLTs sur les aortes des rats malades, suggérant une voie de transduction du signal cellulaire de ces médiateurs différente chez ces rats,

4/ la stimulation de la synthèse de CysLTs par les aortes en réponse à l'Ang II ou la noradrénaline chez les rats malades, confirmant l'implication des dérivés de la 5-LOX dans les effets vasculaires de ces médiateurs dans ces modèles de diabète et d'hypertension artérielle essentielle,

5/ un rôle des CysLTs dans la modulation de la pression artérielle sur un modèle d'hypertension artérielle,

6/ une augmentation de l'excrétion urinaire du leucotriène E₄ chez des rats diabétiques mais également chez des patients diabétiques de type 1, confirmant une activation systémique de la voie de la 5-LOX.

Au vu de ces résultats et des données de la littérature, il apparaît que les leucotriènes sont impliqués dans la pathogenèse des complications cardiovasculaires en raison de leurs propriétés vasculaires mais aussi du fait de l'activation de leur voie de synthèse dans des contextes pathologiques. L'utilisation à but thérapeutique d'inhibiteurs de la voie de la 5-lipoxygénase sera l'étape suivante dans l'exploration des mécanismes reliant les leucotriènes et les pathologies cardiovasculaires.

Références bibliographiques

Aiello R. J., Bourassa P. A., Lindsey S., Weng W., Freeman A., Showell H. J. Leukotriene B4 receptor antagonism reduces monocytic foam cells in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 443-9.

Allen D. E., Gellai M. Hemodynamic responses to leukotriene receptor stimulation in conscious rats. *Am J Physiol* 1990; 258: R1034-41.

Allen S., Dashwood M., Morrison K., Yacoub M. Differential leukotriene constrictor responses in human atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 1998; 97: 2406-13.

Allen S. P., Chester A. H., Dashwood M. R., Tadjkarimi S., Piper P. J., Yacoub M. H. Preferential vasoconstriction to cysteinyl leukotrienes in the human saphenous vein compared with the internal mammary artery. Implications for graft performance. *Circulation* 1994; 90: 515-24.

Allen S. P., Chester A. H., Piper P. J., Sampson A. P., Akl E. S., Yacoub M. H. Effects of leukotrienes C4 and D4 on human isolated saphenous veins. *Br J Clin Pharmacol* 1992; 34: 409-14.

Allen S. P., Sampson A. P., Piper P. J., Chester A. H., Ohri S. K., Yacoub M. H. Enhanced excretion of urinary leukotriene E4 in coronary artery disease and after coronary artery bypass surgery. *Coron Artery Dis* 1993; 4: 899-904.

Antonipillai I., Nadler J., Vu E. J., Bughi S., Natarajan R., Horton R. A 12-lipoxygenase product, 12-hydroxyeicosatetraenoic acid, is increased in diabetics with incipient and early renal disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 1940-5.

Atkinson M. A., Eisenbarth G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001; 358: 221-9.

- Back M., Norel X., Walch L., Gascard J., de Montpreville V., Dahlen S., Brink C.
Prostacyclin modulation of contractions of the human pulmonary artery by cysteinyl-leukotrienes. *Eur J Pharmacol* 2000; 401: 389-95.
- Back M., Norel X., Walch L., Gascard J., Mazmanian G., Dahlen S., Brink C. Antagonist resistant contractions of the porcine pulmonary artery by cysteinyl-leukotrienes. *Eur J Pharmacol* 2000; 401: 381-8.
- Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- Brink C., Dahlen S. E., Drazen J., Evans J. F., Hay D. W., Nicosia S., Serhan C. N., Shimizu T., Yokomizo T. International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 195-227.
- Brock T. G., Anderson J. A., Fries F. P., Peters-Golden M., Sporn P. H. Decreased leukotriene C4 synthesis accompanies adherence-dependent nuclear import of 5-lipoxygenase in human blood eosinophils. *J Immunol* 1999; 162: 1669-76.
- Brock T. G., Paine R., 3rd, Peters-Golden M. Localization of 5-lipoxygenase to the nucleus of unstimulated rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem* 1994; 269: 22059-66.
- Candido R., Allen T. J., Lassila M., Cao Z., Thallas V., Cooper M. E., Jandeleit-Dahm K. A. Irbesartan but not amlodipine suppresses diabetes-associated atherosclerosis. *Circulation* 2004; 109: 1536-42. Epub 2004 Mar 15.
- Candido R., Jandeleit-Dahm K. A., Cao Z., Nesteroff S. P., Burns W. C., Twigg S. M., Dilley R. J., Cooper M. E., Allen T. J. Prevention of accelerated atherosclerosis by angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2002; 106: 246-53.
- Carry M., Korley V., Willerson J. T., Weigelt L., Ford-Hutchinson A. W., Tagari P. Increased urinary leukotriene excretion in patients with cardiac ischemia. In vivo evidence for 5-lipoxygenase activation. *Circulation* 1992; 85: 230-6.

Channon J. Y., Leslie C. C. A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J Biol Chem* 1990; 265: 5409-13.

Chen X. S., Naumann T. A., Kurre U., Jenkins N. A., Copeland N. G., Funk C. D. cDNA cloning, expression, mutagenesis, intracellular localization, and gene chromosomal assignment of mouse 5-lipoxygenase. *J Biol Chem* 1995; 270: 17993-9.

Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.

Christlieb A. R. Renin, angiotensin, and norepinephrine in alloxan diabetes. *Diabetes* 1974; 23: 962-70.

Cole O. F., Fan T. P., Lewis G. P. Release of eicosanoids from cultured rat aortic endothelial cells; studies with arachidonic acid and calcium ionophore A23187. *Cell Biol Int Rep* 1986; 10: 407-13.

Cooper M. E. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in diabetes and its vascular complications. *Am J Hypertens* 2004; 17: 16S-20S; quiz A2-4.

Davi G., Chiarelli F., Santilli F., Pomilio M., Vigneri S., Falco A., Basili S., Ciabattoni G., Patrono C. Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration. *Circulation* 2003; 107: 3199-203. Epub 2003 Jun 16.

Davi G., Ciabattoni G., Consoli A., Mezzetti A., Falco A., Santarone S., Pennese E., Vitacolonna E., Bucciarelli T., Costantini F., Capani F., Patrono C. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999; 99: 224-9.

De Gasparo M. [AT(1) and AT(2) angiotensin II receptors: key features]. *Drugs* 2002; 62: 1-10.

Devaraj S., Jialal I. Alpha-tocopherol decreases interleukin-1 beta release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1125-33.

Devchand P. R., Keller H., Peters J. M., Vazquez M., Gonzalez F. J., Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996; 384: 39-43.

Dixon R. A., Diehl R. E., Opas E., Rands E., Vickers P. J., Evans J. F., Gillard J. W., Miller D. K. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* 1990; 343: 282-4.

Dixon R. A., Jones R. E., Diehl R. E., Bennett C. D., Kargman S., Rouzer C. A. Cloning of the cDNA for human 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 416-20.

Drazen J. M., Yandava C. N., Dube L., Szczerback N., Hippensteel R., Pillari A., Israel E., Schork N., Silverman E. S., Katz D. A., Drajesk J. Pharmacogenetic association between ALOX5 promoter genotype and the response to anti-asthma treatment. *Nat Genet* 1999; 22: 168-70.

Drury P. L., Smith G. M., Ferriss J. B. Increased vasopressor responsiveness to angiotensin II in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients without complications. *Diabetologia* 1984; 27: 174-9.

Duhault J., Koenig-Berard E. [Diabetes mellitus and its animal models]. *Therapie* 1997; 52: 375-84.

Dwyer J. H., Allayee H., Dwyer K. M., Fan J., Wu H., Mar R., Lusis A. J., Mehrabian M. Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 2004; 350: 29-37.

Fabre J. E., Goulet J. L., Riche E., Nguyen M., Coggins K., Offenbacher S., Koller B. H. Transcellular biosynthesis contributes to the production of leukotrienes during inflammatory responses in vivo. *J Clin Invest* 2002; 109: 1373-80.

Faure P., Rossini E., Wiernsperger N., Richard M. J., Favier A., Halimi S. An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diabetes* 1999; 48: 353-7.

Feinmark S. J., Cannon P. J. Endothelial cell leukotriene C4 synthesis results from intercellular transfer of leukotriene A4 synthesized by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 1986; 261: 16466-72.

Folco G., Rossoni G., Buccellati C., Berti F., Maclouf J., Sala A. Leukotrienes in cardiovascular diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: S112-6.

Ford-Hutchinson A. W., Bray M. A., Doig M. V., Shipley M. E., Smith M. J. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 1980; 286: 264-5.

Fowler S. J., Hall I. P., Wilson A. M., Wheatley A. P., Lipworth B. J. 5-Lipoxygenase polymorphism and in-vivo response to leukotriene receptor antagonists. *Eur J Clin Pharmacol* 2002; 58: 187-90.

Funakawa S., Okahara T., Imanishi M., Komori T., Yamamoto K., Tochino Y. Renin-angiotensin system and prostacyclin biosynthesis in streptozotocin diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 1983; 94: 27-33.

Funk C. D., Hoshiko S., Matsumoto T., Rdmark O., Samuelsson B. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2587-91.

Garcia M. J., McNamara P. M., Gordon T., Kannel W. B. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes* 1974; 23: 105-11.

Gijon M. A., Leslie C. C. Phospholipases A2. *Semin Cell Dev Biol* 1997; 8: 297-303.

Haeggstrom J. Z. Leukotriene A4 Hydrolase/Aminopeptidase, the Gatekeeper of Chemotactic Leukotriene B4 Biosynthesis. *J Biol Chem* 2004; 279: 50639-50642. Epub 2004 Aug 31.

Hankin J. A., Jones D. N., Murphy R. C. Covalent binding of leukotriene A4 to DNA and RNA. *Chem Res Toxicol* 2003; 16: 551-61.

Heise C. E., O'Dowd B. F., Figueroa D. J., Sawyer N., Nguyen T., Im D. S., Stocco R., Bellefeuille J. N., Abramovitz M., Cheng R., Williams D. L., Jr., Zeng Z., Liu Q., Ma L., Clements M. K., Coulombe N., Liu Y., Austin C. P., George S. R., O'Neill G. P., Metters K. M., Lynch K. R., Evans J. F. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 30531-6.

Helgadottir A., Manolescu A., Thorleifsson G., Gretarsdottir S., Jonsdottir H., Thorsteinsdottir U., Samani N. J., Gudmundsson G., Grant S. F., Thorgeirsson G., Sveinbjornsdottir S., Valdimarsson E. M., Matthiasson S. E., Johannsson H., Gudmundsdottir O., Gurney M. E., Sainz J., Thorhallsdottir M., Andresdottir M., Frigge M. L., Topol E. J., Kong A., Gudnason V., Hakonarson H., Gulcher J. R., Stefansson K. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. *Nat Genet* 2004; 36: 233-9. Epub 2004 Feb 8.

Henrotin Y., Deby-Dupont G., Reginster J. Y. [Biochemical mediators of inflammation]. *Rev Med Liege* 2001; 56: 433-42.

Hilgers K. F., Peters J., Veelken R., Sommer M., Rupprecht G., Ganten D., Luft F. C., Mann J. F. Increased vascular angiotensin formation in female rats harboring the mouse Ren-2 gene. *Hypertension* 1992; 19: 687-91.

Hishinuma T., Koseki Y., Murai Y., Yamazaki T., Suzuki K., Mizugaki M. Urinary thromboxane A2/prostacyclin balance reflects the pathological state of a diabetic. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 1999; 58: 263-71.

Hoshiko S., Radmark O., Samuelsson B. Characterization of the human 5-lipoxygenase gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 9073-7.

Huang L., Zhao A., Wong F., Ayala J. M., Struthers M., Ujjainwalla F., Wright S. D., Springer M. S., Evans J., Cui J. Leukotriene B4 strongly increases monocyte chemoattractant protein-1 in human monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1783-8. Epub 2004 Jul 22.

Hui Y., Cheng Y., Smalera I., Jian W., Goldhahn L., Fitzgerald G. A., Funk C. D. Directed Vascular Expression of Human Cysteinyl Leukotriene 2 Receptor Modulates Endothelial Permeability and Systemic Blood Pressure. *Circulation* 2004; 15: 15.

Ibe B. O., Anderson J. M., Raj J. U. Leukotriene synthesis by isolated perinatal ovine intrapulmonary vessels correlates with age-related changes in 5-lipoxygenase protein. *Biochem Mol Med* 1997; 61: 63-71.

In K. H., Asano K., Beier D., Grobholz J., Finn P. W., Silverman E. K., Silverman E. S., Collins T., Fischer A. R., Keith T. P., Serino K., Kim S. W., De Sanctis G. T., Yandava C., Pillari A., Rubin P., Kemp J., Israel E., Busse W., Ledford D., Murray J. J., Segal A., Tinkleman D., Drazen J. M. Naturally occurring mutations in the human 5-lipoxygenase gene promoter that modify transcription factor binding and reporter gene transcription. *J Clin Invest* 1997; 99: 1130-7.

Jakobsson P. J., Shaskin P., Larsson P., Feltenmark S., Odlander B., Aguilar-Santelises M., Jondal M., Biberfeld P., Claesson H. E. Studies on the regulation and localization of 5-lipoxygenase in human B-lymphocytes. *Eur J Biochem* 1995; 232: 37-46.

Jala V. R., Haribabu B. Leukotrienes and atherosclerosis: new roles for old mediators. *Trends Immunol* 2004; 25: 315-22.

Janssen-Timmen U., Vickers P. J., Wittig U., Lehmann W. D., Stark H. J., Fusenig N. E., Rosenbach T., Radmark O., Samuelsson B., Habenicht A. J. Expression of 5-lipoxygenase in differentiating human skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 6966-70.

Kachur J. F., Askonas L. J., Villani-Price D., Ghoreishi-Haack N., Won-Kim S., Liang C. D., Russell M. A., Smith W. G. Pharmacological characterization of SC-57461A (3-[methyl[3-[4-(phenylmethyl)phenoxy]propyl]amino]propanoic acid HCl), a potent and selective inhibitor of leukotriene A(4) hydrolase II: in vivo studies. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300: 583-7.

Kamohara M., Takasaki J., Matsumoto M., Saito T., Ohishi T., Ishii H., Furuichi K. Molecular cloning and characterization of another leukotriene B4 receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 27000-4.

Katoh M., Egashira K., Usui M., Ichiki T., Tomita H., Shimokawa H., Rakugi H., Takeshita A. Cardiac angiotensin II receptors are upregulated by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in rats. *Circ Res* 1998; 83: 743-51.

Kawagishi Y., Mita H., Taniguchi M., Maruyama M., Oosaki R., Higashi N., Kashii T., Kobayashi M., Akiyama K. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism in Japanese patients with aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 936-42.

Krump E., Borgeat P. Kinetics of 5-lipoxygenase activation, arachidonic acid release, and leukotriene synthesis in human neutrophils: effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1213: 135-9.

Kuboki K., Jiang Z. Y., Takahara N., Ha S. W., Igarashi M., Yamauchi T., Feener E. P., Herbert T. P., Rhodes C. J., King G. L. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation* 2000; 101: 676-81.

Kuhn H., Thiele B. J. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* 1999; 449: 7-11.

Kumlin M. Measurement of leukotrienes in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: S102-6.

Labat C., Ortiz J. L., Norel X., Gorenne I., Verley J., Abram T. S., Cuthbert N. J., Tudhope S. R., Norman P., Gardiner P., et al. A second cysteinyl leukotriene receptor in human lung. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 800-5.

LaBelle E. F., Polyak E. Norepinephrine stimulates arachidonic acid release from vascular smooth muscle via activation of cPLA2. *Am J Physiol* 1998; 274: C1129-37.

Lam B. K. Leukotriene C(4) synthase. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69: 111-6.

Langheinrich M., Lee M. A., Bohm M., Pinto Y. M., Ganten D., Paul M. The hypertensive Ren-2 transgenic rat TGR (mREN2)27 in hypertension research. Characteristics and functional aspects. *Am J Hypertens* 1996; 9: 506-12.

Larrue J., Rigaud M., Razaka G., Daret D., Demond-Henri J., Bricaud H. Formation of monohydroxyeicosatetraenoic acids from arachidonic acid by cultured rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 112: 242-9.

Lee H., Shi W., Tontonoz P., Wang S., Subbanagounder G., Hedrick C. C., Hama S., Borromeo C., Evans R. M., Berliner J. A., Nagy L. Role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha in oxidized phospholipid-induced synthesis of monocyte chemotactic protein-1 and interleukin-8 by endothelial cells. *Circ Res* 2000; 87: 516-21.

Lee S., Felts K. A., Parry G. C., Armacost L. M., Cobb R. R. Inhibition of 5-lipoxygenase blocks IL-1 beta-induced vascular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. *J Immunol* 1997; 158: 3401-7.

Leikauf G. D., Claesson H. E., Doupnik C. A., Hybbinette S., Grafstrom R. C. Cysteinyl leukotrienes enhance growth of human airway epithelial cells. *Am J Physiol* 1990; 259: L255-61.

Lindgren J. A., Hokfelt T., Dahlen S. E., Patrono C., Samuelsson B. Leukotrienes in the rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 6212-6.

Lindholm L. H., Ibsen H., Borch-Johnsen K., Olsen M. H., Wachtell K., Dahlof B., Devereux R. B., Beevers G., de Faire U., Fyhrquist F., Julius S., Kjeldsen S. E., Kristianson K., Lederballe-Pedersen O., Nieminen M. S., Omvik P., Oparil S., Wedel H., Aurup P., Edelman J. M., Snapinn S. Risk of new-onset diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study. *J Hypertens* 2002; 20: 1879-86.

Luchtefeld M., Drexler H., Schieffer B. 5-Lipoxygenase is involved in the angiotensin II-induced NAD(P)H-oxidase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 308: 668-72.

Luo M., Jones S. M., Peters-Golden M., Brock T. G. Nuclear localization of 5-lipoxygenase as a determinant of leukotriene B4 synthetic capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12165-70. Epub 2003 Oct 06.

Luo M., Lee S., Brock T. G. Leukotriene synthesis by epithelial cells. *Histol Histopathol* 2003; 18: 587-95.

Lynch K. R., O'Neill G. P., Liu Q., Im D. S., Sawyer N., Metters K. M., Coulombe N., Abramovitz M., Figueroa D. J., Zeng Z., Connolly B. M., Bai C., Austin C. P., Chateauneuf A., Stocco R., Greig G. M., Kargman S., Hooks S. B., Hosfield E., Williams D. L., Jr., Ford-Hutchinson A. W., Caskey C. T., Evans J. F. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 1999; 399: 789-93.

Mandal A. K., Skoch J., Bacskai B. J., Hyman B. T., Christmas P., Miller D., Yamin T. T., Xu S., Wisniewski D., Evans J. F., Soberman R. J. The membrane organization of leukotriene synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 6587-92. Epub 2004 Apr 14.

- Matsumoto T., Funk C. D., Radmark O., Hoog J. O., Jornvall H., Samuelsson B. Molecular cloning and amino acid sequence of human 5-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 26-30.
- Mehrabian M., Allayee H. 5-lipoxygenase and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14: 447-57.
- Mehrabian M., Allayee H. Vascular cross-talk: a conversation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1748-9.
- Mehrabian M., Allayee H., Wong J., Shi W., Wang X. P., Shaposhnik Z., Funk C. D., Lusis A. J., Shih W. Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res* 2002; 91: 120-6.
- Morrish N. J., Wang S. L., Stevens L. K., Fuller J. H., Keen H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 2001; 44: S14-21.
- Nasjletti A. Arthur C. Corcoran Memorial Lecture. The role of eicosanoids in angiotensin-dependent hypertension. *Hypertension* 1998; 31: 194-200.
- Natarajan R., Gu J. L., Rossi J., Gonzales N., Lanting L., Xu L., Nadler J. Elevated glucose and angiotensin II increase 12-lipoxygenase activity and expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 4947-51.
- Natarajan R., Nadler J. L. Lipid inflammatory mediators in diabetic vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1542-8. Epub 2004 May 27.
- Norel X., Brink C. The quest for new cysteinyl-leukotriene and lipoxin receptors: recent clues. *Pharmacol Ther* 2004; 103: 81-94.
- Nozawa K., Tuck M. L., Golub M., Eggena P., Nadler J. L., Stern N. Inhibition of lipoxygenase pathway reduces blood pressure in renovascular hypertensive rats. *Am J Physiol* 1990; 259: H1774-80.

Orning L., Krivi G., Bild G., Gierse J., Aykent S., Fitzpatrick F. A. Inhibition of leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase by captopril. *J Biol Chem* 1991; 266: 16507-11.

Palmberg L., Claesson H. E., Thyberg J. Leukotrienes stimulate initiation of DNA synthesis in cultured arterial smooth muscle cells. *J Cell Sci* 1987; 88: 151-9.

Parlapiano C., Danese C., Marangi M., Campana E., Pantone P., Giovanniello T., Zavattaro E., Sanguigni S. The relationship between glycated hemoglobin and polymorphonuclear leukocyte leukotriene B4 release in people with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1999; 46: 43-5.

Parving H. H., Lehnert H., Brochner-Mortensen J., Gomis R., Andersen S., Arner P. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2001; 345: 870-8.

Passa P. Reducing the cardiovascular consequences of diabetes mellitus. *Diabet Med* 1998; 15: S69-72.

Pedersen K. E., Bochner B. S., Udem B. J. Cysteinyl leukotrienes induce P-selectin expression in human endothelial cells via a non-CysLT1 receptor-mediated mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281: 655-62.

Peters-Golden M., Brock T. G. Intracellular compartmentalization of leukotriene biosynthesis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: S36-40.

Peters-Golden M., Brock T. G. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. *FEBS Lett* 2001; 487: 323-6.

Peters-Golden M., Brock T. G. 5-lipoxygenase and FLAP. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69: 99-109.

Peters-Golden M., McNish R. W. Redistribution of 5-lipoxygenase and cytosolic phospholipase A2 to the nuclear fraction upon macrophage activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 147-53.

Peters-Golden M., Song K., Marshall T., Brock T. Translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis. *Biochem J* 1996; 318: 797-803.

Porreca E., Di Febbo C., Di Sciullo A., Angelucci D., Nasuti M., Vitullo P., Reale M., Conti P., Cuccurullo F., Poggi A. Cysteinyl leukotriene D4 induced vascular smooth muscle cell proliferation: a possible role in myointimal hyperplasia. *Thromb Haemost* 1996; 76: 99-104.

Proudfoot J. M., Croft K. D., Puddey I. B., Beilin L. J. Angiotensin II type 1 receptor antagonists inhibit basal as well as low-density lipoprotein and platelet-activating factor-stimulated human monocyte chemoattractant protein-1. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 846-53. Epub 2003 Mar 06.

Qiu D. W., Hui K. P., Lee C. W., Lim T. K., Tan W. C. Simplified method for measuring urinary leukotriene E4. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 677: 152-5.

Rakieten N., Rakieten M. L., Nadkarni M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep* 1963; 29: 91-8.

Riddick C. A., Ring W. L., Baker J. R., Hodulik C. R., Bigby T. D. Dexamethasone increases expression of 5-lipoxygenase and its activating protein in human monocytes and THP-1 cells. *Eur J Biochem* 1997; 246: 112-8.

Romano M., Catalano A., Nutini M., D'Urbano E., Crescenzi C., Claria J., Libner R., Davi G., Procopio A. 5-lipoxygenase regulates malignant mesothelial cell survival: involvement of vascular endothelial growth factor. *Faseb J* 2001; 15: 2326-36.

Roth D. M., Reibel D. K., Lefler A. M. Altered coronary vascular responsiveness to leukotrienes in alloxan-diabetic rats. *Circ Res* 1984; 54: 388-95.

Rouzer C. A., Kargman S. Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J Biol Chem* 1988; 263: 10980-8.

Sakata K., Dahlen S. E., Back M. The contractile action of leukotriene B4 in the guinea-pig lung involves a vascular component. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 449-56. Epub 2004 Jan 12.

Sanak M., Simon H. U., Szczeklik A. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma. *Lancet* 1997; 350: 1599-600.

Schernthaner G., Schwarzer C., Kuzmits R., Muller M. M., Klemen U., Freyler H. Increased angiotensin-converting enzyme activities in diabetes mellitus: analysis of diabetes type, state of metabolic control and occurrence of diabetic vascular disease. *J Clin Pathol* 1984; 37: 307-12.

Secret R. J., Chapnick B. M. Endothelial-dependent relaxation induced by leukotrienes C4, D4, and E4 in isolated canine arteries. *Circ Res* 1988; 62: 983-91.

Secret R. J., Olsen E. J., Chapnick B. M. Leukotriene D4 relaxes canine renal and superior mesenteric arteries. *Circ Res* 1985; 57: 323-9.

Shastri S., McNeill J. R., Wilson T. W., Poduri R., Kaul C., Gopalakrishnan V. Cysteinyl leukotrienes mediate enhanced vasoconstriction to angiotensin II but not endothelin-1 in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H342-9.

Silverman E. S., Du J., De Sanctis G. T., Radmark O., Samuelsson B., Drazen J. M., Collins T. Egr-1 and Sp1 interact functionally with the 5-lipoxygenase promoter and its naturally occurring mutants. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 316-23.

Siragy H. M., Xue C., Abadir P., Carey R. M. Angiotensin Subtype-2 Receptors Inhibit Renin Biosynthesis and Angiotensin II Formation. *Hypertension* 2004; 8: 8.

Spanbroek R., Grabner R., Lotzer K., Hildner M., Urbach A., Ruhling K., Moos M. P., Kaiser B., Cohnert T. U., Wahlers T., Zieske A., Plenz G., Robenek H., Salbach P., Kuhn H., Radmark O., Samuelsson B., Habenicht A. J. Expanding expression of the 5-lipoxygenase pathway within the arterial wall during human atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1238-43.

Stanke-Labesque F., Cracowski J. L., Devillier P., Bessard G. [In vitro study of the effects of cysteinyl leukotrienes on human vascular preparations]. *Therapie* 2000; 55: 29-33.

Stanke-Labesque F., Devillier P., Bedouch P., Cracowski J. L., Chavanon O., Bessard G. Angiotensin II-induced contractions in human internal mammary artery: effects of cyclooxygenase and lipoxygenase inhibition. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 376-83.

Stanke-Labesque F., Devillier P., Veitl S., Caron F., Cracowski J. L., Bessard G. Cysteinyl leukotrienes are involved in angiotensin II-induced contraction of aorta from spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 152-60.

Stern N., Golub M., Nozawa K., Berger M., Knoll E., Yanagawa N., Natarajan R., Nadler J. L., Tuck M. L. Selective inhibition of angiotensin II-mediated vasoconstriction by lipoxygenase blockade. *Am J Physiol* 1989; 257: H434-43.

Stern N., Nozawa K., Golub M., Eggena P., Knoll E., Tuck M. L. The lipoxygenase inhibitor phenidone is a potent hypotensive agent in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens* 1993; 6: 52-8.

Tager A. M., Luster A. D. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003; 69: 123-34.

Takiguchi Y., Umemura K., Hashimoto H., Nakashima M. Involvement of thromboxane and leukotriene in arachidonate induced coronary constriction in diabetic rats. *Diabetologia* 1989; 32: 337-41.

- Tikellis C., Wookey P. J., Candido R., Andrikopoulos S., Thomas M. C., Cooper M. E. Improved islet morphology after blockade of the renin-angiotensin system in the ZDF rat. *Diabetes* 2004; 53: 989-97.
- Tomlinson K. C., Gardiner S. M., Hebden R. A., Bennett T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 103-50.
- Touyz R. M., Schiffrin E. L. Tyrosine kinase signaling pathways modulate angiotensin II-induced calcium ($[Ca^{2+}]_i$) transients in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1996; 27: 1097-103.
- Touyz R. M., Schiffrin E. L. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 639-72.
- Uhl J., Klan N., Rose M., Entian K. D., Werz O., Steinhilber D. The 5-lipoxygenase promoter is regulated by DNA methylation. *J Biol Chem* 2002; 277: 4374-9. Epub 2001 Nov 12.
- Usui M., Egashira K., Tomita H., Koyanagi M., Katoh M., Shimokawa H., Takeya M., Yoshimura T., Matsushima K., Takeshita A. Important role of local angiotensin II activity mediated via type 1 receptor in the pathogenesis of cardiovascular inflammatory changes induced by chronic blockade of nitric oxide synthesis in rats. *Circulation* 2000; 101: 305-10.
- Uz T., Longone P., Manev H. Increased hippocampal 5-lipoxygenase mRNA content in melatonin-deficient, pinealectomized rats. *J Neurochem* 1997; 69: 2220-3.
- Valdivielso J. M., Montero A., Badr K. F., Munger K. A. Inhibition of 5-lipoxygenase activating protein decreases proteinuria in diabetic rats. *J Nephrol* 2003; 16: 85-94.
- Van Sambeek R., Stevenson D. D., Baldasaro M., Lam B. K., Zhao J., Yoshida S., Yandora C., Drazen J. M., Penrose J. F. 5' flanking region polymorphism of the gene encoding

leukotriene C4 synthase does not correlate with the aspirin-intolerant asthma phenotype in the United States. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 72-6.

Vane J. R., Bakhle Y. S., Botting R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 97-120.

Voelkel N. F., Tudor R. M., Wade K., Hoper M., Lepley R. A., Goulet J. L., Koller B. H., Fitzpatrick F. Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) reduces pulmonary vascular reactivity and pulmonary hypertension in hypoxic rats. *J Clin Invest* 1996; 97: 2491-8.

Walch L., Norel X., Gascard J. P., Brink C. Functional studies of leukotriene receptors in vascular tissues. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: S107-11.

Weidmann P., Beretta-Piccoli C., Trost B. N. Pressor factors and responsiveness in hypertension accompanying diabetes mellitus. *Hypertension* 1985; 7: II33-42.

Woods J. W., Coffey M. J., Brock T. G., Singer, II, Peters-Golden M. 5-Lipoxygenase is located in the euchromatin of the nucleus in resting human alveolar macrophages and translocates to the nuclear envelope upon cell activation. *J Clin Invest* 1995; 95: 2035-46.

Woods J. W., Evans J. F., Ethier D., Scott S., Vickers P. J., Hearn L., Heibin J. A., Charleson S., Singer, II. 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J Exp Med* 1993; 178: 1935-46.

Yokomizo T., Izumi T., Chang K., Takawa Y., Shimizu T. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature* 1997; 387: 620-4.

Yoshimoto T., Yokoyama C., Ochi K., Yamamoto S., Maki Y., Ashida Y., Terao S., Shiraishi M. 2,3,5-Trimethyl-6-(12-hydroxy-5,10-dodecadiynyl)-1,4-benzoquinone (AA861), a selective inhibitor of the 5-lipoxygenase reaction and the biosynthesis of slow-reacting substance of anaphylaxis. *Biochim Biophys Acta* 1982; 713: 470-3.

Zhang Y. Y., Walker J. L., Huang A., Keaney J. F., Clish C. B., Serhan C. N., Loscalzo J.
Expression of 5-lipoxygenase in pulmonary artery endothelial cells. *Biochem J* 2002;
361: 267-76.

Résumés

Résumé

Les leucotriènes sont les métabolites de l'acide arachidonique formés via la voie de la 5-lipoxygénase. De par leurs propriétés pro-inflammatoires, vasoconstrictrices, chimiotactiques et prolifératives, ils sont impliqués en physiopathologie cardiovasculaire. Nous avons, dans cette thèse, mis en évidence la contribution des cystéinyl leucotriènes aux effets vasoconstricteurs de l'angiotensine II et de la noradrénaline sur l'aorte de plusieurs modèles de diabète et d'hypertension artérielle essentielle chez le rat. De plus, la 5-lipoxygénase a été localisée au niveau vasculaire. Enfin, nous avons constaté une activation de la voie de synthèse des leucotriènes dans ces conditions pathologiques, qui a été confirmée chez des patients diabétiques de type 1. L'ensemble de ces données suggère l'intérêt potentiel de l'inhibition de la voie de la 5-lipoxygénase dans la prise en charge des pathologies cardiovasculaires.

Mots clés : leucotriènes, diabète, hypertension artérielle, aorte, rat

Abstract

Leukotrienes are bioactive metabolites of arachidonic acid formed through the 5-lipoxygenase pathway. With regard to their potent proinflammatory, vasoactive, chemotactic and growth properties, they have been involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases. In this work, we have shown that cysteinyl leukotrienes are involved in the contractile response to angiotensin II and noradrenaline in aorta from various rat models of diabetes and hypertension. Moreover, we confirmed 5-lipoxygenase location in the vessel. We observed an activation of the 5-lipoxygenase pathway that was confirmed in type 1 diabetic patients. Our data suggest the potential interest of pharmacological blockade of the 5-lipoxygenase pathway in cardiovascular diseases.

Key words: leukotrienes, diabetes, hypertension, aorta, rat