

# La mammite bovine : de l'initiation à la résolution

BOUTET P., BUREAU F., LEKEUX P.

Département des Sciences fonctionnelles, Biochimie

Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, boulevard de Colonster 20, Bât. B42, 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Dr. Ph. Boutet,

Tél : 32(0)4/366.42.08 ; Fax : 32(0)4/366.40.07 ; Email : philippe.boutet@ulg.ac.be

**RESUME :** La guérison de la vache souffrant d'une mammite d'origine bactérienne repose sur l'équilibre entre l'élimination de l'agent infectieux et la résolution de la réponse inflammatoire, étapes toutes deux indispensables au retour d'une composition normale du lait et d'une faible concentration cellulaire. La persistance de la réaction inflammatoire, dont la conséquence principale est la chute de la production laitière, est une caractéristique de la mammite chronique. Cette maladie fréquente résulte des interactions inappropriées entre l'hôte et le pathogène et n'est toujours pas bien comprise. Cette synthèse reprend les principaux mécanismes de défenses de la glande mammaire bovine, en soulignant les rôles prépondérants joués par le neutrophile, et apporte des précisions sur l'importance des lipoxines dans la résolution de l'inflammation. Il est également discuté des raisons pouvant expliquer la persistance de la réaction inflammatoire, phénomène rencontré notamment dans les mammites chroniques à *Staphylococcus aureus*.

## 1. INTRODUCTION

La mamelle bovine est protégée par différents mécanismes de défense, regroupés en deux entités distinctes : l'immunité innée et l'immunité acquise (Sordillo *et al.*, 1997). L'immunité innée, encore appelée réponse non spécifique, est de nature anatomique (les trayons de la glande mammaire), cellulaire (macrophages, neutrophiles et les cellules « tueuses naturelles » ou NK pour *natural killer*), et biochimique (lactoferrine, système du complément, lysozyme, lactoperoxydase). Son action se trouve complétée par la réaction inflammatoire. L'immunité acquise ou réponse spécifique reconnaît les déterminants antigéniques spécifiques d'un pathogène particulier, et en permet une élimination sélective. Elle implique les anticorps, les macrophages, et différentes populations lymphocytaires.

Ainsi, lors de mammite clinique induite par exemple par *Escherichia coli*, une réponse inflammatoire précoce et un recrutement rapide des neu-

trophiles permettent une guérison spontanée dans les jours qui suivent le début de l'infection (Hill, 1994). Si au contraire, une bactérie telle *Staphylococcus aureus* résiste à cette réponse immédiate, l'inflammation persiste et le recrutement des leucocytes se prolonge, entraînant des lésions du parenchyme mammaire et une diminution de la production laitière (Harmon et Heald, 1982 ; Sordillo et Nickerson, 1988). Ce type de mammite subclinique se traduit par l'afflux persistant, plusieurs mois encore après le début de l'infection, des neutrophiles (Sutra et Poutrel, 1994 ; Riollet *et al.*, 2001 ; Boutet *et al.*, 2003).

Cette synthèse reprend les principaux mécanismes de défenses immunitaires de la glande mammaire bovine en insistant sur l'activité centrale qu'occupe le neutrophile. Il y est discuté de mécanismes permettant d'expliquer la persistance de l'inflammation au sein de la mamelle. Des précisions sont apportées sur l'importance des lipoxines (LX) dans la résolution du processus inflammatoire. Un autre grand phénomène est également abordé, à

savoir le rôle de l'apoptose des neutrophiles dans l'accumulation cellulaire au site infectieux.

## 2. LES DÉFENSES IMMUNITAIRES DE LA GLANDE MAMMAIRE

### 2.1. L'immunité innée

La première ligne de défense de la glande mammaire est représentée par le canal du trayon. Celui-ci est constitué, entre autre, de kératine et d'acides gras aux propriétés bactériostatiques, tels que les acides myristique, palmitoléique, et linoléique (Treece *et al.*, 1966). Les germes pathogènes qui parviennent tout de même à traverser l'extrémité du trayon doivent alors affronter les défenses antibactériennes présentes dans les sécrétions lactées, si ils veulent s'établir dans la glande mammaire. Dans les tissus affectés, la réponse inflammatoire, composante de la réponse précoce de l'immunité innée, va permettre l'augmentation

de la perméabilité vasculaire et du flux sanguin. Il en résulte un afflux de cellules et de facteurs solubles indispensables au bon fonctionnement des défenses mammaires. Les propriétés des leucocytes résidents et nouvellement recrutés vont alors jouer un rôle crucial dans l'établissement potentiel de l'infection intramammaire.

Le lait contient différents types cellulaires, incluant les neutrophiles, les macrophages, les lymphocytes et un plus faible pourcentage de cellules épithéliales (Lee *et al.*, 1980 ; Sordillo et Nickerson, 1988 ; Östenson *et al.*, 1988). Selon le statut sain ou infectieux de la glande mammaire, la concentration cellulaire (SCC pour *somatic cell count*) varie en nombre et en composition (tableau I). Le SCC d'une mamelle saine est généralement inférieur à 200.000 cellules/ml (Harmon, 1994 ; Burvenich *et al.*, 2004), mais dans les heures qui suivent une infection intramammaire, le SCC augmente jusqu'à plusieurs millions de cellules/ml de lait (Paape *et al.*, 1981 ; Persson *et al.*, 1992). Des études ont montré que la sévérité et la durée de la mammite sont étroitement liées à la rapidité de la migration des leucocytes au site de l'infection et à leur pouvoir bactéricide (Hill, 1981 ; Grommers *et al.*, 1989).

Les monocytes constituent 2 à 7 % des leucocytes sanguins bovins (Jain, 1986). Quand les monocytes quittent la circulation sanguine et entrent dans les tissus, ils mûrissent et deviennent alors des macrophages. Les macrophages représentent le type cellulaire prédominant dans le lait et les tissus d'une glande mammaire saine, et leurs fonctions primaires sont la phagocytose et la digestion intracellulaire de microorganismes, mais également le retrait des globules gras du lait lors de la période d'involution mammaire

(Outteridge et Lee, 1981). Par ailleurs, les macrophages mammaires agissent comme initiateurs de la réponse inflammatoire. Suite à leur activation lors de la phagocytose du pathogène, ils libèrent des facteurs à activité chimiotactique pour les neutrophiles, et amplifient ainsi la réponse inflammatoire (Craven, 1983). Les macrophages jouent également un rôle clé en temps que cellules présentatrices d'antigènes (APC, pour *antigen-presenting cell*). Certains fragments d'antigènes de la bactérie ingérée vont être traités et présentés au niveau de la surface cellulaire, en association à une molécule MHC de classe II. Ces antigènes MHC de classe II sont des molécules polymorphiques de membrane présentées aux lymphocytes T et interviennent dans la reconnaissance d'antigènes étrangers. Cette reconnaissance active à la fois les lymphocytes T et d'autres APC, comme les cellules dendritiques et les lymphocytes B, ce qui déclenche leur production de cytokines. Ainsi les macrophages mammaires sont capables de libérer des chimiokines, telles que l'interleukine (IL)-8, des métabolites de l'acide arachidonique, et le *platelet-activating factor*. Ces facteurs augmentent fortement la réponse inflammatoire locale et, avec des composants du complément comme le facteur C5a, vont attirer les leucocytes au site inflammatoire (Persson *et al.*, 1993 ; Kehrl et Harp, 2001 ; Sordillo et Streicher, 2002). Finalement, les macrophages phagocytent non seulement les microorganismes, mais également les cellules endommagées, les matrices tissulaires, et les neutrophiles apoptotiques, et minimisent de la sorte les dommages tissulaires (Sipe, 1985).

Dans le sang bovin, 15 à 45 % des leucocytes sont des polymorphonucléaires neutrophiles (Jain, 1986). Après l'initiation de la cascade inflamma-

toire, les neutrophiles sont les premières cellules à migrer du sang vers le site inflammatoire. Quelques heures après l'inoculation d'*E. coli* dans un quartier mammaire sain, de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6 et le *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$  sont retrouvées dans les sécrétions mammaires. Ces cytokines ont des effets locaux et systémiques. Au niveau systémique, elles interviennent dans la réaction de la phase aiguë – fièvre, augmentation des concentrations sériques en cortisol, libération de protéines de la phase aiguë, leucopénie, etc. (Eberhart *et al.*, 1979 ; Lohuis *et al.*, 1988 ; Jackson *et al.*, 1990) – alors que localement, elles activent la diapédèse des neutrophiles. Ainsi, le neutrophile est le type cellulaire prédominant retrouvé dans les tissus et les sécrétions mammaires lors d'un processus inflammatoire. Une fois au site infectieux, les neutrophiles phagocytent et tuent les bactéries ingérées grâce à un processus appelé « flambée oxydative ». Certaines cytokines inflammatoires, telles que l'IL-1, le TNF- $\alpha$  ou l'interféron (IFN)- $\gamma$  peuvent augmenter la phagocytose et/ou le pouvoir bactéricide des neutrophiles (Steinbeck et Roth, 1989 ; Sample et Czuprynski, 1991 ; Sordillo et Babiuk, 1991). Après avoir ingéré et tuer la bactérie, les neutrophiles vont mourir selon un phénomène bien régulé, appelé apoptose ou mort cellulaire programmée.

Les cellules NK possèdent une activité cytotoxique non spécifique ne dépendant pas du MHC, ainsi qu'un récepteur Fc qui leur permet de participer à la défense de type ADCC (*antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity*). Une fois que la cellule NK a fixé à son récepteur Fc un anticorps opsonisé à une cellule cible, contenant par exemple une bactérie intracellulaire,

**Tableau I – Types cellulaires rencontrés dans la glande mammaire saine et infectée**

	SCC (cellules/ml de lait)	Composition cellulaire (%)			
		Macrophages	Neutrophiles	Lymphocytes	Cellules épithéliales
Quartier sain	< 200.000	66-88 <sup>1</sup>	0-11 <sup>1</sup>	10-27 <sup>1</sup>	0-7 <sup>1</sup>
		35 <sup>2,3</sup>	26-34 <sup>2,3</sup>	18-24 <sup>2,3</sup>	12-15 <sup>2,3</sup>
Quartier infecté	> 200.000	9-32 <sup>1,3</sup>	50-95 <sup>1,3</sup>	14-24 <sup>1</sup> 1-2 <sup>3</sup>	0-9 <sup>1,3</sup>

SCC, *somatic cell count* = taux de cellules somatiques du lait

<sup>1</sup> D'après Lee *et al.*, 1980 ; Concha *et al.*, 1986 ; Miller *et al.*, 1991 ; Riollet *et al.*, 2000

<sup>2</sup> D'après Miller *et al.*, 1991

<sup>3</sup> D'après Boutet *et al.*, 2003

la libération de perforines va détruire cette cellule cible.

La glande mammaire contient également des composants bactériostatiques non spécifiques travaillant indépendamment ou de concert avec les anticorps et les facteurs cellulaires. Ces défenses solubles sont représentées par la lactoferrine – contenue notamment dans les granules secondaires des neutrophiles – le système du complément, le lysozyme, et le complexe lactoperoxydase/thiocyanate/péroxyde d'hydrogène (Sordillo *et al.*, 1997). Cependant, ces différents mécanismes de défenses sont retrouvés en faible quantité dans la mamelle en lactation, et semblent dès lors n'offrir que peu de protection à la glande mammaire (Chandran *et al.*, 1964 ; Reiter, 1978 ; Smith et Oliver, 1981 ; Sordillo *et al.*, 1997).

## 2.2. L'immunité acquise

L'immunité acquise implique directement les lymphocytes. Ces cellules ont la capacité de reconnaître les antigènes grâce à des récepteurs membranaires spécifiques du pathogène. Dans la mamelle saine en lactation, la population de lymphocytes est essentiellement représentée par les cellules T, et peu par les cellules B (Sordillo *et al.*, 1997). Les lymphocytes T peuvent être subdivisés en cellules T  $\alpha\beta$ , incluant les lymphocytes CD4+ (T-helper) et CD8+ (de type T-cytotoxique ou T-suppresseur), et en lymphocytes T  $\gamma\delta$ . En fonction du stade de lactation et de la localisation tissulaire, le pourcentage de ces différentes cellules peut varier significativement (Sordillo *et al.*, 1997). Dans les tissus mammaires et les sécrétions lactées saines, les cellules T expriment principalement le récepteur des cellules T  $\alpha\beta$  et sont principalement de phénotype CD8+ ; le rapport CD4:CD8 est donc  $< 1$ , contrairement au sang où le rapport est  $> 1$  (Park *et al.*, 1992 ; Taylor *et al.*, 1994). Le rapport CD4:CD8 dans les sécrétions mammaires devient  $> 1$  lors du tarissement, reste  $> 1$  lors de la période sèche et redevient  $< 1$  juste avant le part (Asai *et al.*, 1998). La signification fonctionnelle des différentes sous-populations de lymphocytes retrouvées dans la glande mammaire bovine reste

obscur, et les conséquences de ces changements sur les défenses de la mamelle restent hypothétiques. Une possibilité serait que les cellules mammaires T CD8+ représentent un type cellulaire activé, différent des cellules T CD8+ sanguines, dont le rôle potentiel serait de maintenir l'intégrité des limites épithéliales en éliminant les cellules abîmées ou infectées (Taylor *et al.*, 1994 ; Asai *et al.*, 1998). Lors d'infection mammaire, les lymphocytes T CD4+ constituent le phénotype prédominant (Taylor *et al.*, 1997). Ces lymphocytes T-helper produisent des cytokines en réponse à la reconnaissance d'un complexe antigène-MHC de classe II présent sur les lymphocytes B ou les macrophages. Grâce à leur capacité à sécréter certaines cytokines, les cellules CD4+ jouent un rôle important dans l'activation des lymphocytes B, des macrophages et d'une variété d'autres cellules participant à la réponse immune (Sordillo *et al.*, 1997 ; Riollet *et al.*, 2000a).

Il est maintenant clairement établi que les cellules CD8+ peuvent exercer une fonction cytotoxique ou une fonction suppressive (Inoue *et al.*, 1993). Les lymphocytes T cytotoxiques reconnaissent des antigènes spécifiques associés aux molécules MHC de classe I présents à la surface de cellules infectées et les éliminent. Ils peuvent donc agir comme des « éboueurs », éliminant les cellules sécrétrices endommagées, lesquelles pourraient augmenter la sensibilité de la glande mammaire aux infections (Taylor *et al.*, 1994). Par contre, les lymphocytes T suppresseurs contrôlèrent et moduleaient la réponse immune. Sordillo et collaborateurs (1997) indiquent que les lymphocytes CD8+ isolés directement après la parturition sont du type suppresseur, alors que ceux isolés en milieu ou en fin de lactation sont plutôt du type cytotoxique. La circulation préférentielle des lymphocytes CD8+ suppresseurs dans les tissus et les sécrétions mammaires pourrait être responsable de la moindre capacité de réponse des leucocytes locaux, comparés à ceux provenant de la circulation sanguine (Sordillo *et al.*, 1997). Une étude a démontré que lors d'infection à *S. aureus*, la prolifération des cellules CD4+ était stoppée par des cellules CD8+ activées, et pourrait donc favoriser la persistance des infections à *S. aureus* (Park *et al.*, 1993). Comme

pour les cellules T CD4+, les deux sous-populations de cellules CD8+ expriment différentes cytokines : IL-4, IL-5 et IL-10 ont été associées au phénotype suppresseur (Salgame *et al.*, 1991 ; Inoue *et al.*, 1993), et IFN- $\gamma$  au phénotype cytotoxique (Shafer-Weaver et Sordillo, 1997). Dans des quartiers atteints d'infection chronique à *S. aureus*, Riollet et collaborateurs (2001) ont montré que les lymphocytes T CD8+ étaient recrutés en plus grand nombre que les CD4+ et que l'expression de l'ARNm de l'IL-10 était augmentée dans les cellules isolées de lait infecté. Ceci suggère que le profil des lymphocytes CD8+ retrouvés dans les quartiers infectés par *S. aureus* est bien de type suppresseur.

Les fonctions biologiques des lymphocytes T  $\gamma\delta$  ne sont pas encore bien caractérisées. En comparaison du sang, le parenchyme et les sécrétions mammaires de la femme et des ruminants contiennent plus de lymphocytes T  $\gamma\delta$  (Richie *et al.*, 1982). Des études ont suggéré qu'ils pourraient agir comme des cellules cytotoxiques et constitueraient une ligne de défense contre les infections bactériennes (Mackay et Hein, 1991). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  migrent préférentiellement vers les surfaces épithéliales et ne circulent pas considérablement (Mackay et Hein, 1989 ; Allison et Harvan, 1991). Les lymphocytes T  $\gamma\delta$ , tout comme les cellules NK, possèdent des propriétés cytotoxiques, sans impliquer le MHC (Sordillo *et al.*, 1997 ; Pollock et Welsh, 2002). Leur capacité cytotoxique suggère que ces cellules sont capables de détruire les cellules épithéliales altérées (Mackay et Hein, 1991).

Les lymphocytes B ont pour rôle primaire de produire des anticorps contre les organismes pathogènes. A la différence des macrophages et des neutrophiles, les lymphocytes B utilisent leur récepteur de surface pour reconnaître des antigènes spécifiques et s'activent une fois que l'antigène est lié au récepteur. Ils internalisent, traitent et présentent aux lymphocytes T-helper l'antigène associé au MHC de classe II. Suite à cette présentation, les lymphocytes T sécrètent des cytokines, telles que IL-2, IL-4, IL-6 et IL-10 (Riollet *et al.*, 2000a), ce qui provo-

que la prolifération et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, producteurs d'anticorps ou de cellules mémoires (Sordillo *et al.*, 1997). Sous certaines conditions, la différenciation des lymphocytes B peut directement être stimulée par un antigène, comme le lipopolysaccharide (LPS) (Sordillo *et al.*, 1997). A la différence des lymphocytes T, le pourcentage de lymphocytes B reste constant tout au long de la lactation (Shafer-Weaver *et al.*, 1996) et leur proportion n'augmente pas dans le lait lors d'infection (Riollet *et al.*, 2001).

Le rôle primaire des plasmocytes est de produire des anticorps spécifiques de l'antigène, qui sont en fait une forme soluble du récepteur du lymphocyte B. Quatre classes d'immunoglobulines (Ig) influencent les défenses de la glande mammaire lors de mammite bactérienne : IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgA et IgM (Sordillo *et al.*, 1997). Contrairement à d'autres espèces, IgG est le type prédominant dans le colostrum et le lait de vache, et non IgA (Kehrli et Harp, 2001). La concentration de chaque classe d'Ig varie avec le stade de lactation et le statut infectieux. Dans la glande mammaire saine, la concentration est faible pendant la lactation mais augmente lentement au moment de la période sèche, pour atteindre un pic de concentration lors de la colostrogénèse (Sordillo *et al.*, 1987). Les concentrations augmentent également lors d'inflammation. La quantité d'Ig mesurée dans la glande dépend du degré de perméabilité du tissu sécrétoire et du nombre de plasmocytes présents dans la mamelle (Sordillo *et al.*, 1987). Bien que l'isotype IgG<sub>1</sub> est prédominant dans les sécrétions lactées d'une glande saine, en présence d'un processus inflammatoire, les neutrophiles peuvent transporter les IgG<sub>2</sub> lors de leur migration vers la glande mammaire (Sordillo *et al.*, 1997).

Les études ont montré que les IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> et IgM peuvent jouer le rôle d'opsonines et augmenter la phagocytose des bactéries par les neutrophiles et les macrophages. Ces anticorps peuvent se lier directement à la bactérie, ou via le composant C3b du complément (Howard *et al.*, 1980). Les neutrophiles et les macrophages peuvent lier les complexes anticorps-bactéries et

les complexes anticorps-C3b-bactéries et phagocytent ainsi la bactérie de manière plus efficace (Sordillo *et al.*, 1997). Les IgA contribuent à l'agglutination, empêchent la colonisation bactérienne, et neutralisent les toxines (Sordillo *et al.*, 1997).

### 2.3. Modulation de la résistance de l'hôte aux infections : implication des cytokines

Les cytokines sont des protéines produites naturellement et jouent un rôle important dans la régulation des activités cellulaires participant à l'immunité innée et acquise. Le terme « cytokine » désigne un groupe hétérogène de protéines produites par un éventail de cellules immunes ou non (Sordillo *et al.*, 1997). De nombreuses études ont rapporté les effets immunomodulateurs de cytokines recombinantes sur d'importantes fonctions immunitaires de la glande mammaire (Daley *et al.*, 1991 ; Sordillo et Babiuk, 1991 ; Sordillo *et al.*, 1991 ; Alluwaimi, 2004). Les groupes majeurs de cytokines étudiées comprennent les interleukines (IL), les facteurs stimulateurs de colonies (*colony-stimulating factor* - CSF), les interférons (IFN) et le TNF (*tumor necrosis factor*) (tableau II).

IL-2 est la cytokine bovine la mieux caractérisée. Elle est principalement produite par les lymphocytes T-helper et est responsable de l'expansion clonale de la réponse immune lymphocytaire T initiale et de l'établissement du phénomène de mémoire (Sordillo *et al.*, 1997). IL-2 joue aussi un rôle dans la croissance et la différenciation des lymphocytes B, augmente la prolifération des thymocytes, active les cellules NK, et initie l'activation des cellules T cytotoxiques (Magnuson *et al.*, 1987).

Les CSF sont un groupe de cytokines requises pour la prolifération et la différenciation d'une variété de cellules souches hématopoïétiques. Le *granulocyte/macrophage* (GM)-CSF a été le premier identifié pour sa capacité à induire le développement de précurseurs hématopoïétiques en granulocytes et macrophages (Metcalf, 1985). Différentes études chez la vache laitière ont montré que le GM-CSF influençait également une variété de fonctions des granulocytes matures. Le traitement des neutrophiles bovins sanguins et

mammaires avec du GM-CSF recombinant bovin (rbGM-CSF) augmente les pouvoirs bactéricide et chimiotactique des neutrophiles (Sordillo *et al.*, 1992). L'infusion intramammaire de rbGM-CSF à des doses supérieures à 5 mg n'affecte pas le SCC du lait mais augmente la capacité de production de superoxyde par les neutrophiles résidents et augmente le pourcentage de phagocytes (Daley *et al.*, 1991).

Les IFN sont un groupe de protéines étroitement liées classées en deux types sur base de leurs propriétés physiques et biologiques. Le type I comprend l'IFN- $\alpha$  et l'IFN- $\beta$ . Le deuxième type se compose d'une seule protéine, l'IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$  est une cytokine dérivée des lymphocytes T, souvent produite en réponse à une stimulation antigénique. Ainsi, IFN- $\gamma$  augmente l'activité des cellules NK, du système ADCC, et des cellules T cytotoxiques. L'IFN- $\gamma$  stimule également la synthèse et la libération de formes réactives de l'oxygène par les macrophages et les neutrophiles (Sordillo *et al.*, 1997).

Le rôle du TNF a été largement étudié dans la pathogénie de la mammite à coliformes. Les symptômes aigus très fréquemment associés à la mammite à coliformes sont dus à la croissance exponentielle du microorganisme, à la libération du LPS, et au développement de la réaction inflammatoire qui y fait suite (Sordillo *et al.*, 1997 ; Burvenich *et al.*, 2003). La libération du LPS initie une réponse de la phase aiguë non spécifique en suscitant la synthèse et la libération de cytokines et d'eicosanoïdes au site inflammatoire (Zia *et al.*, 1987 ; Lohuis *et al.*, 1988 ; Van Miert, 1991). Parmi les cytokines produites durant la phase aiguë de la réaction inflammatoire précoce, le TNF- $\alpha$  est un médiateur de première importance dans le développement du choc endotoxique qui se produit lors de mammite à coliformes suraiguë. Une étude a montré que les monocytes isolés de vaches en parturum produisaient plus de TNF- $\alpha$  en réponse à une stimulation au LPS que les cellules isolées en milieu ou en fin de lactation (Sordillo *et al.*, 1995). L'augmentation de la capacité de production de ce médiateur par ces populations cellulaires aux alentours

**Tableau II – Effets des cytokines sur les réponses inflammatoire et immunitaire de la glande mammaire bovine**

Cytokine	Observation	Référence
IL-1	Associé à une augmentation de l'afflux de neutrophiles dans les infections à <i>E. coli</i> . Son infusion dans une glande saine augmente le SCC, essentiellement composé de neutrophiles et augmente la température rectale. L'infusion d'IL-1 $\beta$ dans une glande infectée chroniquement par <i>S. aureus</i> augmente l'afflux de neutrophiles et la production de radicaux oxygénés, sans effet sur la phagocytose.	Riollet <i>et al.</i> , 2000b ; Shuster <i>et al.</i> , 1995 ; 1997 Nickerson <i>et al.</i> , 1993  Daley <i>et al.</i> , 1991 ; 1993
IL-2	Son infusion dans la glande mammaire augmente le SCC, essentiellement composé de macrophages et de plasmocytes. Son infusion dans une glande infectée par <i>S. aureus</i> augmente le nombre de lymphocytes, neutrophiles, macrophages et le titre en anticorps. Augmente les activités cytotoxiques et bactéricides des lymphocytes. Adjuvant de vaccin efficace.	Nickerson <i>et al.</i> , 1992 ; 1993 ; Torre <i>et al.</i> , 1992 Nickerson <i>et al.</i> , 1989 ; Quiroga <i>et al.</i> , 1993 ; Reddy <i>et al.</i> , 1992 Sordillo <i>et al.</i> , 1991 Pighetti et Sordillo, 1995
IL-6	Facilite la transition de la réaction inflammatoire d'un afflux de neutrophiles vers celui de monocytes. Participe au développement du choc endotoxinique à <i>E. coli</i> mais est négligeable dans la mammite à <i>S. aureus</i> .	Kaplanski <i>et al.</i> , 2003  Shuster <i>et al.</i> , 1993 ; Riollet <i>et al.</i> , 2001 ; Alluwaimi <i>et al.</i> , 2003
IL-8	Puissant agent leucotaxique des neutrophiles produit par les macrophages, les lymphocytes T, les cellules endothéliales. Augmentation de sa concentration lors de mammite à <i>E. coli</i> mais pas de changements significatif dans les infections à <i>S. aureus</i> .  Facilite la libération du CD14 soluble à partir du CD14 membranaire.	Matsushima et Oppenheim, 1989 Riollet <i>et al.</i> , 2000b ; 2000c ; Shuster <i>et al.</i> , 1997 ; Alluwaimi <i>et al.</i> , 2001 Lee <i>et al.</i> , 2003
IL-12	Polarise la réponse immune lymphocytaire vers un phénotype Th-1 ou Th-2 et lie l'immunité innée à l'immunité acquise. Niveau d'expression de l'ARNm augmenté dans une infection expérimentale à <i>S. aureus</i> , mais aucune apparence de polarisation de la réponse immune.	Trinchieri, 1995  Alluwaimi <i>et al.</i> , 2003 ; Riollet <i>et al.</i> , 2001
IFN- $\gamma$	Augmente la phagocytose et l'activité bactéricide du neutrophile.  Défaut de son activité transcriptionnelle dans la mammite expérimentale à <i>S. aureus</i> mais augmentation de sa concentration dans la mammite à coliformes.  Augmente la liaison des IgG, au neutrophile lors de la phagocytose.	Sordillo et Babiuk, 1991 ; Riollet <i>et al.</i> , 2000a Alluwaimi <i>et al.</i> , 2003 ; Hisaeda <i>et al.</i> , 2001  Worku <i>et al.</i> , 1994
TNF- $\alpha$	Augmente la phase aiguë de la réponse inflammatoire.  Augmente la phagocytose et l'activité bactéricide du neutrophile. Augmente l'expression de molécules d'adhésion endothéliale.	Blum <i>et al.</i> , 2000 ; Sordillo et Streicher, 2002 Sordillo et Streicher, 2002 Sordillo et Streicher, 2002
GM-CSF	Augmente les activités chimiotactique et bactéricide du neutrophile. Active la formation de radicaux oxygène par les neutrophiles mais n'a pas d'effet sur leur nombre dans un modèle de mammite à <i>S. aureus</i> . Augmente le nombre et l'activité bactéricide des neutrophiles. Retarde l'apoptose des neutrophiles bovins.	Sordillo <i>et al.</i> , 1992 Daley <i>et al.</i> , 1993  Kehrl <i>et al.</i> , 1991a ; 1991b Boutet <i>et al.</i> , 2004

SCC, *somatic cell count* = taux de cellules somatiques du lait

de la parturition peut expliquer la plus grande fréquence des mammites cliniques de ce type lors de cette période (Sordillo et Streicher, 2002).

### 3. LE NEUTROPHILE : UN ACTEUR CENTRAL

Le développement de la réaction inflammatoire est un élément crucial dans la défense tissulaire contre l'infection par un microorganisme patho-

gène. Les leucocytes, et plus particulièrement les neutrophiles, sont les acteurs principaux de ce mécanisme de défense naturelle, et leur migration au site de l'infection est un facteur déterminant pour la guérison de l'in-

fection. Différentes cytokines, telles que IL-1 $\beta$ , IL-8, TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$ , et le facteur C5a, jouent un rôle important dans l'accumulation, le pouvoir phagocytaire et bactéricide, ou encore la survie des leucocytes au site inflammatoire (Cybulsky *et al.*, 1988 ; Baggiolini *et al.*, 1989 ; Shuster *et al.*, 1997).

### 3.1. Granulopoïèse et granulocyténétique

Les trois phases de la vie du neutrophile sont les phases intramédullaire, circulatoire et tissulaire (Jain, 1986). Ce cycle de vie est de courte durée. La phase intramédullaire comprend les pools de prolifération, de maturation et de réserve de neutrophiles. Chez l'homme, la maturation s'effectue en 10 à 14 jours dans la moelle osseuse (Bainton *et al.*, 1971). Les neutrophiles matures gagnent alors le courant circulatoire dans lequel ils circulent peu de temps (durée de vie de 8,9 heures chez le bovin) (Carlson et Kaneko, 1975). Le neutrophile quitte la circulation par diapédèse entre les cellules endothéliales et pénètre dans les tissus où il fonctionne comme phagocyte. Les neutrophiles sénescents entreprennent alors le processus d'apoptose, ou mort cellulaire programmée, et sont éliminés par les macrophages.

Le processus de la granulopoïèse est sous le contrôle régulateur de facteurs de croissance, parmi lesquels le G-CSF joue un rôle capital. Ces CSF assurent la maintenance d'un état d'équilibre.

### 3.2. Activité fonctionnelle du neutrophile bovin

#### 3.2.1. Chimiotactisme et diapédèse

Physiologiquement, les stimuli de la tétée et de la traite induisent la migration de neutrophiles dans les tissus mammaires (Paape et Guidry, 1969), et par conséquent dans le lait. De cette manière, il existe un apport constant de neutrophiles dans la glande mammaire normalement stérile. Par ailleurs, le drainage du lait fraîchement synthétisé vers les conduits et la citerne permet d'éliminer les neutrophiles venant de migrer dans la mamelle. Le processus se renouvelle avec l'arrivée de neutrophiles dans le lait nouvellement synthétisé par les alvéoles. Cependant, une fois dans la lumière alvéolaire,

les neutrophiles ingèrent des globules gras et de la caséine. Ce phénomène est responsable d'une diminution des fonctions phagocytaire et bactéricide et provoque la mort du neutrophile (Paape *et al.*, 1975). La traite permet alors d'éliminer ces neutrophiles compromis, lesquels sont remplacés par des nouveaux en provenance de la circulation sanguine, et les défenses contre les infections bactériennes sont à nouveau renforcées.

Le lent afflux basal de neutrophiles dans la glande mammaire saine augmente rapidement lors d'infection bactérienne. De puissants médiateurs libérés lors de la réaction inflammatoire vont constituer un gradient chimique et guider les neutrophiles jusqu'au foyer infectieux ; ce processus s'appelle le chimiotactisme. Différents lipopolysaccharides (LPS) de bactéries gram-négatives, les composants du complément C5a et C3a, le leucotriène (LT) B<sub>4</sub>, IL-1, IL-2 et IL-8 sont de puissants chimioattractants (Daley *et al.*, 1991 ; Persson *et al.*, 1993). Ces substances leucotoxiques se lient à des récepteurs spécifiques présents sur la membrane plasmique du neutrophile (Paape *et al.*, 2003).

L'initiation de la réponse inflammatoire et la sécrétion de chimioattractants sont des phénomènes indispensables pour que le processus de diapédèse se produise de manière efficace. Celle-ci se produit grâce à l'expression de différentes molécules d'adhésion, tant sur les cellules endothéliales que sur les neutrophiles. La molécule d'adhésion CR3 (Mac-1, CD11b/CD18) est un membre de la famille  $\beta$ 2-intégrine (molécules d'adhésion des leucocytes), composé de trois hétérodimères LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18) et p150.95 (CD11c/CD18), et permet avec d'autres molécules d'adhésion exprimées sur les cellules endothéliales activées, comme ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), la liaison du neutrophile à l'endothélium (Riollet *et al.*, 2000a ; Paape *et al.*, 2003). La protéine L-sélectine (CD62L), constitutivement exprimée à la surface des neutrophiles, joue également un rôle prépondérant dans le phénomène de diapédèse.

#### 3.2.2. Reconnaissance du pathogène

Le peptidoglycane, associé à la paroi

des bactéries gram-positives et gram-négatives, et le LPS, composant de la membrane externe des bactéries gram-négatives, font parties des PAMP (*pathogen associated molecular patterns*) et se lient aux PRR (*pattern recognition receptors*), présents sur de nombreuses cellules impliquées dans la défense de l'individu. Ils sont capables d'induire la synthèse et la sécrétion de cytokines chez les différentes cellules concernées. Le LPS se lie à une protéine de liaison spécifique (LBP pour *LPS binding protein*) et le complexe est reconnu par le CD14 membranaire présent sur les macrophages. Ceci provoque l'activation du TLR4 (*Toll-like receptor 4*) et induit l'expression de gènes inflammatoires via l'activation du facteur de transcription nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Medzhitov, 2001), provoquant entre autre la libération de TNF- $\alpha$  qui initie la réponse inflammatoire. Le CD14 membranaire peut également être clivé et libère le CD14 soluble. Ce dernier est présent dans le sang et le lait bovin (Wang *et al.*, 2002), et se lie avec beaucoup d'affinité au LPS. Le complexe interagit alors avec les TLR présents à la surface des cellules épithéliales et endothéliales, provoquant la libération de substances chimiotactiques (Wright *et al.*, 1990).

Le contact et la reconnaissance entre le phagocyte et la bactérie représentent les premiers événements qui se produisent lors du processus de phagocytose. La reconnaissance immunologique s'exerce principalement par des anticorps spécifiques qui reconnaissent la bactérie par leurs régions Fab, et lient le récepteur Fc (FcR) présent sur la membrane plasmique du neutrophile. Cette reconnaissance entre l'anticorps et la bactérie s'appelle opsonisation et est principalement exercée par les IgG<sub>2</sub> et IgM chez le bovin (Anderson *et al.*, 1986 ; Miller *et al.*, 1988). Le composant C3b du complément est capable, lui aussi, d'opsoniser la bactérie et de se lier au récepteur CR1 sur le neutrophile et dès lors de promouvoir la phagocytose (Howard *et al.*, 1980 ; Arnaout *et al.*, 1981). Le récepteur CR1 est plus abondant sur les neutrophiles mammaires que sur ceux présents dans le sang, indiquant que la migration des neutrophiles du sang vers la glande mammaire induit l'expression de CR1 (Paape *et al.*, 2003).

Il existe également un autre type de phagocytose, ne dépendant pas de l'opsonisation, importante pour le contrôle des infections intramammaires par les germes gram-négatifs (Paape *et al.*, 1996 ; Dosogne *et al.*, 1998). Celle-ci dépend des lectines et des propriétés hydrophobes des surfaces cellulaires (Paape *et al.*, 2003). Ainsi, les récepteurs lectine-carbohydrates de la surface cellulaire du neutrophile bovin peuvent interagir avec les pili riches en carbohydrates d'*E. coli* en l'absence d'opsonines spécifiques (Paape *et al.*, 1996).

### 3.2.3. Phagocytose

Une fois le contact et la reconnaissance effectués, le neutrophile peut jouer son rôle de phagocyte. Des pseudopodes, provenant de la membrane plasmique du neutrophile, se forment autour du pathogène. Leur fusion mène à la formation d'une vacuole de phagocytose ou phagosome. Les granules cytoplasmiques du neutrophile fusionnent alors avec la membrane du phagosome, donnant naissance au phagolysosome. Le contenu bactéricide des granules se déverse dans le phagolysosome et la digestion du microorganisme peut alors se dérouler. Durant la phagocytose, les lysosomes migrent vers la particule ingérée et les enzymes lysosomiaux sont libérés avant que la fusion des pseudopodes ne soit complète, ce qui provoque la libération d'une partie du contenu des lysosomes en dehors du neutrophile (Gennaro *et al.*, 1983). La phagocytose peut donc être responsable, du moins en partie, de la corrélation négative existant entre le SCC et la production laitière (Raubertas et Shook, 1982).

Le pouvoir phagocytaire des neutrophiles du lait est moindre que celui des neutrophiles sanguins. Cette moindre efficacité est due en partie aux plus faibles réserves énergétiques sous forme de glycogène. Le neutrophile présent dans le lait contient en effet 38 % de glycogène en moins que le neutrophile du sang (Newbould, 1973). Par ailleurs, les globules gras et la caséine du lait réduisent la phagocytose (Paape *et al.*, 1981 ; Weber *et al.*, 1983 ; Sordillo et Babiuk, 1991). Ceci est dû à l'internalisation de membrane plasmique, nécessaire à la for-

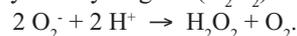
mation de phagosomes, contenant de la graisse et de la caséine. De plus, l'activité bactéricide est inhibée par les composants du lait suite à la perte de lysosomes ayant fusionnés avec des phagosomes contenant de la graisse et de la caséine au lieu de phagosome contenant des bactéries (Paape et Guidry, 1977). Il a été démontré que les activités phagocytaire et bactéricide étaient particulièrement diminuées lors du péripartum (Paape *et al.*, 1981 ; Weber *et al.*, 1983).

### 3.2.4. Activité bactéricide et flambée oxydative

Endéans les secondes qui suivent la reconnaissance de la bactérie et la phagocytose, le neutrophile s'active et génère de puissantes formes réactives de l'oxygène. Ce processus est associé à une augmentation de la consommation en oxygène ( $O_2$ ) (Baldrige et Gerard, 1933) et est appelé « flambée oxydative ». La nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase (NADPH-oxydase) est activée et catalyse la réaction suivante :

$$2 O_2 + NADPH \rightarrow 2 O_2^- + NADP + H^+$$

conduisant à la formation d'anions superoxyde ( $O_2^-$ ). La superoxyde dismutase (SOD) convertit alors  $O_2^-$  en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) :



$H_2O_2$  et les nouveaux  $O_2^-$  formés dans le phagosome peuvent alors interagir pour former un radical hydroxyl ( $OH^\bullet$ ) hautement réactif, composant clé des mécanismes bactéricides dépendant de l' $O_2$ . De plus, la fusion d'un phagosome contenant un microorganisme avec les granules primaires du neutrophiles, ou granules azurophiles, active la myéloperoxydase. Cet enzyme catalyse la réaction entre  $H_2O_2$  et Cl, I, ou Br et conduit à la formation d'hypohalides hautement toxiques et à l'oxydation d'amines. Ce système est très efficace lors d'infection à *E. coli* (Klebanoff, 1970 ; Burvenich *et al.*, 2004).

Depuis quelques années, plusieurs classes de peptides antimicrobiens ont été purifiées à partir de phagocytes de mammifères, et il apparaît maintenant clairement que les neutrophiles bovins sont non seulement capables de détruire les microorganismes grâce à la production de formes réactives de l'oxygène, mais aussi en les exposant dans le phagolysosome à ces pepti-

des antimicrobiens (Burvenich *et al.*, 2004). Parmi ceux-ci, les  $\beta$ -défensines possèdent une activité bactéricide *in vitro* aussi bien vis-à-vis de *S. aureus* que de *E. coli* (Selsted *et al.*, 1993).

### 3.2.5. Acteur de l'inflammation et régulateur de l'immunité

Le neutrophile est donc un acteur essentiel de la réaction inflammatoire durant laquelle il peut exercer une série de fonctions qui constituent collectivement un mécanisme majeur de l'immunité innée. Récemment, cependant, il est devenu de plus en plus évident que l'implication du neutrophile dans les défenses de l'hôte et l'immunité innée s'élargissait bien au-delà de leur traditionnel rôle de phagocyte professionnel. En effet, les neutrophiles sont capables d'exprimer des gènes dont les produits – cytokines et chimiokines – sont étroitement impliqués dans la réponse immunitaire (Scapini *et al.*, 2000). Cette capacité à produire ces différents médiateurs indique que les neutrophiles sont des cellules primordiales impliquées dans les premières phases d'activation et de migration cellulaires. Après la migration au site infectieux, il est probable que les neutrophiles, stimulés par l'agent étiologique, produisent des chimiokines qui vont à leur tour provoquer le recrutement d'autres types de leucocytes. Ainsi, le neutrophile est, par exemple, capable de produire de très grande quantité d'IL-8, provoquant le recrutement ultérieur d'un grand nombre de neutrophiles, amplifiant la réponse initiale, mais produit également d'autres chimiokines responsables de l'accumulation et de l'activation de monocytes, macrophages, cellules dendritiques immatures et lymphocytes T (Cassatella, 1999 ; Scapini *et al.*, 2000). Le neutrophile amplifie donc la réaction inflammatoire et fonctionne aussi bien comme un acteur de cette réponse que comme une cellule immunorégulatrice.

## 3.3. La mort cellulaire programmée ou apoptose

### 3.3.1. Régulation de la durée de vie du neutrophile

L'apoptose est décrite comme une mort cellulaire programmée, physiologique, n'induisant pas ou peu de réac-

tion inflammatoire. Elle se caractérise morphologiquement par la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire et le rétrécissement cellulaire (Reed, 2000). Malgré ces changements, la membrane plasmique reste intacte et agit comme une barrière, du moins durant les premières phases de l'apoptose. Par contre, l'autre forme de mort cellulaire, la nécrose, se caractérise par le gonflement et la lyse cellulaire. La perte de l'intégrité membranaire des cellules nécrotiques s'accompagne de la libération du contenu cellulaire, déclenchant une réaction inflammatoire néfaste pour le voisinage cellulaire (Reed, 2000).

Dans les conditions physiologiques, les neutrophiles bovins ont une demi-vie de courte durée et entrent spontanément en apoptose. Ce processus permet de réguler de façon adéquate le nombre de neutrophiles circulants et est un élément clé assurant l'homéostasie. Lors d'infection, la réaction inflammatoire est capable d'accélérer ou retarder l'apoptose selon qu'elle se trouve en phase évolutive ou résolutive.

### 3.3.2. Influence du processus inflammatoire

Lors d'infection, les cytokines pro-inflammatoires et les facteurs bactériens peuvent moduler le déclenchement de l'apoptose des neutrophiles. Différentes cytokines, surexprimées durant la réaction inflammatoire, telles que IL-1 $\beta$  (Colotta *et al.*, 1992), IL-2 (Pericle *et al.*, 1994), IL-4 (Girard *et al.*, 1997), IL-6 (Biffl *et al.*, 1995), IL-8 (Kettritz *et al.*, 1998 ; Leuenroth *et al.*, 1998), IL-15 (Girard *et al.*, 1996), IFN- $\gamma$  (Colotta *et al.*, 1992 ; Klebanoff *et al.*, 1992), G-CSF (Colotta *et al.*, 1992), et GM-CSF (Colotta *et al.*, 1992 ; Lee *et al.*, 1993), prolongent la survie des neutrophiles humains. TNF- $\alpha$ , une autre cytokine surexprimée dès les premières phases d'une infection mammaire induit l'apoptose des neutrophiles humains (Hachiya *et al.*, 1995 ; Yamashita *et al.*, 1999) et bovins (Van Oostveldt *et al.*, 2002a). Mais, il a été démontré que le LPS inhibait l'apoptose spontanée des neutrophiles humains (Lee *et al.*, 1993 ; Hachiya *et al.*, 1995 ; Sweeney *et al.*, 1998 ; Klein *et al.*, 2001) et protégeait

de l'apoptose induite par le TNF- $\alpha$  (Hachiya *et al.*, 1995). Le LPS injecté dans la glande mammaire empêche l'apoptose des neutrophiles mammaires, mais n'affecte pas l'apoptose des neutrophiles circulants (Van Oostveldt *et al.*, 2002b ; Paape *et al.*, 2003). Ceci est dû au fait que peu de LPS passe dans le courant circulatoire lorsqu'il est infusé dans un quartier mammaire (Hoeben *et al.*, 2000). Cependant, d'autres auteurs ont rapporté une augmentation du taux d'apoptose des neutrophiles sanguins suite à l'infusion intramammaire de LPS de *E. coli* (Yagi *et al.*, 2002). Le rôle du LPS dans l'apoptose des neutrophiles bovins est donc encore actuellement controversé.

### 3.3.3. Régulation moléculaire de l'apoptose

Le délabrement cellulaire caractéristique de l'apoptose est en réalité dû à l'activation d'enzymes protéolytiques spécifiques appartenant à la famille des cystéines protéases et connues sous le nom de caspases (Yuan *et al.*, 1993). Les caspases existent sous forme de zymogènes inactifs dont l'activation provoque une série d'évènements protéolytiques conduisant aux modifications morphologiques cellulaires caractéristiques de l'apoptose.

La capacité d'une cellule à rentrer en apoptose est déterminée par des voies moléculaires pro- et anti-apoptotiques. La famille de protéines Bcl-2 joue un rôle central dans la régulation de ces mécanismes diamétralement opposés (Adams et Cory, 1998 ; Antonsson et Martinou, 2000). Les membres de cette famille se divisent en protéines pro- et anti-apoptotiques. Les neutrophiles humains expriment des membres pro-apoptotiques (Bax, Bik, Bad, Bak, Bid...) et anti-apoptotiques (A1, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1...) de la famille Bcl-2 (Reed, 1997). Des niveaux élevés d'expression de membres pro-apoptotiques de cette famille ont été observés dans les neutrophiles normaux, et pourraient expliquer leur courte durée de vie (Simon, 2003). Ainsi, il existe différentes preuves pour suggérer que le déclenchement ou non de l'apoptose du neutrophile repose sur les changements modifiant l'équilibre des expressions relatives de ces protéines. Chez l'homme, l'augmentation du délai de l'apoptose du neutrophile par le GM-

CSF serait due à une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 (Moulding *et al.*, 1998 ; Epling-Burnette *et al.*, 2001) et une diminution de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax (Weinmann *et al.*, 1999). De plus, sous GM-CSF, la protéine kinase B/Akt est activée, ce qui provoque la phosphorylation de la protéine Bad, laquelle est séquestrée dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 (del Peso *et al.*, 1997 ; Blume-Jensen *et al.*, 1998). Bad ne peut dès lors plus se lier à des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-x<sub>L</sub>, lesquelles vont alors bloquer l'activité pro-apoptotique de protéines comme Bax (Downward, 1999). Lorsque Bad est déphosphorylé, suite à un stimulus pro-apoptotique, il est libéré et va se relocaliser dans la membrane mitochondriale.

L'apoptose des neutrophiles joue un rôle majeur dans la résolution de la réponse inflammatoire, aussi bien chez l'homme (Ishii *et al.*, 1998 ; Haslett, 1999) que chez le bovin (Chin *et al.*, 2000 ; Sladek et Rysanek, 2001). Chez la vache atteinte de mammite subclinique avec une élévation persistante du SCC, il a été démontré que les neutrophiles isolés du lait présentaient un retard d'apoptose par rapport aux neutrophiles isolés de mamelles saines (Boutet *et al.*, 2004). Il a été suggéré que le mécanisme anti-apoptotique responsable était induit par une augmentation de l'expression de l'ARNm de la protéine anti-apoptotique Bcl-x<sub>L</sub>, sous la dépendance du facteur de transcription STAT5 activé par le GM-CSF. Ce mécanisme anti-apoptotique pourrait expliquer, du moins en partie, la persistance de l'inflammation et de l'élévation du SCC dans le lait de vaches atteintes de mammite subclinique.

## 4. LA RÉOLUTION DU PROCESSUS INFLAMMATOIRE: LE RÔLE DES LIPOXINES

La libération d'acide arachidonique et la formation de ses produits dérivés sont des évènements régulateurs clés impliqués dans les défenses de l'hôte, et notamment dans la résolution de l'inflammation. L'oxygénation de l'acide arachidonique initie la synthèse de composés bioactifs puissants,

appelés eicosanoïdes (Samuelsson *et al.*, 1989). Ces métabolites comprennent les prostaglandines (PG), les thromboxanes (TX), les prostacyclines (PI), les leucotriènes (LT), et les lipoxines (LX). Parmi ces dérivés de l'acide arachidonique, les PG à noyau cyclopenténone (cyPG) et les LX possèdent des activités anti-inflammatoires. Alors que les cyPG présentent également certaines propriétés pro-inflammatoires (Bureau *et al.*, 2002), les LX montrent des activités anti-inflammatoires uniques et ont été mises en évidence durant la phase résolutive de l'inflammation.

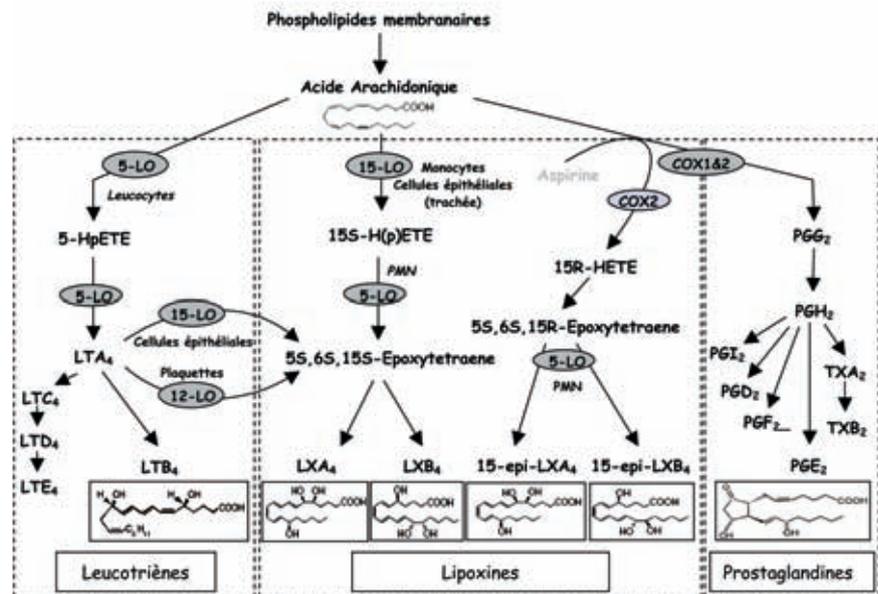
Les LX ont été identifiées pour la première fois par Serhan et collaborateurs (1984) et depuis, leurs propriétés biologiques ne cessent d'être rapportées. Durant ces 20 dernières années, des efforts significatifs ont été consacrés à l'identification des propriétés physiologiques des LX dans la réaction inflammatoire. Et pour cause, puisqu'à l'opposé des eicosanoïdes pro-inflammatoires, les LX fonctionnent comme des signaux inhibiteurs de l'inflammation (McMahon *et al.*, 2001 ; Serhan, 2002). LXA<sub>4</sub> et LXB<sub>4</sub> sont les principales espèces formées chez les mammifères. L'aspirine peut aussi induire la synthèse de LX, appelées 15-epi-LX ou ATL (*aspirin-triggered LX*). Ce sont les 15(R)-énantiomères de LXA<sub>4</sub> et LXB<sub>4</sub> (Claria et Serhan, 1995). Ces ATL partagent beaucoup des fonctions biologiques des LX natives, mais sont plus puissants et plus efficaces (Clish *et al.*, 1999).

#### 4.1. Voie de synthèse et structure des lipoxines

Les lipoxines, dont le nom est en réalité le sigle de produits d'interaction de lipoxygénases (LO), sont typiquement formées lors d'interactions « cellule-cellule ». Trois voies de synthèse majeures, dépendant de l'environnement cellulaire, conduisent à la formation de ces eicosanoïdes dérivés de LO (figure 1). Une molécule d'oxygène est insérée en deux endroits sur l'acide arachidonique (C20:4) grâce à l'action de LO distinctes, présentes dans différents types cellulaires.

La première voie de synthèse des LX repose sur l'action de la 15-LO, présente chez l'homme dans les éosinophiles, les macrophages alvéolaires, les monocytes et les cellules épithé-

**Figure 1 : Médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique dans la réponse inflammatoire et sa résolution.** Les prostaglandines (PG) et les leucotriènes (LT) générés par la cyclooxygénase (COX) et la lipoxygénase (LO) régulent et amplifient l'inflammation. Les lipoxines (LX) sont générés via des voies de synthèse activées lors d'interactions de type « cellule-cellule » grâce à l'action de deux LO sur la même molécule d'acide arachidonique. Les LX agissent comme des signaux endogènes « stop » de l'inflammation.



les (Serhan *et al.*, 1984 ; Serhan, 1997). L'expression et l'activité de la 15-LO sont principalement régulées par l'IL-4 et l'IL-13 (Levy *et al.*, 1993 ; Katoh *et al.*, 1994 ; Nassar *et al.*, 1994 ; Sigal et Conrad, 1994), deux cytokines supposées réguler négativement la réponse inflammatoire (Anderson et Coyle, 1994). Sous l'action de la 15-LO, une molécule d'oxygène est insérée sur le carbone 15 de l'acide arachidonique et conduit à la formation d'un intermédiaire, l'acide 15(S)-hydroperoxyeicosatetraenoïque. Ce composé sert de substrat pour la 5-LO du neutrophile qui génère un epoxide instable, le 5,6-epoxytetraène, qui est converti en LXA<sub>4</sub> et LXB<sub>4</sub> (Serhan *et al.*, 1984). La 5-LO est également sous le contrôle de cytokines, comme le GM-CSF et l'IL-3 (Pouliot *et al.*, 1994 ; Ring *et al.*, 1996). Cette première voie de synthèse des LX est en réalité bidirectionnelle et peut également impliquer le LTA<sub>4</sub>, lequel est libéré par les neutrophiles (Garrick et Wong, 1991) et transformé par la 15-LO des cellules épithéliales – précisément les cellules trachéales – en LXA<sub>4</sub> (Edenius *et al.*, 1990).

La seconde voie de synthèse des LX repose sur l'interaction plaquette-neutrophile (Edenius *et al.*, 1988 ; Serhan et Sheppard, 1990). Cette voie de synthèse majeure se déroule dans le système vasculaire et implique la 5-LO,

présente dans la lignée myéloïde, et la 12-LO, présente dans les plaquettes. La 5-LO du neutrophile génère du LTA<sub>4</sub> à partir de l'acide arachidonique, et les plaquettes convertissent le LTA<sub>4</sub> en LX grâce à l'activité oxygénase de leur 12-LO (Serhan et Sheppard, 1990). Dans ces conditions, lorsque le substrat est le LTA<sub>4</sub>, la 12-LO fonctionne comme une LX-synthétase. Comme plus de 50 % sont libérés par la cellule d'origine, LTA<sub>4</sub> sert aussi bien d'intermédiaire pour les synthèses d'eicosanoïdes intracellulaire et transcellulaire (Fierro et Serhan, 2001). Ainsi, lors de l'interaction et de la co-activation neutrophile-plaquette, le sort du LTA<sub>4</sub> est multiple et comprend : a) la conversion par la 12-LO en LXA<sub>4</sub> et LXB<sub>4</sub> ; b) l'hydrolyse non-enzymatique ; c) la conversion par la LTA<sub>4</sub> hydrolase en LTB<sub>4</sub>, un puissant agent chimiotactique des neutrophiles et éosinophiles, ou d) la conversion en LTC<sub>4</sub> par la LTC<sub>4</sub> synthétase (figure 1). Comme LTB<sub>4</sub> et LTC<sub>4</sub> possèdent de puissantes actions pro-inflammatoires, alors que les LX s'opposent aux réponses induites par les leucotriènes, l'équilibre entre la formation des leucotriènes et des lipoxines est critique pour les réponses cellulaires (Fierro et Serhan, 2001). De plus, durant la biosynthèse des LX, la formation des

LT est bloquée au niveau de la 5-LO (Claria *et al.*, 1996), générant une relation inverse entre la synthèse des LT et des LX. Donc, lorsque des LX sont synthétisées par les neutrophiles lors de la conversion du 15-HETE, la formation des LT est inhibée et les LX sont libérées (Serhan, 1997).

Une voie supplémentaire de synthèse des LX repose sur la formation des 15-epi-LX et est déclenchée par l'aspirine (Claria et Serhan, 1995). En présence de stimuli spécifiques, tels que cytokines ou infection bactériennes, l'aspirine induit l'acétylation de la cyclooxygénase (COX)-2, exprimée dans les cellules épithéliales et endothéliales. Son activité d'endoperoxydase se mue alors en une activité de type LO, transformant l'acide arachidonique en 15(R)-HETE, lequel est libéré par les cellules endothéliales et épithéliales, est transformé par la 5-LO des leucocytes en 15-epi-LXA<sub>4</sub> et 15-epi-LXB<sub>4</sub> (Serhan *et al.*, 1984) (figure 1).

Une fois synthétisées, les LX agissent localement et sont ensuite rapidement inactivées de façon enzymatique. La voie majeure d'inactivation des LX repose sur la déshydrogénation par les monocytes qui convertissent LXA<sub>4</sub> en 15-oxo-LXA<sub>4</sub>, composé biologiquement inactif (Clish *et al.*, 2000). Pour contrecarrer cette inactivation métabolique, des analogues synthétiques stables ont été développés en positionnant respectivement des groupements méthyles sur le carbone 15 et le carbone 5 de LXA<sub>4</sub> et LXB<sub>4</sub>, afin de bloquer la déshydrogénation (Serhan *et al.*, 1995). Des analogues synthétiques stables des 15-epi-LX ont également été réalisés (Schottelius *et al.*, 2002). Ces dérivés possèdent les activités biologiques des LX natives mais sont plus stables et se sont avérés plus efficaces dans différents modèles inflammatoires (Clish *et al.*, 1999 ; Serhan *et al.*, 1999 ; Mitchell *et al.*, 2002).

Durant la réaction inflammatoire, la génération des médiateurs lipidiques se déroule apparemment en deux temps. Dans un modèle inflammatoire *in vivo* de poche d'air dorsale chez la souris, la formation d'eicosanoïdes s'est réalisée selon une cinétique bien précise (Levy *et al.*, 2001). L'injection

de TNF- $\alpha$  dans la cavité cutanée a d'abord provoqué une augmentation de LTB<sub>4</sub>, suivie de l'infiltration des neutrophiles. L'accumulation des neutrophiles dans la poche dorsale a coïncidé avec une augmentation de la concentration en PGE<sub>2</sub>. Une augmentation marquée et persistante des concentrations en LXA<sub>4</sub> s'est montrée concomitante à une diminution de l'infiltration neutrophilique et de la production de PGE<sub>2</sub>. Ainsi, la PGE<sub>2</sub> orienterait la synthèse des médiateurs lipidiques d'une activité 5-LO générant du LTB<sub>4</sub> vers une activité 15-LO permettant la synthèse de LXA<sub>4</sub>, une réponse parallèle à la réduction de l'infiltration des neutrophiles. Il peut donc être suggéré qu'en présence d'une inflammation aiguë, la synthèse des médiateurs lipidiques s'effectue en deux temps, et que les eicosanoïdes jouent un rôle dans l'initiation, la propagation, mais aussi la terminaison de la réponse inflammatoire. La phase initiale est couplée à la synthèse de LT, et la formation subséquente de PG induit une activité LO menant à la génération de LX, favorisant alors la résolution de l'inflammation (Chavis *et al.*, 1996 ; Levy *et al.*, 2001 ; McMahon et Godson, 2004). Mais comment les LX exercent-elles donc leurs nombreuses propriétés anti-inflammatoires ?

#### 4.2. Mécanisme moléculaire du mode d'action : les récepteurs spécifiques des lipoxines

Les actions des LX peuvent être attribuées à l'un des trois mécanismes principaux suivant ou à une combinaison de ceux-ci, dépendant en partie du type cellulaire et du tissu impliqué : a) les LX agissent au niveau de leur propre récepteur de surface cellulaire (séparé pour LXA<sub>4</sub> et LXB<sub>4</sub>) (Fiore *et al.*, 1992 ; Chiang *et al.*, 2000) ; b) LXA<sub>4</sub> interagit avec une sous-classe du récepteur aux peptido-leucotriènes (LTC<sub>4</sub> et LTD<sub>4</sub>), liant aussi LXA<sub>4</sub> (Fierro et Serhan, 2001) ; c) les LX peuvent agir après transport/pénétration au niveau de cibles intracellulaires ou directement à l'intérieur de la cellule d'origine (Simchowicz *et al.*, 1994).

L'utilisation de LXA<sub>4</sub> marquée a permis de mettre en évidence un site spécifique de reconnaissance au niveau

des neutrophiles humains (Fiore *et al.*, 1992). Il semblerait que les LX exercent leurs actions via des récepteurs couplés à la protéine G (GPCR). La connaissance du mécanisme par lequel LXA<sub>4</sub> et son GPCR – initialement ALXR et appelé aujourd'hui ALX (Brink *et al.*, 2003) – activent les signaux anti-inflammatoires est toujours incomplète. ALX est une protéine contenant 7 régions transmembranaires ayant été séquencées à partir de neutrophiles (Fiore *et al.*, 1994) et de monocytes humains (Maddox *et al.*, 1997). Récemment, un second GPCR de LX a été identifié à partir de cDNA de macrophage murin (Takano *et al.*, 1997) et son activation mène aussi à une réponse anti-inflammatoire (Vaughn *et al.*, 2002). Bien que LXA<sub>4</sub> et LXB<sub>4</sub> partagent un profil biologique similaire, LXB<sub>4</sub> n'active pas le récepteur ALX, mais activerait un autre récepteur putatif qui reste à identifier (Romano *et al.*, 1996).

En plus de lier un récepteur qui leur est spécifique, les LX favorisent également la résolution de l'inflammation par compétition antagoniste au niveau du récepteur des LT (cysLT<sub>1</sub>) dans bon nombre de types cellulaires *in vitro* (Badr *et al.*, 1989 ; Lee *et al.*, 1989 ; Brady *et al.*, 1990 ; Lee *et al.*, 1991 ; Papayianni *et al.*, 1996 ; McMahon *et al.*, 2000 ; Gronert *et al.*, 2001), mais aussi *in vivo* (Badr *et al.*, 1989 ; Christie *et al.*, 1992 ; Feng *et al.*, 1996 ; Clish *et al.*, 1999). Si les LX sont des ligands compétitifs du récepteur cysLT<sub>1</sub>, les LT, par contre, ne peuvent se fixer à ALX (Gronert *et al.*, 2001). En résumé, LXA<sub>4</sub> se lie à différents GPCR distincts : les récepteurs ALX et cysLT.

En plus des actions liées à ces deux récepteurs GPC, LXA<sub>4</sub> peut agir au niveau d'un 3<sup>e</sup> type de récepteur, qui lui n'est pas couplé à la protéine G, le récepteur *aryl hydrocarbon* (AhR). Les gènes activés par le AhR comprennent ceux impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et la dégradation des LX (Schaldach *et al.*, 1999).

#### 4.3. Activation de ALX : voies de transduction du signal et effets physiologiques

Les LX peuvent moduler l'activité d'un grand nombre de types cellu-

lares d'origine non myéloïde, tels que les fibroblastes (Sodin-Semrl *et al.*, 2000), les cellules endothéliales (Fierro *et al.*, 2002), les cellules épithéliales du système gastro-intestinal (Gronert *et al.*, 1998 ; Gewirtz *et al.*, 2002), les cellules dendritiques spléniques (Aliberti *et al.*, 2002a), etc. Dans les leucocytes, les LX possèdent la propriété intéressante de présenter des actions diamétralement opposées selon le type cellulaire : elles stimulent l'activation des monocytes et des macrophages, tout en inhibant l'activation des neutrophiles, des éosinophiles et des lymphocytes (Gewirtz *et al.*, 1999 ; Godson *et al.*, 2000 ; McMahon *et al.*, 2001 ; Serhan, 2002). En se liant à son récepteur ALX, LXA<sub>4</sub>, mais pas LXB<sub>4</sub>, augmente la concentration en calcium intracellulaire [(Ca<sup>2+</sup>)i] dans les neutrophiles (Moore et Merritt, 1991) et les monocytes (Romano *et al.*, 1996). Cependant, dans les neutrophiles, l'augmentation de [(Ca<sup>2+</sup>)i] est faible, courte et moins importante que l'augmentation de [(Ca<sup>2+</sup>)i] induite par le peptide formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) (Fiore *et al.*, 1991). Aux concentrations nanomolaires, LXA<sub>4</sub> diminue la mobilisation de Ca<sup>2+</sup> induite par le LTB<sub>4</sub> et le peptide formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), ce qui empêche le chimiotactisme des neutrophiles, la transmigration, l'adhésion, la dégranulation et la production d'anions superoxyde (Lee *et al.*, 1989 ; Colgan *et al.*, 1993 ; Fiore et Serhan, 1995 ; Papayianni *et al.*, 1996). Par contre, aux concentrations micromolaires, LXA<sub>4</sub> induit la mobilisation de Ca<sup>2+</sup> dans les neutrophiles (He *et al.*, 2003). Dans les monocytes, cependant, LXA<sub>4</sub> provoque une augmentation de [(Ca<sup>2+</sup>)i] d'une plus grande magnitude que dans les neutrophiles et supérieure de 50 % à l'augmentation de [(Ca<sup>2+</sup>)i] induite par le fMLP (Romano *et al.*, 1996), ce qui augmente le chimiotactisme et l'adhérence des monocytes (Maddox *et al.*, 1997 ; Fierro et Serhan, 2001). Il semble donc que les effets opposés rencontrés dans les neutrophiles et les monocytes soient dus à des mécanismes cellulaires différents, même si les séquences en acides aminés des récepteurs ALX de ces deux types cellulaires sont les mêmes (Bonnans *et al.*, 2004).

Les propriétés de LXA<sub>4</sub>, des ATL et de leurs analogues stables sont maintenant bien documentées en ce qui concerne leurs effets sur la circulation des leucocytes et sur l'inhibition de la libération de médiateurs inflammatoires, tels que les cytokines et les chimiokines. Ainsi, aux concentrations nanomolaires, LXA<sub>4</sub> et leurs analogues stables inhibent les libérations d'IL-1 induite par le TNF- $\alpha$  et d'IL-8 induite par le LPS dans les neutrophiles humains (Hachicha *et al.*, 1999 ; Jozsef *et al.*, 2002). Dans les fibroblastes synoviaux, LXA<sub>4</sub> inhibe la libération d'IL-1 $\beta$  et d'IL-8 induite par l'IL-6 et la synthèse de métalloprotéinases. Les analogues stables de LX inhibent aussi l'expression du gène codant pour l'IL-8 dans les leucocytes humains (Jozsef *et al.*, 2002). De plus, dans les cellules épithéliales gastro-intestinales, les analogues de LXA<sub>4</sub> réduisent l'activation transcriptionnelle sous la dépendance de NF $\kappa$ B et inhibent la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$  (Gewirtz *et al.*, 2002). Par ailleurs, les LX inhibent les interactions entre les neutrophiles et les cellules endothéliales (Papayianni *et al.*, 1996 ; Filep *et al.*, 2002) et, dès lors, réduisent leur migration au travers de l'épithélium intestinal (Colgan *et al.*, 1993). Aux concentrations nanomolaires, les analogues stables des LX inhibent la libération de la L-sélectine de la membrane cellulaire et l'expression de CD11/CD18 dans les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes (Filep *et al.*, 1999). Les LX et les ATL inhibent aussi la prolifération cellulaire et pourraient dès lors contribuer au rôle préventif anticancéreux de l'aspirine chez l'homme (Claria *et al.*, 1996). Bien d'autres propriétés des LX et de leurs analogues ont été démontrées *in vitro* (tableau III).

La génération des LX lors de maladies inflammatoires est de mieux en mieux documentée. Le tableau IV renseigne des connaissances actuelles sur les effets des LX et des 15-epi-LX dans des études cliniques humaines et des modèles animaux. Le rôle précis de la production des LX dans la physiopathologie de maladies inflammatoires est indéterminé. Une diminution de la production de LX a été démontrée chez les patients asthmatiques chroniques, dans les hépatites chroniques et certaines leucémies chroniques (McMahon et Godson, 2004). Par contre, la production de LX peut

être augmentée dans d'autres maladies, telles que la périodontite juvénile, la glomérulonéphrite, l'arthrite rhumatoïde (Serhan, 1997). De façon générale, il ressort que les LX et les 15-epi-LX sont produites *in vivo* au site inflammatoire, et qu'un défaut de leur synthèse peut se corrélérer à une incapacité de résoudre le processus inflammatoire aigu, contribuant dès lors à l'évolution vers le stade chronique (McMahon et Godson, 2004).

Récemment, il a été supposé qu'un défaut de synthèse de LX pouvait être responsable, du moins en partie, de l'accumulation des neutrophiles et de la persistance de l'inflammation au sein d'une glande mammaire infectée de manière chronique (Boutet *et al.*, 2003). Le rapport entre LXA<sub>4</sub> et LTB<sub>4</sub> a été mesuré dans des quartiers sains et atteints de mammite aiguë ou chronique. Ces deux eicosanoïdes s'opposent dans leur synthèse et dans leur fonction, la mesure de leur rapport individuel au sein d'un quartier infecté pourrait rendre compte de l'état d'évolution du processus inflammatoire. Il ressort de cette étude que le taux de LTB<sub>4</sub> était bas dans les quartiers sains, fortement élevé dans les quartiers atteints de mammite aiguë, et intermédiaire dans les quartiers chroniques. Par contre, alors que les taux de LXA<sub>4</sub> étaient significativement augmentés dans la mammite aiguë, les quartiers sains et atteints de mammites chroniques présentaient des concentrations identiquement faibles. Le rapport LXA<sub>4</sub>:LTB<sub>4</sub> était donc significativement plus faible dans les quartiers chroniques que dans les quartiers sains et atteints de mammite aiguë. Cette observation pourrait expliquer, en partie, l'accumulation persistante de neutrophiles, caractérisant la mammite chronique (Boutet *et al.*, 2003).

#### 4.4. Importance des lipoxines dans la résolution de l'inflammation

Une caractéristique constante de l'inflammation aiguë est l'arrivée des neutrophiles en premier lieu sur le site inflammatoire, suivie de l'arrivée des cellules mononuclées. L'apoptose des neutrophiles et leur élimination rapide

**Tableau III – Effets des lipoxines et de leurs analogues *in vitro* (non exhaustif)**

Activités biologiques	Références
<i>Cellules myéloïdes</i>	
Neutrophiles	
Inhibent	
Chimiotactisme	Lee <i>et al.</i> , 1989 ; Serhan <i>et al.</i> , 2001
La mobilisation de calcium	Lee <i>et al.</i> , 1989
La génération d'anions superoxyde	Hachicha <i>et al.</i> , 1999 ; Jozsef <i>et al.</i> , 2002
La libération d'IL-1 $\beta$	Hachicha <i>et al.</i> , 1999
L'adhésion des neutrophiles à l'endothélium	Papayianni <i>et al.</i> , 1996
La migration au travers de l'endothélium	Papayianni <i>et al.</i> , 1996 ; Filep <i>et al.</i> , 1999
La migration au travers de l'épithélium	Colgan <i>et al.</i> , 1993
L'expression de CD11/CD18	Fiore et Serhan, 1995
La margination et la diapédèse	Hedqvist <i>et al.</i> , 1989
La dégranulation des granules azurophiles	Gewirtz <i>et al.</i> , 2002
La libération d'IL-8	Jozsef <i>et al.</i> , 2002 ; He <i>et al.</i> , 2003
La libération de L-sélectine	Filep <i>et al.</i> , 1999
La génération d'inositol 1,4,5-triphosphate	Grandordy <i>et al.</i> , 1990
L'activation de NF $\kappa$ B et AP1	Jozsef <i>et al.</i> , 2002
Monocytes	
Stimulent	
Chimiotactisme	Maddox <i>et al.</i> , 1997
Adhésion	Maddox <i>et al.</i> , 1997
La phagocytose non phlogistique par les macrophages	Godson <i>et al.</i> , 2000
La réorganisation des filaments d'actine des macrophages/monocytes	Maderna <i>et al.</i> , 2002
Atténuent	
La libération de L-sélectine	Filep <i>et al.</i> , 1999
L'expression de CD11/CD18	Filep <i>et al.</i> , 1999
La génération d'anions superoxyde	Jozsef <i>et al.</i> , 2002
L'activation de NF $\kappa$ B et AP1	Jozsef <i>et al.</i> , 2002
La libération d'IL-8	Jozsef <i>et al.</i> , 2002
Eosinophiles	
Inhibent	
Chimiotactisme	Soyombo <i>et al.</i> , 1994
Migration	Bandeira-Melo <i>et al.</i> , 2002
Lymphocytes	
Empêchent	
La libération de L-sélectine	Filep <i>et al.</i> , 1999
L'expression de CD11/CD18	Filep <i>et al.</i> , 1999
La génération d'anions superoxyde	Jozsef <i>et al.</i> , 2002
L'activation de NF $\kappa$ B et AP1	Jozsef <i>et al.</i> , 2002
La libération d'IL-8	Jozsef <i>et al.</i> , 2002
Cellules NK	
Inhibent	
Cytotoxicité	Ramstedt <i>et al.</i> , 1987
<i>Cellules non myéloïdes</i>	
Cellules endothéliales	
Inhibent	
La mobilisation de P-sélectine	Papayianni <i>et al.</i> , 1996
L'adhésion pour les neutrophiles	Papayianni <i>et al.</i> , 1996
La prolifération	Fierro <i>et al.</i> , 2002
Le chimiotactisme	Fierro <i>et al.</i> , 2002
Atténuent	
L'expression de CD11/CD18	Filep <i>et al.</i> , 1999
La perte de CysLT <sub>1</sub> vasculaire	Gronert <i>et al.</i> , 2001
Cellules de muscle lisse	
Inhibent	
La contraction de l'iléum chez le porc de guinée	Dahlen <i>et al.</i> , 1988
La contraction des muscles lisses bronchiques	Christie <i>et al.</i> , 1992
Cellules rénales mésangiales	
Inhibent	
L'activation de la kinase phosphoinositol-3	McMahon <i>et al.</i> , 2000
La capacité d'adhésion	Brady <i>et al.</i> , 1990
La prolifération	McMahon <i>et al.</i> , 2000 ; 2002
Entérocytes	
Inhibent	
L'expression et la libération d'IL-8 induite par le TNF- $\alpha$	Gronert <i>et al.</i> , 1998
La libération d'IL-8 provoquée par <i>Salmonella typhimurium</i>	Gewirtz <i>et al.</i> , 1998
Fibroblastes	
Inhibent	
La libération d'IL-6 et d'IL-8	Sodin-Semrl <i>et al.</i> , 2000
La métalloprotéinase-3	Sodin-Semrl <i>et al.</i> , 2000
Cellules dendritiques	
Inhibent	
La production d'IL-12	Aliberti <i>et al.</i> , 2002a ; Aliberti <i>et al.</i> , 2002b
La mobilisation	Aliberti <i>et al.</i> , 2002b

**Tableau IV – Effets des lipoxines et de leurs analogues *in vivo* (non exhaustif)**

Organe/Système	Impact <i>in vivo</i>	Références
Hématologique/oncologique	Défaut de synthèse en LX dans les cellules de patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Les LX régulent la myélopoïèse chez l'homme.	Stenke <i>et al.</i> , 1991 Stenke <i>et al.</i> , 1994
Rénal	Les analogues de LX sont protecteurs dans un modèle murin d'ischémie rénale aiguë. L'excrétion urinaire de LXA <sub>4</sub> est détectée chez les personnes en bonne santé. L'excrétion de LX est augmentée dans le rein de rats transfectés avec la 15-LO. Des souris knockout pour la P-sélectine présentent un défaut de synthèse en LX, ce qui provoque l'infiltration de leucocytes dans les glomérules enflammés. Les LX augmentent la filtration glomérulaire et le flux sanguin rénal dans un modèle de glomérulonéphrite expérimentale.	Leonard <i>et al.</i> , 2002 Romano <i>et al.</i> , 2002 Munger <i>et al.</i> , 1999 Mayadas <i>et al.</i> , 1996 Badr <i>et al.</i> , 1989
Gastro-entérique/Hépatique	Les ATL favorisent les défenses muco-solaires dans la gastrite. Les analogues de LX réduisent l'inflammation intestinale et la mortalité dans un modèle murin de colite inflammatoire induite par le sulfate sodique de dextran. La génération de LX est diminuée chez les patients atteints de cirrhose chronique. Les LX stimulent la phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages dans un modèle de péritonite induite par le thioglycollate.	Souza <i>et al.</i> , 2003 Gewirtz <i>et al.</i> , 2002 Claria <i>et al.</i> , 1998 Mitchell <i>et al.</i> , 2002
Pulmonaire	Inhibition de l'hyperréactivité des voies aériennes et de l'inflammation pulmonaire dans un modèle murin d'asthme. Les patients athmatiques intolérant à l'aspirine synthétisent moins de LX que les patients tolérant à l'aspirine. LXA <sub>4</sub> est détecté dans les fluides bronchoalvéolaires de patients atteints de maladie pulmonaires. LXA <sub>4</sub> est détecté dans l'exsudat pleural de patients présentant une effusion pleurale. L'inhalation de LXA <sub>4</sub> réduit la bronchoconstriction induite par le LTC <sub>4</sub> chez des patients athmatiques.	Levy <i>et al.</i> , 2002 Sanak <i>et al.</i> , 2000 Lee <i>et al.</i> , 1990 Levy <i>et al.</i> , 2001 Christie <i>et al.</i> , 1992
Orthodontique	LXA <sub>4</sub> est détecté dans la périodontite juvénile. Les ATL diminuent les niveaux de PGE <sub>2</sub> dans la périodontite à <i>P. gingivalis</i> .	Pouliot <i>et al.</i> , 2000 Pouliot <i>et al.</i> , 2000
Immunologique	La production d'IL-12 est inhibée par les cellules dendritiques spléniques. La croissance de colonies est inhibée dans la moelle osseuse.	Aliberti <i>et al.</i> , 2002a Stenke <i>et al.</i> , 1991 ; 1994
Vasculaire	Les analogues de LX inhibent IL-1β et stimule la production d'IL-4. Les analogues de LX inhibent l'adhérence leucocytaire vasculaire mésentérique chez le rat.	Serhan, 2002 Scalia <i>et al.</i> , 1997
Dermatologique	Les analogues d'ATL inhibent la migration des neutrophiles, l'œdème, et l'hyperprolifération dans différents modèles animaux d'inflammation de la peau. Les analogues de LX inhibent le recrutement de leucocytes induit par le TNF-α dans un modèle murin de poches d'air dorsales. Les LX inhibent l'infiltration des neutrophiles et la perméabilité vasculaire. LXA <sub>4</sub> régule les réponses d'hypersensibilité retardée régulées par le LTB <sub>4</sub> .	Schottelius <i>et al.</i> , 2002 Hachicha <i>et al.</i> , 1999 Takano <i>et al.</i> , 1997 Feng <i>et al.</i> , 1996
Arthrite rhumatoïde	Les niveaux en LX augmentent avec la guérison	Thomas <i>et al.</i> , 1995

ATL, *Aspirin triggered lipoxins* = lipoxines déclenchées par l'aspirine.

par les macrophages est un mécanisme essentiel de la résolution de l'inflammation afin de minimiser les dommages tissulaires. Il a d'ailleurs été proposé que ce phénomène était un moyen significatif pour éliminer les neutrophiles de la glande mammaire et était impliqué dans la résolution de la mammite bovine (Sladek et Rysanek, 2001). Or, une des propriétés les plus importantes des LX est la stimulation de la phagocytose non-phlogistique des neutrophiles apoptotiques par les macrophages, ce qui signifie que les LX se comportent comme de puissants agents chimiotactiques des monocytes, mais ne stimulent pas les réactions qui en découlent, telles que la dégranulation et la génération d'anions superoxyde (Maddox et Serhan, 1996 ;

Maddox *et al.*, 1997). Ce mécanisme important de la résolution de l'inflammation se déroule à des concentrations nanomolaires, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Godson *et al.*, 2000 ; Mitchell *et al.*, 2002). Les effets bénéfiques d'une telle phagocytose ne sont pas seulement liés à la clairance de cellules potentiellement nécrotiques, mais s'associent également à la suppression active de l'inflammation par la production de *transforming growth factor* (TGF)-β1 par les macrophages (Savill et Fadok, 2000) et à une suppression de la libération d'IL-8 (Mitchell *et al.*, 2002). Cette activité s'accompagne de changements au niveau du cytosquelette d'actine des macrophages, activant les GTPases RhoA et Rac (Maderia *et al.*, 2002).

## 5. LES RAISONS DE LA PERSISTANCE DE L'INFLAMMATION

### 5.1. La virulence du pathogène

Un agent infectieux capable de persister dans la glande mammaire doit posséder des mécanismes lui permettant de ne pas être éliminé lors des traites successives et d'éviter les défenses du système immunitaire. Parmi les agents pathogènes capables de persister dans la mamelle tout au long d'une lactation, voire d'une lactation à l'autre, *S. aureus* est le germe qui semble présenter le plus de problèmes à l'ensemble de la filière laitière. La réaction inflammatoire qui se développe est généralement de faible intensité et par conséquent la mammite à *S. aureus* est souvent subclinique. Les infec-

tions intramammaires à *S. aureus* ont tendance à devenir chronique et les traitements aux antibiotiques se caractérisent par un faible taux de guérison (Sutra et Poutrel, 1994).

La pathogénie de la mammite chronique à *S. aureus* n'est pas encore entièrement comprise, mais il semble maintenant clairement établi que ce germe possède une variété de facteurs de virulence lui permettant d'éviter les défenses du système immunitaire et dès lors de survivre dans la glande mammaire (Anderson, 1976 ; Riollet *et al.*, 2001). Ces facteurs de virulence permettent par exemple l'adhésion de la bactérie aux cellules hôtes, favorisent les dommages tissulaires et la dispersion de la bactérie, ou protègent directement la bactérie du système immunitaire de l'animal. Ces facteurs sont, par exemple, des toxines, des enzymes, des protéines de surface (comme la protéine A), des capsules polysaccharidiques, et permettent entre autre à la bactérie de former et coloniser des micro abcès, dans lesquels *S. aureus* est protégé de l'action des neutrophiles, ou encore de supprimer la prolifération des lymphocytes (Anderson, 1976 ; Gudding *et al.*, 1984 ; Craven et Anderson, 1984 ; Nonnecke et Harp, 1985 ; Park *et al.*, 1993). De plus, *S. aureus* est capable de survivre à l'intérieur des neutrophiles, mais aussi de pénétrer et survivre à l'intérieur des cellules épithéliales ou des macrophages (Craven et Anderson, 1984 ; Almeida *et al.*, 1996 ; Hébert *et al.*, 2000 ; Hensen *et al.*, 2000a ; 2000b). La pénétration à l'intérieur des cellules épithéliales semble nécessiter l'interaction entre des protéines de liaison de la fibronectine, exprimée par certaines souches de *S. aureus*, et la cellule hôte, dont la conséquence est le réarrangement du cytosquelette (Dziewanowska *et al.*, 1999).

Les neutrophiles constituent un moyen de défense essentiel contre les infections à *S. aureus*. En effet, dans un modèle d'arthrite septique induite par *S. aureus* chez la souris, l'élimination totale des neutrophiles a provoqué une diminution de la survie et une augmentation de la bactériémie (Verdrengh et Tarkowski, 1997). Cependant, une diminution de la survie des souris infectées a aussi été associée à un nombre excessif de neutrophiles et à une augmentation de la charge bactérienne

au site infectieux (Lowrance *et al.*, 1994) ce qui suggère que les neutrophiles contribuent à l'augmentation du nombre de microorganismes. Gresham et collaborateurs (2000) ont démontré que deux événements intracellulaires se déroulaient dans les neutrophiles : un contribuant à la survie (macropinosome) et un autre à la destruction du pathogène (phagolysosome). Les neutrophiles présenteraient donc à la fois un rôle protecteur et délétère dans l'infection à *S. aureus*.

Des études ont également démontré la capacité de *Streptococcus uberis* à résister à la phagocytose (Thomas *et al.*, 1994) et à la digestion intracellulaire dans les neutrophiles (Leigh *et al.*, 1990). L'adhérence n'est apparemment pas un mécanisme important au début de l'infection, bien que la capacité de certaines souches à adhérer à la matrice extracellulaire (Lammers *et al.*, 2001) et aux cellules mammaires épithéliales en présence de fibronectine (Almeida *et al.*, 1999) peut s'avérer important par la suite, dans le développement d'une infection persistante. De plus, certaines souches de *S. uberis* se sont avérées capables d'envahir et survivre dans les cellules épithéliales mammaires sans en affecter la viabilité (Almeida *et al.*, 2005).

Concernant *E. coli*, il a été démontré que cette bactérie était capable de causer des infections persistantes dans la glande mammaire sans développement d'une réponse immune significative, mais aussi de survivre à l'intérieur de neutrophiles (Hill *et al.*, 1979). Récemment, il a été démontré que les souches d'*E. coli* associées à des infections chroniques pénétraient plus efficacement les cellules mammaires épithéliales que des souches associées à des infections aiguës, et que ce mécanisme nécessitait un réarrangement du cytosquelette de la cellule hôte (Dogan *et al.*, 2005).

## 5.2. La réponse de l'hôte et les boucles autorégulatrices

Suivant la virulence du pathogène impliqué et l'intensité de la réponse inflammatoire de l'hôte, le temps nécessaire à la diminution du SCC, une fois que l'agent infectieux a été éliminé, est de quelques jours, semai-

nes, voire plus encore (Harmon, 1994). Cette observation montre qu'infection et inflammation, bien que liées lors de l'initiation de la réponse immune mammaire, finissent par se dissocier. De plus, les infections subcliniques et chroniques de la glande mammaire, et particulièrement celles à *S. aureus*, se caractérisent par une fluctuation du SCC et de la réponse inflammatoire au cours du temps (Sears *et al.*, 1990 ; Riollet *et al.*, 2001). Hormis la virulence du pathogène impliqué, quelles pourraient être les raisons expliquant la persistance de la réaction inflammatoire chez certaines vaches ?

La plupart des gènes codant pour des protéines inflammatoires impliquées dans la migration et l'activation des neutrophiles contiennent dans leur promoteur des sites  $\kappa B$  pour le facteur nucléaire  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ), et dépendent donc en partie de NF- $\kappa B$  pour leur activation (Pahl, 1999). Il a été démontré que l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa B$  variait d'un niveau faible à élevé dans les cellules isolées de quartiers de vaches atteintes de mammite chronique (Boulanger *et al.*, 2003). Le niveau de cette activité n'était pas corrélé au SCC ou à la proportion de neutrophiles présents dans les échantillons de lait, mais l'était fortement au niveau d'expression de l'IL-8 et du GM-CSF, deux cytokines dépendantes de NF- $\kappa B$  impliquées dans l'initiation et la perpétuation de l'inflammation neutrophilique. Un grand nombre de bactéries peuvent directement activer NF- $\kappa B$  dans les cellules épithéliales et les macrophages, ce qui déclenche la réponse inflammatoire (Münzenmaier *et al.*, 1997 ; Nauman *et al.*, 1997 ; Zhang et Ghosh, 2000). Les cellules épithéliales et les macrophages activés sécrètent alors des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- $\alpha$ , potentiellement activatrices de NF- $\kappa B$  dans les cellules présentes au site infectieux comme les neutrophiles (Nauman *et al.*, 1997 ; Sharma *et al.*, 1998). Cette activité de NF- $\kappa B$  dans les neutrophiles provoque la libération de chimiokines et cytokines, qui vont à leur tour amplifier la réaction inflammatoire.

NF- $\kappa B$  est impliqué dans la physiopathologie de maladies inflammatoires chroniques, telles que l'asthme, et son activité est maintenue à un niveau modéré ou élevé dans les bronches de chevaux poussifs au moins 21 jours

après l'éviction de l'allergène de leur environnement (Bureau *et al.*, 2000a). Ce maintien d'activité dépendrait de l'interaction entre les granulocytes et les cellules épithéliales bronchiques via la rétroaction de boucles autorégulatrices dépendante de l'IL-1 $\beta$  et du TNF- $\alpha$ . Cette activité ne s'arrêterait qu'après la mort des granulocytes (Bureau *et al.*, 2000b). Etant donné qu'un retard d'apoptose des neutrophiles présents dans le lait de vaches souffrant de mammite subclinique a été démontré (Boutet *et al.*, 2004), l'ensemble de ces observations suggère que ces neutrophiles actifs au site inflammatoire sont capables d'entretenir l'inflammation via l'activation de NF- $\kappa$ B, et que son activité pourrait également se maintenir un certain temps dans la glande mammaire, même après l'éradication du germe pathogène. De plus, il peut être supposé que seules la mort et la clairance des neutrophiles permettraient de stopper les effets directs et indirects de ces cellules sur la réponse inflammatoire présente dans la mamelle.

## 6. CONCLUSIONS

Le recrutement rapide de neutrophiles en nombre suffisant vers la glande mammaire est un moyen primordial en début d'infection pour éliminer l'agent pathogène et empêcher le développement d'une mammite. Les mécanismes de la résolution de l'inflammation permettent de stopper la migration des neutrophiles et empêchent ainsi leurs effets néfastes et destructeurs sur le parenchyme mammaire, se développant lorsque ce phénomène persiste. La mammite chronique semble se caractériser par une activité neutrophilique permanente mais insuffisante pour éradiquer le germe infectieux, dont la conséquence principale est la diminution de la production laitière. Cette activité neutrophilique serait due, entre autre, à une viabilité accrue induite par des cytokines pro-inflammatoires, comme par exemple le GM-CSF. Ce retard d'apoptose permettrait aux neutrophiles d'exercer leur rôle de cellule immunorégulatrice en sécrétant diverses cytokines capables d'amplifier la réaction inflammatoire. Le mauvais fonctionnement des pouvoirs

phagocytaire et bactéricide du neutrophile serait, quant à lui, attribué à la virulence du germe pathogène mais aussi à différents facteurs propres à l'animal hôte. Par ailleurs, la persistance de la réaction inflammatoire dans la mammite chronique semble liée à des concentrations trop faibles en lipoxines, médiateurs aux propriétés anti-inflammatoires uniques. Ces faibles niveaux pourraient dépendre de l'intensité de la réponse inflammatoire, trop faible dans la mammite chronique que pour favoriser l'orientation de l'activité cellulaire vers la synthèse de lipoxines (orientation vers l'activité 15-LO). La mammite chronique se caractériserait par conséquent par une activité cellulaire orientée majoritairement vers la synthèse de médiateurs pro-inflammatoires. Il reste encore à démontrer si l'orientation de la réaction inflammatoire vers la synthèse de LX ne dépend pas directement de la virulence du germe pathogène et donc indirectement de l'intensité de la réponse inflammatoire qu'il suscite.

La meilleure compréhension de l'immunité innée et acquise, et la connaissance plus approfondie des mécanismes d'interaction entre la bactérie et l'hôte, ouvriront de nouvelles perspectives dans le développement de stratégies immuno-modulatrices nécessaires à la prévention ou au traitement de la mammite bovine. Ainsi, suivant le germe pathogène impliqué, il serait utile de savoir si les neutrophiles sont hypo- ou hyper-fonctionnels, afin de déterminer s'il faudrait orienter leur activation et les faire vivre plus longtemps, ou *a contrario* s'il faudrait les faire mourir et donc provoquer leur rentrée en apoptose. Dès lors, des agents capables de moduler le déclenchement de l'apoptose, par exemple en la retardant au maximum en début d'infection et en l'accéléralant en fin d'infection, pourraient jouer un rôle thérapeutique dans la résolution de la mammite bovine. Récemment, l'induction de l'apoptose de neutrophiles présents dans le lait d'une vache atteinte de mammite subclinique avec une élévation persistante du SCC a pu être réalisée *ex vivo* en inhibant l'activité du facteur de transcription STAT5 (Boutet *et al.*, 2004). Il reste cependant à déterminer les effets d'un tel traitement *in vivo* sur les mécanismes de défenses de la glande mammaire, et

à élucider comment serait influencée la virulence de l'agent infectieux.

Il importe également de mieux déterminer le rôle joué par les lymphocytes T. Les cellules T sont apparemment de type suppresseur lors d'infection à *S. aureus* et pourrait expliquer, en partie, la persistance de ce type d'infection. Réorienter la réponse vers l'expression d'un phénotype cytotoxique pourrait dès lors se montrer efficace. L'utilisation des cellules dendritiques, puissantes cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T et initiateurs de la réponse immune, pourrait s'avérer être une approche intéressante. Finalement, il importe que les futures recherches consacrées à l'étude des mécanismes intervenant dans l'interaction hôte-pathogène répondent aussi aux attentes du consommateur. L'approche vaccinale conserve dès lors tout son intérêt grâce à son approche préventive, chère aux yeux de toute la filière et particulièrement aux élevages biologiques.

## 7. REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier les Professeurs J.-F. Beckers, C. Burvenich, Chr. Hanzen, J.-M. Godeau, J. Mainil et A. Vanderplasschen pour leurs conseils judicieux et les nombreuses discussions enrichissantes encadrant le sujet vaste que représente l'inflammation de la glande mammaire bovine.

## SUMMARY

### The bovine mastitis : from initiation to resolution

The cure of a cow suffering from a bacterial mastitis relies on the balance between the eradication of the pathogen and the resolution of the inflammatory response, two processes that are essential to come back to a normal milk composition with low somatic cell count. The persistence of the inflammatory response, which main consequence is a reduction in milk yield, is a feature of chronic mastitis. This frequent disease depends on inappropriate host-pathogen

interactions and is not yet well understood. This review resumes the main defence mechanisms of the bovine mammary gland, emphasizing the predominant

roles played by the neutrophil, and brings some precisions on lipoxin implications in the resolution of inflammation. Reasons that may explain the persis-

tence of the inflammatory reaction, a phenomenon found in the *Staphylococcus aureus* chronic mastitis, are also discussed.

## BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS J.M., CORY S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 1998, **281**, 1322-1326.
- ALIBERTI J., HIENY S., REIS E., SOUSA C., SERHAN C.N., SHER A. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by Dcs : a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nat. Immunol.*, 2002a, **3**, 76-82.
- ALIBERTI J., SERHAN C., SHER A. Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J. Exp. Med.*, 2002b, **196**, 1253-1262.
- ALLISON J.P., HAVRAN W.L. The immunobiology of T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, **9**, 679-705.
- ALLUWAIMI A.M., ROSSITTO P.V., LEUTENEGGER C.M., FARVER T.B., SMITH W.L., CULLOR J.S. The somatic cell count versus cytokines as a tool in bovine udder health control. In : Proceedings of the IV Congress of Egyptian Society for Cattle Diseases, Asiut, Egypt, 2001.
- ALLUWAIMI A.M., LEUTENEGGER C.M., FARVER T.B., ROSSITTO P.V., SMITH W.L., CULLOR J.S. The cytokine markers in *Staphylococcus aureus* mastitis of bovine mammary gland. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 2003, **50**, 105-111.
- ALLUWAIMI A.M. The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. *Res. Vet. Sci.*, 2004, **77**, 211-222.
- ALMEIDA R.A., MATTHEWS K.R., CIFRIAN E., GUIDRY A.J., OLIVER S.P. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.*, 1996, **79**, 1021-1026.
- ALMEIDA R.A., FANG W., OLIVER S.P. Adherence and internalization of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells are mediated by host cell proteoglycans. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, **177**, 313-317.
- ALMEIDA R.A., BATCHA T., OLIVER S.P. Persistence of *Streptococcus uberis* in bovine mammary epithelial cells. In : Hoegeveen H. (Ed.), Mastitis in dairy production : current knowledge and future solutions. Wageningen Academic Publishers : Wageningen, 2005, 137-142.
- ANDERSON J.C. Mechanisms of staphylococcal virulence in relation to bovine mastitis. *Br. Vet. J.*, 1976, **132**, 229-245.
- ANDERSON G.P., COYLE A.J. TH2 and 'TH2-like' cells in allergy and asthma: pharmacological perspectives. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1994, **15**, 324-332.
- ANDERSON K.L., SMITH A.R., SHANKS R.D., WHITMORE H.L., DAVIS L.E., GUSTAFSSON B.K. Endotoxin-induced bovine mastitis : immunoglobulins, phagocytosis, and effect of flunixin meglumine. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 2405-2410.
- ANTONSSON B., MARTINOU J.C. The Bcl-2 protein family. *Exp. Cell. Res.*, 2000, **256**, 50-57.
- ARNAOUT M.A., MELAMED J., TACK B.F., COLTEN H.R. Characterization of the human complement (c3b) receptor with a fluid phase C3b dimer. *J. Immunol.*, 1981, **127**, 1348-1354.
- ASAI K., KAI K., RIKIISHI H., SUGAWARA S., MARUYAMA Y., YAMAGUCHI T., OHTA M., KUMAGAI K. Variation in CD4+ T and CD8+ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1998, **65**, 51-61.
- BADR K.F., DEBOER D.K., SCHWARTZBERG M., SERHAN C.N. Lipoxin A4 antagonizes cellular and in vivo actions of leukotriene D4 in rat glomerular mesangial cells: evidence for competition at a common receptor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1989, **86**, 3438-3442.
- BAGGIOLINI M., WALZ A., KUNKEL S.L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.*, 1989, **84**, 1045-1049.
- BAINTON D.F., ULLYOT J.L., FARQUHAR M.G. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. *J. Exp. Med.*, 1971, **134**, 907-934.
- BALDRIDGE C., GERARD R. The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Pathol.*, 1933, **103**, 235-236.
- BANDEIRA-MELO C., DIAZ B.L., CORDEIRO R.S., JOSE P.J., SERHAN C.N., MARTINS M.A., BOZZA P.T. Inhibition of allergen-induced eosinophil migration by lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2002, **507**, 211-216.
- BIFFL W.L., MOORE E.E., MOORE F.A., BARNETT C.C.Jr. Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent. *J. Leukoc. Biol.*, 1995, **58**, 582-584.
- BLUM J.W., DOSOGNE H., HOEBEN D., VANGROENWEGHE F., HAMMON H.M., BRUCKMAIER R.M., BURVENICH C. Tumor necrosis factor-alpha and nitrite/

- nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 2000, **19**, 223-235.
- BLUME-JENSEN P., JANKNECHT R., HUNTER T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr. Biol.*, 1998, **8**, 779-782.
- BONNANS C., CHANEZ P., CHAVIS C. Lipoxins in asthma: potential therapeutic mediators on bronchial inflammation? *Allergy*, 2004, **59**, 1027-1041.
- BOULANGER D., BUREAU F., MELOTTE D., MAINIL J., LEKEUX P. Increased nuclear factor kappaB activity in milk cells of mastitis-affected cows. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 1259-1267.
- BOUTET P., BUREAU F., DEGAND G., LEKEUX P. Imbalance between lipoxin A4 and leukotriene B4 in chronic mastitis-affected cows. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 3430-3439.
- BOUTET P., BOULANGER D., GILLET L., VANDERPLASSCHEN A., CLOSSET R., BUREAU F., LEKEUX P. Delayed neutrophil apoptosis in bovine subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.*, 2004, **87**, 4104-4114.
- BRADY H.R., PERSSON U., BALLERMANN B.J., BRENNER B.M., SERHAN C.N. Leukotrienes stimulate neutrophil adhesion to mesangial cells: modulation with lipoxins. *Am. J. Physiol.*, 1990, **259**, F809-F815.
- BRINKC., DAHLENS.E., DRAZENJ., 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.
- BUREAU F., BONIZZI G., KIRSCHVINK N., DELHALLE S., DESMECHT D., MERVILLE M.P., BOURS V., LEKEUX P. Correlation between nuclear factor-kappaB activity in bronchial brushing samples and lung dysfunction in an animal model of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000a, **161**, 1314-1321.
- BUREAU F., DELHALLE S., BONIZZI G., FIEVEZ L., DOGNE S., KIRSCHVINK N., VANDERPLASSCHEN A., MERVILLE M.P., BOURS V., LEKEUX P. Mechanisms of persistent NF-kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J. Immunol.*, 2000b, **165**, 5822-5830.
- BUREAU F., DESMET C., MELOTTE D., JASPAR F., VOLANTI C., VANDERPLASSCHEN A., PASTORET P.P., PIETTE J., LEKEUX P. A proinflammatory role for the cyclopentenone prostaglandins at low micromolar concentrations: oxidative stress-induced extracellular signal-regulated kinase activation without NF-kappa B inhibition. *J. Immunol.*, 2002, **168**, 5318-5325.
- BURVENICH C., VAN MERRIS V., MEHRZAD J., DIEZ-FRAILE A., DUCHATEAU L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res.*, 2003, **34**, 521-564.
- BURVENICH C., MONFARDINI E., MEHRZAD J., CAPUCO A.V., PAAPE M.J. Role of neutrophil polymorphonuclear leukocytes during bovine coliform mastitis : physiology or pathology ? *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.*, 2004, **66**, 97-150.
- CAPUCO A.V., PAAPE M.J., NICKERSON S.C. *In vitro* study of polymorphonuclear leukocyte damage to mammary tissues of lactating cows. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 663-668.
- CARLSON G.P., KANEKO J.J. Intravascular granulocyte kinetics in developing calves. *Am. J. Vet. Res.*, 1975, **36**, 421-425.
- CASSATELLA M.A. Neutrophil-derived proteins : selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.*, 1999, **73**, 369-509.
- CHANDAN R.C., SHAHANI K.M., HOLLY R.G. Lysozyme content of human milk. *Nature*, 1964, **204**, 76-77.
- CHAVIS C., VACHIER I., CHANEZ P., BOUSQUET J., GODARD P. 5(S),15(S)-dihydroxyeicosatetraenoic acid and lipoxin generation in human polymorphonuclear cells: dual specificity of 5-lipoxygenase towards endogenous and exogenous precursors. *J. Exp. Med.*, 1996, **183**, 1633-1643.
- CHIANGN., FIERROI.M., GRONERT K., SERHAN C.N. Activation of lipoxin A(4) receptors by aspirin-triggered lipoxins and select peptides evokes ligand-specific responses in inflammation. *J. Exp. Med.*, 2000, **191**, 1197-1208.
- CHIN A.C., LEE W.D., MURRIN K.A., MORCK D.W., MERRILL J.K., DICK P., BURET A.G. Tilmicosin induces apoptosis in bovine peripheral neutrophils in the presence or in the absence of *Pasteurella haemolytica* and promotes neutrophil phagocytosis by macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000, **44**, 2465-2470.
- CHRISTIE P.E., SPUR B.W., LEE T.H. The effects of lipoxin A4 on airway responses in asthmatic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992, **145**, 1281-1284.
- CLÀRIA J., SERHAN C.N. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 9475-9479
- CLÀRIA J., LEE M.H., SERHAN C.N. Aspirin-triggered lipoxins (15-epi-LX) are generated by the human lung adenocarcinoma cell line (A549)-neutrophil interactions and are potent inhibitors of cell proliferation. *Mol. Med.*, 1996, **2**, 583-596.
- CLÀRIA J., TITOS E., JIMENEZ W., ROS J., GINES P., ARROYO V., RIVERA F., RODES J. Altered biosynthesis of leukotrienes and lipoxins and host defense disorders in patients with cirrhosis and ascites. *Gastroenterology*, 1998, **115**, 147-156.
- CLISH C.B., O'BRIEN J.A., GRONERT K., STAHL G.L., PETASIS N.A., SERHAN C.N. Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment in vivo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 8247-8252.

- CLISH C.B., GRONERT K., SERHAN C.N. Local and systemic delivery of an aspirin-triggered lipoxin stable analog inhibits neutrophil trafficking. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2000, **905**, 274-278.
- COLGAN S.P., SERHAN C.N., PARKOS C.A., DELP-ARCHER C., MADARA J.L. Lipoxin A4 modulates transmigration of human neutrophils across intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.*, 1993, **92**, 75-82.
- COLOTTA F., REF., POLENTARUTTI N., SOZZANI S., MANTOVANI A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, 1992, **80**, 2012-2020.
- CONCHA C., HOLMBERG O., ASTROM G. Cells found in non-infected and staphylococcus-infected bovine mammary quarters and their ability to phagocytose fluorescent microspheres. *Zentralbl. Veterinarmed. B*, 1986, **33**, 371-378.
- CRAVEN N. Generation of neutrophil chemoattractants by phagocytosing bovine mammary macrophages. *Res. Vet. Sci.*, 1983, **35**, 310-317.
- CRAVEN N., ANDERSON J.C. Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by bovine mammary gland macrophages and intracellular protection from antibiotic action in vitro and in vivo. *J. Dairy Res.*, 1984, **51**, 513-523.
- CYBULSKY M.I., MCCOMB D.J., MOVAT H.Z. Neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. Mediator roles of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha 1. *J. Immunol.*, 1988, **140**, 3144-3149.
- DAHLENS.-E., FRANZEN L., RAUD J., SERHAN C.N., WESTLUND P., WIKSTROM E., BJORCK T., MATSUDA H., WEBBER S.E., VEALE C.A., et al. Actions of lipoxin A4 and related compounds in smooth muscle preparations and on the microcirculation in vivo. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1988, **229**, 107-130.
- DALEY M.J., COYLE P.A., WILLIAMS T.J., FURDA G., DOUGHERTY R., HAYES P.W. *Staphylococcus aureus* mastitis: pathogenesis and treatment with bovine interleukin-1 beta and interleukin-2. *J. Dairy Sci.*, 1991, **74**, 4413-4424.
- DALEY M.J., WILLIAMS T.J., COYLE P.A., FURDA G., DOUGHERTY R., HAYES P.W. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* infections with recombinant cytokines. *Cytokine*, 1993, **5**, 276-284.
- DEL PESO L., GONZALEZ-GARCIA M., PAGE C., HERRERA R., NUNEZ G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, 1997, **278**, 687-689.
- DOGAN B., KLAESSIG S., SIMPSON K., OLIVER S., ALMEIDA R., SCHUKKEN Y.H. Pathogenesis of chronic intramammary *Escherichia coli* infections. In : Hoegeveen H. (Ed.), Mastitis in dairy production : current knowledge and future solutions. Wageningen Academic Publishers : Wageningen, 2005, 131-136.
- DOSOGNE H., BURVENICH C., PAAPE M.J. Effect of extracellular ionic calcium and magnesium on opsonic and non-opsonic phagocytes of *Escherichia coli* bovine blood polymorphonuclear leucocytes. *Comp. Haematol. Int.*, 1998, **8**, 82-86.
- DOWNWARD J. How Bad phosphorylation is good for survival. *Nat. Cell. Biol.*, 1999, **1**, E33-E35.
- DZIEWANOWSKA K., PATTI J.M., DEOBALD C.F., BAYLES K.W., TRUMBLE W.R., BOHACH G.A. Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infect. Immun.*, 1999, **67**, 4673-4678.
- EBERHART R.J., NATZKE R.P., NEWBOULD F.H.S. Coliform mastitis : a review. *J. Dairy Sci.*, 1979, **62**, 1-22.
- EDENIUS C., HAEGGSTROM J., LINDGREN J.A. Transcellular conversion of endogenous arachidonic acid to lipoxins in mixed human platelet-granulocyte suspensions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, **157**, 801-807.
- EDENIUS C., KUMLIN M., BJORK T., ANGGARD A., LINDGREN J.A. Lipoxin formation in human nasal polyps and bronchial tissue. *FEBS Lett.*, 1990, **272**, 25-28.
- EPLING-BURNETTE P.K., ZHONG B., BAI F., JIANG K., BAILEY R.D., GARCIA R., JOVE R., DJEU J.Y., LOUGHRAN T.P. JR, WEI S. Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol.*, 2001, **166**, 7486-7495.
- FENG Z., GODFREY H.P., MANDY S., STRUDWICK S., LIN K.T., HEILMAN E., WONG P.Y. Leukotriene B4 modulates in vivo expression of delayed-type hypersensitivity by a receptor-mediated mechanism : regulation by lipoxin A4. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, **278**, 950-956.
- FIERRO I.M., SERHAN C.N. Mechanisms in anti-inflammation and resolution : the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2001, **34**, 555-566.
- FIERRO I.M., KUTOK J.L., SERHAN C.N. Novel lipid mediator regulators of endothelial cell proliferation and migration: aspirin-triggered-15R-lipoxin A(4) and lipoxin A(4). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2002, **300**, 385-392.
- FILEP J.G., ZOUKI C., PETASIS N.A., HACHICHA M., SERHAN C.N. Anti-inflammatory actions of lipoxin A(4) stable analogs are demonstrable in human whole blood : modulation of leukocyte adhesion molecules and inhibition of neutrophil-endothelial interactions. *Blood*, 1999, **94**, 4132-4142.
- FILEP J.G., ZOUKI C., PETASIS N.A., HACHICHA M., SERHAN C.N. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 modulate adhesion molecule expression on human leukocytes in whole blood and inhibit neutrophil-endothelial cell adhesion. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2002, **507**, 223-228.
- FIORE S., BREZINSKI M.E., SHEPPARD K.A., SERHAN C.N. The lipoxin biosynthetic circuit

- and their actions with human neutrophils. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1991, **314**, 109-132.
- FIGORE S., RYEOM S.W., WELLER P.F., SERHAN C.N. Lipoxin recognition sites: specific binding of labeled lipoxin A4 with human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 16168-16176.
- FIGORE S., MADDOX J.F., PEREZ H.D., SERHAN C.N. Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. *J. Exp. Med.*, 1994, **180**, 253-260.
- FIGORE S., SERHAN C.N. Lipoxin A4 receptor activation is distinct from that of the formyl peptide receptor in myeloid cells: inhibition of CD11/18 expression by lipoxin A4-lipoxin A4 receptor interaction. *Biochemistry*, 1995, **34**, 16678-16686.
- GARRICK R., WONG P.Y. Enzymatic formation and regulatory function of lipoxins and leukotriene B4 in rat kidney mesangial cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1991, **314**, 361-369.
- GENNARO R., DEWALD B., HORISBERGER U., GUBLER H.U., BAGGIOLINI M. A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *J. Cell. Biol.*, 1983, **96**, 1651-1661.
- GEWIRTZ A.T., MCCORMICK B., NEISH A.S., PETASIS N.A., GRONERT K., SERHAN C.N., MADARA J.L. Pathogen-induced chemokine secretion from model intestinal epithelium is inhibited by lipoxin A4 analogs. *J. Clin. Invest.*, 1998, **101**, 1860-1869.
- GEWIRTZ A.T., FOKIN V.V., PETASIS N.A., SERHAN C.N., MADARA J.L. LXA4, aspirin-triggered 15-epi-LXA4, and their analogs selectively downregulate PMN azurophilic degranulation. *Am. J. Physiol.*, 1999, **276**, C988-C994.
- GEWIRTZ A.T., COLLIER-HYAMS L.S., YOUNG A.N., KUCHARZIK T., GUILFORD W.J., PARKINSON J.F., WILLIAMS I.R., NEISH A.S., MADARA J.L. Lipoxin a4 analogs attenuate induction of intestinal epithelial proinflammatory gene expression and reduce the severity of dextran sodium sulfate-induced colitis. *J. Immunol.*, 2002, **168**, 5260-5267.
- GIRARD D., PAQUET M.E., PAQUIN R., BEAULIEU A.D. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood*, 1996, **88**, 3176-3184.
- GIRARD D., PAQUIN R., BEAULIEU A.D. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *Biochem. J.*, 1997, **325**, 147-153.
- GODSON C., MITCHELL S., HARVEY K., PETASIS N.A., HOGG N., BRADY H.R. Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J. Immunol.*, 2000, **164**, 1663-1667.
- GRANDORDY B.M., LACROIX H., MAVOUNGOU E., KRILIS S., CREA A.E., SPUR B.W., LEE T.H. Lipoxin A4 inhibits phosphoinositide hydrolysis in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, **167**, 1022-1029.
- GRESHAM H.D., LOWRANCE J.H., CAVER T.E., WILSON B.S., CHEUNG A.L., LINDBERG F.P. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J. Immunol.*, 2000, **164**, 3713-3722.
- GROMMERS F.J., VAN DE GEER D., VAN DER VLIET H., HENRICKS P.A., NIJKAMP F.P. Polymorphonuclear leukocyte function: relationship between induced migration into the bovine mammary gland and in vitro cell activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1989, **23**, 75-83.
- GRONERT K., GEWIRTZ A., MADARA J.L., SERHAN C.N. Identification of a human enterocyte lipoxin A4 receptor that is regulated by interleukin (IL)-13 and interferon gamma and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced IL-8 release. *J. Exp. Med.*, 1998, **187**, 1285-1294.
- GRONERT K., MARTINSSON-NISKANEN T., RAVASI S., CHIANG N., SERHAN C.N. Selectivity of recombinant human leukotriene D(4), leukotriene B(4), and lipoxin A(4) receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA(4) and regulation of vascular and inflammatory responses. *Am. J. Pathol.*, 2001, **158**, 3-9.
- GUDDING R., MCDONALD J.S., CHEVILLE N.F. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* mastitis: bacteriologic, histologic, and ultrastructural pathologic findings. *Am. J. Vet. Res.*, 1984, **45**, 2525-2531.
- HACHICHA M., POULIOT M., PETASIS N.A., SERHAN C.N. Lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4 inhibit tumor necrosis factor 1alpha-initiated neutrophil responses and trafficking: regulators of a cytokine-chemokine axis. *J. Exp. Med.*, 1999, **189**, 1923-1930.
- HACHIYA O., TAKEDA Y., MIYATA H., WATANABE H., YAMASHITA T., SENDO F. Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF-alpha-induced human neutrophil apoptosis in vitro. *Microbiol. Immunol.*, 1995, **39**, 715-723.
- HARMON R.J., HEALD C.W. Migration of polymorphonuclear leukocytes into the bovine mammary gland during experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, 1982, **43**, 992-998.
- HARMON R.J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.*, 1994, **77**, 2103-2112.
- HASLETT C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1999, **160**, S5-S11.
- HE R., SANG H., YE R.D. Serum amyloid A induces IL-8 secretion through a G protein-coupled receptor, FPRL1/LXA4R. *Blood*, 2003, **101**, 1572-1581.
- HEBERT A., SAYASITH K., SENECHAL S., DUBREUIL P., LAGACE J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus*

- aureus in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, **193**, 57-62.
- HEDQVIST P., RAUD J., PALMERTZ U., HAEGGSTROM J., NICOLAOU K.C., DAHLEN S.E. Lipoxin A4 inhibits leukotriene B4-induced inflammation in the hamster cheek pouch. *Acta Physiol. Scand.*, 1989, **137**, 571-572.
- HENSEN S.M., PAVICIC M.J., LOHUIS J.A., DE HOOG J.A., POUTREL B. Location of *Staphylococcus aureus* within the experimentally infected bovine udder and the expression of capsular polysaccharide type 5 in situ. *J. Dairy Sci.*, 2000a, **83**, 1966-1975.
- HENSEN S.M., PAVICIC M.J., LOHUIS J.A., POUTREL B. Use of bovine primary mammary epithelial cells for the comparison of adherence and invasion ability of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Dairy Sci.*, 2000b, **83**, 418-429.
- HILL A.W., SHEARS A.L., HIBBITT K.G. The survival of serum resistant *Escherichia coli* in the bovine mammary gland following experimental infection. *Res. Vet. Sci.*, 1979, **26**, 32-37.
- HILL A.W. Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* mastitis in the dairy cow. *Res. Vet. Sci.*, 1981, **31**, 107-112.
- HILL A.W. *Escherichia coli* mastitis. In : Gyles C.L. (Eds.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International : Wallingford, 1994, 117-133.
- HISAEDA K., HAGIWARA K., EGUCHI J., YAMANAKA H., KIRISAWA R., IWAI H. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha levels in sera and whey of cattle with naturally occurring coliform mastitis. *J. Vet. Med. Sci.*, 2001, **63**, 1009-1011.
- HOEBEN D., BURVENICH C., TREVISI E., BERTONI G., HAMANN J., BRUCKMAIER R.M., BLUM J.W. Role of endotoxin and TNF-alpha in the pathogenesis of experimentally induced coliform mastitis in periparturient cows. *J. Dairy Res.*, 2000, **67**, 503-514.
- HOWARD C.J., TAYLOR G., BROWNLIE J. Surface receptors for immunoglobulin on bovine polymorphonuclear neutrophils and macrophages. *Res. Vet. Sci.*, 1980, **29**, 128-130.
- INOUE T., ASANO Y., MATSUOKA S., FURUTANI-SEIKI M., AIZAWA S., NISHIMURA H., SHIRAI T., TADA T. Distinction of mouse CD8+ suppressor effector T cell clones from cytotoxic T cell clones by cytokine production and CD45 isoforms. *J. Immunol.*, 1993, **150**, 2121-2128.
- ISHIY., HASHIMOTOK., NOMURA A., SAKAMOTO T., UCHIDA Y., OHTSUKA M., HASEGAWA S., SAGAI M. Elimination of neutrophils by apoptosis during the resolution of acute pulmonary inflammation in rats. *Lung*, 1998, **176**, 89-98.
- JACKSON J.A., SHUSTER D.E., SILVIA W.J., HARMON R.J. Physiological responses to intramammary or intravenous treatment with endotoxin in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 1990, **73**, 627-632.
- JAIN N.C. Cattle : normal haematology with comments on response to disease. In : Jain N.C. (Eds.), *Schalm's Veterinary Hematology*. Lea & Febiger : Amsterdam, 1986, 178-207.
- JOZSEF L., ZOUKI C., PETASIS N.A., SERHAN C.N., FILEP J.G. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF-kappa B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2002, **99**, 13266-13271.
- KAPLANSKI G., MARIN V., MONTERO-JULIAN F., MANTOVANI A., FARNARIER C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.*, 2003, **24**, 25-29.
- KATOH T., LAKKIS F.G., MAKITA N., BADR K.F. Co-regulated expression of glomerular 12/15-lipoxygenase and interleukin-4 mRNAs in rat nephrotoxic nephritis. *Kidney Int.*, 1994, **46**, 341-349.
- KEHRLI M.E. JR., GOFF J.P., STEVENS M.G., BOONE T.C. Effects of granulocyte colony-stimulating factor administration to periparturient cows on neutrophils and bacterial shedding. *J. Dairy Sci.*, 1991a, **74**, 2448-2458.
- KEHRLI M.E. JR., CULLOR J.S., NICKERSONS.C. Immunobiology of hematopoietic colony-stimulating factors: potential application to disease prevention in the bovine. *J. Dairy Sci.*, 1991b, **74**, 4399-4412.
- KEHRLI M.E. JR., HARP J.A. Immunity in the mammary gland. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 2001, **17**, 495-516.
- KETTRITZ R., GAIDOM L., HALLER H., LUFT F.C., JENNETTE C.J., FALK R.J. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils. *Kidney Int.*, 1998, **53**, 84-91.
- KLEBANOFF S.J. Myeloperoxidase-mediated antimicrobial systems and their role in leukocyte function. In : Schultz J. (Ed.), *Biochemistry of the phagocytic process : localization and the role of myeloperoxidase and the mechanism of the halogenation reaction*. North-Holland Publishing Company : London, 1970, 89-114.
- KLEBANOFF S.J., OLSZOWSKI S., VAN VOORHIS W.C., LEDBETTER J.A., WALTERSDORPH A.M., SCHLECHTE K.G. Effects of gamma-interferon on human neutrophils: protection from deterioration on storage. *Blood*, 1992, **80**, 225-234.
- KLEIN J.B., BURIDI A., COXON P.Y., RANE M.J., MANNING T., KETTRITZ R., MCLEISH K.R. Role of extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3 kinase in chemoattractant and LPS delay of constitutive neutrophil apoptosis. *Cell. Signal.*, 2001, **13**, 335-343.
- LAMMERS A., VAN VORSTENBOSCH C.J., ERKENS J.H., SMITH H.E. The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells. *Vet. Microbiol.*, 2001, **80**, 255-265.

- LEE A., WHYTE M.K., HASLETT C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J. Leukoc. Biol.*, 1993, **54**, 283-288.
- LEE C.S., WOODING F.B., KEMP P. Identification, properties, and differential counts of cell populations using electron microscopy of dry cows secretions, colostrum and milk from normal cows. *J. Dairy Res.*, 1980, **47**, 39-50.
- LEE J.W., PAAPE M.J., ELSASSER T.H., ZHAO X. Elevated milk soluble CD14 in bovine mammary glands challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J. Dairy Sci.*, 2003, **86**, 2382-2389.
- LEE T.H., HORTON C.E., KYAN-AUNG U., HASKARD D., CREA A.E., SPUR B.W. Lipoxin A4 and lipoxin B4 inhibit chemotactic responses of human neutrophils stimulated by leukotriene B4 and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. *Clin. Sci.*, 1989, **77**, 195-203.
- LEE T.H., CREA A.E., GANT V., SPUR B.W., MARRON B.E., NICOLAOU K.C., REARDON E., BREZINSKI M., SERHAN C.N. Identification of lipoxin A4 and its relationship to the sulfidopeptide leukotrienes C4, D4, and E4 in the bronchoalveolar lavage fluids obtained from patients with selected pulmonary diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1990, **141**, 1453-1458.
- LEE T.H., LYMPANY P., CREA A.E., SPUR B.W. Inhibition of leukotriene B4-induced neutrophil migration by lipoxin A4: structure-function relationships. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, **180**, 1416-1421.
- LEIGH J.A., FIELD T.R., WILLIAMS M.R. Two strains of *Streptococcus uberis*, of differing ability to cause clinical mastitis, differ in their ability to resist some host defence factors. *Res. Vet. Sci.*, 1990, **49**, 85-87.
- LEONARD M.O., HANNAN K., BURNE M.J., LAPPIN D.W., DORAN P., COLEMAN P., STENSON C., TAYLOR C.T., DANIELS F., GODSON C., PETASIS N.A., RABB H., BRADY H.R. 15-Epi-16-(para-fluorophenoxy)-lipoxin A(4)-methyl ester, a synthetic analogue of 15-epi-lipoxin A(4), is protective in experimental ischemic acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2002, **13**, 1657-1662.
- LEUENROTH S., LEE C., GRUTKOSKI P., KEEPING H., SIMMSH.H. Interleukin-8-induced suppression of polymorphonuclear leukocyte apoptosis is mediated by suppressing CD95 (Fas/Apo-1) Fas-1 interactions. *Surgery*, 1998, **124**, 409-417.
- LEVY B.D., ROMANO M., CHAPMAN H.A., REILLY J.J., DRAZEN J., SERHAN C.N. Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15(S)-hydroxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoic acid and lipoxins. *J. Clin. Invest.*, 1993, **92**, 1572-1579.
- LEVY B.D., CLISH C.B., SCHMIDT B., GRONERT K., SERHAN C.N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat. Immunol.*, 2001, **2**, 612-619.
- LEVY B.D., DE SANCTIS G.T., DEVCHAND P.R., KIM E., ACKERMAN K., SCHMIDT B.A., SZCZEKLIK W., DRAZEN J.M., SERHAN C.N. Multi-pronged inhibition of airway hyper-responsiveness and inflammation by lipoxin A(4). *Nat. Med.*, 2002, **8**, 1018-1023.
- LOHUIS J.A., VERHEIJDEN J.H., BURVENICH C., VAN MIERT A.S. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. 1. Changes in body temperature and reticulo-rumen motility, and the effect of repeated administration. *Vet. Q.*, 1988, **10**, 109-116.
- LOWRANCE J.H., O'SULLIVAN F.X., CAVER T.E., WAEGELL W., GRESHAM H.D. Spontaneous elaboration of transforming growth factor beta suppresses host defense against bacterial infection in autoimmune MRL/lpr mice. *J. Exp. Med.*, 1994, **180**, 1693-1703.
- MACKAY C.R., HEIN W.R. A large proportion of bovine T cells express the gamma delta T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *Int. Immunol.*, 1989, **1**, 540-545.
- MACKAY C.R., HEIN W.R. Marked variations in gamma delta T cell numbers and distribution throughout the life of sheep. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1991, **173**, 107-111.
- MADDOX J.F., SERHAN C.N. Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. *J. Exp. Med.*, 1996, **183**, 137-146.
- MADDOX J.F., HACHICHA M., TAKANO T., PETASIS N.A., FOKIN V.V., SERHAN C.N. Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 6972-6978.
- MADERNA P., COTTELL D.C., BERLASCONI G., PETASIS N.A., BRADY H.R., GODSON C. Lipoxins induce actin reorganization in monocytes and macrophages but not in neutrophils: differential involvement of rho GTPases. *Am. J. Pathol.*, 2002, **160**, 2275-2283.
- MAGNUSON N.S., SPIES A.G., NISSEN M.S., BUCK C.D., WEINBERG A.D., BARR P.J., MAGNUSON J.A., REEVES R. Bovine interleukin 2: regulatory mechanisms. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1987, **17**, 183-192.
- MATSUSHIMA K., OPPENHEIM J.J. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine*, 1989, **1**, 2-13.
- MAYADAS T.N., MENDRICK D.L., BRADY H.R., TANG T., PAPAYIANNI A., ASSMANN K.J., WAGNER D.D., HYNES R.O., COTRAN R.S. Acute passive anti-glomerular basement membrane nephritis in P-selectin-deficient mice. *Kidney Int.*, 1996, **49**, 1342-1349.
- MCPHILLIPS F., FANNING A., BRADY H.R., GODSON

- C. Lipoxin A4 antagonizes the mitogenic effects of leukotriene D4 in human renal mesangial cells. Differential activation of MAP kinases through distinct receptors. *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 27566-27575.
- MCMAHON B., MITCHELL S., BRADY H.R., GODSON C. Lipoxins: revelations on resolution. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2001, **22**, 391-395.
- MCMAHON B., MITCHELL D., SHATTOCK R., MARTIN F., BRADY H.R., GODSON C. Lipoxin, leukotriene, and PDGF receptors cross-talk to regulate mesangial cell proliferation. *FASEB J.*, 2002, **16**, 1817-1819.
- MCMAHON B., GODSON C. Lipoxins: endogenous regulators of inflammation. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2004, **286**, F189-F201.
- MEDZHITOV R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2001, **1**, 135-145.
- METCALF D. The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Science*, 1985, **229**, 16-22.
- MILLER R.H., GUIDRY A.J., PAAPE M.J., DULIN A.M., FULTON L.A. Relationship between immunoglobulin concentrations in milk and phagocytosis by bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 42-45.
- MILLER R.H., PAAPE M.J., FULTON L.A. Variation in milk somatic cells of heifers at first calving. *J. Dairy Sci.*, 1991, **74**, 3782-3790.
- MITCHELL S., THOMAS G., HARVEY K., COTTELL D., REVILLE K., BERLASCONI G., PETASIS N.A., ERWIG L., REES A.J., SAVILL J., BRADY H.R., GODSON C. Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of inflammation: stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in vivo. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2002, **13**, 2497-2507.
- MOORES K.E., MERRITT J.E. Lipoxin A4 elevates cytosolic calcium in human neutrophils. *Eicosanoids*, 1991, **4**, 89-94.
- MOULDING D.A., QUAYLE J.A., HART C.A., EDWARDS S.W. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood*, 1998, **92**, 2495-2502.
- MUNGER K.A., MONTERO A., FUKUNAGA M., UDA S., YURA T., IMAI E., KANEDA Y., VALDIVIELSO J.M., BADR K.F. Transfection of rat kidney with human 15-lipoxygenase suppresses inflammation and preserves function in experimental glomerulonephritis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 13375-13380.
- MUNZENMAIER A., LANGE C., GLOCKER E., COVACCI A., MORAN A., BERESWILL S., BAEUERLE P.A., KIST M., PAHL H.L. A secreted/shed product of *Helicobacter pylori* activates transcription factor nuclear factor-kappa B. *J. Immunol.*, 1997, **159**, 6140-6147.
- NASSAR G.M., MORROW J.D., ROBERTS L.J. II, LAKKIS F.G., BADR K.F. Induction of 15-lipoxygenase by interleukin-13 in human blood monocytes. *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 27631-27634.
- NAUMANN M., WESSLER S., BARTSCH C., WIELAND B., MEYER T.F. *Neisseria gonorrhoeae* epithelial cell interaction leads to the activation of the transcription factors nuclear factor kappaB and activator protein 1 and the induction of inflammatory cytokines. *J. Exp. Med.*, 1997, **186**, 247-258.
- NEWBOULD F.H. The effect of added serum and glucose, and some inherent factors, on phagocytosis in vitro by milk leukocytes from several cows. *Can. J. Comp. Med.*, 1973, **37**, 189-194.
- NICKERSON S.C., BAKER P.A., TRINIDAD P. Local immunostimulation of the bovine mammary gland with interleukin-2. *J. Dairy Sci.*, 1989, **72**, 1764-1773.
- NICKERSON S.C., OWENS W.E., BODDIE R.L., BODDIE N.T. The effect of chronic immunostimulation of the nonlactating bovine mammary gland with interleukin-2, pokeweed mitogen, and lipopolysaccharide. *J. Dairy Sci.*, 1992, **75**, 3339-3351.
- NICKERSON S.C., OWENS W.E., REJMAN J.J., OLIVER S.P. Effects of interleukin-1 and interleukin-2 on mammary gland leukocyte populations and histology during the early nonlactating period. *Zentralbl. Veterinarmed. B*, 1993, **40**, 621-633.
- NONNECKE B.J., HARP J.A. Effect of chronic staphylococcal mastitis on mitogenic responses of bovine lymphocytes. *J. Dairy Sci.*, 1985, **68**, 3323-3328.
- ÖSTENSSON K., HAGELTORN M., ASTROM G. Differential cell counting in fraction-collected milk from dairy cows. *Acta Vet. Scand.*, 1988, **29**, 493-500.
- OUTTERIDGE P.M., LEE C.S. Cellular immunity in the mammary gland with particular reference to T, B lymphocytes and macrophages. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1981, **137**, 513-534.
- PAAPE M.J., GUIDRY A.J. Effect of milking on leucocytes in the subcutaneous abdominal vein of the cow. *J. Dairy Sci.*, 1969, **52**, 998-1002.
- PAAPE M.J., GUIDRY A.J., KIRK S.T., BOLT D.J. Measurement of phagocytosis of <sup>32</sup>P-labeled *Staphylococcus aureus* by bovine leukocytes: lysostaphin digestion and inhibitory effect of cream. *Am. J. Vet. Res.*, 1975, **36**, 1737-1743.
- PAAPE M.J., GUIDRY A.J. Effect of fat and casein on intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by milk leukocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1977, **155**, 588-593.
- PAAPE M.J., WERGIN W.P., GUIDRY A.J., SCHULTZE W.D. Phagocytic defense of the ruminant mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1981, **137**, 555-578.
- PAAPE M.J., LILIUS E.M., WIITANEN P.A., KONTIO M.P., MILLER R.H. Intramammary defense against infections induced by *Escherichia coli* in cows. *Am. J. Vet. Res.*, 1996, **57**, 477-482.
- PAAPE M.J., BANNERMAN D.D., ZHAO X., LEE J.W. The bovine neutrophil: structure and function in blood and milk. *Vet. Res.*, 2003, **34**, 597-627.
- PAHL H.L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcrip-

- tion factors. *Oncogene*, 1999, **18**, 6853-6866.
- PAPAYIANNI A., SERHAN C.N., BRADY H.R. Lipoxin A4 and B4 inhibit leukotriene-stimulated interactions of human neutrophils and endothelial cells. *J. Immunol.*, 1996, **156**, 2264-2272.
- PARK Y.H., FOX L.K., HAMILTON M.J., DAVIS W.C. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J. Dairy Sci.*, 1992, **75**, 998-1006.
- PARK Y.H., FOX L.K., HAMILTON M.J., DAVIS W.C. Suppression of proliferative response of BoCD4<sup>+</sup> T lymphocytes by activated BoCD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the mammary gland of cows with *Staphylococcus aureus* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1993, **36**, 137-151.
- PERICLE F., LIU J.H., DIAZ J.I., BLANCHARD D.K., WEI S., FORNI G., DJEU J.Y. Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.*, 1994, **24**, 440-444.
- PERSSON K., SANDGREN C.H., RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Studies of endotoxin-induced neutrophil migration in bovine teat tissues, using indium-111-labeled neutrophils and biopsies. *Am. J. Vet. Res.*, 1992, **53**, 2235-2240.
- PERSSON K., LARSSON I., HALLEN SANDGREN C. Effects of certain inflammatory mediators on bovine neutrophil migration in vivo and in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1993, **37**, 99-112.
- PIGHETTI G.M., SORDILLO L.M. Enhanced antigen-specific responses in bovine mammary glands following administration of interleukin-2. *J. Dairy Sci.*, 1995, **78**, 528-537.
- POLLOCK J.M., WELSH M.D. The WC1(+) gammadelta T-cell population in cattle: a possible role in resistance to intracellular infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2002, **89**, 105-114.
- POULIOT M., MCDONALD P.P., BORGEAT P., MCCOLL S.R. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates the expression of the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in human neutrophils. *J. Exp. Med.*, 1994, **179**, 1225-1232.
- POULIOT M., CLISH C.B., PETASIS N.A., VAN DYKE T.E., SERHAN C.N. Lipoxin A(4) analogues inhibit leukocyte recruitment to *Porphyromonas gingivalis*: a role for cyclooxygenase-2 and lipoxins in periodontal disease. *Biochemistry*, 2000, **39**, 4761-4768.
- QUIROGA G.H., SORDILLO L.M., ADKINSON R.W., NICKERSON S.C. Cytologic responses of *Staphylococcus aureus*-infected mammary glands of heifers to interferon gamma and interleukin-2 treatment. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 1894-1900.
- RAMSTEDT U., SERHAN C.N., NICOLAOU K.C., WEBBER S.E., WIGZELL H., SAMUELSSON B. Lipoxin A-induced inhibition of human natural killer cell cytotoxicity: studies on stereospecificity of inhibition and mode of action. *J. Immunol.*, 1987, **138**, 266-270.
- RAUBERTAS R.F., SHOOK G.E. Relationship between lactation measures of somatic cell concentration and milk yield. *J. Dairy Sci.*, 1982, **65**, 419-425.
- REDDY P.G., REDDY D.N., PRUIETT S.E., DALEY M.J., SHIRLEY J.E., CHENGAPPA M.M., BLECHA F. Interleukin 2 treatment of *Staphylococcus aureus* mastitis. *Cytokine*, 1992, **4**, 227-231.
- REED J.C. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin. Hematol.*, 1997, **34**, 9-19.
- REED J.C. Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.*, 2000, **157**, 1415-1430.
- REITER B. Review of nonspecific antimicrobial factors in colostrum. *Ann. Rech. Vet.*, 1978, **9**, 205-224.
- RICHIE E.R., BASS R., MEISTRICH M.L., DENNISON D.K. Distribution of T lymphocyte subsets in human colostrum. *J. Immunol.*, 1982, **129**, 1116-1119.
- RING W.L., RIDDICK C.A., BAKER J.R., MUNAFO D.A., BIGBY T.D. Lymphocytes stimulate expression of 5-lipoxygenase and its activating protein in monocytes in vitro via granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3. *J. Clin. Invest.*, 1996, **97**, 1293-1301.
- RIOLLET C., RAINARD P., POUTREL B. Cells and cytokines in inflammatory secretions of bovine mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2000a, **480**, 247-258.
- RIOLLET C., RAINARD P., POUTREL B. Differential induction of complement fragment C5a and inflammatory cytokines during intramammary infections with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2000b, **7**, 161-167.
- RIOLLET C., RAINARD P., POUTREL B. Kinetics of cells and cytokines during immune-mediated inflammation in the mammary gland of cows systemically immunized with *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Inflamm. Res.*, 2000c, **49**, 486-496.
- RIOLLET C., RAINARD P., POUTREL B. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy Sci.*, 2001, **84**, 1077-1084.
- ROMANO M., MADDOX J.F., SERHAN C.N. Activation of human monocytes and the acute monocytic leukemia cell line (THP-1) by lipoxins involves unique signaling pathways for lipoxin A4 versus lipoxin B4: evidence for differential Ca<sup>2+</sup> mobilization. *J. Immunol.*, 1996, **57**, 2149-2154.
- ROMANO M., LUCIOTTI G., GANGEMI S., MARINUCCI F., PRONTERA C., D'URBANO E., DAVI G. Urinary excretion of lipoxin A(4) and related compounds: development of new extraction techniques for lipoxins. *Lab. Invest.*, 2002, **82**, 1253-1254.
- SALGAME P., ABRAMS J.S., CLAYBERGER C., GOLDSTEIN H., CONVIT J., MODLIN R.L., BLOOM B.R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*, 1991, **254**, 279-282.

- SAMPLE A.K., CZUPRYNSKI C.J. Priming and stimulation of bovine neutrophils by recombinant human interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor alpha. *J. Leukoc. Biol.*, 1991, **49**, 107-115.
- SAMUELSSON B., FUNK C.D., HOSHIKO S., MATSUMOTO T., RADMARK O. Molecular biology of leukotriene and lipoxin formation. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.*, 1989, **19**, 1-10.
- SANAK M., LEVY B.D., CLISH C.B., CHIANG N., GRONERT K., MASTALERZ L., SERHAN C.N., SZCZEKLIK A. Aspirin-tolerant asthmatics generate more lipoxins than aspirin-intolerant asthmatics. *Eur. Respir. J.*, 2000, **16**, 44-49.
- SAVILL J., FADOK V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 2000, **407**, 784-788.
- SCALIA R., GEFEN J., PETASIS N.A., SERHAN C.N., LEFER A.M. Lipoxin A4 stable analogs inhibit leukocyte rolling and adherence in the rat mesenteric microvasculature: role of P-selectin. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 1997, **94**, 9967-9972.
- SCAPINI P., LAPINET-VERA J.A., GASPERINI S., CALZETTI F., BAZZONI F., CASSATELLA M.A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev.*, 2000, **177**, 195-203.
- SCHALDACH C.M., RIBY J., BJELDANES L.F. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry*, 1999, **38**, 7594-7600.
- SCHOTTELIUS A.J., GIESEN C., ASADULLAH K., FIERRO I.M., COLGAN S.P., BAUMAN J., GUILFORD W., PEREZ H.D., PARKINSON J.F. An aspirin-triggered lipoxin A4 stable analog displays a unique topical anti-inflammatory profile. *J. Immunol.*, 2002, **169**, 7063-7070.
- SEARS P.M., SMITH B.S., ENGLISH P.B., HERER P.S., GONZALEZ R.N. Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, 1990, **73**, 2785-2789.
- SELSTED M.E., TANGY.Q., MORRIS W.L., MCGUIRE P.A., NOVOTNY M.J., SMITH W., HENSCHEN A.H., CULLOR J.S. Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 1993, **268**, 6641-6648.
- SERHAN C.N., HAMBERG M., SAMUELSSON B. Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1984, **81**, 5335-5339.
- SERHAN C.N., SHEPPARD K.A. Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions: evidence for the transformation of leukotriene A4 by platelet 12-lipoxygenase in vitro. *J. Clin. Invest.*, 1990, **85**, 772-780.
- SERHAN C.N., MADDOX J.F., PETASIS N.A., AKRITOPOULOU-ZANZE I., PAPAYIANNI A., BRADY H.R., COLGAN S.P., MADARA J.L. Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry*, 1995, **34**, 14609-14615.
- SERHAN C.N. Lipoxins and novel aspirin-triggered 15-epi-lipoxins (ATL): a jungle of cell-cell interactions or a therapeutic opportunity? *Prostaglandins*, 1997, **53**, 107-137.
- SERHAN C.N., TAKANO T., MADDOX J.F. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 and stable analogs on lipoxin A4 are potent inhibitors of acute inflammation: receptors and pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1999, **447**, 133-149.
- SERHAN C.N., FIERRO I.M., CHIANG N., POULIOT M. Cutting edge: nociceptin stimulates neutrophil chemotaxis and recruitment: inhibition by aspirin-triggered-15-epi-lipoxin A4. *J. Immunol.*, 2001, **166**, 3650-3654.
- SERHAN C.N. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: an update and role in anti-inflammation and pro-resolution. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 2002, **68-69**, 433-455.
- SHAFFER-WEAVER K.A., PIGHETTI G.M., SORDILLO L.M. Diminished mammary gland lymphocyte functions parallel shifts in trafficking patterns during the postpartum period. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1996, **212**, 271-280.
- SHAFFER-WEAVER K.A., SORDILLO L.M. Bovine CD8+ suppressor lymphocytes alter immune responsiveness during the postpartum period. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1997, **56**, 53-64.
- SHARMA S.A., TUMMURU M.K., BLASER M.J., KERR L.D. Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells. *J. Immunol.*, 1998, **160**, 2401-2407.
- SHUSTER D.E., KEHRLI M.E. JR, STEVENS M.G. Cytokine production during endotoxin-induced mastitis in lactating dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 80-85.
- SHUSTER D.E., KEHRLI M.E. JR, BAUMRUCKER C.R. Relationship of inflammatory cytokines, growth hormone, and insulin-like growth factor-I to reduced performance during infectious disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1995, **210**, 140-149.
- SHUSTER D.E., KEHRLI M.E. JR, RAINARD P., PAAPE M. Complement fragment C5a and inflammatory cytokines in neutrophil recruitment during intramammary infection with *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1997, **65**, 3286-3292.
- SIGAL E., CONRAD D.J. Human 15-lipoxygenase: a potential effector molecule for interleukin-4. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.*, 1994, **22**, 309-316.
- SIMCHOWITZ L., FIORE S., SERHAN C.N. Carrier-mediated transport of lipoxin A4 in human neutrophils. *Am. J. Physiol.*, 1994, **267**, C1525-C1534.
- SIMON H.U. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol. Rev.*, 2003, **193**, 101-110.
- SIPE J.D. Cellular and humoral components of the early inflammatory reaction. In: Gordon A.H., Koj A.

- (Eds.), The acute-phase response to injury and infection. Elsevier Science Publishers : Amsterdam, 1985, 3-21.
- SLADEK Z., RYSANEK D. Neutrophil apoptosis during the resolution of bovine mammary gland injury. *Res. Vet. Sci.*, 2001, **70**, 41-46.
- SMITH K.L., OLIVER S.P. Lactoferrin : a component of non-specific defense of the involuting bovine mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1981, **137**, 535-554.
- SODIN-SEMRL S., TADDEO B., TSENG D., VARGA J., FIORE S. Lipoxin A4 inhibits IL-1 beta-induced IL-6, IL-8, and matrix metalloproteinase-3 production in human synovial fibroblasts and enhances synthesis of tissue inhibitors of metalloproteinases. *J. Immunol.*, 2000, **164**, 2660-2666.
- SORDILLO L.M., NICKERSON S.C., AKERS R.M., OLIVER S.P. Secretion composition during bovine mammary involution and the relationship with mastitis. *Int. J. Biochem.*, 1987, **19**, 1165-1172.
- SORDILLO L.M., NICKERSON S.C. Morphologic changes in the bovine mammary gland during involution and lactogenesis. *Am. J. Vet. Res.*, 1988, **49**, 1112-1120.
- SORDILLO L.M., DOYMAZ M.Z., OLIVER S.P. Morphological study of chronic *Staphylococcus aureus* mastitis in the lactating bovine mammary gland. *Res. Vet. Sci.*, 1989, **47**, 247-252.
- SORDILLO L.M., BABIUK L.A. Modulation of bovine mammary neutrophil function during the periparturient period following in vitro exposure to recombinant bovine interferon gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1991, **27**, 393-402.
- SORDILLO L.M., CAMPOS M., BABIUK L.A. Antibacterial activity of bovine mammary gland lymphocytes following treatment with interleukin-2. *J. Dairy Sci.*, 1991, **74**, 3370-3375.
- SORDILLO L.M., AFSETH G., DAVIES G., BABIUK L.A. Effects of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on bovine peripheral blood and mammary gland neutrophil function in vitro. *Can. J. Vet. Res.*, 1992, **56**, 16-21.
- SORDILLO L.M., PIGHETTI G.M., DAVIS M.R. Enhanced production of bovine tumor necrosis factor-alpha during the periparturient period. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1995, **49**, 263-270.
- SORDILLO L.M., SHAFER-WEAVER K., DEROSA D. Immunobiology of the mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 1997, **80**, 1851-1865.
- SORDILLO L.M., STREICHER K.L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*, 2002, **7**, 135-146.
- SOUZA M.H., DE LIMA O.M. JR, ZAMUNER S.R., FIORUCCI S., WALLACE J.L. Gastritis increases resistance to aspirin-induced mucosal injury via COX-2-mediated lipoxin synthesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2003, **285**, G54-G61.
- SOYOMBO O., SPUR B.W., LEE T.H. Effects of lipoxin A4 on chemotaxis and degranulation of human eosinophils stimulated by platelet-activating factor and N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine. *Allergy*, 1994, **49**, 230-234.
- STEINBECK M.J., ROTH J.A. Neutrophil activation by recombinant cytokines. *Rev. Infect. Dis.*, 1989, **11**, 549-568.
- STENKE L., NASMAN-GLASER B., EDENIUS C., SAMUELSSON J., PALMBLAD J., LINDGREN J.A. Lipoxigenase products in myeloproliferative disorders : increased leukotriene C4 and decreased lipoxin formation in chronic myeloid leukemia. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.*, 1991, **21B**, 883-886.
- STENKE L., REIZENSTEIN P., LINDGREN J.A. Leukotrienes and lipoxins--new potential performers in the regulation of human myelopoiesis. *Leuk. Res.*, 1994, **18**, 727-732.
- SUTRA L., POUTREL B. Virulence factors involved in the pathogenesis of bovine intramammary infections due to *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 1994, **40**, 79-89.
- SWEENEY J.F., NGUYEN P.K., OMANN G.M., HINSHAW D.B. Lipopolysaccharide protects polymorphonuclear leukocytes from apoptosis via tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *J. Surg. Res.*, 1998, **74**, 64-70.
- TAKANO T., FIORE S., MADDOX J.F., BRADY H.R., PETASIS N.A., SERHAN C.N. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. *J. Exp. Med.*, 1997, **185**, 1693-1704.
- TAYLOR B.C., DELLINGER J.D., CULLOR J.S., STOTT J.L. Bovine milk lymphocytes display the phenotype of memory T cells and are predominantly CD8+. *Cell. Immunol.*, 1994, **156**, 245-253.
- TAYLOR B.C., KEEFE R.G., DELLINGER J.D., NAKAMURA Y., CULLOR J.S., STOTT J.L. T cell populations and cytokine expression in milk derived from normal and bacteria-infected bovine mammary glands. *Cell. Immunol.*, 1997, **182**, 68-76.
- THOMAS L.H., HAIDER W., HILL A.W., COOK R.S. Pathologic findings of experimentally induced *Streptococcus uberis* infection in the mammary gland of cows. *Am. J. Vet. Res.*, 1994, **55**, 1723-1728.
- THOMAS E., LEROUX J.L., BLOTMAN F., CHAVIS C. Conversion of endogenous arachidonic acid to 5,15-diHETE and lipoxins by polymorphonuclear cells from patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm. Res.*, 1995, **44**, 121-124.
- TORRE P.M., KONUR P.K., OLIVER S.P. Proliferative response of mammary gland mononuclear cells to recombinant bovine interleukin-2. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1992, **32**, 351-358.
- TREECE J.M., MORSE G.E., LEVY C. Lipid analyses of bovine teat canal keratin. *J. Dairy Sci.*, 1966, **49**, 1240.

- TRINCHIERI G. Interleukin-12 : a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 1995, **13**, 251-276.
- VAN MIERT A.S. Acute phase response and non-cellular defense mechanisms. *Flemish Vet. J.*, 1991, **62** : Suppl 1, 69.
- VAN OOSTVELDT K., PAAPE M.J., DOSOGNE H., BURVENICH C. Effect of apoptosis on phagocytosis, respiratory burst and CD18 adhesion receptor expression of bovine neutrophils. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 2002a, **22**, 37-50.
- VAN OOSTVELDT K., TOMITA G.M., PAAPE M.J., CAPUCO A.V., BURVENICH C. Apoptosis of bovine neutrophils during mastitis experimentally induced with *Escherichia coli* or endotoxin. *Am. J. Vet. Res.*, 2002b, **63**, 448-453.
- VAUGHN M.W., PROSKE R.J., HAVILAND D.L. Identification, cloning, and functional characterization of a murine lipoxin A4 receptor homologue gene. *J. Immunol.*, 2002, **169**, 3363-3369.
- VERDRENGH M., TARKOWSKI A. Role of neutrophils in experimental septicemia and septic arthritis induced by *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, 1997, **65**, 2517-2521.
- WANG Y., ZARLENGA D.S., PAAPE M.J., DAHL G.E. Recombinant bovine soluble CD14 sensitizes the mammary gland to lipopolysaccharide. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2002, **86**, 115-124.
- WEBER L., PETERHANS E., WYLER R. The chemiluminescent response of bovine polymorphonuclear leucocytes isolated from milk and blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 1983, **4**, 397-412.
- WEINMANN P., GAEHTGENS P., WALZOG B. Bcl-Xl- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3. *Blood*, 1999, **93**, 3106-3115.
- WORKU M., PAAPE M.J., MARQUARDT W.W. Modulation of Fc receptors for IgG on bovine polymorphonuclear neutrophils by interferon-gamma through de novo RNA transcription and protein synthesis. *Am. J. Vet. Res.*, 1994, **55**, 234-238.
- WRIGHT S.D., RAMOS R.A., TOBIAS P.S., ULEVITCH R.J., MATHISON J.C. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 1990, **249**, 1431-1433.
- YAGI Y., SHIONO H., SHIBAHARA T., CHIKAYAMA Y., NAKAMURA I., OHNUMA A. Increase in apoptotic polymorphonuclear neutrophils in peripheral blood after intramammary infusion of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2002, **89**, 115-125.
- YAMASHITA K., TAKAHASHI A., KOBAYASHI S., HIRATA H., MESNER P.W. JR., KAUFMANN S.H., YONEHARA S., YAMAMOTO K., UCHIYAMA T., SASADA M. Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood*, 1999, **93**, 674-685.
- YUAN J., SHAHAM S., LEDOUX S., ELLIS H.M., HORVITZ H.R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 1993, **75**, 641-652.
- ZHANG G., GHOSH S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. *J. Endotoxin Res.*, 2000, **6**, 453-457.
- ZIA S., GIRI S.N., CULLOR J., EMAU P., OSBURN B.I., BUSHNELL R.B. Role of eicosanoids, histamine, and serotonin in the pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*-induced bovine mastitis. *Am. J. Vet. Res.*, 1987, **48**, 1617-1625.