Thèse de doctorat de

L'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

Ecole doctorale Bio Sorbonne Paris Cité - ED157

Laboratoire INSERM LVTS U1148

Aspects diagnostiques et thérapeutiques du modèle d'ischémie - reperfusion mésentérique

Par HOANG Quoc Thang

Thèse de doctorat de Biothérapies

Co-dirigées par Dr Jean-Baptiste MICHEL et Dr Alexy TRAN-DINH

Présentée et soutenue publiquement à l'INSERM LVTS U1148 le 06 Décembre 2016

Président du jury : MONTRAVERS Philippe / PU-PH / Université Paris 7

Rapporteur : PLISSONNIER Didier / PU-PH / CHU de Rouen

Rapporteur : LEONE Marc / PU-PH / CHU de Marseille Nord

Directeur de thèse : MICHEL Jean-Baptiste / MD, PhD, DRE / INSERM LVTS U1148

Titre : Aspects diagnostiques et thérapeutiques du modèle d'ischémie - reperfusion mésentérique

Résumé :

Introduction: La lésion d'ischémie - reperfusion (I/R) intestinale est associée à une mortalité élevée. Le rôle de la transmigration des neutrophiles est probablement essentiel dans le dysfonctionnement de la barrière induit par la lésion I/R et la nécrose subséquente. Le but de notre étude était d'évaluer, au niveau pré-clinique, la valeur thérapeutique potentielle du peptide P8RI (un agoniste de CD31) dans la lésion I/R de l'intestine grêle.

Méthodes: I/R intestinale a été induite chez des rats Wistar par clampage de l'artère mésentérique supérieure (AMS) pendant 30 min suivi par 4 h de reperfusion. Trois groups de rats ont été comparés: P8RI (n = 20, I/R et P8RI 2,5 mg/kg/h de reperfusion), I/R témoins positifs (n = 21, I/R et infusion de sérum physiologique) et témoins (n = 14, dissection de l'AMS sans clampage et infusion de sérum physiologique). La matrix métallopeptidase 9 (MMP-9) dans la plasma, le liquide péritonéal et l'intestin; la MPO intestinale, l'ADN libre plasmatique, les taux d'hémoglobine intraluminale et l'épaisseur épithéliale ont été évalués comme marqueurs intermédiaires de la lésion intestinale. La détection du matériel génétique d'E.coli par PCR quantitative dans le sang a été également réalisée chez les témoins positifs et chez les rats traités par P8RI pendant la période de reperfusion. Le CD31 clivé dans le plasma a été mesuré par une méthode d'ELISA maison.

Résultats: La grade histologique de l'intestin grêle chez les animaux traités par P8RI est supérieur à celui des témoins positifs d'I/R ($p < 0,05$). P8RI protège l'intestin grêle contre la destruction épithéliale induite par lésion I/R ($p < 0,01$). Il y a une corrélation négative significative entre l'abrasion épithéliale et le score de Chiu de classement histologique de la lésion I/R mésentérique ($r = -0,7245$, $p < 0.001$). P8RI protège l'intestin grêle de la MPO *in situ*, de la libération de la MMP-9 ($p < 0,05$) et des complications hémorragiques digestives causées par lésion I/R ($p < 0,01$). Les taux plasmatiques et péritonéaux accrus de MMP-9, induits par I/R, sont significativement réduits par P8RI ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, respectivement). L'ADN d'E.coli circulant est significativement plus élevé chez les rats de témoins positifs que dans le groupe P8RI ($p < 0,05$). L'ADN libre plasmatique pendant la reperfusion chez les rats de témoins positifs augmente significativement plus que celle des rats du groupe P8RI ($p < 0,05$). P8RI n'a aucun effet sur le compte neutrophilaire sanguin, mais induit une diminution significative de CD31 clivé dans le plasma pendant l'I/R mésentérique ($p < 0,01$). Les corrélations entre l'abrasion épithéliale et l'ADN libre, MMP-9, CD31 clivé plasmatiques, les taux de MMP-9 et MPO intestinale suggèrent que le mécanisme protecteur de P8RI implique l'inhibition de l'activation neutrophilaire, y compris le clivage de CD31.

Conclusions: Cette étude suggère que le traitement par le peptide P8RI, un agoniste de CD31, réduit de la façon préventive, la lésion I/R de l'intestin grêle chez les rats.

Mots clefs : Ischémie - reperfusion mésentérique, neutrophiles, CD31, P8RI

Title : Diagnostic and treatment aspects of mesenteric ischemia - reperfusion model

Abstract :

Background: Intestinal ischemia/reperfusion (I/R) injury is associated with a high mortality. The role of transmigration of PMNs is probably essential in I/R-induced intestinal barrier dysfunction and subsequent necrosis. The aim of this study was to evaluate, at a preclinical level, the potential therapeutic value of P8RI peptide (a CD31 agonist), in small bowel I/R injury.
Methods: Intestinal I/R was induced in Wistar rats by superior mesenteric artery (SMA) clamping for 30 min followed by 4 h of reperfusion. Three groups of rats were compared: P8RI (n=20, I/R and P8RI 2.5mg/kg/h infusion), I/R positive controls (n=21, I/R and normal saline infusion), and sham operated negative controls (n=14, SMA dissection with no clamping and normal saline infusion). Plasma, peritoneal fluid and intestinal matrix metallopeptidase 9 (MMP-9), intestinal MPO, plasma cf-DNA, intraluminal hemoglobin levels and epithelial thickness were all evaluated as intermediate markers of intestinal injury. Detection of E.coli genetic material by quantitative PCR in blood was also performed in I/R controls and P8RI-treated rats during the reperfusion period. Plasma cleaved CD31 was measured by homemade ELISA.
Results: The small bowel histologic grade in P8RI-treated animals was higher than in I/R controls ($p < 0.05$). P8RI protected against epithelial destruction induced by I/R injury ($p < 0.01$). There was a significant negative correlation between epithelial abrasion and Chiu's score of histologic grading of mesenteric I/R injury ($r = -0.7245$, $p < 0.001$). P8RI protected the small bowel from *in situ* MPO and MMP-9 release ($p < 0.05$) and digestive bleeding complications due to I/R injury ($p < 0.01$). The increased plasma and peritoneal MMP-9 levels induced by I/R were significantly reduced by P8RI ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). Plasma cf-DNA during reperfusion in I/R controls increased significantly more than in the P8RI group ($p < 0.05$). E.coli DNA was significantly higher in I/R controls than in the P8RI group ($p < 0.05$). P8RI had no effect on blood neutrophil counts but induced a significant diminution of cleaved CD31 in plasma during mesenteric I/R ($p < 0.01$). Correlations between epithelial abrasion and plasma cf-DNA, MMP-9, cleaved CD31, intestinal MMP-9 and MPO levels suggest that the protective mechanism of P8RI might involve the inhibition of neutrophil activation, including CD31 cleavage.
Conclusions: This study suggests that a treatment by P8RI peptide, a CD31 agonist, reduces small bowel I/R injury in rats

Keywords : Mesenteric ischemia - reperfusion, neutrophils, CD31, P8RI

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance

A mon directeur de thèse, Dr Jean-Baptiste MICHEL, pour m'avoir accepté comme un de ses derniers doctorants et pour m'avoir appris à être plus autonome tout au long de ce travail de recherche et à comprendre également beaucoup d'autres domaines hors de la recherche.

A Dr Alexy TRAN-DINH, mon co-directeur de thèse, de m'avoir très bien aidé en Réanimation Chirurgicale de Bichat et aussi durant ma thèse en science.

A Monsieur le Professeur Alain CARPENTIER, Monsieur Olivier BRAULT et l'ensemble de la fondation Alain Carpentier pour leur support financier et leur soutien de ce travail de recherche.

A Monsieur le Professeur Philippe MONTRAVERS, le président du jury, afin de m'avoir recommandé pour ce poste de thèse et pour le financement de ma thèse, et également pour son accueil chaleureux quand j'étais étudiant de DFMS en anesthésie - réanimation.

A Messieurs les Professeurs Marc LEONE et Didier PLISSONNIER, d'avoir accepté de faire des rapports pour mon manuscrit.

A ma chef du service, Professeur NGUYEN Thi Thanh, qui soutient toujours mes études.

A Monsieur le Professeur Philippe SCHERPEREEL et à la World Federation of Societies of Anaethesiologists, pour leurs soutiens au début de ce projet de recherche.

A Dr Giuseppina CALIGIURI et Pr Antonino NICOLETTI, pour m'avoir permis d'élargir mes connaissances dans la recherche scientifique et la statistique.

A Liliane LOUEDEC, pour sa présence et son aide dans toutes les manipulations expérimentales.

A Dr Alexandre NUZZO et Dr Mary PELLEGRIN, d'avoir passé le temps pour les corrections de ma rédaction scientifique.

A l'unité INSERM LVTS U1148 pour m'avoir permis de réaliser mon projet dans d'excellentes conditions.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'aide de différentes personnes qui ont participé de près ou de loin à mon projet de thèse : Sandrine DELBOSC, Francesco ANDREATA, Jamila KHALLOU-LASCHET, Adrian BRUN, Kamel BOUKAIS, Varouna SYVANNARATH,

Benoît HO-TIN-NOE, Jean-Phillipe DESILLES, Catherine DESCHILDRE, GASTON Anh-Thu, Corrine LEGRAND, Redouane GHEBOULI et Ziad TOUAT.

Je remercie à ma famille qui me fait trouver toujours la motivation dans la vie.

Enfin, j'aimerais remercier ma chère épouse, Ngoc Lieu, pour son soutien éternel et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie générale; et mon petit Hoa Minh Francis, pour son sourire quotidien.

Table des matières

Liste des principales abréviations 9
Table des illustrations 11
INTRODUCTION 12
I. ANATOMIE - PHYSIOLOGIE DE LA CIRCULATION MESENTERIQUE 12
1. Anatomie de la circulation mésentérique 12
2. Physiologie de la circulation mésentérique 13
II. SYNDROME DE L'ISCHEMIE - REPERFUSION MESENTERIQUE 14
1. Définition de l'ischémie - reperfusion 14
2. Syndrome de l'ischémie - reperfusion mésentérique 14
2.1. Epidémiologie 14
2.2. Etiologie de l'ischémie mésentérique 15
2.3. Biologie cellulaire dans l'ischémie - reperfusion mésentérique 16
2.3.1. Mécanisme de la mort cellulaire dans l'ischémie - reperfusion mésentérique 16
2.3.1.1. Définition de la mort cellulaire dans la lésion d'ischémie - reperfusion 16
A. Apoptose 17
B. Autophagie 17
C. Nécrose et nécroptose 18
2.3.2. Mort cellulaire dans l'ischémie - reperfusion mésentérique 19
2.3.3. Restitusion de la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique 21
2.3.4. Mécanisme de la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique 21
2.3.4.1. Xanthine oxidase et radicaux d'oxygène libres 22
2.3.4.2. Endothéline 24
2.3.4.3. Protéines de choc thermique 25
2.3.4.4. Nitric oxide (NO) 25
2.3.4.5. Hème oxygénase 27
2.3.4.6. Protéines pro-inflammatoires 28
2.3.4.7. Complément 29
2.3.5. Rôles des cellules dans la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique 29
2.3.5.1. Cellules endothéliales 29
2.3.5.2. Plaquettes 30
2.3.5.3. Neutrophiles 31
A. Activation et migration neutrophilaire 31
B. Mécanisme de lésion causée par les neutrophiles 34
2.3.6. Rôles des molécules impliquées dans l'ischémie - reperfusion mésentérique 38
2.3.6.1. ADN libre 38
2.3.6.2. Myéloperoxidase (MPO) 38
2.3.6.3. MMPs - MMP-9 39
2.3.6.4. Selectines 39
2.3.6.5. CD31 (PECAM-1) 41
A. Structure du CD31 41
B. CD31 et la migration neutrophilaire 43
C. CD31 et l'ischémie - reperfusion 45
D. Clivage et fonction physiologique du CD31 46
2.4. Conséquences intestinales et systémiques de l'ischémie - reperfusion mésentérique 47
2.4.1. Altérations de la fonction absorptive intestinale 47

2.4.2. Altération de la fonction de barrière épithéliale intestinale 47
2.4.3. Translocation bactérienne 48
2.4.4. Conséquences systémique 48
2.5. Présentation clinique et paraclinique 49
2.5.1. Diagnostic 49
2.5.1.1. Présentation clinique 49
2.5.1.2. Examens complémentaires radiologiques 49
A. L'échographie 49
B. L'angioscanner et l'angiographie par résonance magnétique 50
C. L'endoscopie 50
D. L'angiographie avec cathéter 51
2.5.2. Marqueurs biologique de l'ischémie - reperfusion mésentérique 51
2.5.2.1. L-lactate 51
2.5.2.2. D-lactate 52
2.5.2.3. D-dimère 53
2.5.2.4. α-glutathion S-transferase (alphaGST) 53
2.5.2.5. I-FABP 53
2.5.2.6. Procalcitonine (PCT) 54
2.6. Evaluation histologique d'ischémie - reperfusion mésentérique 55
III. PRISE EN CHARGE DE L'ISCHEMIE - REPERFUSION MESENTERIQUE 56
1. Revascularisation mésentérique et résection intestinale 57
1.1 Techniques endovasculaires 57
1.1.1. Embolectomie d'aspiration 58
1.1.2. Thrombolyse de l'AMS 58
1.1.3. Recanalisation et endoprothèse antégrade de l'AMS 58
1.1.4. Recanalisation et endoprothèse rétrograde de l/AMS 59
1.1.5. Traitement endovasculaire de la thrombose veineuse mésentérique 59
1.2. Traitement chirurgical 59
1.2.1. Embolectomie chirurgicale 60
1.2.2. Chirurgie de pontage de l'AMS 60
1.2.3. Résection intestinale 60
2. Traitement symptomatique 61
2.1. Remplissage vasculaire 61
2.2. Traitement vasoactif 61
2.3. Traitement anticoagulant 63
2.4. Traitement antibiotique 63
2.5. Nutrition 64
3. Traitement d'ischémie mésentérique non occlusive (IMNO) 64
IV. MODELE EXPERIMENTAL D'ISCHEMIE - REPERFUSION MESENTERIQUE 66
1. Généralité des modèles expérimentaux d'ischémie - reperfusion mésentérique 66
2. Notre modèle exprérimental d'ischémie - reperfusion mésentérique 67
2.1. Fucoidan 67
2.2. Peptide P8RI 68
3. Modèle expérimental d'ischémie - reperfusion mésentérique 69
3.1. Animaux 69
3.2. Protocole chirurgical 69
3.3. Prélèvement 71
3.3.1. Prélèvement sanguin 71

3.3.2. Liquide péritonéal 71
3.3.3. Prélèvement tissulaire 71
3.4. Dosage des paramètres biologiques 72
3.4.1. Activation neutrophilaire 72
3.4.1.1. Numération neutrophilaire 72
3.4.1.2. Activation neutrophilaire 72
3.4.2. Conséquences digestives 72
3.4.3. Histologie 72
3.4.4. Translocation bactérienne 72
3.4.5. Clivage de CD31 73
3.5. Analyse statistique 73
III. PRESENTATION DE NOTRE ETUDE 73
RESULTATS 74
I. FUCOIDAN 74
1. Modèle expérimental d'une heure d'ischémie - 4h de reperfusion mésentérique 74
1.1. Lactate plasmatique 74
1.2. ADN libre circulant 75
1.3. Hb intraluminale 76
2. Modèle expérimental de 30 min d'ischémie - 4h de reperfusion mésentérique 76
2.1. Posologie de Fucoidan 76
2.2. ADN libre circulant 77
2.3. Hb intraluminale 77
II. PEPTIDE AGONISTE DE CD31 - P8RI 78
Article: **Protective effects of CD31 pharmacological activation on mesenteric ischemia reperfusion injury in rats** 79
CONCLUSION 117
Bibliographie 123

Liste des principales abréviations

AAA: Anévrysme de l'Aorte Abdominale

ADN: Acide désoxyribonucléique

Akt: Protéine kinase B

AMI: Artère mésentérique inférieure

AMS: Artère mésentérique supérieure

Atg1: AuTophaGy related 1

ATP: Adénosine triphosphate

coll: collègues

ELISA: Enzym-linked immnuosorbent assay

eNOS: Endothelial nitric oxyde synthase

ET: Endothéline

FADD: Fas-Associated protein with Death Domain

GPCRs: G-protein coupled recepteur

GTPase: Guanosine triphosphate hydrolase

HO: Hème oxygénase

HSP: Heat shock proteins

HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells

ICAM-1: InterCellular Adhesion Molecule 1

IMA: Ischémie mésentérique aigüe

IMNO: Ischémie mésentérique non obstructive

iNOS: Inducible nitric oxide synthase

ITIMs: Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

KO: knock-out

MMP-8: matrix metallopeptidase 8

MMP-9: matrix metallopeptidase 9

MPO: Myéloperoxidase

MPT: Mitochondrial permeability transition

mTOR: mammalian target of rapamycine

NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NETs: Neutrophil extracellular traps

NF-κB: Nuclear factor-kappa B

nNOS: neuronal nitric oxide synthase

NO: nitric oxide

PARP1: Poly [ADN-ribose] polymerase 1

PCR: Polymerase chain reaction

PECAM-1: Platelet endothelial cell adhesion molecule 1

PI3K: Phosphoinositide 3 - kinase

PLA2: Phospholipase A2

PSGL-1: P-selectin glycoproteine ligand 1

RIP1/3: Receptor-interacting protein 1/3

SDRA: Syndrome de détresse respiratoire aigüe

SH2: Scr homology 2

SIRS: Syndrome de réponse inflammatoire systémique

SOD: Superoxide dimutase

TNF-α: Tumor necrosis factor α

TRADD: Tumor necRosis factor type 1 - Associated with Death Domain

TRAIL: Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligands.

VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1

XDH: Xanthine dehydrogenase

XO: Xanthine oxidase

Table des illustrations

Figure 1. Schématisation de la vascularisation artérielle digestive 13
Figure 2. Mécanisme de la mort cellulaire dans l'ischémie - reperfusion 18
Figure 3. Le continuum de la lésion ischémique de l'intestin, de la muqueuse normale à l'infacrtus transmural 20
Figure 4. Physiopathologie des lésions d'ischémie - reperfusion 22
Figure 5. Mécanisme de la lésion induite par la xanthine oxidase 23
Figure 6. La production des dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS) dans la paroi vasculaire pendant l'ischémie - reperfusion 24
Figure 7. Rôle de NO dans la lésion d'ischémie - reperfusion intestinale 26
Figure 8. Stimulation cellulaire avec les cytokines 28
Figure 9. Modèle proposé de mécanisme d'adhésion plaquettaire sur l'endothélium 31
Figure 10. Circuit de feedback positive de la libération et du recrutement neutrophilaire 33
Figure 11. Séquence des événements de la migration des neutrophiles 34
Figure 12. Mécanismes de la lésion tissulaire induite par neutrophiles 35
Figure 13. Résumé des granules neutrophilaires et leurs contenus 36
Figure 14. Formation des NETs 37
Figure 15. Mécanismes impliqués dans la bactéricidie et le potentiel lésionnel tissulaire de la MPO neutrophilaire 38
Figure 16. La structure des selectins 40
Figure 17. Les domaines protéiques et leurs fonctions cellulaires du récepteur CD31 41
Figure 18. Interaction homophile de CD31 43
Figure 19. Les fonctions pro-inflammatoires du PECAM-1 (CD31) 43
Figure 20. Marqueurs biologiques potentiels de l'IMA et leur origine pariétale intestinale 52
Figure 21. Algorithme chirurgical du traitement des patients avec l'occlusion d'AMS 57
Figure 22. Concentration de lactate plasmatique - Modèle expérimental d'une heure d'ischémie et 4h de reperfusion 75
Figure 23. Cinétique d'ADN libre circulant du modèle d'une heure d'ischémie et 4 h de reperfusion 75
Figure 24. Taux d'Hb intraluminale du modèle d'une heure d'ischémie et 4 h de reperfusion 76
Figure 25. Cinétique d'ADN libre circulant de groupe de Fucoidan à forte dose, à faible dose et de contrôle positive 77
Figure 26. Hb intraluminal de groupe de Fucoidan à forte dose, à faible dose et de contrôle positive 78
Tableau 1. Description des 4 systèmes de score histologique 56
Tableau 2. Comparaison des modèles d'ischémie mésentérique 66
Tableau 3. Protocole d'anesthésie avec uréthane 70

Introduction

I. ANATOMIE - PHYSIOLOGIE DE LA CIRCULATION MESENTERIQUE

1. Anatomie de la circulation mésentérique

La circulation mésentérique réfère spécifiquement à la vascularisation intestinale.[1] L'artère mésentérique supérieure (AMS) nait de la face antérieure de l'aorte, approximativement 1 cm au dessous du tronc cœliaque, au niveau généralement de la première vertèbre lombaire. Les branches principales d'AMS sont l'artère pancréaticoduodénale, l'artère colique moyenne, l'artère colique droite, de 4 à 6 branches jéjunales et de 9 à 13 branches pour l'iléum et l'artère iléocolique[2] qui sont anastomosées entre elles, formant des arcades vasculaires. L'AMS vascularise l'ensemble de l'intestin grêle et le colon jusqu'à l'angle colique gauche. L'artère mésentérique inférieure (AMI) est généralement la plus petite artère de la vascularisation mésentérique et nait de l'aorte approximativement 6 cm au dessous de l'AMS, au niveau de troisième vertèbre lombaire, Elle vascularise le tiers gauche du colon tranverse, le colon descendant et sigmoïde, et le tiers proximal du rectum.[2]

Trois anastomoses sont montrées entre l'AMS et l'AMI (Figure 1). La source principale en est l'artère marginale de Drummond qui se lie au niveau de mésentère colique et vascularise les *vasa recta*. En cas d'occlusion de l'AMS ou l'AMI, cette artère est probablement dilatée. La deuxième anastomose est l'arcade de Riolan qui se lie aussi dans le mésentère mais sa localisation est plus centrale et elle connecte souvent aux artères coliques moyennes et gauches. La troisième anastomose potentielle est l'artère mésentérique sinueuse ou atopique. Elle représente l'arc de Riolan dilaté ou un canal anastomotique dans le mésentère.[2] Ces anastomoses sont insuffisantes à assurer une revascularisation quand l'AMS est occluse de la manière aigüe. Cependant, dans le syndrome d'ischémie chronique causée par athérosclérose artérielle progressive, elles seront probablement adaptées pour prévenir l'ischémie intestinale.[3]

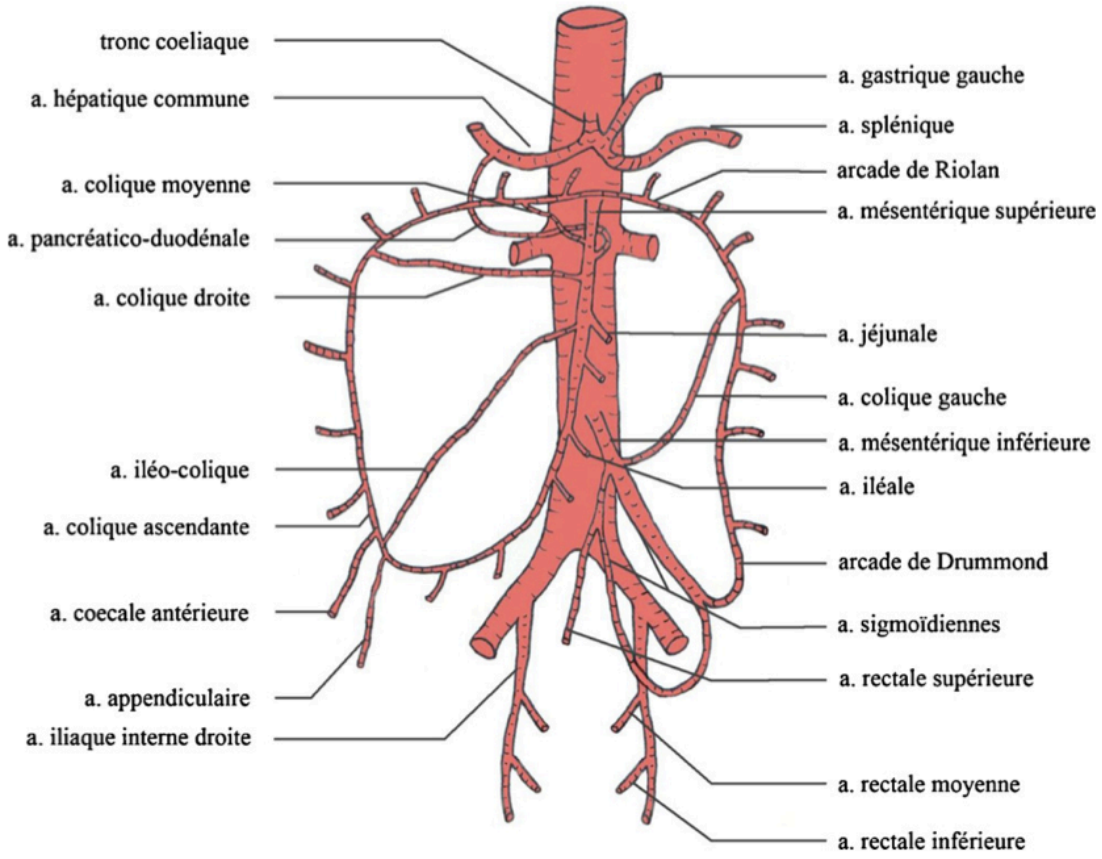


Figure 1. Schématisation de la vascularisation artérielle digestive[4]

Après la distribution sanguine de l'AMS à l'intestin grêle, le sang s'accumule dans la veine mésentérique qui se termine dans la veine porte. À l'intérieur de la paroi de l'intestin grêle, la circulation mésentérique est organisée en deux types de relation, en série et en parallèle. La circulation de la muqueuse est en série avec la circulation sous-muqueuse qui est vascularisée par la circulation muqueuse et en parallèle avec la circulation de la musculeuse de la paroi. Cette organisation permet une redistribution interne de flux sanguin à l'intérieur de l'organe sans altérer le flux sanguin total.[1]

2. Physiologie de la circulation mésentérique

Les vaisseaux méméséntériques sont des vaisseaux très réactifs.[2] Les déterminats principaux de la régulation des flux mésentériques sont le contrôle cardiovasculaire central, les neuro-régulateurs autonomes, les substances neurohumorales, les facteurs métaboliques locaux et les caractéristiques vasculaires intrinsèques. Les artères splanchniques humaines répondent *in vitro* à l'adrénaline, la prostaglandine $F_{2\alpha}$, et la bradykinine et sont moins sensibles à la relaxation endothelium-dépendante que leurs équivalents pulmonaires, périphériques ou coronaires. L'hyperréactivité des vaisseaux splanchniques justifie les larges variations du flux

sanguin mésenterique observées entre la période de jeûne et de digestion, également entre le syndrome d'ischémie non occlusive et le vasospasme.[1,2]

La circulation mésentérique peut être considérée comme un des reservoirs de la volémie qui peut être utilisé en réponse à certains stress circulatoires. Au début du choc circulatoire, quelqu'en soit la cause, la distribution du flux sanguin change via la constriction et la dilatation sélectives des différents lits vasculaires. Le flux sanguin pour le myocarde augmente, la perfusion cérébrale se maintient tandis que les perfusions musculaires, cutanées et intestinales se réduisent. Dans cette adaptation physiologique, la vasoconstriction mésentérique survient précocement et profondément même avant l'instabilité hémodynamique. Cette vascoconstriction splanchnique préférentielle peut être déclenchée par différents stades de choc, ou par la stimulation directe avec la médication vasoactive. L'ischémie se développe seulement quand le flux mésenterique est réduit à moins de 50% de flux de base normal.[5]

II. SYNDROME DE L'ISCHEMIE - REPERFUSION MESENTERIQUE

1. Définition de l'ischémie - reperfusion

Le mot "ischémie" est utilisé pour définir un apport sanguin insuffisant aux tissus, causé par l'obstruction du flux artériel.[6,7] L'ischémie provoque la dysfonction tissulaire et la mort cellulaire. La restauration du flux sanguin (reperfusion) peut paradoxicallement augmenter les lésions tissulaires quand elle redistribue l'oxygène, provoquant un stress oxidatif par production des radicaux libres, qui peut accélérer la nécrose.[8] L'augmentation de la dysfonction, l'extension de la lésion et/ou la mort cellulaire sont influencées par l'ampleur et la durée de l'ischémie. La revascularisation et la restauration du flux sanguin le plus précocement possible restent donc la base de tous les traitements de l'ischémie. Cependant, la susceptibilité des differents organes à l'ischémie est variable. La reperfusion qui est nécessaire pour rétablir l'apport en d'oxygène et en substrats métaboliques aux cellules et éliminer les produits potentiellement toxiques du métabolisme cellulaire anaerobie, peut aussi induire les lésions surajoutées à l'ischémie *per se* et libérer les médiateurs inflammatoires dans la circulation générale, causant les lésions systémiques à distance (pulmonaires, rénales, cérébrales).[7]

2. Syndrome de l'ischémie - reperfusion mésentérique

2.1. Épidémiologie

L'ischémie mésentérique aiguë (IMA) n'est pas une maladie fréquente et son taux est inférieur à 1/1000 des cas d'hospitalisation.[9] L'incidence globale de l'ischémie mésentérique aiguë entre 1970 et 1982, diagnostiquée par autopsie ou laparotomie, dans la population de Malmö, en Suède a été estimée à 12,9/100.000 personnes-années. Cette incidence augmente exponentiellement avec l'âge, est également distribuée entre les hommes et les femmes après l'avoir ajustée à l'âge dans la population.[10] Malgré des avancements appliqués dans le traitement de ce syndrome depuis 35 ans, le taux de mortalité reste élevé. Les revues actuelles montrent une mortalité entre 60% et 80%, voire 100%.[9,11-13] Une récente étude française multicentrique a montré que le taux de mortalité des patients qui ont subi une ischémie - reperfusion mésentérique en réanimation est de 58%.[14]

2.2. Etiologie de l'ischémie mésentérique

L'ischémie mésentérique est causée par une baisse du flux sanguin, insuffisant pour la demande métabolique de l'organe.[12,13] La cause la plus fréquente de l'ischémie mésentérique, l'obstruction artérielle a deux formes différentes, aiguë et chronique. L'ischémie mésentérique aiguë est une urgence chirurgicale. Elle est associée à une occlusion embolique dans 40 - 50% des cas avec 20 - 35% d'occlusion thrombotique sur artère sténosée pré-existante et moins de 5% de dissection ou d'inflammation sur l'artère mésentérique supérieure.[12] Les ischémies mésentériques aiguës d'origine embolique, sont le plus fréquemment secondaires à la migration d'un thrombus provenant de l'oreillette gauche, du ventricule gauche ou des valves cardiaques. Le thrombus migre préférentiellement dans l'artère mésentérique supérieure en raison de son calibre et de son angulation avec l'aorte descendante.[4]

Plus de 90% des ischémies mésentériques chroniques sont associées à l'athérosclérose progressive qui touche l'origine des vaisseaux viscéraux.[12] Elle affecte surtout la partie proximale d'artère digestive, déjà sténosée, et implique les artères splanchniques principales, compliquant les tentatives de revascularisation. Un facteur déclenchant responsable d'une diminution de débit splanchnique (état de choc, chirurgie abdominale, circulation extracorporelle, infection ou traumatisme abdominal) est fréquemment retrouvé[4].

Les thromboses veineuses mésentériques retrouvée dans 5 à 15% des cas d'ischémie mésentérique, résulte de la stagnation du sang veineux et de l'œdème visceral. Leurs causes incluent la thrombose primaire ou idiopathique, mais 90% des cas sont associés à la thrombophilie, au traumatisme, ou à une inflammation locale (pancréatite, diverticulite, ou

inflammation ou infection de la voie biliaire)[12]. L'ischémie digestive est alors secondaire à l'arrêt du flux sangiun veineux, provoquant un important œdème de la paroi digestive, un afflux liquidien dans la lumière digestive, constituant un troisième secteur digestif, d'une hypotension artérielle et d'une augmentation de la viscosité sanguine. À son paroxysme, ces lésions s'accompagnent de saignement intramural et d'un infarctus digestif, compliquant la chute du débit sanguin mésentérique.[4]

La quatrième étiologie, labelisée ischémie mésentérique non occlusive (IMNO), serait une vasocontriction intense secondaire à un état de choc, une défaillance cardiaque ou traitement vasoconstricteur.[4] L'IMNO est reconnue comme une cause rare de l'infarctus mésentérique aiguës en gastroenterologie. Par contre, elle est considérée comme une altération pathologique fréquente chez les patients en réanimation ou associée à des chirurgies majeures.[5] Les autres facteurs possibles sont les insuffisances cardiaques, le sepsis, les arythmies cardiaques, la dialyse et les traitements par digoxine ou agonistes alpha-adrénergiques.[4] Les chirurgies cardiovasculaires avec clampage prolongé de l'aorte ou en cas de recours à des drogues vasoactives, sont aussi des causes d'ischémie mésentérique non occlusive.[4,5,15] Elle est une complication rare mais grave de la chirurgie cardiaque. La mortalité de l'IMNO survenue en post-opératoire cardiaque est supérieure à 90%.[16] L'étude d'Ultee et coll a montré l'incidence de l'ischémie intestinale après la chirurgie de l'anévrysme de l'aorte abdominale (AAA) est de 1,6% sur l'AAA intact et 15,2% sur les AAA en rupture. La mortalité des ischémies digestives post-opératoires suite à la cure d'un AAA est également élevée, 20,5% suite à une intervention ouverte et 34,6% suite à une intervention endovasculaire sur AAA à froid et 48,2% suite à une intervention ouverte et 30,8% endovasculaire suite à une rupture d'AAA.[17] La lésion d'ischémie - reperfusion intestinale est un phénomène inévitable dans la transplantation de l'intestin grêle. La lésion tissulaire induite par la reperfusion est un facteur majeur qui décide le succès de la transplantation de l'intestin grêle et garantit les stratégies de prévention additionnelles.[18] L'IMNO reste une pathologie importante dans la chirurgie et l'anesthésie-réanimation chirurgicale.

2.3. Biologie cellulaire dans l'ischémie - reperfusion mésentérique

2.3.1. Mécanisme de la mort cellulaire dans l'ischémie - reperfusion mésentérique

2.3.1.1. Définition de la mort cellulaire dans la lésion d'ischémie - reperfusion

La mort cellulaire induite par la l'ischémie - reperfusion est considérée comme la conséquence de facteurs extrinsèques au tissu comme la perte de support énergétique, l'élaboration des médiateurs pro-inflammatoire et de molécules toxiques, ainsi la mort cellulaire a été appelée nécrose.[7] Actuellement, les cellules ischémiées sont reconnues déclencher un programme de mort par une signalisation cellulaire via le processus d'apoptose et d'autophagie.[19] D'autre part, des évidences montrent la mobilisation et la coordination des mécanismes de signalisation spécifiques dans les 2 autres voies de la mort cellulaire, appelées nécrose programmée ou nécropoptose (Figure 2).[7]

A. Apoptose

Le mécanisme apoptotique est divisé dans 2 voies, "extrinsèque" et "intrinsèque", malgré les croisements possibles entre les deux voies.[19-21] La voie extrinsèque implique l'activation des récepteurs comme FAS, TNF-α et TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Cette activation recruite certaines protéines de la mort cellulaire comme FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) et TRADD (Tumor necRosis factor type 1 - Associated with Death Domain) au niveau des récepteurs complexes. Ces complexes de la mort cellulaire activent la protéase caspase-8 qui clive et active la caspase-3. Caspase-3 joue le rôle d'exécuteur cellulaire en protéolysant certains composants cellulaires majeurs.[19-21]

Dans la voie intrisèque, la stimulation cytotoxique causée par l'ischémie - reperfusion induit la translocation et l'intégration des membres de la famille de protéine Bcl-2 (ex: Bax, Bak) sur la membrane externe de la mitochondrie. Ces protéines perméabilisent, avec le mécanisme encore controversés, la membrane externe de la mitochondrie et activent ainsi la libération de protéines pro-apoptotiques du cytosol comme le cytochrome C, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 et l'endonucléase G. Le cytochrome C adhère à la protéine cytosolique apaf1 et résulte "l'apoptosome" qui active le système de protéase caspase-9 et caspase-3. Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 activent les caspases en séquestrant ou digérant respectivement les protéines inhibitrices de caspase. L'endonucléase G médie la fragmentation des ADNs.[19-21]

B. Autophagie

L'autophagie est le mécanisme principal de la cellule pour éliminer les organites obsolètes ou endommagés et les agrégats de protéines. C'est un mécanisme de survie des cellules pour résister aux conditions de stress, tels que l'hypoxie, la dysfonction mitochondriale et l'infection en renouvelant les acide aminés et les acides gras pour maintenir les fonctions cellulaires, ou en supprimant les organes endommagés et les pathogènes intracellulaires. L'autophagie physiologique est un mécanisme de survie cellulaire. Par contre, l'autophagie incontrôlée ou dépassée induira la mort cellulaire et pourra contribuer aux lésions d'ischémie -

reperfusion.[7] L'autophagie commence morphologiquement avec l'expansion de la membrane d'isolation, dit phagophore, autour du compartiment cellulaire/organites à traiter.[22-24] La membrane par la suite enveloppe complètement les constituants pour former l'autophagosome vésiculaire qui fusionne avec le lysosome. Les composants interiorisés dans les phagolysomes sont degradés enzymatiquement dans un environnement subcellulaire acide.[7]

L'autophagie est régulée strictement comme l'apoptose par les voies spécifiques. La voie principale de contrôle est mTOR (mammalian target of rapamycin), qui est désactivée, par Atg1, une kinase contrôlée par les conditions de stress. Atg1, Atg13 et Atg7 initient la formation du phagophore qui est aussi facilitée par un autre complexe vps34, vps15, et beclin-1, les PI3K (phosphoinositide-3 kinase). La fusion de l'autophagosome avec le lysosome est médiée par Rab7 GTPase et la protéine de membrane lysosomale LAMP2.[22-24]

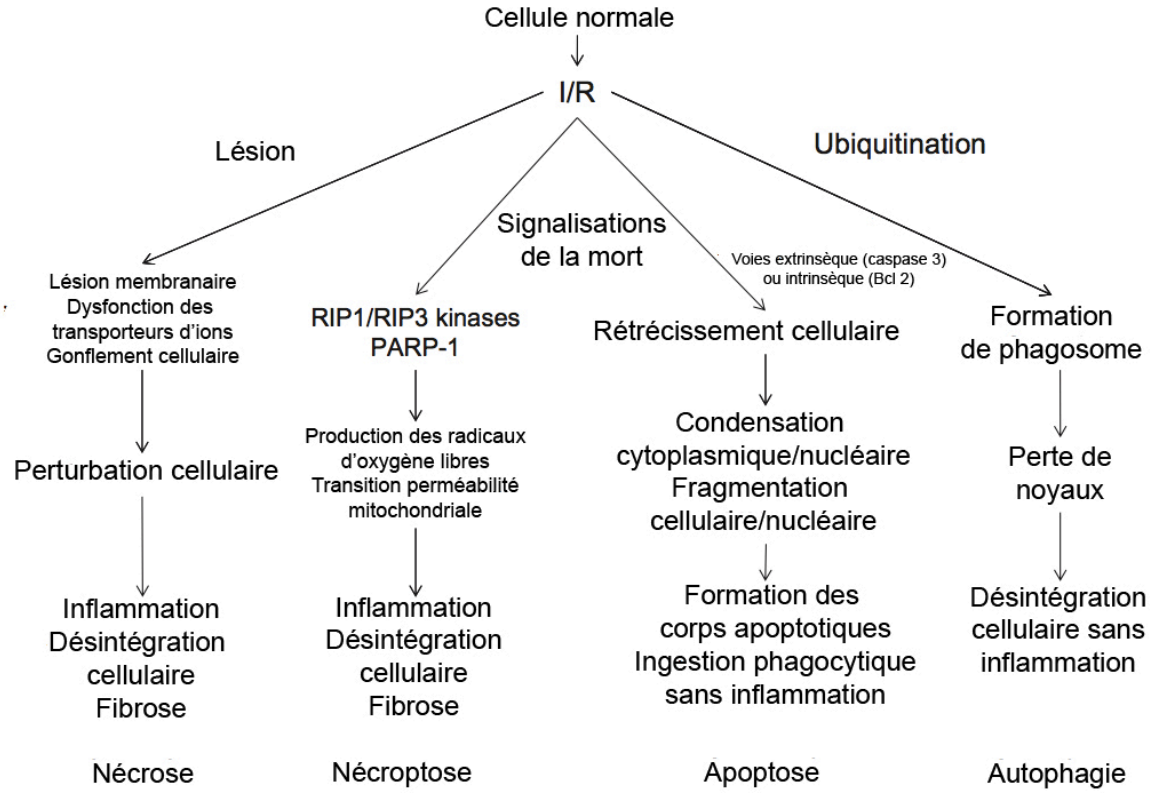


Figure 2. Mécanisme de la mort cellulaire dans l'ischémie - reperfusion.[7]

C. Nécrose et nécroptose

La nécrose est caractérisée morphologiquement par le gonflement des cellules et de leurs organites, la dysfonction mitochondriale, l'absence de fragmentation nucléaire, la rupture de la membrane plasmique et la fuite extracellulaire du contenu intracellulaire. Au contraire de l'origine programmée de l'apoptose et de l'autophagie, la nécrose était considérée comme un

événement aléatoire et incontrôlé qui conduit à la mort "accidentelle" de la cellule dans la réponse à un stress incontrôlable. Le concept de la nécrose programméee, appelé également nécroptose, est cependant discuté en particulier dans les conditions telles que l'ischémie - reperfusion.[7] L'activation du stress cellulaires ou des récepteurs de la mort cellulaire mobilise et active un groupe de serine/threonine kinases qui est appelé RIPs (receptor-interacting proteins). On a montré les activités de RIP1 et RIP3 comme les médiateurs de la nécrose.[25-27] La reduction de la mort cellulaire TNF-α-induite causée par la necrostatin-1 via l'inhibition de kinase RIP1 supporte le concept de nécrose récepteur-induite via un processus cellulaire contrôlé.[26] La cible mitochondriale de la nécrose RIP-médiée est le pore MPT (mitochondrial permeability transition), un canal large, non spécifique de la membrane interne mitochondriale qui est ouvert en réponse à la production excessive des dérivés réactifs de l'oxygène et à la surcharge de Ca^{2+} de la matrice mitochondriale. L'augmentation soudaine de la perméabilité de cette membrane disperse le gradient électrochimique de proton, ce qui conduit à la déplétion d'ATP, la production des dérivés réactifs de l'oxygène, le gonflement et la rupture des organites.[19,28-30] La voie de nécrose concerne aussi l'activation de l'enzyme de réparation PARP1 (poly ADP-ribose polymerase-1).[31,32] La PARP-1 stimulée active la libération des facteurs d'apoptose-induite de la mitochondrie qui transloquent dans le noyau cellulaire et dégradent les ADNs.[7]

2.3.2. Mort cellulaire dans l'ischémie - reperfusion mésentérique

L'intestin est un des organes les plus sensibles à l'ischémie.[33,34] L'ischémie mésentérique est due à une diminution du débit sanguin dans le territoire vasculaire mésentérique entrainant des lésions cellulaires touchant initialement la muqueuse puis les couches plus profondes de la paroi digestive.[35] Les études chez les animaux et chez les hommes ont montré que l'ischémie mésentérique prolongée suivie par la reperfusion abîme la barrière paracellulaire, provoque la mort des cellules épithéliales et facilite la translocation bactérienne du tube digestive à la circulation et au peritoine.[36,37] Les deux types de mort des cellules épithéliales, l'apoptose et la nécrose, sont bien documentés dans l'ischémie - reperfusion mésentérique.[38-41] Huang et coll ont justifié le rôle de la nécroptose dans la mort des cellules épithéliales dans l'ischémie - reperfusion mésentérique, par le mécanisme de l'assemblage et de la phosphorylation du complex RIP1/3.[39] Après la mort et la desquamation des entérocytes de l'extrémité luminale des villosités, l'ischémie - reperfusion intestinale déclenche l'apoptose des cellules épithéliales des cryptes comme les cellules Paneth.[37] Les cellules Paneth sont indispensables pour la protection contre l'invasion bactérienne en sécrétant des multiples

peptides anti-microbiens.[42] L'apoptose des cellules Paneth est associée à l'augmentation de la translocation bactérienne et à l'inflammation intestinale.[43] La perte fonctionnelle des cellules Paneth contribue ainsi à la lésion locale, mais également à distance en sécrétant IL-17A pro-inflammatoires.[44]

La destruction et la restitution des cellules épithéliales intestinales dans l'ischémie - reperfusion mésentérique sont variables en fonction du temps d'ischémie et du temps de reperfusion auquel elle est mesurée (figure 3). Dans le modèle murin après 1h d'ischémie et à différents temps de reperfusion, Pontell et coll ont montré des lésions sévères de la muqueuse à 1h et 3h de reperfusion. La villosité est absente ou sévèrement desquamée. La re-épithélialisation (cicatrisation) s'amorce à partir de 6h de reperfusion.[45]

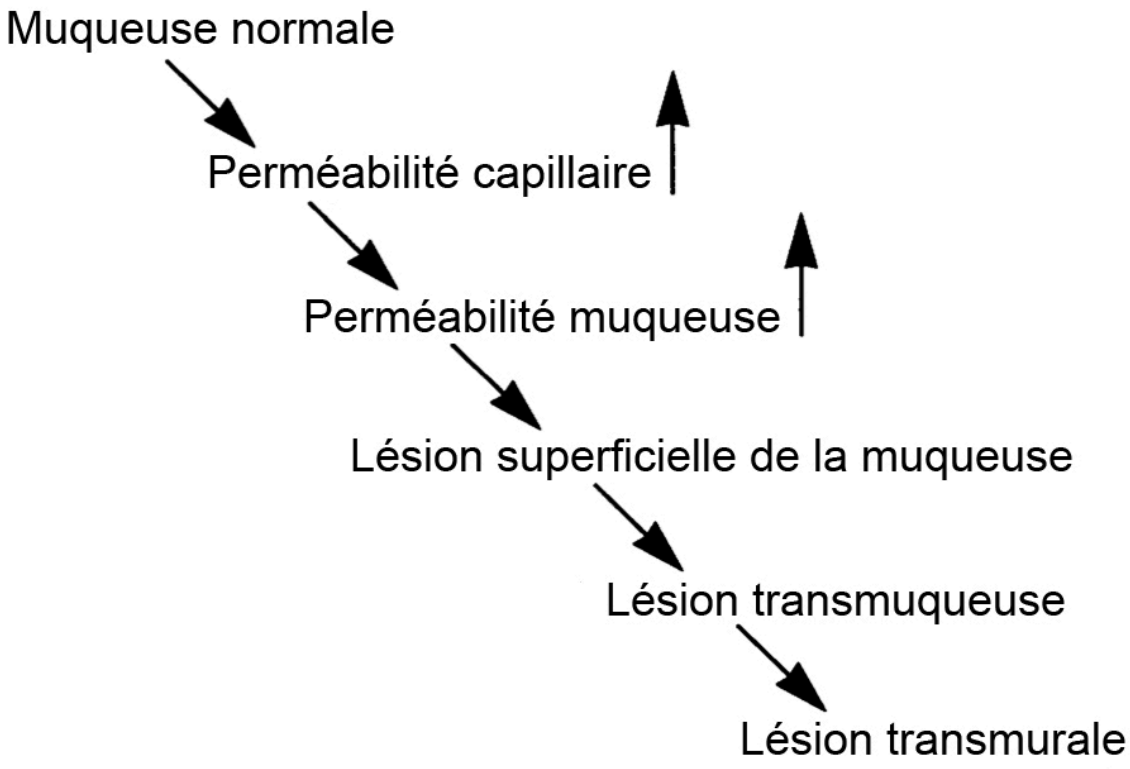


Figure 3. Le continuum de la lésion ischémique de l'intestin, de la muqueuse normale à l'infacrtus transmural[46]

La mort des cellules musculaires lisses de l'intestin grêle causée par l'ischémie - reperfusion mésentérique a été identifiée par Mei et coll, par la réaction TUNEL positive de ces cellules au sein de la lésion.[47] L'étude de Pontell et coll a montré l'histologie de la mort des cellules musculaires lisses dans l'ischémie - reperfusion mésentérique. La lésion est principalement localisée sur la musculeuse longitudinale et associée à l'extravasation de leucoccytes. Par contre, le mécanisme précis des lésions des cellules musculaires lisses de l'intestin dans

l'ischémie - reperfusion mésentérique n'a pas encore été mis en évidence.[45]

L'ischémie - reperfusion mésentérique induit aussi la mort des neurones entériques. Des études ont montré des modifications neuronales myentériques dans l'ischémie - reperfusion mésentérique comme la diminution de la taille neuronale ou la dégénération neuronale.[48,49] Dans le modèle expérimental chez les rats, le nombre des neurones myentériques dans la partie intestinale soumise sous à l'ischémie - reperfusion est diminué, indiquant la mort neuronale. De plus, le nombre relatif des neurones acidophiliques, marqueur de l'état lésionel ou la mort des neurones, est augmenté dans les ganglions myentériques à partir de 24h et dans les ganglions sous-muqueux à 72h de reperfusion après 1h d'ischémie mésentérique. La déplétion d'ATP et la défaillance de transport des ions transmembranaires actif pendant l'ischémie - reperfusion induisent une accumulation intracellulaire des ions suivie par l'influx d'eau, le changment de pH et finalement le gonflement des neurones. La perte des neurones au niveau de l'intestin est associée à l'altération de la motilité intestinale après l'ischémie - reperfusion mésentérique.[50]

2.3.3. Restitution de la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique

Les lésions de la muqueuse gastrointestinale peuvent être divisées en 2 types: profondes et superficielles. La réparation des lésions profondes prend des semaines car les régions larges de la muqueuse doivent être remplacées par le nouveau tissu. C'est un processus nécessitant une importante activité mitotique. La réparation des lésions superficielles de la muqueuse gastrointestinale est appelée “restitution” dans laquelle les cellules épithéliales de proximité s’aplatissent rapidement, étendent leurs lamellipodes et migrent pour reformer une barrière épithéliale. Cette réponse rapide a été documentée dans les études sur l'estomac, le duodénum et le colon.[51] La restitution épithéliale au niveau de jéjunum après l'ischémie mésentérique a été étudié par Ikeda et coll[51], et au niveau d'iléum par Pontell et coll.[45] La restitution rapide survient après 75 min de reperfusion succédant à 15 min d'ischémie. Après 60 min d'ischémie, la fréquence de restitution est considérablement diminuée.[51]

La restitution de la muqueuse intestinale est associée aux cellules caliciformes. Elles résident sur toute la longueur de l'intestin et sont responsables de la production et du maintien de la couverture muqueuse protectrice en synthétisant et secrétant des glycoprotéines de haut poids moléculaires que sont les mucines.[45]

2.3.4. Mécanisme de la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique

La sensitivité de l'intestin grêle à l'ischémie - reperfusion est d'origine de 2 facteurs: (1) l'intestin grêle possède une grande quantité des enzymes de xanthine dehydrogenase et xanthine oxidase qui sont nécessaires pour le production des radicaux d'oxygène libre et (2) il contient une flore bactérienne abondante qui peut entrer dans la circulation systémique et détériore les organes à distance.[35] Le mécanisme de la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique est multiple (figure 4).

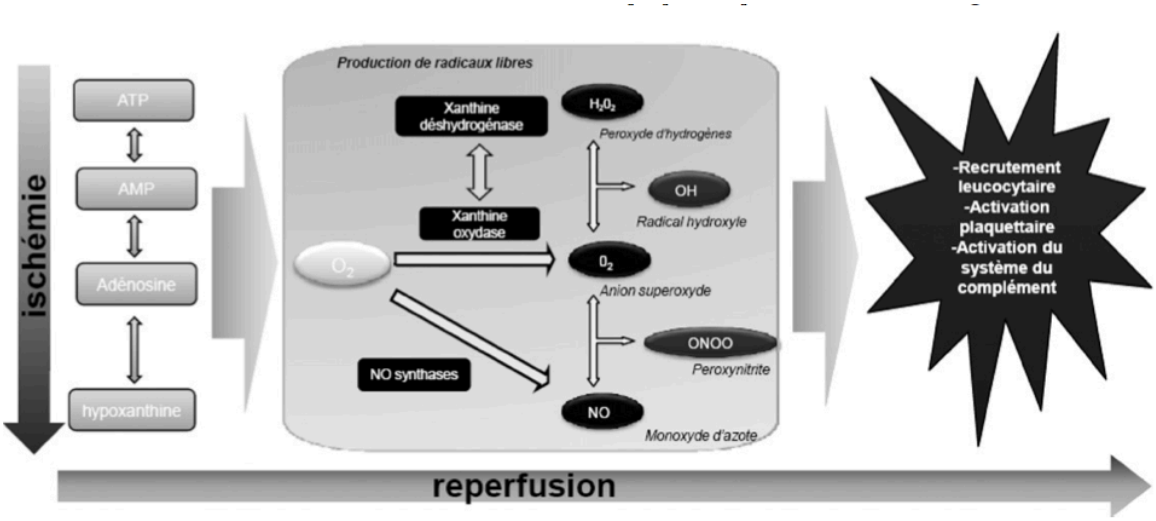


Figure 4. Physiopathologie des lésions d'ischémie - reperfusion.[4]

2.3.4.1. Xanthine oxidase et radicaux d'oxygène libres

La xanthine oxidase est une enzyme très versatile qui joue un rôle important dans le catabolisme de purines. L'intestin grêle est la ressource la plus riche de radicaux libres qui peuvent causer la lésion des autres tissus. La xanthine deshydrogénase (XDH) peut être convertie à la xanthine oxidase réversiblement et irréversiblement chez les mammifères. Au cours de la période ischémiqueémique, l'ATP cellulaire est métabolisé pour donner de l'hypoxanthine. Le stress hypoxique déclenche également la conversion de XDH à XO radicaux d'oxygène producteur. La déplétion d'ATP résulte la perte de la régulation des canaux d'ions ATP dépendants qui induit des passages d'ions passifs à travers les membranes cellulaires: K^+ et Mg^{2+} sortent, mais Na^+, Ca^{2+} et H_2O entrent, ce qui provoque le gonflement des cellules. L'augmentation de Ca^{2+} est déplétée avec une des concéquences importantes est l'activation d'une protéase calcium-dépendante qui clive la XDH à la XO. Pendant la reperfusion, l'oxygène moléculaire est réintroduit dans le tissu où il se réagit avec l'hypoxanthine et la XO pour produire des radicaux d'oxygène libres, anion superoxide (O_2^-)

(figure 5) et hydrogène peroxide (H_2O_2).[33]

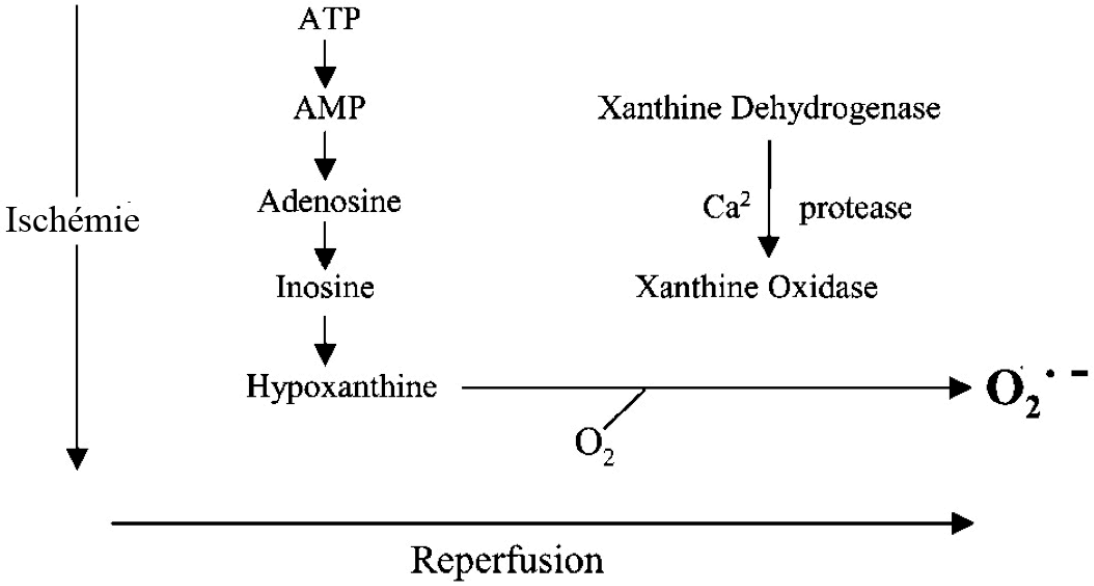


Figure 5. Mécanisme de la lésion induite par la xanthine oxidase[33]

Dans les conditions physiologiques, l'effet déplété de O_2^- est prévenu par la superoxide dimutase (SOD) qui convertit O_2^- en H_2O_2. Cependant, lors de la reperfusion des tissus ischémiques, ce mécanisme de défense naturelle peut être surmonté. Le O_2^- est un radical avec son énergie relativement faible, mais il est responsable de la production de radical très réactif et lésionnel ($OH^•$). L'$OH^•$ cause la lésion biologique via la stimulation de chaîne de réaction libre connue sous le nom de la peroxidation lipidique, dans laquelle l'$OH^•$ attaque les acides lipidiques sur la membrane phospholipide et cause la perturbation des organites et des cellules.[33]

La figure 6 montre la production des radicaux d'oxygène libres dans la paroi vasculaire. La production des radicaux d'oxygène libres est d'origine aussi neutrophilaire. Nalini et coll ont montré que ce n'est pas XO mais neutrphiles qui est la source initiale des radicaux d'oxygène libres dans un modèle de la lésion d'ischémie - reperfusion intestinale chez les rats.[52]

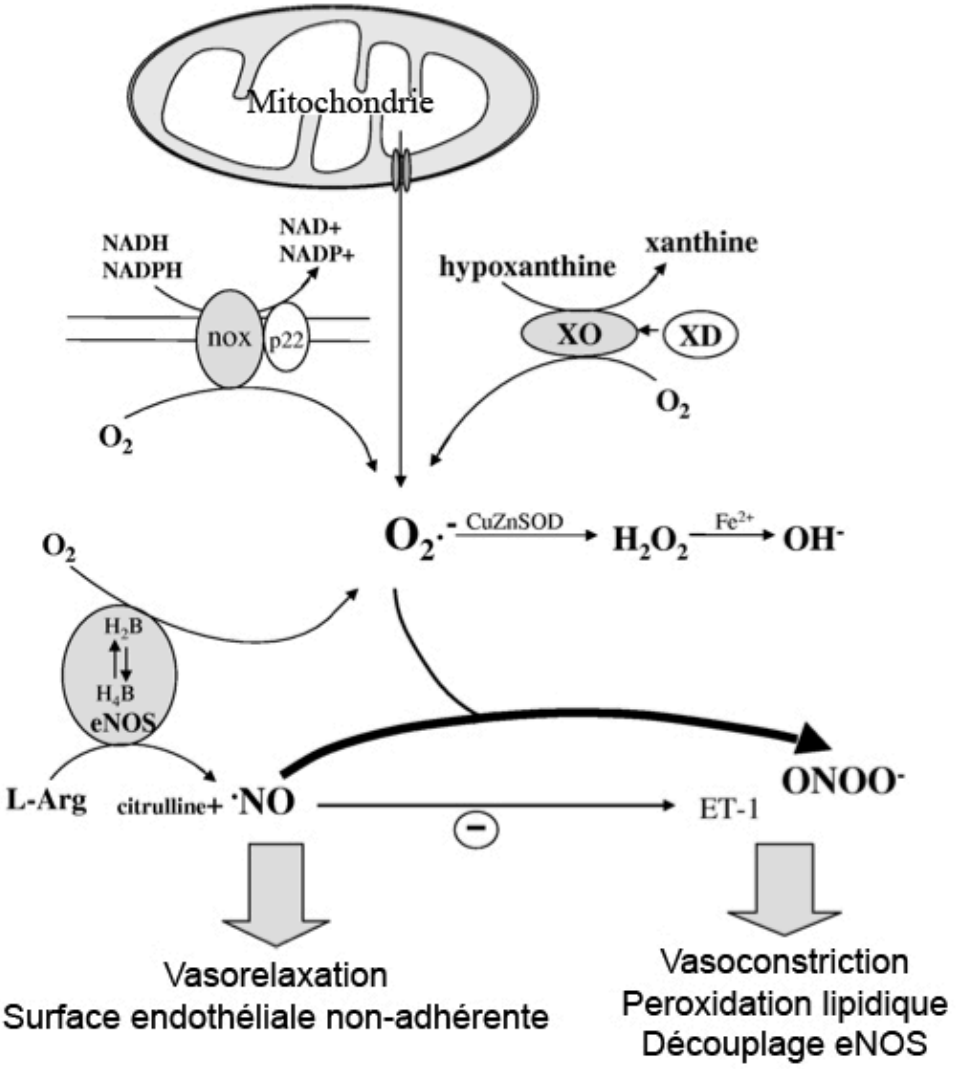


Figure 6. La production des dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS) dans la paroi vasculaire pendant l'ischémie - reperfusion. Dans la condition physiologique, eNOS (endothelial NO synthetase) forme NO et citrulline de L-arginine. Le NO, directement ou par inhibition de la libération ET-1, favorise la vasorelaxation. Il y a une inbalance déséquilibre entre la formation de NO et $O_2^{\cdot -}$. Les enzymes qui contributent à la production augmentée de $O_2^{\cdot -}$ sont la chaîne mitochondriale de transport d'électron, NADPH oxidase, xanthin oxidase (XO) et eNOS. $O_2^{\cdot -}$ excessive inactive NO via la formation de peroxinitrite ($ONOO^-$) et la conséquence est la diminution de la relaxation endothélium-dépendante et la vasoconstriction éventuelle. $ONOO^-$ est un oxidant potentiel qui influence la peroxidation lipidique et la découplage de eNOS. $O_2^{\cdot -}$ peut être dismuté en H_2O_2 et en présence des ions métaliques, H_2O_2 peut être métabolisé en radical hydroxyl. L-Arg, L-arginine; H2B, dihydrobiopterin; H4B, tetrahydrobiopterin; XD, xanthine dehydrogenase; SOD, superoxide dismutase.[53]

2.3.4.2. Endothéline (ETs)

L'ETs est un vasoconstrictor peptidique puissant dérivé de l'endothélium vasculaire.[54] Dans

les 3 isoformes actives (ET-1, ET-2 et ET-3), l'ET-1 est le plus puissant vasoconstricteur endogène connu jusqu'à maintenant. L'effet de vasoconstriction de l'ET-1 est prédominemment médié par les récepteurs ET-A présents sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux. Les récepteurs ET-B médient la vasoconstriction (ET-B2) et la vasodilatation (ET-B1).[33] L'antagonist de récepteur ET protège significativement la lésion d'ischémie - reperfusion intestinale.[55-57] Les effets principaux de l'inhibition d'ET sont la diminution des lésions muqueuses, l'augmentation de flux sanguin, l'augmentation d'ATP muqueuse et la diminution de l'adhésion leukocytaire.[58]

2.3.4.3. Protéines de choc thermique

Les protéines de choc thermique (heat shock proteins, HSPs) sont des protéines intracellulaires qui sont exprimées pour accumuler après l'ischémie. Dans l'intestin du rat, la tolérance à la lésion ischémique est associée à la production des divers protéines de choc thermique inductibles: HSP-70, HSP-72, et HSP-73. Le mécanisme exact par lequel HSPs confèrent la protection intestinale contre la lésion d'ischémie - reperfusion intestinale n'est pas encore connu. Stojadinovic et coll ont montré un mécanisme probable qui concerne l'inhibition de la production de leukotriene-B4 et la prévention ultérieure de l'activation et la chimiotaxie neutrophilaire.[33]

2.3.4.4. Nitric oxide (NO)

NO est un radical libre et un substant très réactif. NO est synthétisé de L-arginine par une famille des enzymes connues sous le nom NO synthétase (NOS).[33]

Il y a 3 isoformes identifiées de NOS : NOS endothélial (eNOS), neuronal (nNOS) et inductible (iNOS).[59] Les ressources possibles de NO dans l'intestin grêle sont le tissu intestinal intrinsèque (épithélium, mastocytes, muscle lisse et plexus neuronal) et leucocytes (neutrophiles et monocytes).[33]

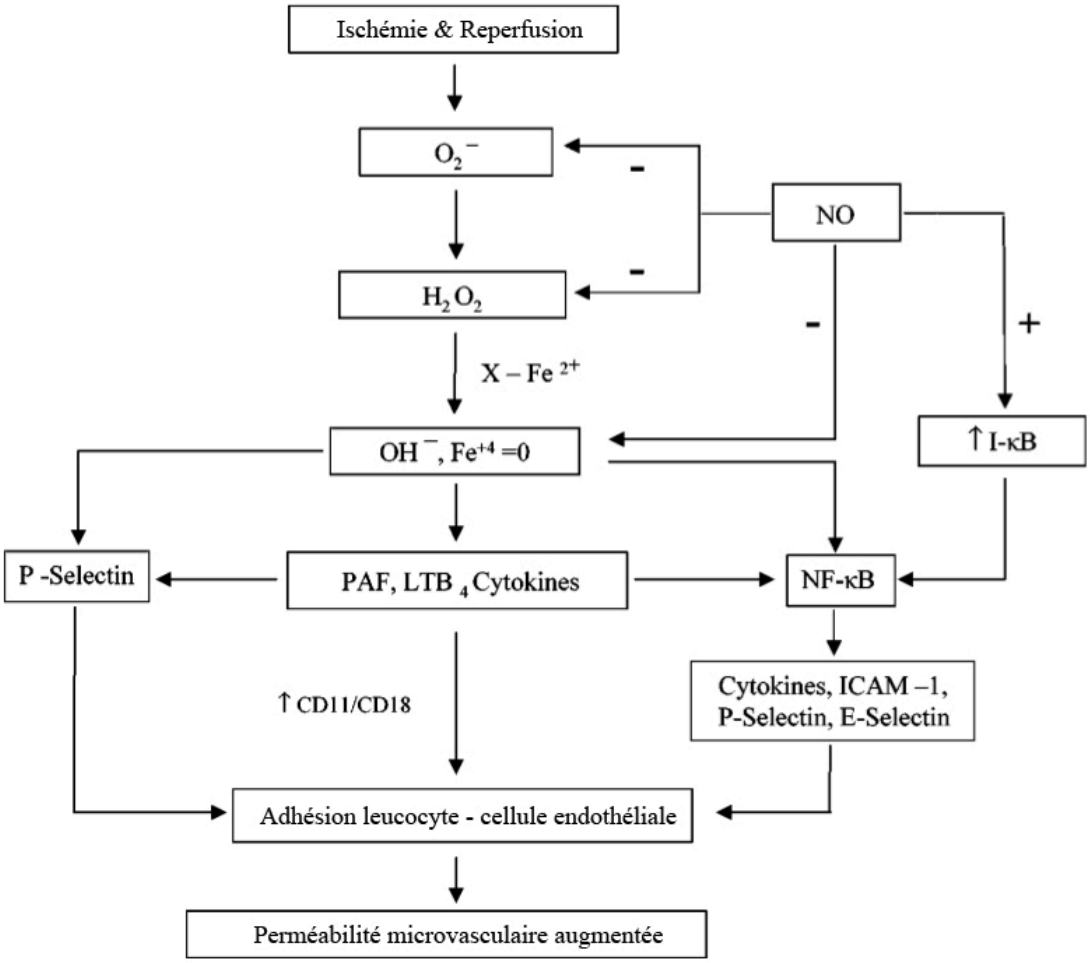


Figure 7. Rôle de NO dans la lésion d'ischémie - reperfusion intestinale.[33]

Le rôle de NO dans la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique (figure 7) est encore considérablement controversé. Il joue un rôle double comme une molécule cytotoxique et cytoprotective dans la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique dans laquelle l'inhibition de NO cause la dysfonction tissulaire dans certains modèles et donne le bénéfice dans les autres.[33] Les formes constitutives de NOS (nNOS et eNOS) sont cruciales pour la physiologie normale et l'inhibition de ces enzymes cause la lésion tissulaire.[33,60] L'induction d'iNOS produit une grande quantité de NO et peroxynitrite qui causent la lésion tissulaire, et l'inhibition spécifique de cette enzyme est donc considérée comme bénéfique.[33] De plus, les souris knocknout d'iNOS ont montré une résistance significative à la dysfonction de la barrière épithéliale et à la translocation bactérienne après la lésion d'ischémie - reperfusion intestinale. Ce résultat a supporté le rôle d'iNOS comme une médiateur important de la lésion de reperfusion dans l'intestin grêle.[61] Au contraire, Cuzzocrea et coll ont mis en évidence que la production de peroxynitrite n'est pas associée à l'induction d'iNOS mais à l'inhibition d'eNOS.[62] Wu et coll ont montré que la formation d'iNOS après la lésion d'ischémie -

reperfusion intestinale induit l'apoptose de la muqueuse.[63] La lésion pulmonaire après la lésion d'ischémie - reperfusion intestinale est associée à la diminution de l'expression d'eNOS dans le poumon. L'expression d'iNOS qui survient pendant la période tardive de la reperfusion avec la surproduction de NO et la nitrosylation de la protein tyrosine résidues aggravent la lésion pulmonaire.[33]

Le NO a beaucoup d'effets bénéfiques dans l'intestin grêle comme le nettoyage des radicaux libres d'oxygène, la maintenance de la perméabilité vasculaire normale, l'inhibition de la prolifération de muscle lisse, la réduction de l'adhésion leucocytaire sur l'endothélium mésentérique, la prévention de l'activation mastocytaire et l'inhibition de l'aggrégation plaquettaire.[33]

Dans la physiologie normale, le NO est majoritairement localisé dans la microcirculation.[64] Il y a cependant une accumulation de O_2^- pendant la phase précoce de la reperfusion. Les neutrophiles ont ainsi la tendance d'adhérer sur l'endothélium et les plaquettes ont tendance d'aggréger. En absence de NO, le O_2^- sera spontanément dismuté pour former H_2O_2. La H_2O_2 formée par cette voie peut favoriser l'activation de phospholipase A2 (PLA2) et dirige à l'accumulation des médiateurs pro-inflammatoires comme le PAF (platelet activating factor) et leukotriènes (Figure 7). Ces changements peuvent induire l'activation de la transcription de NF-κB (nuclear factor kappa B) qui est le régulateur primaire de l'expression des gènes des cytokines et des molécules d'adhésion.[33] L'activation de la voie NF-κB est montrée impliquée dans la lésion cellulaire de la période de reperfusion.[7,65] La perte de la production endogène de NO donne des conséquences graves qui résultent la dysfonction de l'endothélium et la lésion tissulaire médiée par les neutrophiles.[33]

2.3.4.5. Hème oxygénase (HO)

L'expression de HO-1 dans certains modèles de la lésion d'ischémie - reperfusion intestinale a été montrée comme un cytoprotecteur dans la cascade lésionnelle d'ischémie - reperfusion intestinale.[66-69] La HO-1 est une enzyme limitant le taux de conversion de l'hème en carbon monoxide (CO), biliverdine et ion de fer (Fe^{2+}).[33] Le système de HO-1 est censé de jouer un rôle pivotal dans la maintenance de l'homéostase oxidante et antioxidante pendant la lésion cellulaire. Il a 4 effets bénéfiques majeurs : (a) fonction antioxidante, (b) maintenance de la microcirculation, (c) anti-apoptose et (d) fonction anti-inflammatoire.[70] Vachharajani et coll ont mis en évidence que HO-1 et biliverdine modulent le recrutement leucocytaire en altérant

l'expression de P- et E-selectin dans l'intestin, le poumon, le foie et le rein.[71] La HO-1 inhibe aussi le système NO en régulant la sous-expression d'iNOS.[72]

2.3.4.6. Protéines pro-inflammatoires

Le NO joue le rôle clés dans la synthèse des protéines pro-inflammatoires[73]. Le NO peut être avoir l'effet sur le niveau de transcription, probablement par la régulation de NF-κB, qui régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le processus de la lésion d'ischémie - reperfusion.[74] Le NF-κB est normalement trouvé dans le cytoplasme des cellules non-stimulées sous la forme inactive; par exemple le complexe tertière p50/p65/I-κB ou le complexe p65/p105. La stimulation des cellules avec certains cytokines, oxidants ou médiateurs pro-inflammatoires comme le PAF ou leucotriènes cause une phosphorylation et une ubiquitination des sous-unités I-κB ou p105 (figure 8).[33] Ce phénomène résulte la translocation de la sous-unité dans le noyau cellulaire pour activer la transcription des gènes ciblés. Le NF-κB induit l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, P-selectin, E-selectin), TNF-α, interleukines, chémokines et enzymes (iNOS et cyclooxygénase 2).[75,76] Dans la lésion d'ischémie - reperfusion, la ré-oxygénation est la stimulation clés dans la régulation de NF-κB. La régulation de sur-expression des molécules d'adhésion est inhibée quand il y a une bonne maintenance entre la sous-unité I-κBα et NF-κB.[77] Le NO prévient la formation des substances qui activent le NF-κB et améliore l'activité des protéines qui inhibent le NF-κB. Les études avant ont montré que le NO peut induire la synthèse ou stabilise la sous-unité I-κBα donc limite l'activation du NF-κB.[78]

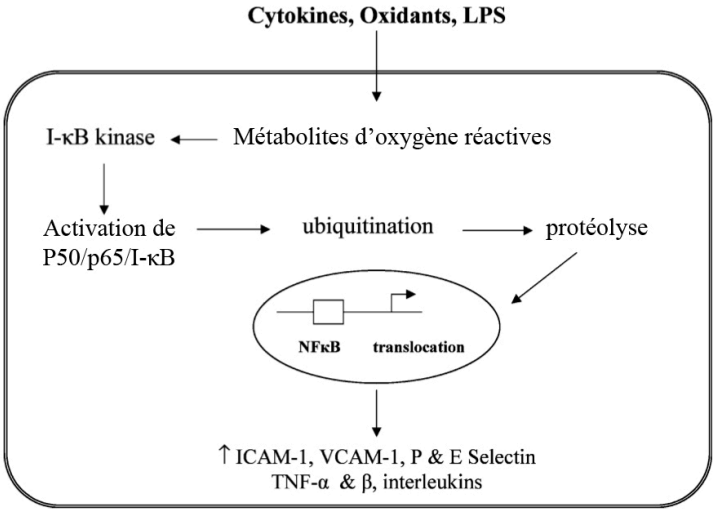


Figure 8. Stimulation cellulaire avec les cytokines.[33]

2.3.4.7. Complément

Quelques études suggèrent que le système de complément est un cadidat majeur dans la physiopathologie de la lésion d'ischémie - reperfusion intestinale.[79-82] La P-selectin a été montrée comme un médiateur de la lésion d'ischémie - reperfusion intestinale via le dépôt de complément (C5b-9) sur la muqueuse intesinale.[83] L'activation de la cascade des compléments induit une série des phénomènes inflammatoires puissants, l'expression de gène d'ICAM-1 et la régulation active des cytokines comme TNF-α et IL-1α.[81] Montalto et coll ont justifié que le complément régule activement l'iNOS intestinal et diminue le taux de protéine de la superoxide dismutase (SOD) mitochondriale.[84] Une étude récente a montré que l'inhibition de complément C5a améliore l'hémodynamique et diminue l'activation inflammatoire et les signes histologiques de la lésion muqueuse dans un modèle de l'IMNO.[85]

2.3.5. Rôles des cellules dans la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique

2.3.5.1. Cellules endothéliales

La classe interne des vaisseaux sanguins, l'endothélium vasculaire, est un organe actif avec l'activité de paracrine, d'endocrine, et d'autocrine. Elle est cruciale pour la régulation du tonus vasculaire et la maintenance de l'homéostase vasculaire. Elle produit le NO (endothelium-derived relaxing factor nitric oxide) et les autres molécules vasodilatatrices, prostacycline et EDHF (endothelium-dependent hyperpolarizing factor) compris. Les cellules endothéliales produisent aussi les vasocontracteurs comme endothéline-1 (ET-1) et thromboxane. L'$O_2^{\circ -}$ est aussi classifié comme un vasoconstricteur dérivé par les cellules endothéliales.[53]

La dysfonction de la barrière endothéliale est une réponse bien connue de la microvasculature à différentes conditions pathologiques associées à l'inflammation. La reperfusion du tissu ischémique antérieurement provoque une réponse dans la microvasculature qui est très similaire à l'inflammation. L'ischémie - reperfusion résulte une augmentation de la production des radicaux d'oxygène libres et les médiateurs pro-inflammatoires et une augmentation de la perméabilité vasculaire.[86] La dysfonction de la barrière endothéliale qui est caractérisée par une perméabilité endothéliale augmentée est importante dans le développement de la défaillance multiviscérale.[86,87] Olanders et coll ont noté une augmentation de la fuite d'albumine travers la barrière endothéliale dans la majorité des organes à 12h de reperfusion après 40 min d'ischémie intestinale. Cette étude a montré aussi que la perméabilité de la barrière endothéliale augmente en même temps avec la possibilité de la consommation induite et/ou l'inactivation des inhibiteurs de protéases.[88] Sun et coll ont mis en évidence que la

dysfonction endothéliale développe à la nécrose via le mécanisme de la mort cellulaire à membrane compromise pendant la phase précoce de reperfusion avec l'imbalance protéase - antiprotéase.[87]

L'ischémie - reperfusion résulte aussi une réponse microvasculaire caractérisée par l'expression des molécules d'adhésion et le recrutement neutrophilaire.[89] La migration des neutrophiles des venules postcapillaires à la zone inflammatoire est complexe et médiée par la régulation active des molécules d'adhésion comme P-selectin et L-selectin sur la surface endothéliale et leur interaction avec L-selectin exprimé constitutivement sur les leucocytes. Il y a aussi le rôle des autres molécules comme d'ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) et VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule 1) exprimées sur le cellules endothéliales.[33] L'étude de Cooper et coll a indiqué que la lésion d'ischémie - reperfusion intestinale induit une réponse d'adhésion plaquette - endothéliale dans les venules postapillaires via le mécanism concernant PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) et P-selectin plaquettaire et endothéliale, avec P-selectin plaquettaire jouant le rôle plus important.[89]

2.3.5.2. Plaquettes

La contribution des plaquettes est connue maintenant dans la réponse inflammatoire et lésionnelle à l'ischémie - reperfusion.[89,90] L'ischémie - reperfusion est une des stimulaions qui induit l'interaction plaquette - endothéliale dans la microcirculation. L'intensité de l'adhésion plaquettaire dépend de la durée de l'ischémie. Il y a certains des glycoprotéines exprimées sur les plaquettes, cellules endothéliales et leucocytes peuvent médier l'adhésion plaquettaire dans la microcirculation. Les plaquettes peuvent attacher sur les cellules endothéliales activées en absence de la dénudation endothéliale dans certaines circonstances inflammatoires comme l'ischémie - reperfusion (figure 9). Les molécules d'adhésion concernées dans l'adhésion plaquettaire dans l'ischémie - reperfusion sont les GPIIb/IIIa plaquettaires, les facteur von Willebrand (vWF), PSGL-1 et P-selectin plaquettaires et endothéliales et l'ICAM-1 endothéliale.[89,91] Les plaquettes peuvent attacher directement aux cellules endothéliales avec les récepteurs glycoprotéiques comme GPIIb/IIIa qui lient aux ligands exprimés sur les cellules endothéliales comme vWF, ICAM-1 et P-selectin. La P-selectin plaquettaire peut aussi attacher aux ligands pas connus sur l'endothélium de venules. Les plaquettes attachées peuvent créer une plate-forme sur laquelle les leucocytes peuvent roller et établir une adhésion solide. Quand les leucocytes attachés expriment aussi le PSGL-1, les plaquettes peuvent arrêter sur ces cellules stationnées via l'interaction entre la P-selectin et la PSGL-1.[91]

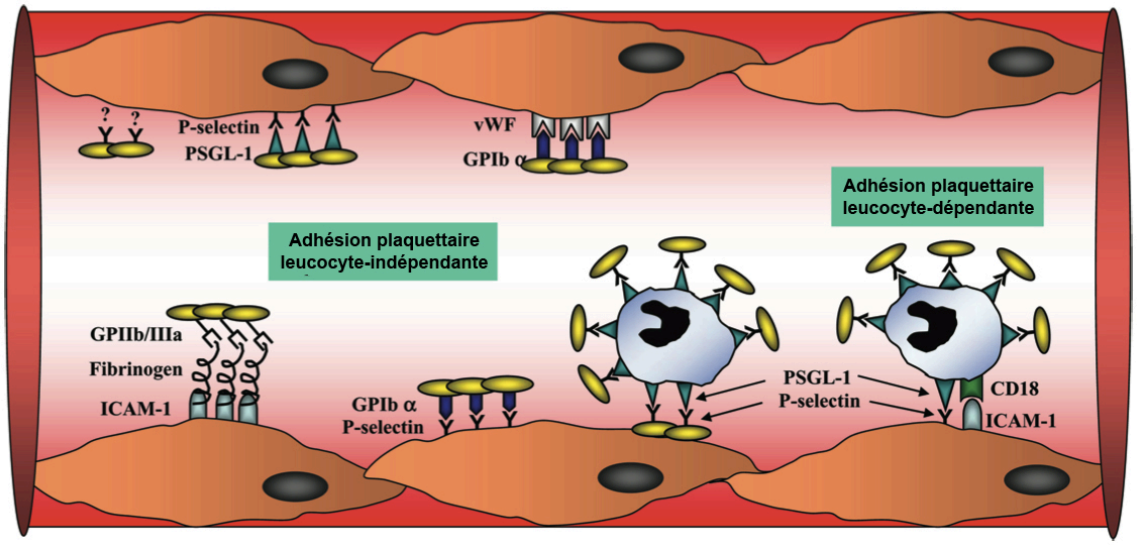


Figure 9. Modèle proposé de mécanisme d'adhésion plaquettaire sur l'endothélium.[91]

Malgré que l'adhésion plaquettaire dans la microcirculation a été bien montrée dans certains modèles animaux des maladies humaines, l'importance physiopathologique de cette réponse microvasculaire n'est pas encore claire. Les études sur l'ischémie - reperfusion intestinale montrent que l'accumulation plaquettaire dans la microcirculation pendant la phase de reperfusion favorise le recrutement leucocytaire. Ce phénomène exacerbe ainsi l'intensité de la réponse inflammatoire. Le mécanisme de lésion causée par les plaquettes accumulées dans la microcirculation est encore également mal défini. Les plaquettes sont capables de libérer certains produits potentiellement cytotoxiques (par exemple: hydrogène peroxide) ou pro-apoptotique (calpain, transforming growth factor β - TGF-β). De plus, les plaquettes peut causer la lésion en altérant la perfusion microvasculaire via la libération des vasoconstricteurs (par exemple: thromboxane) ou l'obstruction physique.[91]

2.3.5.3. Neutrophiles

A. Activation et migration neutrophilaire

Neutrophiles polynucléaires se comportent supérieur de 50% des leukocytes circulants.[92] Ils constituent une des types cellules les plus puissantes de la protection contre les bactéries.[92-94] Ils jouent aussi le rôle clés dans la réponse inflammatoire sévère à la lésion d'ischémie - reperfusion.[95] Ils sont des cellules primaires qui répondent après l'ischémie - reperfusion et représentent les composants importants dans la réponse inflammatoire prolongée et la sévérité associées à lésion d'ischémie - reperfusion. Ils circulent dans le sang en état dormant avec un efficient très faible d'être capturés et arrêtés sur l'endothélium normal. Dès l'infection et

l'inflammation, les médiateurs pro-inflammatoires induisent les changements sur l'endothélium vasculaire qui donnent les signaux aux neutrophiles circulants pour leurs mobilisation, adhésion et pénétration au travers de l'endothélium (figure 10).[92] De plus, le tissu ischémique et les macrophages tissulaires sur le site d'ischémie libèrent les dérivés réactifs de l'oxygène et les cytokines. Les dérivés réactifs de l'oxygène activent les compléments et conduisent la chémotaxie de neutrophiles dans le tissu ischémique, à côté de IL-1 et C5a qui initient une neutrophilie rapide. Les compléments et cytokines adhèrent aux neutrophiles activés sur le site d'ischémie. Ce phénomène favorise la production des autres cytokines et régule la surexpression des molécules d'adhésion. C5a adhère au récepteur de C5a sur la neutrophile (C5aR) et stimule NF-κB qui initie la transcription de TNF-α, IL-8 et IL-6. TNF-α favorise la production de IL-1 et régule la surexpression des intégrines CD11/CD18 qui sont nécessaires pour une adhésion solide à la cellule épithéliale/endothéliale permettant la pénétration de la barrière endothéliale/épithéliale. IL-8 favorise la netrophilie et IL-6 stimule la granulopoiésie dans la moelle osseuse. La réponse extrême de l'infiltration neutrophilaire passe les mécanismes de protection, et conduit au circuit de feedback positive de la mobilisation, production, recrutement, migration et lésion excessive au-delà de cette initiale lésion.[96]

Les études récentes ont montré le rôle clés de neutrophiles dans la physiopathologie de l'ischémie - reperfusion mésentérique.[97-99] Le résultat histologique de l'étude de Schofield et coll[96] a illustré aussi l'infiltration neutrophilaire et la destruction des villi dans la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique. L'activation neutrophilaire joue un rôle critique dans l'inflammation intestinale induite par l'ischémie - reperfusion.[100] La déplétion neutrophilaire a été montrée comme la protection intestinale de la lésion muqueuse tardive et l'offre de la protection des organes à distance.[101-103]

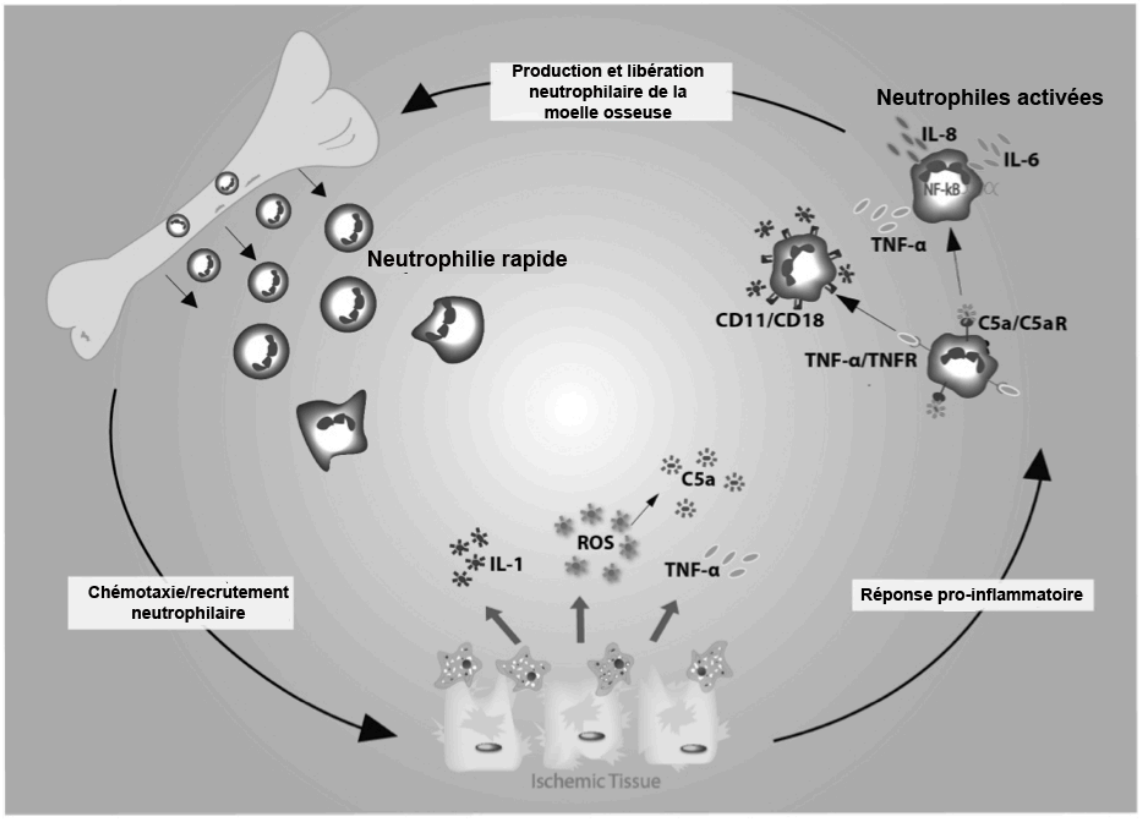


Figure 10. Circuit de feedback positive de la libération et du recrutement neutrophilaire.[96]

La surveillance intravitale microscopique des tissus présentant l'ischémie - reperfusion révèle une réponse inflammatoire caractérisée par l'augmentation d'adhésion et la migration des neutrophiles dans les venules postcapillaires. La migration neutrophilaire des venules postcapillaires à la zone inflammatoire (figure 11) est un processus complex qui a 3 étapes connues sous les noms de roulement, d'adhésion et d'extravasation.[33]

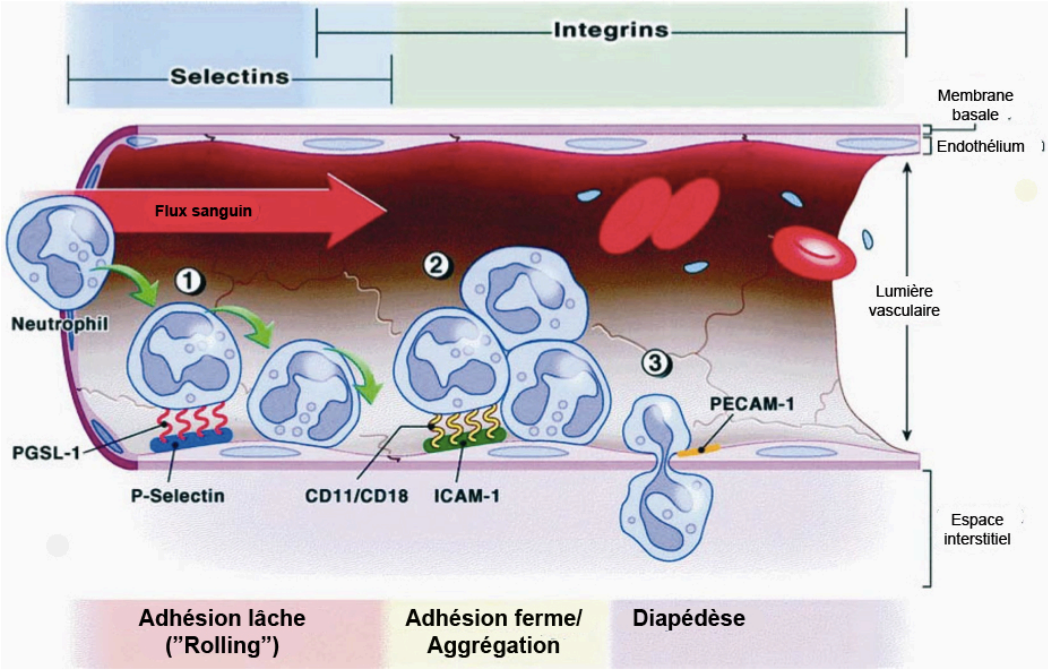


Figure 11. Séquence des événements de la migration des neutrophiles[33]

Les neutrophiles ne sont pas seulement activés par la ligation des récepteurs couplés à la protéine G (GPCRs) avec les chémokines et les autres chémoattractants mais encore par les signaux reçus des molécules d'adhésion comme les selectins et les intégrines β2. Quand le seuil d'activation est atteint, les intégrines β2 sont changées aux formes à l'affinité haute et redistribuées sur la surface cellulaire et déclenchent l'arrêt et l'adhésion.[104] Les leucocytes roulent d'abord sur la surface endothéliale.[33] Le premier contact entre les neutrophiles et l'endothélium appelé la capture est médié par les selectins et leurs récepteurs[94], comme le P-selectin et E-selectin sur l'endothélium et L-selectin exprimée sur les leucocytes.[33] La liaison des selectins fait les neutrophiles approcher les chémokines présentées par les cellules endothéliales qui induisent l'activation des voies de signalisation de neutrophiles. Cette activation cause le changement des les intégrines β2 (CD11a, CD11b et CD11c/CD18).[33,94] Les intégrines activées attachent aux molécules d'adhésion comme ICAM-1 et VCAM-1 exprimées sur les cellules endothéliales.[33] Pendant l'interaction avec l'endothélium, les leucocytes reçoivent encore les signaux de PSGL-1, L-selectin, GPCRs et intégrines qui peuvent activer les différentes voies de signalisation et induisent la transmigration au travers des cellules endothéliales, la libération brusque des molécules réactives d'oxygène et la dégranulation.[104]

B. Mécanisme de lésion causée par les neurophiles

Les neutrophiles peuvent causer la lésion tissulaire par quelques mécanismes (figure 12) comme (1) la production des radicaux libres d'oxygène, (2) la sécrétion des enzymes protéolytiques via la dégranulation et (3) l'occlusion physique de la microcirculation avec l'extension de l'ischémie.[33]

La production des radicaux libres d'oxygène est une des réponses fonctionnelles des neutrophiles pour accomplir leur rôle de la défense immunitaire. Cette réponse peut être déclenchée par les médiateurs inflammatoires comme le C5a et l'IL-8. Leurs récepteurs, comme les GPCRs, induisent rapidement les voies de signalisation qui dirigent à l'assemblage de la NADPH (nicotinamide adenin dinucleotide phosphate) oxidase. Ce complexe oxidase multiprotéine est dormant dans les cellules quiescentes dans lesquelles ses composants sont séparés dans le cytosol et les compartements membranaires. Après d'être stimulés, ses composants assemblent rapidement sur la membrane cellulaire et l'enzyme devient activée et permet la réduction NADPH-dépendante de l'O_2 au forme superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$) et les radicaux dérivés comme le hydrogène peroxide (H_2O_2), le radical hydroxyl (OH.) et acide hypochloreux (HClO). La production des radicaux libres d'oxygène est cruciale pour la défense contre les pathogènes mais elle contribue aussi à la lésion tissulaire.[105]

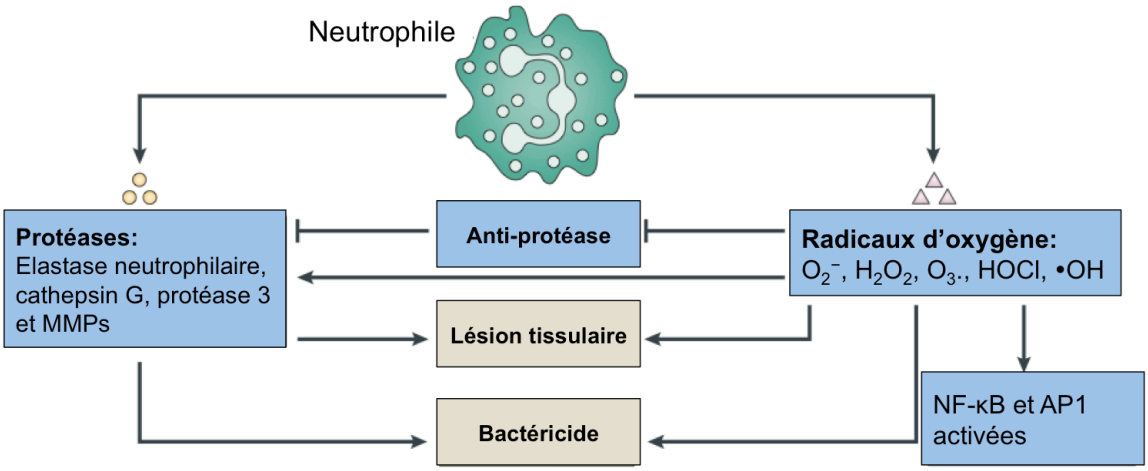


Figure 12. Mécanismes de la lésion tissulaire induite par neutrophiles.[106]

Les neutrophiles sont des leucocytes très mobiles et contiennent à forte densité des granules sécrétoires. Les neutrophiles libèrent les médiateurs granule-dérivés par la dégranulation, ou l'exocytose, de granules sécrétoires attachées à la membrane. Les neutrophiles contiennent au moins 4 différents types de granules: (1) granules primaires, connues sous le nom des granules azurophiliques; (2) granules secondaires, connues sous la nom granules spécifiques;

(3) granules tertières et (4) vésicules sécrétoires (Figure 13).

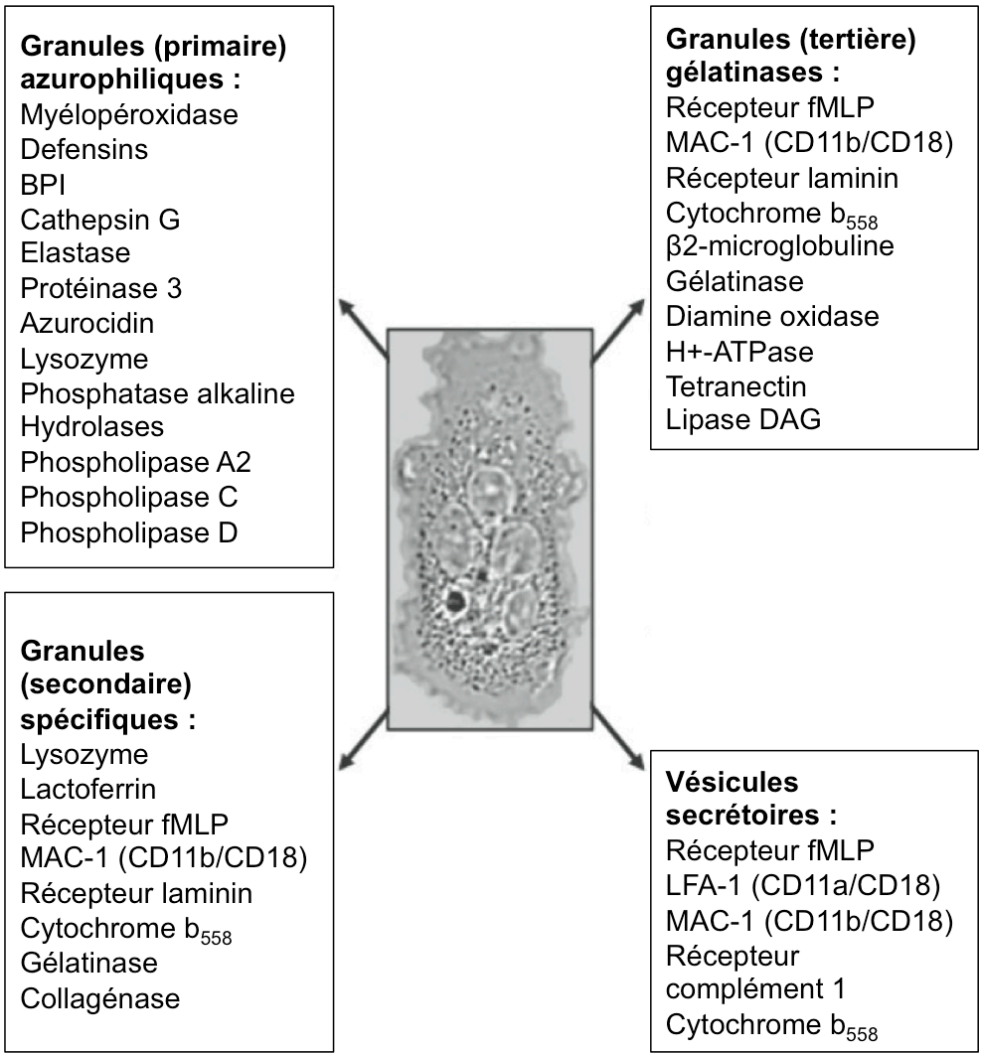


Figure 13. Résumé des granules neutrophilaires et leurs contenus.[107]

Pour tuer et dégrader les pathogènes potentiels, les neutrophils sont armées avec une variation de substances anti-microbiennes et protéases. La majorité de ces molécules est stockée dans les granules cytoplasmiques pour assurer une quantité pleine qui sont prête d'être utilisée. De plus, parce que certaines des substances sont non spécifiques et peut-être toxiques pour le corps, la contenance de ces molécules dans les granules peut prévenir la lésion tissulaire et neutrophile elle-même. Cependant, si les neutrophiles sont stimulés ou activés de façon continue, une libération accrue du contenu de leurs granules peut entrainer des lésions tissulaires touchant la matrice extracellulaire et l'environnement péri-cellulaire.[108]

Les granules primaires constituent le site de stockage principal des médiateurs les plus toxiques tels l'élastase, la myéloperoxidase (MPO), la cathepsine et les defensines. Les granules secondaires et tertiaires contiennent principalement la lactoferrine et la MMP-9

(matrix metallopreotease 9, connue aussi sous le nom de gélatinase B), respectivement. Par ailleurs, les vésicules sécrétoires des polynucléaires neutrophiles humains contiennent de l'albumine, ce qui suggère leur origine extracellulaire par endocytose de la membrane plasmique. Les granules sont retenus dans le cytosplasme du neutrophile jusqu'à l'activation d'un recepteur membranaire induisant leur mouvement vers la membrane plasmique ou phagosomale et la sécrétion granulaire. La membrane des granules s'attache alors et fusionne avec la membrane plasmique ou phagosomale pour libérer leur contenu vers le milieu extra-cellulaire ou à l'intérieur d'un phagosome. La libération des médiateurs granulaires fait intervenir un couplage de récepteurs étroitement contrôlé et impliqué dans le phénomène d'exocytose. Ainsi, la translocation et l'exocytose des granules nécessitent l'activation et le recrutement de nombreuses voies de signalisation impliquant le Ca^{2+}, les phospholides ou la famille des kinases src.[109]

En dehors de la dégranulation, les neutrophiles activés peuvent être à l'origine des NETs (neutrophil extracellular traps), autre mécanisme de défense antimicrobienne. Les NETs (figure 14) contiennent des granules et des protéines antimicrobiennes comme l'histone, l'élastase, la myéloperoxidase (MPO), la pentraxine, la lactoferrine et la cathepsine G.[95] Par ailleurs, la formation de NETs (NETosis) induit une mort du polynucléaire neutrophile impliqué, mort cellulaire à part entière différenciée de l'apoptose et de la nécrose.[110,111] En effet, la formation de NETs induit la dissolution de l'enveloppe du noyau et des granules cytoplasmiques autorisant une interaction entre la chromatine et les protéines antimicrobiennes granulaires via la NADPH oxidase et la voie Raf-MEK-ERK.[112] Ce mécanisme immunitaire important de la lutte contre les pathogènes peut cependant participer au développement de lésions tissulaires en cas de formation excessive et inadaptée de NETs, comme c'est le cas dans l'ischémie - reperfusion.[95]

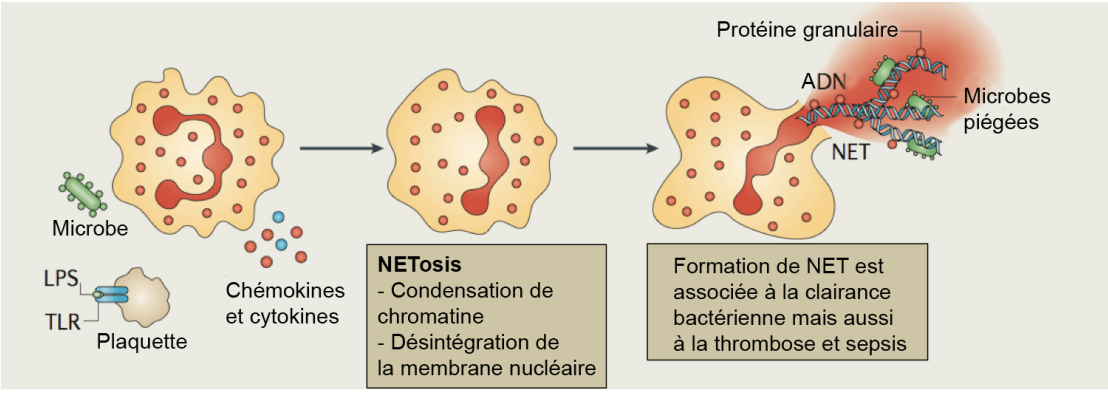


Figure 14. Formation des NETs.[113]

2.3.6. Rôle des molécules impliquées dans l'ischémie - reperfusion mésentérique

2.3.6.1. ADN libre

L'ADN libre circulant est un marqueur plasmatique associé à la formation de NETs.[95] *In vitro*, la production des NETs entraine une augmentation de l'ADN libre.[114] Dans des études tissulaires sur échantillons d'anévrysme d'aorte abdominale, la présence de NETs est corrélée à la concentration d'ADN libre circulant.[115] De plus, chez les patients de réanimation, ce biomarqueur est indépendamment associé au sepsis et à la mortalité.[116-118] Enfin, dans l'ischémie intestinale, l'ADN libre circulant est associé à la sévérité des lésions, l'inflammation et la nécrose intestinale dans le travail de Arnalich et coll.[119]

2.3.6.2. Myéloperoxidase (MPO)

La MPO est une enzyme inflammatoire qui génère de l'acide hypochloride réactif en présence d'hydrogène peroxide et d'ion chloride. La MPO est contenue dans les granules azurophiliques des neutrophiles.[108,120-122] Elle est la principale enzyme libérée après l'activation neutrophilaire[121] et entre dans la composition des NETs.[123] Chez l'homme, l'augmentation de l'activité de la MPO (dans le plasma ou dans les autres liquides biologiques) est considérée comme un marqueur d'activation neutrophilaire dans plusieurs situations pathologiques incluant le syndrome d'ischémie - reperfusion.[124] Si sa principale fonction est antimicrobienne, la MPO peut néanmoins être responsable de lésions tissulaires (figure 15).[122] Ainsi, l'activité de la MPO a été rapportée corrélée à la sévérité de l'inflammation dans le tissu intestinal pendant l'ischémie - reperfusion.[124]

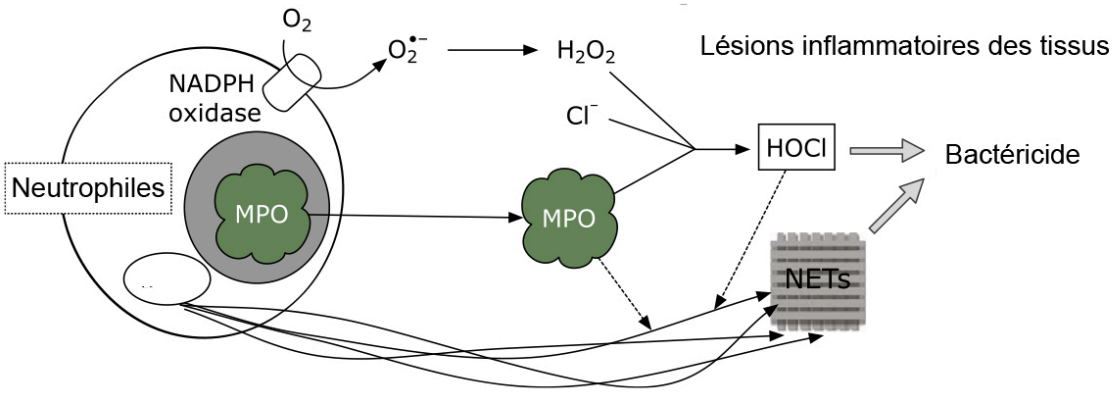


Figure 15. Mécanismes impliqués dans la bactéricidie et le potentiel lésionnel tissulaire de la MPO neutrophilaire.[125]

2.3.6.3. MMPs - MMP-9

L'infiltration tissulaire leucocytaire est un processus de défense et de réparation tissulaire essentiel, médié par les métalloprotéases matricielles (matrix metalloproteinases, MMPs) qui favorisent l'extravasation et la migration leucocytaire.[126] Les MMPs font partie d'une famille d'endopeptidases zinc-dépendantes classée en 5 groupes: les collagénases (MMP-1, -8 et -13), les gélatinases (MMP-2 et -9), les stromélysines (MMP-3, -10 et -11), les matrilysines (MMP-7 et -26) et les MMPs membranaires (MT-MMPs).[126-128] Dans la réponse inflammatoire de l'ischémie – reperfusion, plusieurs études ont suggéré un rôle important des MMPs dans la migration des cellules inflammatoires, la régulation des médiateurs pro-inflammatoires, la disruption des contacts matrice - cellules, la protéolyse nucléaire, la modulation des récepteurs médiant le signal de mort cellulaire, l'angiogénèse et le remodelage tissulaire.[127]

La MMP-9 (gélatinase B) représente le membre le plus complexe de la famille des MMPs[129]. Elle est majoritairement produite par les polynucléaires neutrophiles, eosinophiles ou les monocytes/macrophages.[126] Stockée en grande quantité dans les granules neutrophilaires sous forme de pro-MMP-9, la MMP-9 est rapidement libérée après l'activation neutrophilaire dans l'ischémie - reperfusion.[127] En clinique, la concentration plasmatique de MMP-9 est élevée chez les patients après un accident vasculaire cérébral ischémique, un syndrome coronarien aigu et une transplantation hépatique.[130] Kocael et coll ont également mis en évidence une élévation significative de la MMP-9 plasmatique dans un modèle d'ischémie - reperfusion mésentérique.[124]

2.3.6.4. Selectins

Les selectins sont les molécules carbohydrate - binding qui lient aux ligands fucosylés et sialylés. Elles sont retrouvées sur les cellules endothéliales, leucocytes et plaquettes. Elles sont des molécules d'une famille avec 3 glycoprotéines de la surface cellulaire type I : E-, L- et P-selectin (figure 16). La L-selectin est exprimée sur toutes les granulocytes, monocytes et dans la majorité des lymphocytes. La P-selectin est stockée dans les α-granules des plaquettes et dans le corps Weibel-Palade des cellules endothéliales et déplacée sur la surface des cellules endothéliales et plaquettes activées. La E-selectin n'est pas exprimée dans les conditions de base mais rapidement induite par les cytokines inflammatoires.[131]

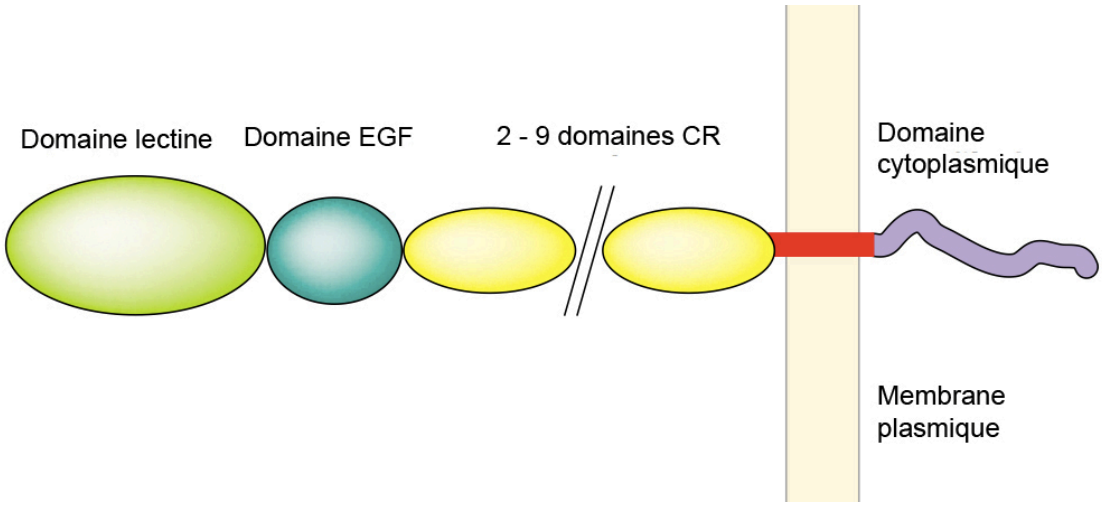


Figure 16. La structure des selectins. Les selectins composent un domaine de lectin N-terminal (vert), un domaine EGF (epidermal growth factor) (vert foncé), deux (L-selectin), six (E-selectin) ou neuf (P-selectin) consensus répétés avec homologie aux protéines régulatoires de complément (CR) (jaune), un domaine transmembranaire (rouge) et un domaine cytoplasmique (violet).[131]

Dans l'ischémie - reperfusion splanchnique, les neutrophils commencent à adhérer sur l'endothélium reperfusé approximativement à partir de 20 minutes et à accumuler dans le tissu reperfusé à 30 minutes après le reperfusion.[132] L'interaction leucocyto-endothéliale dans la phase précoce de la reperfusion dépend aux actions des P, L et E-selectin.[133] Dès l'activation, le P-selectin est rapidement déplacée à la surface des cellules endothéliales où elle peut se lier aux structures carbohydrates exprimées à la surface neutrophilaire.[134] E-selectin qui est aussi exprimée sur les cellules endothéliales exige une synthèse protéique *de novo* et peut être régulée positivement par les cytokines après une période de 4 - 6 h. Chaque selectin se lie facilement aux oligosaccharides sialylés et fucosylés comme Lewis^X sialyl, une tétrasaccharide impliqué dans la reconnaissance des sélectins, tandis que seulement la P- et L-selectin semblent à se lier à l'héparine et les molécules héparine-mimétiques.[135] Il y a beaucoup de ligands pour selectins mais seulement le PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1) est bien caractérisé dans la fonction moléculaire et cellulaire.[131] Ce ligand est reponsable pour 90% de la liaison de P-slectin et le plus important ligand de L-selectin dans la condition inflammatoire, où il est présent dès l'adhésion leucocytaire et la fragmentation leucocytaire.[136] PSGL-1 peut aussi lier à E-selectin mais il n'est pas son principal ligand, ce qui reste encore à découvrir.[131]

La première étape du processus de la migration neutrophilaire dès l'ischémie - reperfusion, le roulement des neutrophiles est marqué par l'interaction entre P-selectin endothéliale et le

PSGL-1 des neutrophiles activés.[137] Cette interaction à faible affinité permet de mettre les neutrophiles à la proximité des chémokines pour le continuum des autres interactions plus fortes (intégrine β2, ICAM-1, VCAM-1) qui renforce l'adhésion neutrophilaire sur les cellules endothéliales puis l'extravasation neutrophilaire.[137,138]

2.3.6.5. CD31 (PECAM - 1)

A. Structure du CD31

Platelet/endothelial cell adhesion molecule - 1 (PECAM-1) ou CD31 est une glycoprotéine transmembranaire de type I, de 130-kD. Son expression est constitutive et exclusivement restrainte sur les cellules endothéliales (10^6 molécules par cellule), les leucocytes de l'immunité innée (granulocytes et monocytes/macrophages, 10^5 molécules/cellule), les lymphocytes T et B (10^4 molécules/cellule) et les plaquettes ($5x10^3$ molécules/plaquette).[139,140]

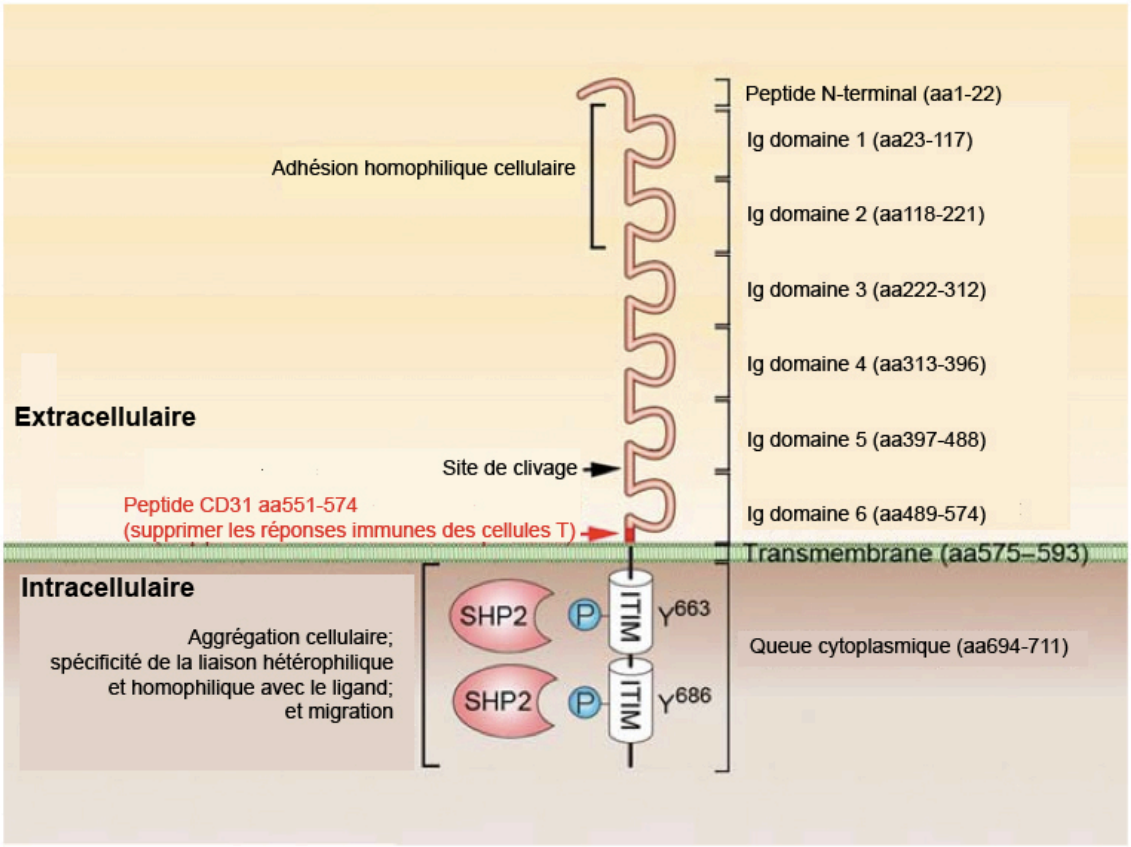


Figure 17. Les domaines protéiques et leurs fonctions cellulaires du récepteur CD31. Ig: immunoglobuline; aa: acide aminé; ITIM: immunotyrosine-based inhibitory motif; Y: tyrosine.[141]

La partie extracellulaire du CD31 se compose 6 domaines en boucle de type Immunoglobuline (“Ig-like”), numérotés à partir du plus eloigné de la membrane. Le domaine 1 N-terminal extracellulaire contient les résidus importants pour l'interaction CD31-CD31. La portion extracellulaire est liée au segment transmembranaire qui comporte 19-résidus qui à son tour est lié à la queue cytoplasmique qui contient 118-résidus. Parmi les acides amines phosphorylable du domaine cytoplasmique, le CD31 contient 2 ITIMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs) centrés autour de Tyr663 et Tyr686 qui deviennent phosphorylés par des tyrosine kinases engagées lors de l'activation cellulaire (figure 17). Une fois phosphorylés, ces ITIMs recrutent et activent des tyrosines phosphatases contenant Src homologie 2 (SH2).[142]

Le role du CD31 au cours de la réponse inflammatoire peut sembler contradictoire.[143] Alors que certains travaux suggèrent que le CD31 favorise l'inflammation en facilitant la migration transendothéliale des leucocytes[144-146] et en servant comme un mécano-capteur pour la contrainte de cisaillement fluidique[147], d’autre montrent que le CD31 réduit l’amplitude de la réponse inflammatoire via ses capacités de : (1) inhiber l'activation cellulaire[148-154]; (2) réduire le taux de cytokine pro-inflammatoire; (3) réduire l'accumulation leucocytaire au site de l'inflammation[155-157] et (4) maintenir et restaurer l'intégralité vasculaire.[155,157-160]

Alors qu’en première hypothèse la concentration des molecules de CD31 aux jonctions intercellulaires des cellules endothéliales pouvait suggerer un fonction de molecule d’adhésion, à difference des molecules d’adhésion ICAM-1 et VCAM-1, le domaine extracellulaire de CD31 n'a pas de séquence de liaison avec les intégrines. Le CD31 se lie principalement avec les autres molécules CD31 via l'interaction de liaison homophile (figure 18) qui a besoin de domaines d'homologie immunoglobuline amino-terminaux 1 et 2 (IgD1 et IgD2).[161]

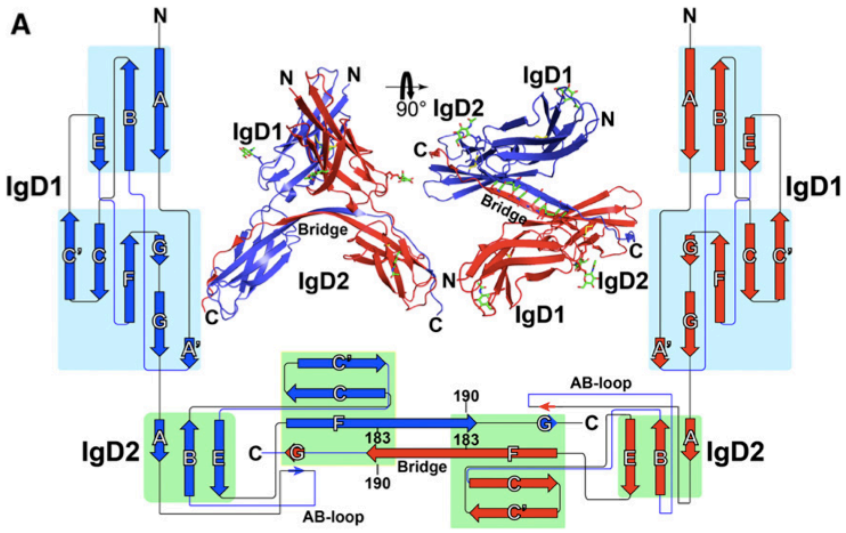


Figure 18. Interaction homophile de CD31.[161]

B. CD31 et la migration neutrophilaire

L'interaction homophile de CD31 à la jonction intercellulaire endothéliale est nécessaire pour maintenir l'intégrité de la barrière vasculaire et pour reguler l'interaction leucocyte-cellule endothéliale pendant le processus de diapédèse.[161]

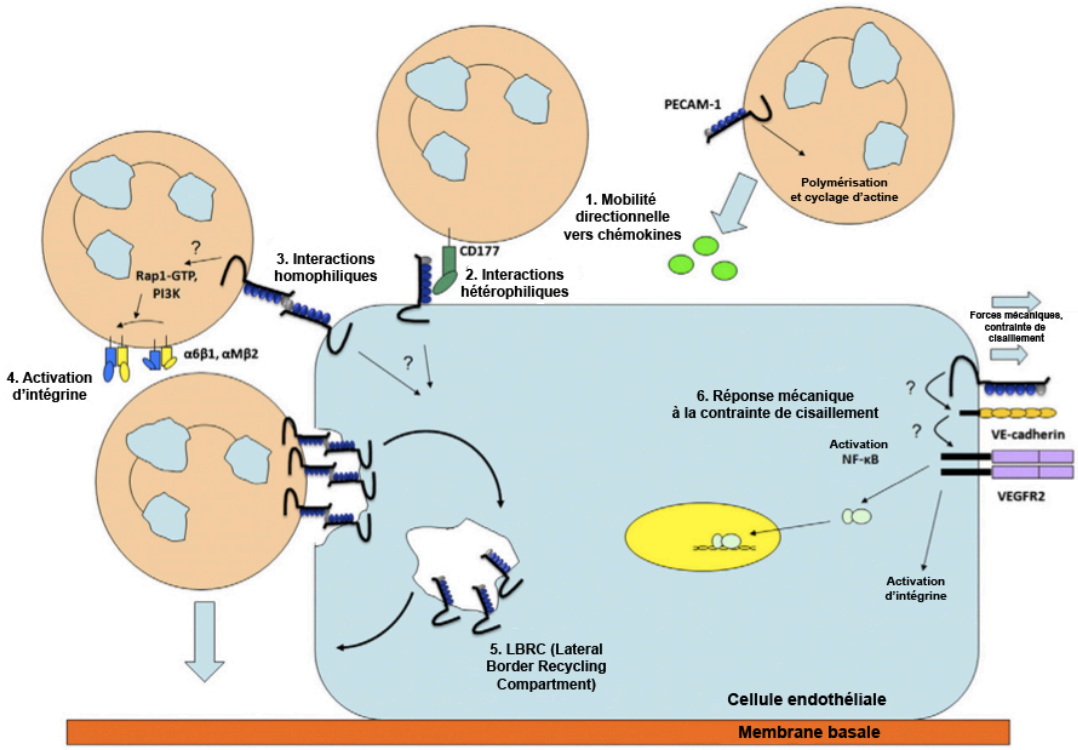


Figure 19. Les fonctions pro-inflammatoires du PECAM-1 (CD31).[143]

La présence de CD31 sur les neutrophiles est aussi importante pour la migration migration directionnelle, induite par les chémokines, des neutrophiles vers le site inflammatoire.[162] Les chemokines induisent la migration car ells activent les integrines sur la surface neutrophilaire qui, à leur tour, activent le cycle et la polymérasion d'actine dans la cellule.[163] Puisque les chemokines se lient aux proteoglycans de la matrice extracellulaire, leur concentration est croissante au fur et à mesure que l'on s'approche du site inflammatoire. C'est pour cela qu'il est communement admis que les neutrophils. Les neutrophiles qui expriment CD31 sont par conséquent mieux être recrutées au site inflammatoire.[143]

Après l'adhésion leucocytaire sur les cellules endothéliales, les auteurs ont supposé que l'interaction homophile CD31-CD31 entre les leucocytes et les cellules endothéliales favorise la pénétration leucocytaire au travers la jonction intercellulaire (figure 19). Cette interaction homophile peut déclencher aussi les signalisations qui induire l'activation des intégrines sur les leucocytes.[143] Elle déclenche la régulation positive de l'intégrine $\alpha_6\beta_1$, un récepteur de laminine (le composant majeur de la basale lamina) sur les neutrophiles qui leur permet de traverser la membrane basale périvasculaire.[164,165] Le mécanisme de l'activation des intégrines favorisé par CD31 semble via (1) la régulation des autres modulateurs des intégrines; (2) l'association avec les autres molécules CD31 sur la plane membranaire et (3) la modulation de potentiel de la membrane cellulaire.[143]

Le rôle de CD31 endothélial dans la migration neutrophilaire est plus complexe que celui des neutrophiles. Le CD31 endothélial facilite la migration neutrophilaire avec 2 mécanismes adhésifs : (1) l'interaction homophile avec CD31 neutrophilaire et (2) l'interaction hétérophile avec un autre récepteur, CD177 neutrophilaire. Parce que le CD177 est expimé seulement sur 45 - 65% des individus et que 3 - 5% de la population n'exprime pas le CD177 sur les neutrophiles, le mécanisme du rôle de CD177 reste un domain actif pour les recherches scientifiques. Un mécanisme important qui permet le CD3 endothélial de soutenir la migration leucocytaire a été révélé dans une série d'études qui identifie que CD31 est un constituant principal d'un compartiment de recyclage des cellules endothéliales, dit LBRC (lateral border recycling compartment).[143] Le LBRC est un réseau de membrane connecté à la surface qui est localisé à la frontière entre les cellules endothéliales adjacentes.[166] Ce réseau membranaire contient le CD31 et est recyclé et ciblé à la région sur laquelle la migration transcellulaire ou paracellulaire survient.[166,167] La migration neutrophilaire dépend du recyclage de LBRC qui est médié par les microtubules et les moteurs moléculaires de la

famile kinesine des cellules endothéliales.[168] Malgré que l'expression de CD31 est clairement importante pour la migration transendothéliale des neutrophiles, les transductions des signaux induits par le domaine cytoplasmique de CD31 endothélial ne sont pas encore claires.[143]

L'évidence du rôle de CD31 dans la migration leucocytaire fait les études démontrer que les facteurs bloquants de CD31 seraient cliniquement bénéfiques pour bloquer cette migration dans les maladies inflammatoires.[143] Les anticorps contre CD31 bloquent l'accumulation des neutrophiles dans (1) le péritoine après la péritonite induite par glycogène chez les souris et rats; (2) le poumon après le dépôt de complexe immune IgG chez les rats et (3) la peau humaine transplantée sur les souris immunosupprimées.[145,169]

Par contre, il y a des autres études sur les lymphocytes qui ne supportent pas la corrélation positive entre l'expression de CD31 et la migration leucocytaire. Une étude *in vitro* a montré que les lymphocytes migrés au travers de HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) monocouche sont très riches en cellules $CD31^-$ mais déplétées en cellules $CD31^+$. De plus, la population lymphocytaire déplétée des cellules $CD31^+$ par méthode immunologique est capable de traverser aussi la HUVEC monocouche. Ces résultats montre que l'expression du CD31 lymphocytaire n'est pas nécessaire pour la transmigration au travers de HUVEC monocouche.[170] Tada et coll ont réalisé une étude *in vivo* de l'arthrite collagène-induite chez les souris et montré que les lymphocytes des souris défectueuses de CD31 ont une migration accélérée à l'articulation inflammée.[171] Dans une autre étude, les neutrophiles des souris CD31KO (knock-out) sont arrêtés entre l'endothélium vasculaire et la basale membranaire aux microvaisseaux mésentériques du site inflammé confirmant le rôle de CD31 dans la migration neutrophilaire. Mais le nombre normal des leucocytes récupérés dans le site inflammé chez les souris CD31KO suppose que la défaillance de la migration leucocytaire au travers la basale lamina en absence de CD31 peut être compensée par l'utilisation des autres molécules d'adhésion ou probablement par un taux de migration augmenté.[172]

C. CD31 et l'ischémie - reperfusion

Les études montrent également l'effet bénéfique des bloquants de CD31 dans les modèles d'ischémie - reperfusion expérimentaux. L'utilisation des anticorps anti-CD31 réduit la taille de l'infarction myocardique chez les rats.[173] La nécrose myocardique dans un modèle des chats est également inhibée par l'anticorps anti-CD31 avec le mécanisme probable de l'inhibition de la migration transendothéliale des neutrophiles.[174] Valentini et coll ont justifié

que l'anticorp monoclonal de CD31 inhibe la regénération tubulaire des reins, une évidence de plus pour supporter l'hypothsêse de l'inhibition de la migration neutrophilaire.[175]

Au niveau de la circulation mésentérique, l'extravasation leucocytaire des microvaisseaux est inhibée par l'anticorps anti-CD31. L'anticorps anti-CD31 n'a aucun effet sur le roulement et l'adhésion leucocytaire mais inhibe leur migration aux tissus extravasculaires à la manière dose-dépendente en bloquant le passage des leucocytes à la basale membranaire.[146] Sun et coll ont montré que l'utilisation de l'anticorps monoclonal anti-CD31 réduit la perméabilité endothéliale et les concentrations systémiques d'IL-1β et partiellement restaure les inhibiteurs de protéases plasmatiques dans le modèle d'ischémie mésentérique de 40 minutes et reperfusion de 12h chez les rats.[176]

D. Clivage et fonction physiologique du CD31

Les ITIMs de CD31 intracellulaire ne sont pas phosphorylés en repos parce que le CD31 ne possède pas d'activité kinase intrinsèque. Les molécules de CD31 se lient les uns aux autres par l'intermédiaire d'une liaison trans-homophile des domaines du type Ig 1 - 2 entre les cellules qui interagissent. Cette interaction trans-homophile est requise pour déclencher l'aggrégation des molécules de CD31 sur le plan de la membrane, ce qui nécessite à son tour une séquence juxtamembranaire cis-homophile. La phosphorylation intracellulaire de la partie ITIMs du CD31 devient alors possible car ses ITIMs peuvent être exposés à l'activité des tyrosine kinase qui sont déplacée à proximité d'autres récepteurs membranaires associés (par exemple des récepteurs de cellule T). La phosphorylation des ITIMs déclenche le recrutement et l'activation des phosphatases intracellulaires SH2. En fonction des adaptateurs de signalisation associés au récepteur de la membrane la plus proche, l'activation de SH2 peut conduire soit à l'activation de la signalisation en cascade soit à leur inhibition. Par conséquence, la fonction de CD31 varie du type de cellule. Chaque domaine sur le CD31 joue le différent rôle dans les cellules autant que dans le développement des maladies vasculaires et inflammatoires. Par exemple, le CD31 perd le pattern de l'expression de la jonction intercellulaire quand les cellules endothéliales sont exposées aux cytokines inflammatoires.[141] De plus, la perte effective du CD31 est observée dès l'activation et la différenciation des lymphocytes.[177] Le clivage du CD31 lymphocytaire serait protéolytique avec la perte de la partie extracellulaire du CD31. Ce processus est extrêmement rapide et similaire au mécanisme observé avec les autres molécules transmembranaires contenant les domaines IgG-mimétiques. Fornasa et coll ont montré la possibilité d'utilisation d'un peptide homophile

ou un composant peptidomimétique approprié pour sauver la fonction immuno-régulatoire physiologique de CD31 sur les lymphocytes T activés.[178]

Les neutrophiles perdent également leur expression de CD31 sur la surface après la migration transendothéliale ou l'extravasation *in vitro* dans la peau humaine transplantée sur les souris immunosupprimées sévères.[179] L'apoptose neutrophilaire est aussi marquée par une régulation négative de l'expression de CD31 sur la surface neutrophilaire[180] qui est justifiée par le mécanisme de clivage protéolytique.[181]

On a identifié que la perte supposée de CD31 sur les lymphocytes T activées est incomplète et résulte un clivage entre le 5e et 6e domaines extracellulaires Ig-mimétiques. Le CD31 clivé est ensuite libéré dans la circulation, où il est présent avec un variant de parties de CD31 soluble. On peu supposer que le clivage protéolytique du CD31 des neutrophiles joue le rôle important dans la physiopathologie des lésions tissulaires causées par les neutrophiles.

2.4. Conséquences intestinales et systémiques de l'ischémie - reperfusion mésentérique

2.4.1. Altération de la fonction absorptive intestinale

Plusieurs études ont démontré une altération de la fonction absorptive secondaire aux lésions épithéliales induites par l'ischémie - reperfusion.[182-184] Cette altération peut conduire à une dénutrition par malabsorption.[33] Dans un modèle expérimental chez le rat, Sileri et coll ont montré que les lésions aiguës et chroniques d'ischémie - reperfusion mésentérique altéraient la fonction absorptive de l'intestin et que cette altération était associée à une mortalité élevée.[185]

2.4.2. Altération de la fonction de barrière épithéliale intestinale

La lésion de la muqueuse intestinale causée par l'ischémie peut être détectée par une augmentation précoce de la perméabilité épithéliale intestinale. Une augmentation de la perméabilité intestinale est souvent retrouvée chez les patients en post-opératoire de chirurgie vasculaire majeure. Cette lésion est majoritairement causée par la reperfusion. Le NO sécreté par l'endothélium vasculaire régule la perfusion de la muqueuse en condition de repos métabolique. L'entérocyte ainsi qu'une grande variété de types cellulaires intestinaux, sont des sources potentielles de NO. L'activation de synthétase d'oxide nitrique inductible (iNOS) pendant l'inflammation conduit à une hyperémie muqueuse et une altération de la motricité intestinale. En effet, à concentration élevée le NO perturbe l'actine cytosquelettique, inhibe la synthèse d'ATP et desserre les jonctions intercellulaires conduisant à un état hyperperméable.

Les oxidants comme le peroxide d'hydrogène et le radical superoxide ont été montrés comme principaux responsables de l'augmentation de la perméabilité épithéliale intestinale après

ischémie - reperfusion. La perturbation du cytosquelette consiste en une polymérisation excessive de l'actine. Ce phénomène est le résultat d'une déplétion en ATP médiée par l'exposition aux oxidants, secondaire à l'inhibition de la déshydrogénase glycéraldéhyde-3-phosphate glycolytique et de la phosphorylation mitochondriale d'ADP. Les cytokines sont également impliquées dans l'augmentation de la perméabilité intestinale associée à l'ischémie - reperfusion.[186]

2.4.3. Translocation bactérienne

La translocation bactérienne correspond au passage des bactéries vivantes du tube digestif à travers la muqueuse épithéliale dans le sang ou d'autres sites extra-intestinaux, tels que les nodules lymphatiques mésentériques, le foie et la rate.[187] Cette translocation peut induire un sepsis, un choc septique voire un syndrome de défaillance multiviscérale.[33] L'augmentation de la perméabilité intestinale accompagnant l'ischémie - reperfusion mésentérique favorise la translocation bactérienne.[188,189] Les autres facteurs incriminés sont la pullullation bactérienne du grêle et les états dysimmunitaires.[33]

La translocation bactérienne peut être mesurée directement et indirectement. Il existe 2 méthodes directes de mesure de la translocation bactérienne : la culture de nodules lymphatiques mésentériques et l'utilisation de bactéries marquées. La culture de nodules lymphatiques mésentériques n'a de valeur que positive car elle est peu sensible. Cette méthode peut sous-estimer l'incidence réelle de la translocation bactérienne. Le marquage bactérien utilise le 99mTc comme dans les travaux de Diniz et coll qui suivaient le comportement bactérien en mesurant la radioactivité des organes à différents temps après reperfusion mésentérique.[190]

Les méthodes de mesure indirecte sont la culture du sang périphérique, la détection de l'ADN bactérien par PCR (polymerase chain reaction), de l'endotoxine bactérienne et la recherche urinaire de sucres non-métabolisables.[190] Parmis ces méthodes indirectes, la PCR est considérée plus sensible que la culture et permet une évaluation quantitative de la translocation bactérienne d'origine intestinale.[191]

2.4.4. Conséquences systémiques

La lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique résulte de la production de molécules comme l'hydrogène peroxide, le superoxide et les cytokines pro-inflammatoires qui peuvent retentir sur la fonction des organes à distance. Ils sont à l'origine du syndrome de la réponse inflammatoire systémique qui peut évoluer vers un syndrome de défaillance multiviscérale.[192]

De plus, l'activation du complément et des leucocytes circulants par la translocation bactérienne peut également induire et/ou intensifier la réponse inflammatoire systémique après ischémie - reperfusion intestinale.[193]

Parmis ces atteintes d'organes, le syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) est une complication classique de la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique, secondaire à une infiltration neutrophilaire du tissu pulmonaire.[194,195]

2.5. Présentation clinique et paraclinique

2.5.1. Diagnostic

2.5.1.1. Présentation clinique

Les patients avec ischémie mésentérique aigüe peuvent initialement présenter une "douleur classique discordante avec l'examen" associée au bruit épigastrique qui cependant n'existe pas chez les autres patients.[9] En effet, l'examen physique abdominal peut être initialement normal, sans distention abdominale, ni défense ni contracture. Secondairement, cette douleur peut s'accompagne d'un "silence auscultatoire abdominal" lié à la sidération du péristaltisme intestinal.[4] D'autres patients peuvent avoir une sensibilité à la palpation abdominale en raison de l'irritation péritonéale causée par une lésion entière de l'épaisseur intestinale. Ce signe peut faire les cliniciens envisager les autres diagnostics que l'ischémie mésentérique aigüe.[196] Chez patient avec douleur abdominale aigüe, il est important à évaluer la possibilité de la maladie athérosclérotique et de la source potentielle d'un embole, comme antécédent de la fibrillation atriale et infarctus du myocarde récent.[197]

La différenciation entre occlusion artérielle et veineuse n'est pas toujours simple. Les patients présentant la thrombose veineuse mésentérique ont tendance à présenter une douleur abdominale moins brusque que l'occlusion artérielle.[198] Les facteurs de risque de thrombose veineuse qui doivent être évalués comprennent un antécédent de thrombose veineuse, une maladie hépatique chronique ou une thrombose de la veine porte, un cancer, une chirurgie abdominale récente, une maladie inflammatoire et une thrombophilie[12].

2.5.1.2. Examens complémentaires radiologiques

A. L'échographie

L'échographie a une grande fiabilité et reproductibilité avec une sensibilité et une spécificité de 85 à 90%. Elle est un outil efficace et moins cher dans l'évaluation des vaisseaux

proximaux, bien que les résultats puissent être limités sur les vaisseaux plus distaux.[12]

La valeur de l'échographie est extrêmement dépendante de la capacité d'observateur. De plus, l'imagerie ultrasonographique adéquate est probablement difficile à obtenir chez les patients obèses, avec gaz digestif et calcification extrême des vaisseaux. Une évaluation ultrasonographique adéquate est souvent impossible chez les patients présentant l'IMA en raison de la durée de l'examen et de la pression abdominale requise. Cet examen est donc à réserver pour le suivi après intervention de l'IMA.[12]

B. Angioscanner et angiographie par résonance magnétique

Avec exactitude de 95 à 100%, l'angioscanner devient la méthode d'imagerie recommandée pour le diagnostic des syndromes ischémiques viscéraux.[9,199,200] Cet examen permet d'évaluer l'origine, la longueur des vaisseaux, l'extension de la sténose ou de l'occlusion et d'aider à choisir les options de revascularisation.[12]

À côté des informations sur les vaisseaux, l'angioscanner peut indiquer des sources potentielles d'embolie, d'autres structures intra-abdominales et des anomalies comme l'épaississement de la paroi intestinale et le stranding mésentérique associés à la diminution de flux sanguin. Les autres signes pathologiques comme pneumatose, aéropéritoine ou aéroportie sont aussi notés sur l'angioscanner. Afin de déterminer la présence de l'ischémie mésentérique, l'angioscanner devrait être effectué avec l'injection intraveineuse du produit de contraste et en coupe axiale mince (1 - 3 mm).[12]

L'angiographie par résonance magnétique est une option attractive qui peut fournir des informations sur le flux et éviter les risques de radiation et d'utilisation de produit de contraste associées à l'angioscanner. Ce test prend cependant plus de temps, manque la résolution nécessaire et peut sur-estimer le degré de sténose.[9]

C. L'endoscopie

L'endoscopie, un examen fréquent dans le diagnostic de la douleur abdominale, est la plus utile dans les conditions de diagnostic d'ischémie et d'inflammation dans l'estomac, l'intestin grêle proximal, le rectum et le colon droit.[201] L'endoscopie n'atteint pas cependant la majorité des sections de l'intestin grêle les plus fréquemment impliquées dans l'ischémie mésentérique. Elle est sensible pour identifier les changements tardifs, comme l'infarction, mais elle manque

la sensitivité et la spécificité dans la détection des changements ischémiques plus précoces.[12]

D. L'angiographie avec cathéters

L'angiographie avec cathéters, qui est auparavant considérée comme une méthode standard pour le diagnostic de l'ischémie mésentérique, devient maintenant une option thérapeutique initiale. L'angiographie avec cathétérisation sélective des vaisseaux mésentériques est utilisée maintenant quand la revascularisation est choisie. Les thérapies uniques ou complémentaires, y compris la thrombolyse, l'angioplastie avec ou sans stent, et la vasodilatation intraartérielle, sont combinées pour restaurer la circulation sanguine.[202-204] L'angiographie est aussi utilisée pour confirmer le diagnostic avant la laparotomie d'exploration.[9]

2.5.2. Marqueurs biologiques de l'ischémie - reperfusion mésentérique

Le diagnostic précoce repose aujourd'hui sur une haute suspicion clinique devant toute douleur abdominale soudaine, intense et inhabituelle ou la présence de signes digestifs chez le patient de réanimation. Il est confirmé par l'angioscanner. La faible sensibilité et spécificité et le caractère initiallement déroutant des signes cliniques et biologiques expliquent que l'angioscanner et le diagnostic sont le plus souvent réalisés au stade tardif des complications chirurgicales et systémiques.[205] Aucun marqueur biologique diagnostique assez sensible et suffisamment spécifique n'est actuellement disponible en pratique clinique pour le diagnostic d'ischémie intestinale. La molécule candidate doit être spécifique de la paroi intestinale et sa concentration et son intégralité structurale doivent être préservées du métabolisme hépatique pour être mesurable dans le sang veineux périphérique.[206] Il est important de rappeler dans ce contexte qu'avec n'importe quelle cause, la lésion commence de la muqueuse et s'étend à la séreuse. Un marqueur spécifiquement muqueux pourrait ainsi être plus précoce qu'un marqueur séreux (figure 20). Puisque l'IMA est associée à une mortalité élevée, le test doit avoir une sensibilité très haute pour assurer l'exclusion du diagnostic en situation d'urgence. Il est aussi nécessaire d'avoir un test assez spécifique pour sélectionner les patients chez lesquels un angioscanner doit être réalisé.[205]

Les marqueurs biologiques expérimentaux actuellement évalués sont présentés ci-dessous.

2.5.2.1. L-lactate

L'absence de marqueur biologique fiable de l'IMA et son diagnostic souvent retardé a longtemps fait utiliser le L-lactate plasmatique comme test diagnostique. Cependant son

élévation est tardive dans l'évolution de l'IMA et reflète souvent la présence d'un infarcissement intestinal transmural et le début d'une hypoperfusion systémique évoluant vers la défaillance multi-viscérale et le décès. L'absence d'élévation systémique précoce de la L-lactate après une ischémie intestinale s'explique par le premier passage hépatique qui est capable de métaboliser une grande quantité de L-lactate provenant de la circulation porto-mésentérique.[207] Dans une cohorte de 164 patients atteints d'IMA, le premier dosage plasmatique de lactates était normal dans 57% des cas. Ainsi la L-lactate ne peut pas être utilisée comme marqueur précoce d'IMA.[205]

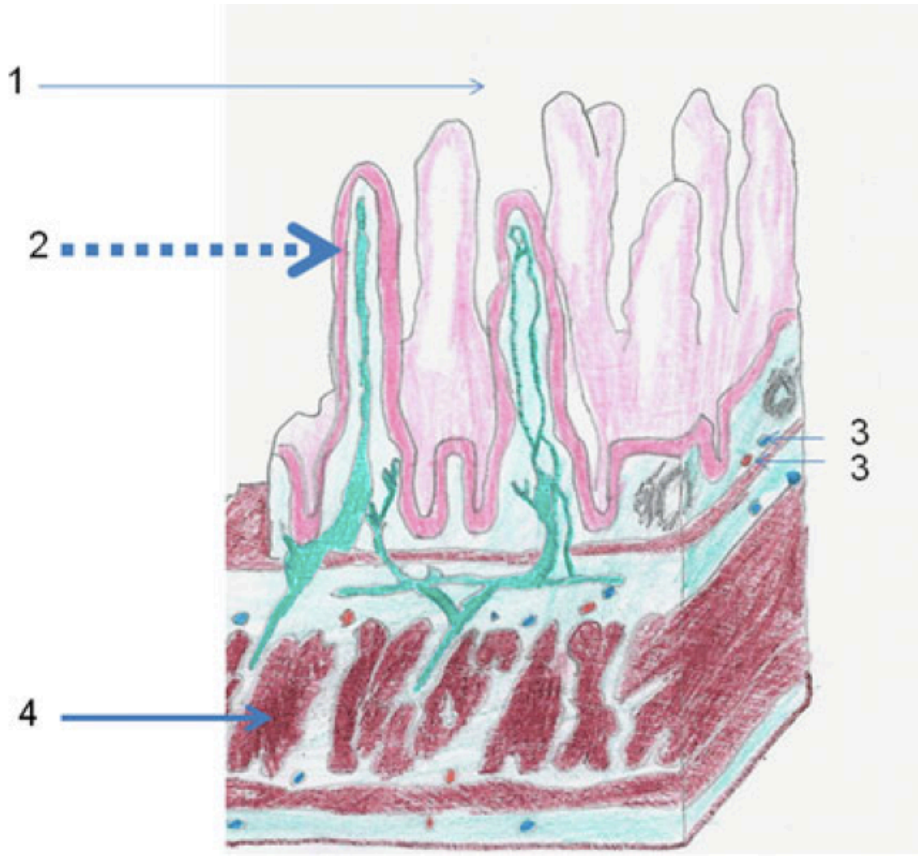


Figure 20. Marqueurs biologiques potentiels de l'IMA et leur origine pariétale intestinale: 1. D-lactate (grande flèche) dans la lumière intestinale, 2. I-FABP et α-glutathione S-transferase (ligne pointillée) dans l'épithélium, 3. D-dimer (petite flèche) dans les petites artères et veines, 4. Creatine kinase (flèche épaisse) dans la musculeuse.[205]

2.5.2.2. D-lactate

La D-lactate est un sous-produit de la fermentation bactérienne entéro-colique qui n'est ni produit ni métabolisé par les cellules humaines. A partir de la lumière intestinale, elle peut rejoindre la circulation sanguine après une lésion épithéliale intestinale, une augmentation de la perméabilité intestinale ou au cours des situations de pullulation bactérienne chronique de

l'intestin grêle rencontrées dans les occlusions intestinales chroniques ou le syndrome de l'intestin court. Dans les modèles d'ischémie - reperfusion intestinale chez les rongeurs, les taux plasmatiques de D-lactate augmentent significativement de façon régulière entre 5 minutes à 4 heures après la ligature de l'AMS en comparaison avec des témoins « laparotomie blanche » et des témoins en occlusion intestinale sans ischémie.[208] Une élévation significative a également été rapportée dans des modèles ischémiques par hypertension intra-abdominale suggérant une libération précoce (à faible débit splanchnique) avant la constitution des lésions histologiques irréversibles.[209] Son utilité clinique pour le diagnostic de l'IMA a été suggérée dans une petite étude rétrospective comparant des patients en IMA à d'autres causes d'abdomen chirurgical.[210] Chez des patients en post-opératoire de chirurgie d'anévrysme de l'aorte abdominale, un taux de D-lactate élevé à 6h était prédictif de complications ischémiques intestinales.[211] Des résultats contradictoires ont été cependant rapportés récemment dans un modèle porcin d'ischémie intestinale.[212]

2.5.2.3. D-dimères

Les D-dimères plasmatiques, marqueurs de la fibrinolyse, ont été rapporté comme des marqueurs ayant une sensibilité élevée entre 96 et 100% pour le diagnostic d'IMA. Ces données n'ont cependant jamais été confirmées au stade précoce de l'IMA. De plus, leur spécificité est insuffisante et explique leur inutilité en pratique clinique.[205]

2.5.2.4. α-glutathione S-transferase (alphaGST)

L'alphaGST est une enzyme impliquée dans le processus de détoxification intra-cellulaire via la conjugaison au glutathion, l'hydrophilisation et la facilitation de l'excrétion fécale ou urinaire.[205] Elle est exprimée dans le foie et l'intestin et sa concentration plasmatique augmente précocement dans la première heure après ligature de l'AMS dans des modèles d'ischémie - reperfusion mésentérique chez le rongeur.[213] Chez l'homme, une élévation significative de l'alphaGST a été montrée chez 12/24 cas d'IMA par rapport à 12 autres cas de douleurs abdominales aiguës suspectes d'ischémie avec une valeur prédictive négative de 100%.[214]

2.5.2.5. I-FABP (intestinal fatty acid binding protein)

L'I-FABP est une petite protéine hydrophile, membre de la famille des FABP (fatty acid binding protein) impliquée dans le transport intra-cellulaire des acides gras. L'I-FABP est spécifique de l'entérocyte dont elle représente plus de 2% des protéines cytoplasmiques. Elle

est ainsi fortement exprimée dans la muqueuse intestinale du duodénum à l'iléon.[215] Plusieurs études expérimentales ont suggéré que l'I-FABP était un marqueur biologique sensible et spécifique de la lésion intestinale dans des modèles murins d'ischémie intestinale.[216] Plusieurs travaux chez l'homme ont également rapporté une élévation significative de l'I-FABP plasmatique chez des patients après ischémie intestinale.[215,217-221]

De nombreuses limites expliquent qu'aucun de ces marqueurs n'est aujourd'hui utilisé en pratique clinique devant une douleur abdominale dans le diagnostic positif et différentiel de l'IMA. Dans les modèles animaux d'ischémie mésentérique, la spécificité des protéines évaluées pourrait varier de façon significative entre les espèces et le groupe contrôle est généralement constitué d'animaux sains opérés d'une laparotomie blanche. Chez l'homme, la plupart des études ont concerné de faibles effectifs d'IMA très hétérogènes, avec une probabilité pré-test élévée et à un stade tardif nécessitant une évaluation chirurgicale.[222] Des évaluations comparatives prospectives sur de larges effectifs incluant d'autres causes de douleurs abdominales est indipensable.[205]

2.5.2.6. Procalcitonine (PCT)

La valeur de la PCT dans le diagnostic de l'ischémie intestinale est expliquée par la physiopathologie de sa formation. Une réaction inflammatoire induite par l'ischémie déclenche la libération des dérivés réactifs de l'oxygène qui, à leur tour, favorisent la sécrétion de TNF-α et IL-6. Le stress oxydatif de conséquence affecte la muqueuse intestinale et les entérocytes et réduit la perméabilité de la paroi intestinale. Les bactéries indigènes dans le tube digestif (*E.coli,* espèce *Lactobacillus, Bacteroides, Klebsiella,* etc) prolifèrent et génèrent des endotoxines bactériennes qui favorisent finalement la libération de PCT dans la circulation sanguine.[223]

Les études cliniques ont montré que PCT est un biomarqueur prometteur pour le diagnostic de l'ischémie intestinale. Avec les seuils faibles (0,25 - 0,5 ng/mL), la PCT sanguine fournit au clinicien des informations sur la présence de lésions ischémiques irréversibles et peut identifier les patients qui nécessitent un traitement d'urgence ou un monitorage stricte. Sa valeur diagnostique pourrait cependant limitée par la présence d'une infection bactérienne. En effet, quelques auteurs ont signalé que la PCT est un marqueur diagnostique pour (1) le sepsis qui peut se produire pendant l'ischémie et (2) la nécrose associée à la défaillance multiviscérale. Quand il y a un suspect de lésion ischémique et une valeur de PCT élevée, le médecin doit demander une analyse microbiologique pour exclure l'infection. En effet, les phénomènes ischémiques sont étroitement liés aux phénomènes infectieux car la sécrétion de

PCT dépend respectivement de l'inflammation et de la translocation bactérienne qui conduit l'infection. La maladie rénale chronique pourrait également influencer la valeur de PCT bien que Meisner et coll aient indiqué que ce n'est pas le cas. En outre, le taux de PCT peut être élevé dans certaines contextes non ischémiques (arrêt cardiaque, réaction médicamenteuse avec eosinophilie et syndrome des symptômes systémiques, coup de chaleur, etc) et diminué dans les autres conditions (antibiothérapie efficace, tuberculose, etc). Pour compenser les inconvénients de la PCT, il est nécessaire d'étudier les nouveaux biomarqueurs (comme la copeptine et la proadrénoméduline) dans les conditions ischémiques associées à la libération de PCT. D'autre part, la discordance entre les modèles pré-cliniques et les différences étilogiques de l'ischémie dans les études cliniques peuvent influencer la valeur disgnostique de la PCT.[223]

2.6. Evaluation histologique d'ischémie - reperfusion mésentérique

Le degré de la lésion causée par l'ischémie - reperfusion mésentérique est souvent estimé par une évaluation histologique. La méthode couramment utilisée et facilement disponible pour la préparation des tissus est la fixation dans le formol, la déshydratation, l'inclusion en paraffine puis une section de 4 μm d'épaisseur avant la coloration. La quantification de la lésion intestinale peut être évaluée au niveau de la zone la plus sévèrement atteinte ou en effectuant une moyenne normalisée des lésions. A cet effet, plusieurs systèmes de gradation de la lésion intestinale ischémique ont été décrits dans la littérature.[224]

Un score idéal d'évaluation histologique devrait inclure les caractéristiques suivantes : être proportionnel à la gravité morphologique des lésions, fiable et avec une bonne reproductibilité intra- et inter-observateur. Il devrait évaluer l'extension des lésions aux éléments structuraux de la paroi intestinale incluant les villosités, les cryptes, la muqueuse et la sous-muqueuse. Enfin, le score idéal devrait être facile à retenir et à utiliser avec une faible variabilité inter-observateur.[224]

Tableau 1. Description des 4 systèmes de score histologique.[224,225]

Parks	Sonnino	Parks/Chiu	Parks/Chiu modifié[226]
Inflammation et nécrose des villosités - cellules épithéliales 0. Pas de lésion 1. Extrémités de villosités affectées occasionnelles 2. Majorité des extrémités de villosités affectées 3. Majorité des extrémités et quelques villosités affectées 4. Extrémités, partie moyenne et inférieure de la majorité des villosités affectées Inflammation et nécrose des cryptes - cellules épithéliales 0. Pas de lésion 1. Cryptes affectées occasionnelles 2. Cryptes affectées éparses 3. Beaucoup de cryptes affectées 4. Majorité des cryptes affectées	0 pour normal, 1 pour résultats anormaux: Villosités - Présentes/Absentes - Normales/Anormales (longues, courtes, étroites, larges) Epithélium - Normal/Perte cellulaire anormale, dénudation complète, œdème Tissus conjonctif: - Normal/œdème anormal, infiltration intra- et extravasculaire Vaisseaux lymphatiques - Présents/absents - Normaux/dilatés anormaux, occlus Cryptes - Présentes/Absentes - Normales/ Organisation anormale - Régénération : présente/absente Lamina propria - Présente/Absente - Normale/œdème anormal, infiltration neutrophilaire, stase intravasculaire, hémorragie Musculeuse muqueuse - Présente/Absente - Normale/Stase intravasculaire anormale, hémorragie Bactéries - Présentes/Absentes	Chiu 0. Muqueuse normale 1. Espace sous-épithélial à la pointe des villosités 2. Extension des espaces sous-épithéliaux avec lifting modéré 4. Lifting massif sous les villosités, quelques pointes dénudées 5. Villosité dénudée, capillaires dilatées Park 6. Lésion de la crypte 7. Infarctus transmuqueux 8. Infarctus transmural	0. Normal 1. Oedème sous-épithélial, séparation partielle des cellules apicales 2. Cellules épithéliales débarrassées des extrémités des villosités 3. Extension de lésions à la base des villosités 4. Nécrose partielle de la muqueuse de lamina propria 5. Nécrose totale de la muqueuse

III. PRISE EN CHARGE DE L'ISCHEMIE - REPERFUSION MESENTERIQUE

Bien que la tolérance de l'intestin à l'ischémie puisse être prolongée en raison d'un haut pouvoir d'extraction de l'O2 et de sa capacité à mobiliser la circulation collatérale, l'IMA non traitée évolue presque inexorablement vers la nécrose intestinale ischémique, ses complications et le décès. L'objectif principal du traitement est ainsi d'optimiser le flux et l'apport en oxygène mésentérique.[4] Un traitement optimal peut inclure une laparotomie ou une intervention endovasculaire et les patients sont mieux traités dans un centre vasculaire avec un bloc opératoire hybride.[197,227] Les techniques hybrides utilisant la chirurgie d'exploration abdominale ouverte en combinaison avec des outils endovasculaires ont la possibilité d'offrir un traitement minimalement invasif aux patients d'IMA.[228] Un algorithme chirurgical du traitement de l'IMA est présenté en figure 21.

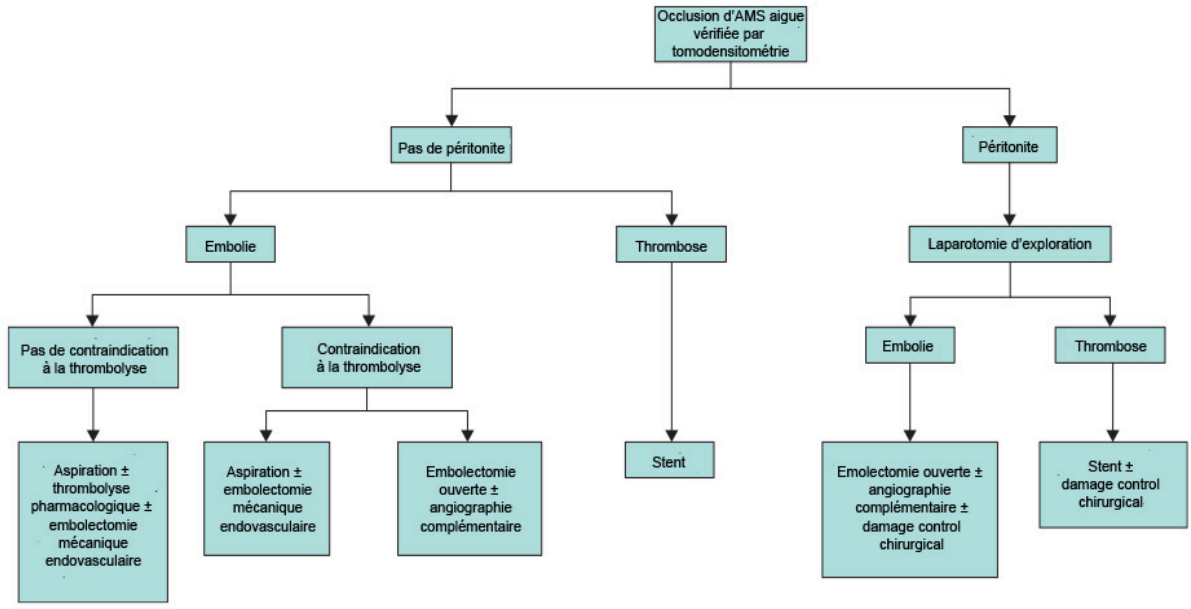


Figure 21. Algorithme chirurgical du traitement des patients avec l'occlusion d'AMS.[227]

1. Revascularisation mésentérique et résection intestinale

1.1. Techniques endovasculaires

L'angiographie joue toujours un rôle important dans le diagnostic et le traitement de l'IMA. Avec le développement de traitements endovasculaires ou adjuvants, son rôle thérapeutique est bien renforcé. L'angiographie offre plusieurs options thérapeutiques principales ou complémentaires en fonction de la pathologie spécifique, comme l'injection intraartérielle de vasodilatateurs, la thrombolyse et l'angioplastie avec ou sans endoprothèse (stent).[9] Dans l'IMA, les lésions vasculaires proximales peuvent être traitées par dilatation, voire par la mise en place d'une endoprothèse, alors que les lésions distales peuvent être une indication à une

thrombolyse in situ. Dans les cas les plus graves, une extravasation du produit de contraste dans la lumière digestive peut être observée, traduisant la présence d'un saignement actif.[4] L'AMS peut être atteinte par les voies fémorale et brachiale, bien que parfois l'exploration locale de l'AMS dans l'abdomen est également nécessaire.[227]

1.1.1. Embolectomie d'aspiration

L'embolectomie d'aspiration endovasculaire est une option thérapeutique chez les patients sans péritonite.[227] L'AMS est cathétérisée en utilisant un cathéter à courbe inverse et un guide hydrophile à 0,035 pouce est passé dans la branche iléocolique de l'AMS. Le guide est par la suite remplacé par un autre guide plus rigide pour avoir une stabilité. Avec le guide mis en place, un introducteur avec son moyeu amovible est placé à proximité de l'embole de l'AMS. A l'intérieur, un cathéter à la taille de 6 Fr est introduit dans le caillot qui est aspiré avec une seringue de 20ml lorsque l'introducteur est retiré. Le moyeu de l'introducteur est enlevé pour retirer complètement les caillots résiduels. L'angiographie d'achèvement est ensuite effectuée pour évaluer le résultat final.[227,228]

1.1.2. Thrombolyse de l'AMS

Dans le cas de l'embolectomie d'aspiration incomplète ou l'embolisation distale, la thrombolyse locale est une alternative thérapeutique chez les patients sans péritonite.[229-231] La thrombolyse locale est obtenue par administration d'activateur de plasminogène tissulaire recombinant à vitesse de 0,5 - 1 mg/h via un cathéter avancé jusqu'à ou à l'intérieur d'embole. L'angiographie est réalisée une ou deux fois par jour pour le suivi de la thrombolyse. La complication de type d'hémorragie pendant la thrombolyse est exceptionnelle et limitée spontanément.[227]

1.1.3. Recanalisation et endoprothèse antégrade de l'AMS

La traitement des lésions sténotiques ou occlusives sous-jacentes est fréquemment réalisé au cours de la même procédure d'embolectomie d'aspiration ou de thrombolyse. Un fil de guide coronaire de 0,014 pouces est occasionnellement nécessaire et suivi par la dilatation avec un ballon de 1,5 mm. Lorsqu'un fil de guide de 0,035 pouces est placé dans l'artère iléo-colique, un introducteur est avancé au-delà de la lésion athéroscléreuse. Une endoprothèse expansible par ballonet est mis en place pour maintenir le diamètre de la lumière artérielle. Le résultat après la mise en place d'endoprothèse et la mesure de la pression sont vérifiés par l'angiographie. S'il y a une pression de gradient à travers l'endoprothèse supérieure de 10

mmHg, une autre angiographie et/ou une mise en place additionnelle d'endoprothèse est réalisée.[227]

1.1.4. Recanalisation et l'endoprothèse rétrograde de l'AMS

Si l'approche endovasculaire par la voie fémorale et brachiale est inaccessible, la laparotomie et l'exposition de l'AMS sont effectuées pour la recanalisation et la mise en place d'une endoprothèse rétrograde de l'AMS.[232,233] Cette approche nous permet de vérifier l'état des viscères abdominaux, d'avoir un contrôle distal de l'AMS, et d'éviter la chirurgie de pontage sur l'intestin nécrosé. L'AMS est exposée et ponctionnée par une micro-aiguille. Un fil de guide passe à l'intérieur d'un cathéter de l'AMS à travers l'intérieur de l'introducteur placé dans l'artère fémorale ou brachiale pour avoir un système "throught-to-throught". Si la thrombectomie est nécessaire, une artériotomie transversale est réalisée au niveau de la ponction et la thrombectomie est effectuée par un ballonet Fogarty qui passe dans l'aorte. Cette approche permet également une mise en place antégrade d'une endoprothèse appropriée via la connexion "throught-to-throught". La mise en place antégrade est meilleure que la technique rétrograde parce que la procédure est réalisée à la manière plus familiale sans exposition des opérateurs à la dose supérieure de la radiation.[227]

1.1.5. Traitement endovasculaire de la thrombose veineuse mésentérique

Plusieurs procédures endovasculaires pour le traitement de la thrombose veineuse mésentérique ont été développées dans les années récentes, comme le TIPS (percutaneous transjugular intrahepatic portosystémique shunting) avec thrombectomie mécanique d'aspiration et thrombolyse directe, le thombectomie mécanique transhépatique percutanée, thombolyse via l'AMS et thrombolyse via le cathéter veineux mésentérique placé chirurgicalement.[227] Les techniques endovasculaires améliorent le taux de survie, augmentent la perméabilité portomésentérique avec les taux d'hypertension portale plus faibles, et ont des complications plus faibles en évitant la résection intestinale chez certains patients sélectifs.[202] Par contre, il n'y a pas d'étude avec les données comparatives qui aide d'établir les indications du traitement endovasculaire de la thrombose veineuse mésentérique.[227]

1.2. Traitement chirurgical

L'exploration chirurgicale est requise pour tous les patients qui présentent des signes de risque intestinal, quelle que soit l'étiologie sous-jacente. L'aspect intra-opératoire de l'intestin peut être trompeur. L'intestin qui s'approche une nécrose irréversible peut être trompeusement

normal en apparence et, inversement, l'intestin qui apparaît très ischémique peut être viable après la revascularisation. Dans tous les cas, le chirurgien doit ainsi procéder à une revascularisation avant de résection intestinale, sauf si en face à une zone nécrosée, une perforation et une péritonite franches.[9]

1.2.1. Embolectomie chirurgicale

L'abdomen est mieux exploré par une incision verticale médiane. Un segment de l'AMS proximale entre les branches coliques moyenne et droite est isolé. Une dissection circonférentielle proche est souvent nécessaire pour isoler et contrôler les branches jéjunales dans ce segment. Après l'administration systémique d'héparine, l'artère est ouverte transversalement pour une réparation directe. Pour les petits vaisseaux, une courte artériotomie longitudinale peut également envisagée. L'AMS proximale est ouverte pour enlever le caillot sans ou avec utilisation d'un cathéter d'embolectomie. Le flux pulsatile de l'AMS est prévu après l'extraction d'embole.[9] L'embolectomie ouverte d'AMS reste une bonne option thérapeutique où le résultat devrait être vérifié par l'angiographie.[197]

1.2.2. Chirurgie de pontage de l'AMS

Plusieurs combinaisons d'orientation de mise en place du pontage sont disponibles. Les décisions sont influencées largement par la disponibilité des vaisseaux potentiels pour une anastomose proximale et par la présence ou l'absence de la péritonite. Dans le cadre émergent, un seul pontage à l'AMS est tout ce qui est nécessaire. Le chirurgien vasculaire peut effectuer un pontage rétrograde via l'artère iliaque droite commune, l'artère iliaque gauche ou l'aorte infrarénale distale. Si les sources distales sont inclampables, malades ou anévrismales, une dérivation antérograde peut être considérée. Les avantages de la dérivation antérograde comprennent le fait que l'aorte supra-cœliaque est exceptionnellement malade et que l'orientation de pontage est plus droite et moins susceptible de risque de la torsion. Le chirurgien vasculaire peut utiliser les veines saphènes ou fémorales comme le greffon de pontage. Le greffon de pontage synthétique de type Dacron ou polytetrefluoroethylène est aussi préféré mais la perméabilité supérieure des dérivations mésentériques prothétiques n'est pas bien documentée.[9]

1.2.3. Résection intestinale

En cas d'ischémie tardive, une laparotomie doit être pratiqué sans délai en double équipe par un chirurgien digestif et un chirurgien vasculaire. Les territoires nécrotiques seront réséqués

de façon appropriée. Un rétablissement de continuité immédiat est à éviter dans ce contexte et les segments intestinaux non réséqués seront laissés en stomie pour surveillance et anastomose ultérieure. En l'absence de revascularisation ou de revascularisation douteuse, un second look doit être envisagé à 24-48h.[234] En cas de nécrose intestinale extensive nécessitant de grande résection intestinale, une stratégie agressive de résection et de réanimation devrait être proposée si l'on envisage une nutrition parentérale à long terme ou une transplantation intestinale.[222]

2. Traitement symptomatique

2.1. Remplissage vasculaire

Quel que soient les mécanismes étiologiques (occlusifs ou non, artériels ou veineux), l'IMA s'accompagne d'un spasme vasculaire splanchnique réflexe pouvant persister après revascularisation et d'une hypovolémie par troisième secteur luminal intestinal. Un remplissage vasculaire est donc proposé avant même que l'hémodynamique systémique ne soit altérée. Le choix du soluté de remplissage reste controversé. Une étude a récemment comparé, dans un modèle expérimental de chirurgie digestive, les effets du remplissage vasculaire par cristalloïdes versus colloïdes sur le débit splanchnique et ses conséquences métaboliques. Les colloïdes semblaient avoir un effet de conservation et de rétablissement du débit splanchnique supérieur aux cristalloïdes. Ces derniers pourraient contribuer à majorer l'œdème pariétal intestinal, favorisé par l'atteinte de la perméabilité épithéliale, et donc la résistance vasculaire pariétale sans modification du débit sanguin ou du métabolisme intestinal.[4]

2.2. Traitement vasoactif

En cas de défaillance circulatoire, l'administration d'agents vasoconstricteurs peut être nécessaire. Cette situation est fréquente en cas de choc distributif associé, où les variations de perfusion régionale et du transport en oxygène sont importantes et difficilement prévisibles. L'administration de catécholamines doit, dans ce contexte, être prudente et proposée qu'après optimisation de la volémie. En effet, leurs effets délétères sur la circulation splanchnique sont potentiellement nombreux par majoration du spasme vasculaire mésentérique réflexe: baisse du débit sanguin, hypersécrétion gastrique acide, altération de l'extraction de l'oxygène, augmentation des lactates dans les veines hépatiques, iléus et défaillance hépatique. Des critères prédictifs d'une réponse au remplissage vasculaire pourraient être utiles afin de guider la prise en charge hémodynamique.[4]

La noradrénaline est théoriquement responsable d'une vasoconstriction mésentérique, variable selon les conditions d'expérimentation et la portion du tube digestif étudiée. L'augmentation de la pression de perfusion améliore les apports en oxygène, mais les effets de la noradrénaline sur la consommation en oxygène et le débit mésentérique sont souvent imprévisibles. En conditions expérimentales, la noradrénaline administrée à doses croissante améliore le débit cardiaque, le transport et l'extraction en oxygène. Cependant le débit microcirculatoire et la saturation tissulaire en oxygène du jéjunum ne sont pas améliorés. En réanimation, la plupart des études qui s'intéressent aux patients recevant de la noradrénaline pour le maintien de la pression artérielle moyenne après optimisation de la volémie, n'ont pas montré d'amélioration significative des indices de perfusion mésentérique ni d'effets indésirables. Chez ces patients, en dehors du contexte d'ischémie digestive, l'optimisation du débit systémique a probablement contribué à optimiser le débit splanchnique.[4]

De façon analogue, l'adrénaline peut réduire le flux sanguin mésentérique. Les effets vasoconstricteurs de l'adrénaline varient également en fonction du segment digestif. Dans une étude évaluant les effets des catécholamines sur la perfusion mésentérique chez 20 patients en choc septique, De Backer et coll ont montré que la perfusion mésentérique était moindre chez les patients traités par adrénaline en dépit d'une amélioration du débit cardiaque. Ces données restent néanmoins controversées d'autant qu'aucune différence en terme de morbi-mortalité n'ait pu être mise en évidence. Ainsi dans une étude récente, Schwarte et coll ont souligné l'importance du type d'anesthésie sur les effets splanchniques de l'adrénaline et de la noradrénaline. Dans ce travail expérimental, la noradrénaline et l'adrénaline augmentaient significativement les apports mésentériques en oxygène, respectivement de 60 et 140%.[4]

Une étude récente comparant la noradrénaline et la dopamine dans le traitement du choc septique ne retrouvait pas de différence de mortalité. Il était néanmoins rapporté davantage d'effets secondaires chez les patients traités par dopamine et notamment des IMA. Cette différenc n'était pas retrouvée chez les patients les plus graves.[4]

Les effets de la dobutamine sont également controversés. Une augmentation du flux sanguin mésentérique est observée, mais elle n'est pas toujours accompagnée d'une augmentation de la consommation en oxygène splanchnique. En association avec l'adrénaline, elle a montré une amélioration de la perfusion gastrique dans un modèle expérimental de choc septique. Seule, elle aggraverait la perfusion mésentérique dans un modèle animal expérimental d'occlusion de l'AMS.[4]

La vasopressine et la terlipressine sont aussi proposées par certains auteurs dans la prise en charge du choc septique réfractaire. Mais l'importante vasoconstriction splanchnique

secondaire à leur utilisation, pouvant aggraver l'ischémie digestive, ne permet pas recommander son utilisation dans ce contexte. Enfin, la dopexamine semble être la catécholamine la moins délétère pour la perfusion hépatosplanchnique mais ses effets restent mal connus chez l'homme.[4]

2.3. Traitement anticoagulant

En absence de saignement actif non maîtrisé, une anticoagulation à dose curative est recommandée pour traiter la maladie thrombotique ou embolique et prévenir la propagation d'un thrombus ou la récidive après traitement de revascularisation. Le ratio de TCA est ciblé à 2 fois le témoin. Elle pourra être interrompue transitoirement en cas de geste chirurgical.[4]

2.4. Traitement antibiotique

Les modifications du microbiote (pullulation anaérobie aux dépens de la flore aérobie) semblent assez précoces après ischémie intestinale et contribuent à entretenir et majorer les lésions épithéliales et la fonction de barrière.[235,236] Cette altération de la fonction de barrière épithéliale fait interagir sur une large surface ce microbiote avec le système immun sous-muqueux, stimulant l'immunité innée et les voies locales et systémique de l'inflammation.[235]
Le sepsis et le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS) auto-entretiennent la perte d'intégrité épithéliale intestinale par 1) une diminution du renouvellement cellulaire[237] 2) une stimulation apoptotique[43] 3/un phénomène de vol micro-vasculaire via une activation de la NO synthase.[238,239] Par ailleurs, la translocation bactérienne ou d'endotoxines (par voie portale ou lymphatique, donc rarement documentable en bactériologie) augmente l'intensité de la réaction systémique faisant du tube digestif, malgré l'absence fréquente de documentation microbiologique, un véritable foyer infectieux et dysimmunitaire conduisant à la défaillance multi-viscérale.[240] Dans les études expérimentales sur l'ischémie - reperfusion, le phénomène de translocation bactérienne est mis en évidence dans 25 à 100% des cas.[241]
Les modèles expérimentaux d'IMA ont montré que la translocation bactérienne, l'inflammation systémique et la mortalité peuvent être diminuées par une antibiothérapie administrée par voie entérale.[242]
Dans le cadre plus spécifique de l'IMA, il a été suggéré dans une étude pilote prospective sur 18 patients qu'une prise en charge multimodale incluant une antibiothérapie entérale systématique permettait une diminution de la mortalité et des taux de résection intestinale.[222]
Malgré l'absence de démonstration apportée dans la littérature, la crainte d'une sélection microbienne rend l'utilisation de l'antibiothérapie entérale ou systémique exceptionnelle,

notamment en réanimation.[243,244] Dans une méta-analyse récente intéressant 28852 patients de réanimation, Daneman et coll n'ont pas montré de sélection significative de BMR par l'utilisation des protocoles de décontamination digestive.[245] A contrario, la pratique de la décontamination digestive a même été montrée associée à une diminution significative du portage de BMR.[246,247] Ainsi, dans le cadre d'une utilisation restreinte à l'IMA, modèle par excellence d'altération de la perméabilité épithéliale digestive et de pullulation microbienne, et devant le risque vital immédiat associé à la translocation microbienne dans ce contexte, la balance bénéfices/risques de l'administration précoce d'une antibiothérapie entérale voire systémique semble être nettement en sa faveur et s'imposer devant le cadre du « bon usage» et du principe de précaution.[12,222]

2.5. Nutrition

Toute nutrition administrée par voie orale ou entérale est susceptible d'accroître les besoins métaboliques et en O_2 du tissu intestinal (épithélium et musculeuse notamment) et d'aggraver les lésions d'ischémie et de reperfusion. De plus, la sidération musculaire lisse (iléus) réflexe et la dilatation intestinale accompagnant l'ischémie compromettent cette voie nutritionnelle en situation aiguë. La mise en place d'une sonde nasogastrique n'a alors de sens qu'en aspiration pour permettre de réduire éventuellement la pression intra-abdominale, potentiellement délètère pour la perfusion digestive. Une nutrition parentérale est ainsi proposée tant que l'ischémie intestinale aiguë est évolutive.[222]

3. Traitement d'ischémie mésentérique non occlusive (IMNO)

Le traitement des IMNO est avant tout étiologique : traitement d'une insuffisance cardiaque ou d'un sepsis sévère, correction d'une hypovolémie.[4] Le diagnostic précoce est primordial car cela offre la seule chance de guérisson. L'angiographie mésentérique est le test qui est capable de diagnostiquer mais il n'est pas effectué en routine car il est invasif, a besoin de l'expertise spéciale et difficile à faire chez patient instable.[248] L'administration de papavérine lors de l'artériographie diagnostique est proposée. En l'absence de péritonite, une nouvelle artériographie peut être proposée dans les 24 heures pour vérifier la disparition du vasospasme. Certains auteurs préconisent également une héparinothérapie intraveineuse en prévention de la thrombose du vaisseau traité.[4]

Le traitement médical qui vise à l'amélioration de la perfusion de la muqueuse devrait commencer par remplissage vasculaire. Les catécholamines ne doivent être administrées qu'après un remplissage vasculaire suffisant. À côté de la reconnaissance de l'ischémie

muqueuse comme un facteur majeur chez ces patients, des études ont été réalisées dans le but de restaurer l'ischémie ou pH intra-muqueuse avec un succès limité. Ce résultat est expliqué probablement par la difficulté de réorienter le flux sanguin vers l'intestin sans affecter d'autres organes ou parce que les lésions de reperfusion restent ou augmentent. Puisque les effets négatifs de l'ischémie sont aggravés principalement par les lésions de reperfusion, et ces dernières lésions sont presque toujours présentes chez les patients d'IMNO, l'approche thérapeutique d'ischémie - reperfusion nécessite une exploration plus particulière. L'effet bénéfique des inhibiteurs de l'enzyme de conversion a été démontré dans les modèles expérimentaux sur l'ulcération due au stress, mais une seule étude clinique a montré une amélioration sur l'ischémie mésentérique.[5] Les antagonistes de l'endothéline sont probablement les nouveaux médicaments les plus prometteurs car ils bloquent la voie finale commune de la vasoconstriction mésentérique. Les données sur les animaux indiquent leur efficacité potentielle spécifique sur l'ischémie gastro-intestinale après un choc hypovolémique et septique.[56,249] Les prostaglandines ont été utilisées avec succès dans un modèle expérimental de sepsis chez le chat et à confirmer chez les patients de choc septique.[250] Les molécules visant à la lésion de reperfusion, comme N-acétylcystéine et vitamine E, réduisent cette lésion dans les modèles animaux. Cette approche est prometteuse mais sous-estimée cliniquement.[251,252]

La nutrition entérale précoce peut améliorer la perfusion et les effets immunologiques[5]. Elle augmente la perfusion mésentérique dans les modèles expérimentaux du choc après hypoperfusion, post-opératoire et chez les brûlés.[5,253,254]

Première partie : Modèle expérimental d'ischémie - reperfusion mésentérique

I. GENERALITES DES MODELES EXPERIMENTAUX D'ISCHEMIE - REPERFUSION MESENTERIQUE

La morbi-mortalité élevée du syndrome d'ischémie - reperfusion mésentérique explique son intérêt particulier en recherche préclinique. Malgré le nombre croissant d'études expérimentales publiées sur ce sujet, aucune n'a aujourd'hui d'application clinique utile. Ceci peut être expliqué par les divers processus pathologiques conduisant à l'ischémie - reperfusion intestinale, mais également par une sélection inappropriée du modèle de recherche. Les modèles animaux font partie intégrante de l'étude des lésions intestinales induites par l'ischémie - repefusion mésentérique. Cependant, les situations cliniques altérant la circulation mésentérique chez l'homme sont variées et complexes qui peuvent être cause et conséquence de la lésion intestinale ischémique et associées des défaillances systémiques.[255]

Les modèles animaux sont indispensables pour la recherche du mécanisme de l'ischémie - reperfusion mésentérique[256,257] mais, chaque modèle ayant des avantages et des inconvénients, aucun modèle ne peut récapituler parfaitement à lui seul le début et la progression naturelle de la maladie humaine.[255]

Tableau 2. Comparaison des modèles d'ischémie mésentérique.[255]

	Occlusion vasculaire complète		Bas débit	Occlusion vasculaire segmentaire
	Ligature de l'AMS	Embolisation de l'AMS		
Avantages	- Modèle des causes artérielles occlusives - Facilité de réalisation du modèle chirurgical	- Modèle des causes artérielles occlusives - Intestin non exposé ou manipulé - Idéal pour les études radio-diagnostiques	- Modèle des causes non occlusives - Modèle accentuant la lésion de reperfusion	- Modèle des causes occlusives distales - Etude simultanée de différentes durées d'ischémie - Modèles expérimentaux chez l'homme
Inconvénients	- Mauvais modèle	- Mauvais modèle	- Difficulté élevée	- Ligature de

	d'ischémie chronique - Modèle limité aux causes artérielles occlusives - Variabilité des lésions ischémiques en sévérité et extension - Mortalité élevée - Pas de réduction de flux au colon distal	d'ischémie chronique - Modèle limité aux causes artérielles occlusives - Difficulté de l'approche chirurgicale - Nécessité d'animaux de grande taille - Occlusion vasculaire non reversible empêchant l'étude de la reperfusion	de la chirurgie - Lésions ischémiques minimisées	l'artère et de la veine mésentérique

Dans les modèles animaux, l'importance de la lésion de reperfusion après ischémie a été et est toujours controversée. Elle semble dépendre du type d'ischémie (occlusion artérielle complète versus incomplète), de la durée de l'ischémie, de l'espèce animale et du segment intestinal touché.[255]

La méthode d'occlusion vasculaire complète pour l'induction de la lésion intestinale ischémique chez les rongeurs est actuellement l'approche la plus utilisée en recherche expérimentale sur l'ischémie - reperfusion mésentérique. Les rongeurs sont avantageux en raison de leur coût, de la facilité de maintenance et du taux de reproduction rapide. Un grand nombre d'études utilise des modèles chez le rat.[255]

II. NOTRE MODELE EXPERIMENTAL D'ISCHEMIE - REPERFUSION MESENTERIQUE

Les études d'intervention thérapeutique ciblent généralement la lésion oxydative et l'activation neutrophilaire.[255] Puisque les neutrophiles jouent un rôle très important dans le syndrome d'ischémie - reperfusion mésentérique, nous avons réalisé un modèle d'ischémie - reperfusion mésentérique testant deux molécules : le Fucoidan et le P8RI

1. Fucoidan

Les Fucoidans correspondent à un type de polysaccharide qui contient des taux importants de L-fucose et des groupes esters sulfates, provenant principalement des algues brunes.[258-260] Depuis les années 1990, notre laboratoire a une grande expérience scientifique dans le

domaine des Fucoidans (plus de 15 publications internationales, et plusieurs brevets). Les Fucoidans possèdent un large panel d'actions biologiques, notamment anti-inflammatoires, anti-coagulantes, et anti-adhésives.[261]

La structure du Fucoidan correspond à un polymère de fucose sulfaté. Notre équipe a récemment comparé l'interaction de la P-sélectine avec différents polysaccharides de poids moléculaire faible: Fucoidan, l'héparine et le sulfate de dextrane. Plusieurs expériences de liaison ont été effectuées (plaques de micro titration, spectrométrie de masse, résonance plasmonique de surface). Des expériences de cytométrie de flux sur sang humain ont été effectuées avec l'isothiocyanate de fluorescéine sur les polysaccharides avec ou sans activateurs de plaquettes. Le Fucoidan empêche la liaison de la P-sélectine pour le sialyl Lewis X. La spectrométrie de masse met en évidence la formation d'un complexe entre la P-sélectine et le Fucoidan. L'intensité de la fixation du Fucoidan à la P-selectin est dépendante du niveau de l'activation cellulaire. La compétition entre Fucoidan et un anticorps anti-P-sélectine a montré la spécificité de l'interaction. Par rapport aux anticorps ou sialyl Lewis^X, le Fucoidan est un produit de faible coût, produit industriellement. Le développement du Fucoidan comme ligand multimodal a fait l'objet d'un dépôt de brevet : « Fucoidan comme ligand pour le diagnostic des pathologies dégénératives », a été breveté par l'Inserm;. JB Michel, L. Bachelet, F. Chaubet, F. Rouzet, A. Meulemans, D. Letourneur. Brevet International. PCT/FR2009/050659 2009. Dans ce travail le groupe a montré que le Fucoidan marqué au technetium marquait puissament les zones d'ischémie - reperfusion cardiaque chez le rat.

En bloquant la P-selectin, le Fucoidan limite les interactions entre l'endothélium activé et les neutrophiles et probablement les bactéries. Les effets bénéfiques du Fucoidan en pathologie infectieuse ont déjà été rapportés comme dans la méningite expérimentale.[262] Nous utiliserons du Fucoidan de bas poids moléculaire (5000 - 7500 Daltons) produit par dépolymerisation oxidative de haut poids par Algues et Mer (Ouessant).

2. Peptide P8RI

Zehnder et coll ont identifié un anticorps qui inhibe la réaction lymphocytaire mixte (MLR) d'une manière spécifique et dépendante de la dose. Ils ont en outre découvert qu'un peptide de CD31 correspondant à l'épitope de cet anticorps et se composant de 23 acides aminés proximaux de la membrane cellulaire inhibait fortement le MLR. Ils ont émis l'hypothèse que ce peptide constituait une région fonctionnelle importante et interférait avec l'activation des lymphocytes par compétition avec des épitopes liés. Cependant, les auteurs n'ont pas pu

déterminer si la signalisation médiée par le CD31 était activée ou inhibée par le peptide de CD31.[263]

Chen et coll ont montré que ce peptide empêchait l'apparition de la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD, graft-versus-host disease) et augmentait la survie à long terme dans un modèle murin de cette maladie. Ils ont émis l'hypothèse que le peptide de CD31 inhibait une voie commune dans l'activation des lymphocytes T. Encore une fois, ils n'ont pas réussi à élucider le rôle du peptide de CD31 dans l'activation des lymphocytes T.[264]

Notre laboratoire a montré qu'un risque élevé d'athérosclérose était lié à l'augmentation du CD31 clivé et à la diminution des autres parties solubles du CD31, et non lié à la concentration totale du CD31 circulant. De plus, l'observation que le CD31 n'était pas inexprimé mais uniquement clivé à la surface des lymphocytes activés a fait poser l'hypothèse d'une restauration possible de sa fonction immunorégulatrice physiologique en ciblant la partie résiduelle de la molécule. Notre laboratoire a développé un peptide de CD31 qui se compose d'une séquence inverse des 8 acides aminés de CD31 (aa582-589) en forme D-énantiomère. La structure de ce peptide est H-kwpalfvr-OH avec une masse moléculaire de 1016 Daltons (Da).

Le développement du peptide de CD31 a fait l'objet d'un dépôt de brevets "Utilisation de peptides de CD31 dans le traitement d'affection thrombotique et auto-immunes" (WO 2010000741 A1) et "Peptides de CD31 améliorés" (WO 2013190014 A1) brevetés par l'Inserm; Giuseppina Caligiuri et Antonino Nicoletti.

À côté de l'effet de ce peptide en maladie thrombotique et auto-immune, les résultats préliminaires du laboratoire ont montré un effet thérapeutique potentiel dans un modèle murin d'ischémie - reperfusion cérébrale.

3. Modèle expérimental d'ischémie - reperfusion mésentérique

3.1. Animaux

Les animaux utilisés dans cette étude sont des rats de type Wistar, âgés entre 8 et 10 semaines et pesant entre 250 à 350g.

3.2. Protocole chirurgical

Les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une dose d''uréthane fonction du poids (protocole suivant):

Solution d'uréthane à 0.75 g/ml (45 g dans 60 ml d'eau) - conservation à 4°C

Volume à injecter en intrapéritonéal en fonction du poids du rat

Tableau 3. Protocole d'anesthésie avec uréthane - Volume en ml

Poids (g)	**200**	**300**
0	0.54	0.81
5	0.55	0.82
10	0.57	0.84
15	0.58	0.85
20	0.60	0.86
25	0.61	0.87
30	0.62	0.89
35	0.63	0.90
40	0.65	0.92
45	0.66	0.93
50	0.68	0.95
55	0.69	0.96
60	0.70	0.97
65	0.71	0.98
70	0.73	1.00
75	0.74	1.01
80	0.75	1.02
85	0.76	1.03
90	0.78	1.05
95	0.79	1.06

La chirurgie est réalisée sur une table chauffante à température 37^{o}C. Les rats sont intubés et ventilés.

Un cathéter de perfusion veineux central en silicone est posé au niveau de la veine jugulaire droite. Un autre cathéter de type plastique PE50 est mis en place au niveau de l'artère carotide droite pour réaliser les prélèvements sanguins aux différrents temps. Les urines sont collectées via un cathéter sus-pubien posé chirurgicalement.

Le type de perfusion est choisi en fonction du groupe de rats:

- Contrôle et laparotomie blanche: sérum physiologique
- Fucoidan: Fucoidan dilué dans du sérum physiologique

- P8RI: Peptide P8RI dilué dans du sérum physiologique

La perfusion est démarrée après la mise en place de cathéter veineux en appliquant une vitesse de perfusion de 10ml/kg/h pendant toute l'expérimentation.

Les rats sont laparotomisés sur la ligne médiane avant dissection de l'artère mésentérique supérieure. L'osbtruction de l'AMS est réalisée par une ligature sur une tube plastique pendant 30 minutes. La reprise de la circulation artérielle mésentérique est obtenue en coupant la ligature de l'AMS, permettant une reperfusion pendant 4 heures. À la fin des 4 heures de reperfusion mésentérique, les rats sont sacrifiés et le prélèvement des organes est effectué.

3.3. Prélèvements

3.3.1. Prélèvement sanguin

Le sang est prélevé à six différents moments de l'expérimentation; T0: avant l'anesthésie, T1: après 30 minutes d'ischémie mésentérique, T2, T3, T4 et T5: 1h, 2h, 3h et 4h de reperfusion, respectivement.

Le premier prélèvement sanguin (T0) est réalisé par la voie rétro-orbitaire avec une pipette de Pasteur. Le sang des 5 autres moments (500 µL) est prélevé par le cathéter veineux central sur tube EDTA.

Pour chaque prélèvement, un volume de 40 µL de sang total est mis dans un eppendorf et stocké à -80°C pour la PCR quantitative de recherche des matériels génétiques d'E.coli. Le sang restant est centrifugé à 500G pendant 15 minutes à 4^{o}C. Le surnageants (plasma) sont récupérés et à nouveau centrigugés à 16000G pendant 30 minutes à 4^{o}C. Le plasma obtenu après la deuxième centrifugation est aliquoté et stocké à -80^{o}C pour les dosages ultérieurs.

3.3.2. Liquide péritonéal

Le liquide péritonéal est prélevé à quatre différents moments de l'expérimentation: T0: avant le clampage de l'AMS, T1: après 30 minutes d'ischémie, T2 et T3: 2h et 4h de reperfusion. Le liquide est prélevé sur tube EDTA avant d'être centrifugé à 500G pendant 15 minutes à 4^{o}C. Les surnageants sont récupérés et à nouveau centrigugés à 16000G pendant 30 minutes à 4^{o}C avant d'être aliquoté et stocké à -80^{o}C pour les dosages ultérieurs.

3.3.3. Prélèvement tissulaire

L'ablation de l'intestin grêle du rat est réalisée par la coupe au niveau de la frontière entéro-mésentérique. Une partie de 2 - 3 cm au milieu d'intestin est coupée et fixée dans le formol, incluant une injection de formol dans la lumière intestinale.

Le contenu intraluminal est récupéré en extrudant l'intestin avec des pinces. Ce contenu et l'intestin grêle restant sont stockés séparément et rapidement à -80°C pour les dosages ultérieurs.

L'intestin restant est homogénéisé par un système de billes (TissuLyser) avec le tampon de RIPA avant d'être centrifugé à 16000G pendant 30 minutes à 4^{o}C. Les surnageants sont récupérés, aliquotés et stocké à -80^{o}C pour les dosages ultérieurs.

3.4. Dosage des paramètres biologiques

3.4.1. Activation neutrophilaire:

3.4.1.1. Numération neutrophilaire sanguine:

Les neutrophiles sanguins sont quantifiés par le compteur SCIL Animal Care Company GmbH avec les résultats exprimés en x10^{3} /µL de sang artériel.

3.4.1.2. Activation neutrophilaire

Nous avons mesuré l'activation neutrophilaire par les dosages suivants:

- MMP-9 dans le plasma, liquide péritonéal et l'homogénat intestinal (méthode ELISA avec le kit Total MMP-9 DuoSet ELISA, R&D SYSTEMS®).
- MPO dans l'homogénat intestinal avec la méthode ELISA directe. La courbe de standard est réalisée en utilisant la MPO recombinante (USCN®) et l'anticorp de rat anti-MPO biotinylé (Hycult®). Elle est normalisée par la concentration en protéines totales.
- ADN libre circulant dans le plasma avec la méthode de fluorescence Picogreen (Quant-it Picogreen dsDNA Reagent Kit, Invitrogen®).

3.4.2. Conséquences digestives

- Hémoglobine intraluminale: La concentration de l'hème dans le liquide intraluminal est mesurée par la méthode colorimétrique à l'acide formique. Elle est normalisée par la concentration en protéines totales.

3.4.3. Histologie

- Coloration au Bleu Alcian et Rouge nucléaire
- Classification de la sévérité lésionelle histologique par le score de Chiu/Park modifié
- Morphométrie quantitative sur coupes histologiques transversales avec mesure de la hauteur épithéliale, épaisseur de la couche musculaire, diamètre et contour de la lumière intestinale, nombre des cellules Goblet (logiciel QWin).

2.3.4.4. Translocation bactérienne

La quantification des matériels génétiques de la bactérie *E.coli* a été réalisée avec la méthode de PCR quantitative dans le sang total. Les amorces utilisées étaient fournies par Eurogentec® et la machine utilisée est le CFX96^{TM} Real Time System (BioRad®).

3.4.5. Clivage de CD31

La concentration de CD31 clivés dans le plasma a été déterminée par la méthode de cytométrie en flux sur le système BioPlex 200 System, BioRad® en utilisant des billes magnétiques CBA, BioRad® couplées à l'anticorp anti-CD31 du rat, R&D SYSTEMS®.

3.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 5 pour Mac OS X. Les tests Mann-Whitney et t de Student ont été utilisés pour comparer les variables à des temps spécifiques. La cinétique des variables a été comparée avec une analyse de variance (ANOVA) à 2 facteurs suivie par des tests post-hoc de Kruskal-Wallis et Bonferroni. La corrélation entre le score Chiu/Park modifié et les paramètres morphométriques est évaluée par le calcul du coefficient de corrélation de Spearman. La corrélation bivariée entre les variables a été analysée par le coefficient de corrélation Pearson. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée statistiquement significative.

III. PRESENTATION DE NOTRE ETUDE

Notre étude a été présentée en poster électronique et en communication libre dans le Congrès de la Société Française d'Anesthésie et de Réanimation en Septembre 2016.

Partie 2 : Résultats

I. FUCOIDAN

1. Modèle expérimental d'une heure d'ischémie - 4h de reperfusion mésentérique Les rats étaient anesthésiés puis opérés avec clampage de l'artère mésentérique supérieure pendant 1 heure et la reperfusion mésentérique suivie pendant 4 heures. Deux groupes des rats ont été realisés: groupe contrôle positif (9 rats) avec la perfusion de sérum physiologique et groupe Fucoidan (9 rats) avec la perfusion continue de Fucoidan à 40 mg/kg/h à 30 minutes avant la laparotomie et pendant l'ischémie - reperfusion mésentérique.Nous avons mis en évidence que le temps d'ischémie mésentérique de 1 h est un modèle expérimental fort avec un taux de mortalité peropératoire d'environs 30%.

1.1. Lactates plasmatique

Nous avons dosé la concentration de lactate dans la plasma à T0 (avant la chirurgie), après 1 h d'ischémie, à 2 h et 4 h de reperfusion mésentérique. Le dosage a eté réalisé au laboratoire Biochimie de l'UFR de Médecine Paris 7 - site Bichat sur un automate multiparamétrique Olympus AU 400. Les valeurs de base de lactate plasmatique est de 2,2 mmol/L et il n'y a pas de changement net de cette concentration durant l'ischémie - reperfusion mésentérique. L'analyse de variance à 2 facteurs ne montre pas une différence significative entre 2 groupes contrôle et Fucoidan ($p = 0,131$; figure 22).

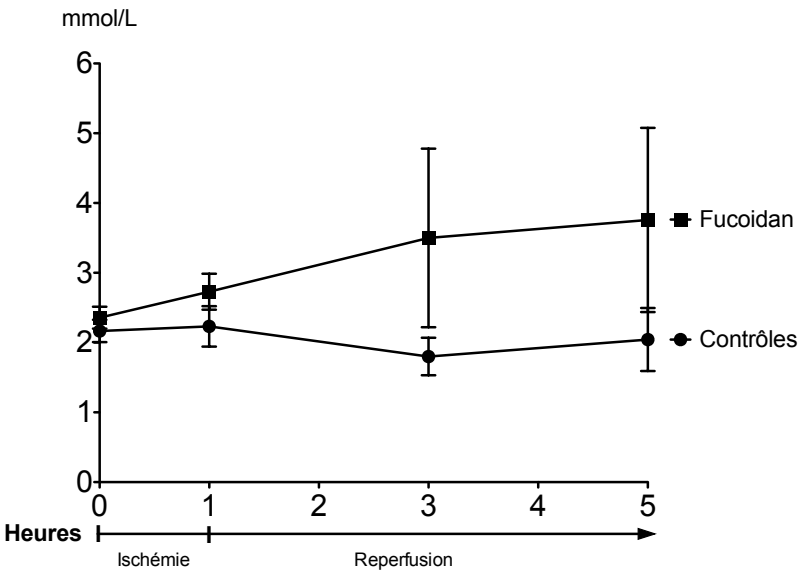


Figure 22. Concentration de lactate plasmatique - Modèle expérimental d'une heure d'ischémie et 4h de reperfusion.

1.2. ADN libre circulant

Le dosage d'ADN libre circulant, méthode fluorescence à Picogreen, a montré une nette augmentation d'ADN libre en fonction du temps d'ischémie - reperfusion mésentérique mais il y a aucune différence significative entre 2 groupes (figure 23).

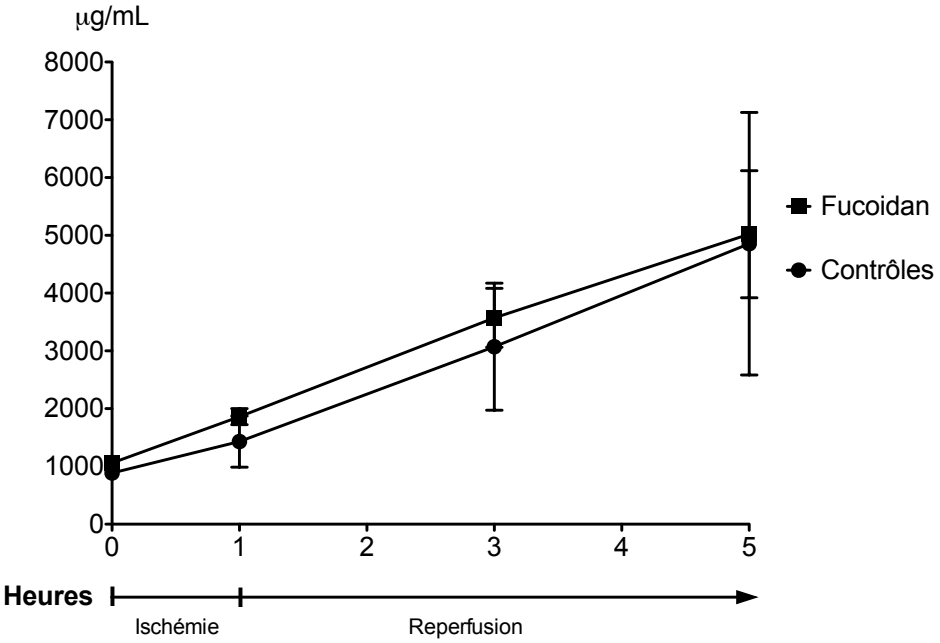


Figure 23. Cinétique d'ADN libre circulant du modèle d'une heure d'ischémie et 4 h de reperfusion.

1.3. Hb intraluminale

Le marqueur de l'hémorragie digestive, Hb intraluminale, a été mesuré par la méthode de dosage de l'hème avec acide formique. Le résultat est normalisé à la concentration de protéines totales dosée dans le contenu intraluminal des rats opérés. Les taux d'Hb intraluminale du groupe contrôle et de groupe Fucoidan sont respectivement de 195,4 ± 164,2 µg/mg et 221,3 ± 167,8 µg/mg de protéines totales (Figure 24). Le test statistique Mann-Whitney ne montre pas de différence significative entre 2 groupes (p = 0,74).

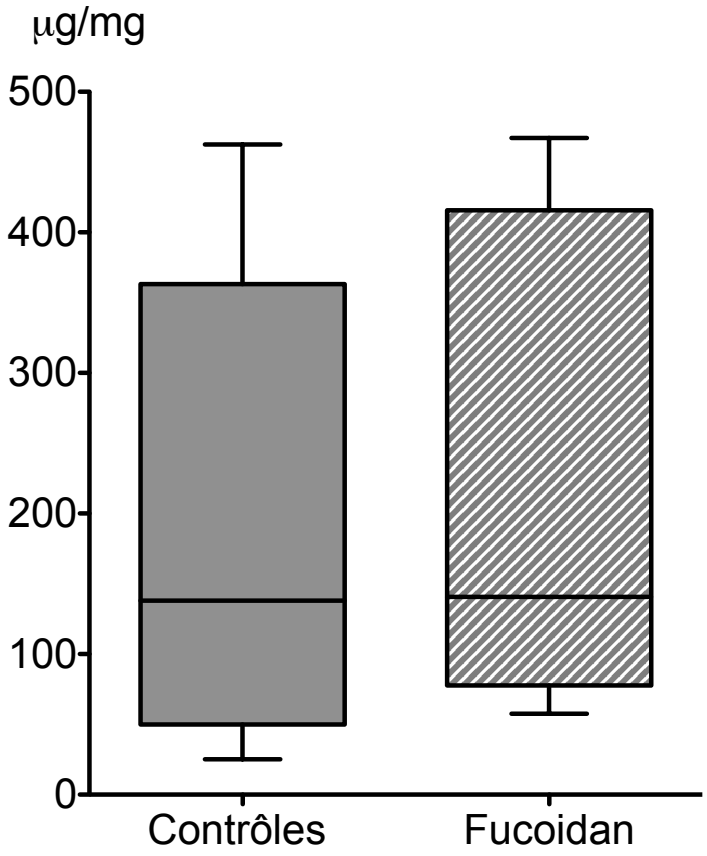


Figure 24. Taux d'Hb intraluminale du modèle d'une heure d'ischémie et 4 h de reperfusion

Nous avons conclu que la dose de Fucoidan utilisée n'est pas appropriée et le temps d'ischémie d'une heure est très aggressive pour un modèle expérimental. Le temps d'ischémie mésentérique a été par conséquence réduit en 30 minutes et le temps de reperfusion toujours de 4h.

2. Modèle expérimental de 30 min d'ischémie - 4h de reperfusion mésentérique

2.1. Posologie de Fucoidan

Nous avons testé les 2 autres doses de Fucoidan : 80mg/kg/h (6 rats) et 4mg/kg/h (6 rats).

2.2. ADN libre circulant

Le dosage d'ADN libre circulant des groupes contrôles (8 rats), Fucoidan faible dose (6 rats) et Fucoidan forte dose (6 rats) nous a montré un effet d'aggravation du Fucoidan dans l'ischémie - reperfusion mésentérique (Figure 25) avec une augmentation significative des ADN libres dans les 2 groupes Fucoidans (analyse de variance à 2 facteurs, $p < 0,05$).

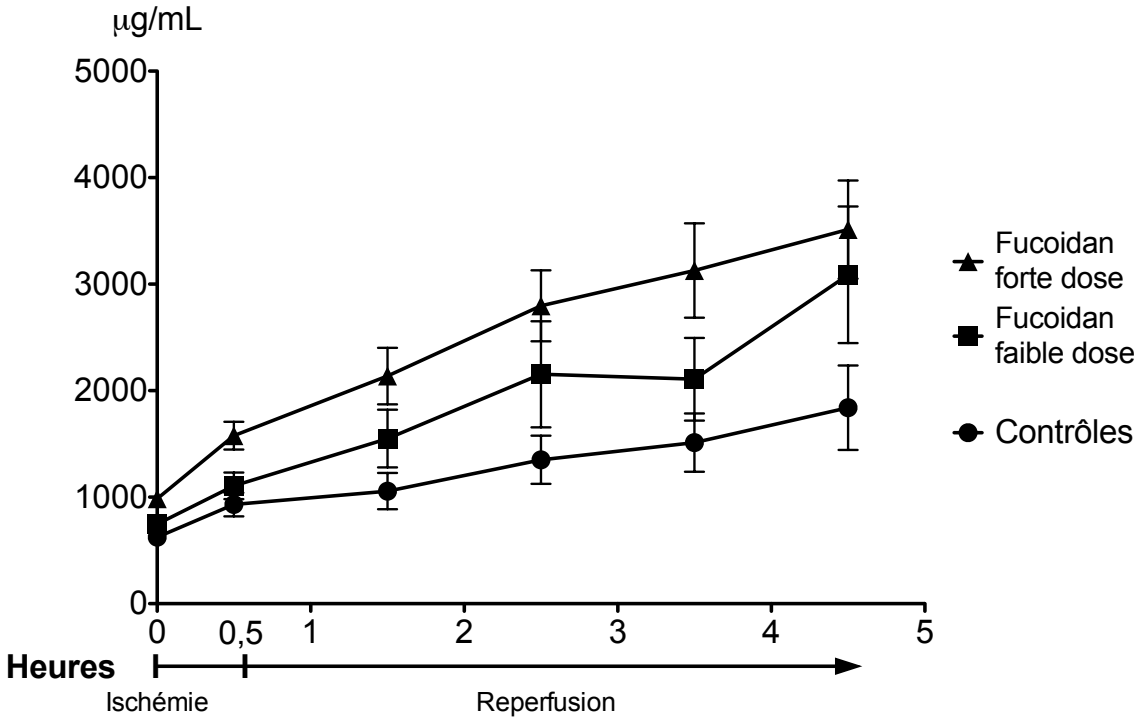


Figure 25. Cinétique d'ADN libre circulant de groupe de Fucoidan à forte dose, à faible dose et de contrôle positive

2.3. Hb intraluminale

Le taux d'Hb intraluminale des groupes contrôles positives, Fucoidan forte dose et Fucoidan faible dose sont respectivement 317,1 ± 93,27; 197,9 ± 87,91 et 287,9 ± 129,1 µg/mg de protéines totales (Figure 26).

L'analyse de variance à un facteur ne montre pas de différence entre les groupes ($p = 0,13$). Le test Mann-Whitney a justifié par contre une diminution significative d'Hb intraluminale dans le groupe Fucoidan forte dose en comparant le groupe contrôle ($p < 0,05$).

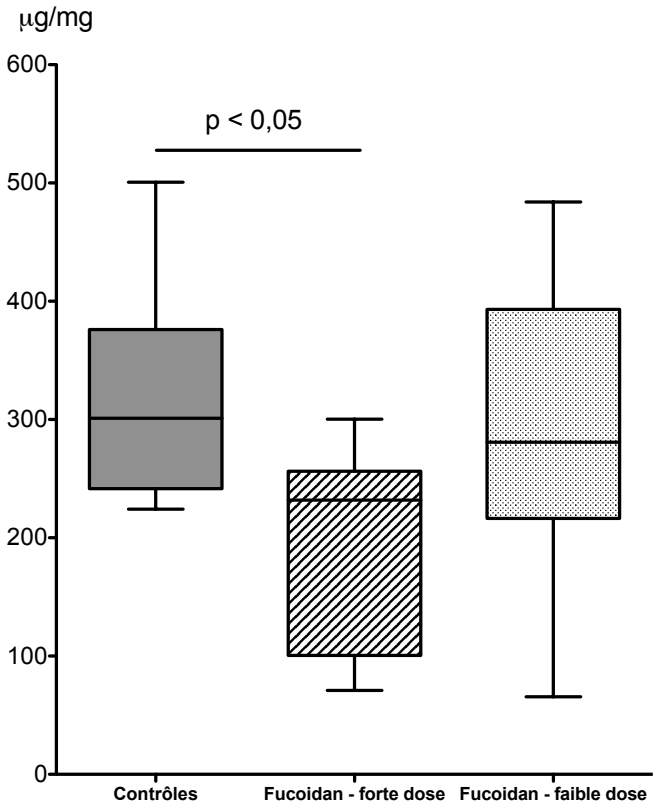


Figure 26. Hb intraluminal de groupe de Fucoidan à forte dose, à faible dose et de contrôle positive

II. PEPTIDE AGONISTE DE CD31 - P8RI

Le modèle de traitement avec le peptide agoniste du récepteur CD31 fait l'objet un article scientifique qui est présenté à la suite.

Partie 3 : Article

Protective effects of pharmacological activation of CD31 on mesenteric ischemia reperfusion injury in rats

Quoc Thang Hoang[1], Nuzzo Alexandre[1,2], Louedec Liliane[1], Delbosc Sandrine[1], Andreata Francesco[1], Khallou-Laschet Jamila[1], Montravers Philippe[3], Longrois Dan[1,3], Caligiuri Giuseppina[1], Nicoletti Antonino[1], Tran-Dinh Alexy[1,3] Michel Jean-Baptiste[1].

1 INSERM LVTS U1148, CHU Bichat Claude-Bernard, Paris, France

2 Structure d'URgences Vasculaires Intestinales (SURVI), CHU Beaujon, Clichy, France

3 Département d'anesthésie-réanimation, CHU Bichat Claude-Bernard, Paris, France

Correspondance to:

Michel Jean-Baptiste

INSERM LVTS U1148, CHU Bichat Claude-Bernard

46, rue Henri Huchard

75877 Paris Cedex 18, France

Tel: 00 33 1 40 25 75 26

Email: jean-baptiste.michel@inserm.fr

Abstract

Background: Intestinal ischemia/reperfusion (I/R) injury is associated with a high mortality. The role of transmigration of PMNs is probably essential in I/R-induced intestinal barrier dysfunction and subsequent necrosis. The aim of this study was to evaluate, at a preclinical level, the potential therapeutic value of P8RI peptide (a CD31 agonist), in small bowel I/R injury.

Methods: Intestinal I/R was induced in Wistar rats by superior mesenteric artery (SMA) clamping for 30 min followed by 4 h of reperfusion. Three groups of rats were compared: P8RI (n=20, I/R and P8RI 2.5mg/kg/h infusion), I/R positive controls (n=21, I/R and normal saline infusion), and sham operated negative controls (n=14, SMA dissection with no clamping and normal saline infusion). Plasma, peritoneal fluid and intestinal matrix metallopeptidase 9 (MMP-9), intestinal MPO, plasma cf-DNA, intraluminal hemoglobin levels and epithelial thickness were all evaluated as intermediate markers of intestinal injury. Detection of E.coli genetic material by quantitative PCR in blood was also performed in I/R controls and P8RI-treated rats during the reperfusion period. Plasma cleaved CD31 was measured by homemade ELISA.

Results: The small bowel histologic grade in P8RI-treated animals was higher than in I/R controls ($p < 0.05$). P8RI protected against epithelial destruction induced by I/R injury ($p < 0.01$). There was a significant negative correlation between epithelial abrasion and Chiu's score of histologic grading of mesenteric I/R injury ($r = -0.7245$, $p < 0.001$). P8RI protected the small bowel from *in situ* MPO and MMP-9 release ($p < 0.05$) and digestive bleeding complications due to I/R injury ($p < 0.01$). The increased plasma and peritoneal MMP-9 levels induced by I/R were significantly reduced by P8RI ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). Plasma cf-DNA during reperfusion in I/R controls increased significantly more than in the P8RI group ($p < 0.05$). E.coli DNA was significantly higher in I/R controls than in the P8RI group ($p < 0.05$). P8RI had no effect on blood neutrophil counts but induced a significant diminution of cleaved CD31 in plasma during mesenteric I/R ($p < 0.01$). Correlations between epithelial abrasion and plasma cf-DNA, MMP-9, cleaved CD31, intestinal MMP-9 and MPO levels suggest that the protective mechanism of P8RI might involve the inhibition of neutrophil activation, including CD31 cleavage.

Conclusions: This study suggests that a treatment by P8RI peptide, a CD31 agonist, reduces small bowel I/R injury in rats.

INTRODUCTION

Acute mesenteric ischemia-reperfusion is a life-threatening emergency with a high mortality rate, reaching 58% in intensive care unit patients.[1] It may arise in a broad range of clinical conditions including superior mesenteric artery occlusion[2] and non-occlusive mesenteric ischemia related to cardiac surgery[3], aortic surgery[4] and hemorrhagic[5], cardiogenic[6] or septic shock. Ischemia-reperfusion (IR) injury can result in irreversible bowel damage leading to transmural necrosis, an overwhelming inflammatory response[7], multiple organ failure[8,9] and death.

Intestinal I/R is pathogenic of systemic innate immune response and multiple organ failure observed in these clinical acute conditions.[10] Intestinal I/R is highly morbid and associated with mortality in both surgical and trauma patients.[11] I/R injury is defined by initial vascular events, involving blood stasis, coagulation and leukocyte extravasation, and their tissue consequences, ultimately leading to tissue necrosis. There is growing evidence that incriminates platelets and polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and their interactions with the endothelium as major actors in the pathophysiology of intestinal I/R.[11,12] Leukocyte rolling, margination and extravasation into the interstitial compartment is facilitated by P-selectin exposed by activated platelets and endothelial cells, but not by CD31 (PECAM).[13] On reaching the extravascular compartment, activated neutrophils release toxic reactive oxygen species (ROS), and proteases, resulting in increased microvascular permeability, edema, thrombosis, and parenchymal cell death.[14]

CD31 is a ~130 kDa Type 1 transmembrane glycoprotein that belongs to the Ig superfamily. It is expressed by leukocytes, platelets and endothelial cells.[15,16] Transhomophilic engagement of CD31 raises the activation threshold of these different cell types through intercellular recruitment and activation of SH2 tyrosine phosphatase.[17] When submitted to activating stimuli strong enough to overcome this activation threshold, the occurence of cell activation is accompanied by the cleavage and shedding of most extracellular CD31, which invalidate the transhomophilic engagement of the receptor thus enhancing the capacity of the target cell to be further activated.[13] A lack of CD31 signaling enhances T-cell activation and increase T-cell infiltration to atherosclerotic arteries.[18,19] Of interest, after the shedding part of the membrane-proximal extracellular sequence remains exposed at the cell surface. We recently identified an artificial octapeptide (termed P8RI, patent WO2131090014) which is able to

engage the intracellular signaling of CD31 in spite of its cleavage. This peptide is derived from a native sequence[15] and is optimized for use as a therapeutic agent, *in vivo*. Since it can reduce target cell activation event in conditions where endogenous CD31 is likely to be shed, we hypothesized that P8RI can play a protective role in mesenteric I/R by preventing excessive neutrophil activation.

Thus, the aim of the present study was to investigate the therapeutic effect of a CD31-derived peptide (P8RI) in preventing or reducing the mesenteric I/R injury in a rat model.

MATERIALS AND METHODS

Animal

The procedure and the animal care complied with the principles formulated by the National Society for Medical Research (animal facility agreement: n° B75-18-03, experimentation authorization n° 75-101). Eight week-old male Wistar rats were purchased from the Janvier laboratory. Rats were housed in stainless steel cages in a hygienic, well-ventilated animal facility. They had free access to standard rat pellets and water.

Mesenteric ischemia-reperfusion injury

Rats were randomized into 3 groups as follows: an ischemia reperfusion (I/R) group (positive controls, 21 rats), an I/R+ P8RI group (P8RI treated-group, 20 rats) and a sham-operated group (negative controls, 14 rats). The rats' body temperature was maintained at 37°5C on a heated surgical table. Non-fasting rats were anesthetized by intraperitoneal injection of 2 mg/kg of urethane. The right jugular vein was cannulated via for venous perfusion and the right carotid artery, for blood collection and arterial pressure measurement. Laparotomy was performed using a ventral midline incision. In the sham group, the Superior Mesenteric Artery (SMA) was dissected and exposed but not occluded. In the control and P8RI groups, the SMA was exposed and clamped at the level of its origin in the aorta, using a microvascular bulldog clamp. The clamp was removed after 30 min of ischemia, allowing reperfusion for 4 hours. A single 1 mg intravenous bolus of P8RI was administered 5 min before clamping the SMA and was followed by a continuous perfusion at 1 mg/h until the end of the reperfusion period. The same procedure was performed for the control group by replacing P8RI with saline.The experimenter was blinded with regard to the treatment given.

Arterial blood samples and peritoneal fluid were collected in tubes containing 1.8 mg of EDTA per ml of blood just prior to laparotomy, 30 min after clamping the SMA and every

hour during the 4 hours of reperfusion (after 2 and 4 hours of reperfusion for peritoneal fluid). Blood and peritoneal fluid samples were centrifuged for 30 min at 16,000 g and the supernatants obtained were aliquoted and stored at -80°C until analysis. All rats were euthanized under general anesthesia after the procedure and the entire small intestine was removed for histological analysis.

A mid-gut loop (2 cm in size) was resected before fixation in formalin. The luminal content of the small intestine was removed and stored at -80°C for quantification of intestinal bleeding. The remaining small bowel was homogenized, homogenates were centrifuged for 30 min at 16,000 g and the supernatants were aliquoted and stored at - 80°C until analysis.

Assessment of intestinal injury

Histological analysis

Histological analyses were performed on small intestine segments of 21 rats from the 3 groups (control, P8RI and sham). A mid-gut loop was removed and fixed in formalin as stated above. Transverse paraffin-embedded sections of small intestine were obtained under vacuum and stained with Alcian blue (a stain for highly glycosylated mucin) and nuclear red before scanning by a Nanozoomer®. Histologic evaluation was performed by light microscopy using the grading system described by Chiu et al[20] and modified by Oldham et al[21] (Table 1).

Morphometric analysis

A morphometric evaluation of transverse histological gut sections was performed using QWin software. Analyses involved determination of luminal area and perimeter, muscular and epithelial layer areas, and Goblet cell number and overall surface area (Figure 1). The luminal surface (blue, Fig.1B) was defined by choosing the space inside the intestinal ring whose external border was limited by the epithelium (green, Figure 1B). The muscular layer was defined as extending from the basal side of the epithelial layer to the external border of the intestinal ring (serous border) (red - Figure 1B). The epithelial layer was determined by choosing and drawing the cell layers between the muscular layer and external border of the luminal surface. Calculation of the surfaces of different layers was based on the length of the calibrated scale bar. The number of Goblet cells was defined by enumerating the visible cells stained in blue (brown dots - Figure 1B). The normalized muscular and epithelial thickness was obtained by dividing the muscular and epithelial surface by the external border of the intestinal ring.

Measurement of intestinal bleeding

The luminal content of the small intestine was homogenized in distilled water and centrifuged for 30 min at 16,000 g. Heme content was assessed by addition of formic acid to the homogenate supernatant (v/v 30/70) and was considered as being proportional to hemoglobin release. Hemoglobin from bovine erythrocytes was used as a standard. After binding of formic acid to the heme, OD was monitored at 405 nm[22]. The Hb concentration was normalized by the total protein concentration in the luminal contents. The total protein concentration was measured by colorimetric protein quantification (Thermo Scientific Pierce BCA® assay).

Measurement of myeloperoxidase in small bowel

The plasma myeloperoxidase (MPO) concentration was measured using a direct enzyme-linked immunosorbent assay (direct ELISA). The MPO calibration curve was plotted from the reaction between recombinant MPO (USCN®) and biotinylated rat MPO antibody (Hycult®). The small bowel homogenate supernatant was coated on 96-well half-area microplates, blocked with bovine serum albumin 0.5% and incubated with biotinylated rat MPO antibody (Hycult®). Streptavidine was used for the detection of the antigen-antibody reaction. The assay absorbance was analyzed using a Tecan monochromator plate reader at 450 nm wavelength.

Measurement of matrix metallopeptidase 9 in small bowel

The intestinal total matrix metallopeptidase 9 (MMP-9) protein concentration was determined using rat total MMP-9 DuoSet ELISA kit (R&D SYSTEMS®). The capture antibody was coated on 96-well half-area microplates and blocked with blocking buffer before incubation with the small bowel homogenate supernatant. The detection antibody was adjusted for the double antibody sandwich ELISA protocol. Streptavidine and Color Reagent (R&D SYSTEMS®) were used for detection of antigen-antibody reaction. The assay absorbance was analyzed at 450 nm wavelength using a Tecan plate reader as above.

Assessment of local and systemic consequences

Measurement of matrix metallopeptidase 9 in peritoneal fluid and plasma

The peritoneal fluid and plasma matrix metallopeptidase 9 (MMP-9) protein concentrations were determined using rat total MMP-9 DuoSet ELISA kit (R&D SYSTEMS®) as stated below.

Measurement of circulating cell-free DNA levels

Circulating cell-free DNA (cf-DNA) concentration was determined in plasma using the Quant-it Picogreen dsDNA Reagent Kit (Invitrogen). The Lambda DNA standard and 10 µL

of sample were diluted in TE Buffer (200nM Tris-HClHCl, 20 mM EDTAEDTA, pH 7.5, 100-µL final) before addition of 100 µL Picogreen dsDNA reagent. After mixing, the fluorescence was measured using a micro-plate reader (excitation 480 nm, emission 520 nm).

Evaluation of bacterial translocation using the quantification of Escherichia coli (E.coli) DNA in blood samples.

Quantification of DNA of *E.*Coli involved 7 rats from the I/R positive control group and 7 rats from the P8RI group. DNA extractions were performed using 20 µL Dilution Buffer and 0,5 µL DNA Release Additive (Phire Tissu Direct PCR Master Mix – Thermo ®). After a 5 min incubation at room temperature, the blood was denatured at 98°C for 2 min and then centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The supernatants were collected after centrifuging and 1 µL of supernatant was tested in quantitative PCR. The primers used in this study were *E.coli* primers from Eurogentec®. The instrumentation used was the CFX96^{TM} Real Time System (BioRad®). The amplification was programmed as follows: 1 cycle: 50℃, 2 minutes; 1 cycle: 95℃, 15 minutes; 50 cycles: 95℃ 40 sec and 60℃ 1 minute. *E.Coli* DNA was quantified by the number of cycles taken (Ct) to detect a real signal from total blood. For statistical evaluation, the value of 1/Ct was used for comparison between groups.

Blood neutrophil counts

Neutrophils were quantified in arterial blood samples using a counter (SCIL Animal Care Company GmbH, Vierheim, Germany). Results were expressed as x10^3 /µL of blood.

Assessment of CD31 cleavage

To detect the soluble CD31 fraction, the cytometric bead array (CBA®, BD) technology was customized. Magnetic CBA beads (MC10035-01, BioRad®) were conjugated with a polyclonal antibody directed against the extracellular portion of the rat CD31 (R&D, #AF3628) using a commercial kit (BioRad® 171-406001 following the manufacture's instructions).

The coupled beads (3000 beads/sample) were incubated with EDTA-plasma (1/5 dilution) for 90 minutes at room temperature under orbital shaking (850 rpm). Positive binding of circulating CD31 captured by the anti-CD31 cytometric beads was detected by incubation with a monoclonal antibody (BD 555027, clone TLD-3A12 at concentration 2 µg/mL) coupled to PE for1 hour at room temperature under orbital shaking.

The median fluorescent intensity of the detecting antibody was analyzed on 100 acquired beads per sample using BioPlex 200 System, BioRad®. The standard curve was obtained by using serial dilutions of recombinant mouse CD31 (R&D 3628).

Statistical analysis

Quantitative data were expressed as means ± S.E.M. The in vivo experiments were designed in order to use a two-way (treatment and time as independent factors) analysis of variance (ANOVA) followed by Kruskal-Wallis and Bonferroni *post hoc* tests. Mann-Whitney non-parametric *post hoc* and Student t tests were used for comparison of the different groups at specific time points. A p value < 0.05 was considered significant. The correlation of Chiu score grading with morphometric parameters was established using Spearman's correlation coefficient. The correlation between the biological parameters was tested using bivariable correlation analysis with Pearson's correlation coefficient. All analyses were performed using GraphPad Prism 5 for Mac OS X software.

RESULTS

Assessment of intestinal injury

Histological analysis

Histologic grades of three groups are shown in Table 2. Intestinal mucosal injury scores of the P8RI group were significantly lower than in the I/R group ($p < 0.05$). The P8RI group showed no significant difference in histologic grade after ischemia and reperfusion from the sham group ($p > 0.05$). Values represent means ± SEM (max - min), obtained from I/R, P8RI and sham groups with 7 rats for each group.

Morphometric analysis

Morphometric parameters measured are shown in Figure 2. Mean normalized muscle thickness of the I/R and P8RI groups after ischemia and reperfusion were 36.81 ± 1.67 µm and 38.97 ± 1.49 µm respectively, both significantly thinner than in the sham group (52.81 ± 3.19 µm) ($p < 0.01$) but with no difference between the I/R group and the P8RI-treated group. Moreover, there was no significant difference between normalized muscle thickness of I/R and P8RI groups (Figure 2A).

Mean normalized epithelial thickness (Figure 2B) of the I/R group (97.14 µm) was significantly lower than that of the P8RI group (97.14 ± 11.17 µm vs 156.6 ± 8.62 µm, $p<0.01$) and both significantly lower than in the sham group (192.3 ± 11.96 µm, $p < 0.001$).

Figure 3 showed that P8RI rats had a higher mean count of Goblet cells in gut histological sections (5287 ± 569 cells) than the I/R and sham groups (2742 ± 368 and 2475 ± 177 cells respectively; $p < 0.01$). Qualitative histologic image showed an increased number of Goblet cells in the intestinal crypts of the P8RI group as compared to I/R and sham groups.

The normalized epithelial thickness was inversely correlated with the Chiu score ($p < 0.001$, Spearman r = -0.7245) (Figure 4).

Intestinal bleeding (Figure 5)

Intraluminal hemoglobin normalized to protein concentration was significantly higher in I/R rats (221.7 ± 25.39 µg/mg of total protein) than in P8RI and Sham rats (112.7 ± 10.76 and 94.56 ± 10.27 µg/mg of total protein, respectively, NS).

Myeloperoxidase in small bowel

Intestinal normalized MPO concentrations (Figure 6) were significantly higher in the I/R group (24.53 ± 11.56 µg/mg of total protein) than in the P8RI and sham groups (11.18 ± 7.99 and 5.90 ± 3.69 µg/mg of total protein, respectively, NS).

MMP-9 in small bowel

Intestinal normalized MMP-9 concentrations (Figure 7) were significantly higher in I/R rats (6.83 ± 5.68 ng/mg of total protein) than in P8RI and sham rats (1.5 ± 0.83 ng/mg and 1.62 ± 0.67 ng/mg of total protein, respectively).

Assessment of local and systemic consequences

MMP-9 in peritoneal fluid and plasma

Baseline peritoneal fluid mean normalized MMP-9 level was approximately 0.5 ng/mg total protein (figure 8). There was no increase of peritoneal MMP-9 in sham group during the surgery but a significant increase in the I/R and P8RI groups ($p < 0.001$). However, MMP-9 levels were significantly lower in the P8RI group than in I/R group (10501 ± 1948 vs 4405 ± 949 ng/mg of protein total at 4h of reperfusion, $p < 0.001$, Bonferroni *post hoc* test).

Baseline total MMP-9 concentration in plasma of was approximately 13 ng/mL (figure 9). Two-way ANOVA analysis showed a significant difference between the dynamics of plasma MMP-9 levels in the three groups ($p < 0.001$). After 1 hour of reperfusion, MMP-9 plasma levels increased significantly at a steady rate in the I/R control group compared to the P8RI group ($p < 0.05$).

Cf-DNA in plasma

The plasma levels of cell-free DNA during mesenteric I/R are shown in Figure 10. Before laparotomy, cf-DNA levels were 527 ± 34.29 µg/mL, 520.7 ± 36.34 µg/mL and 493.4 ± 25.37 µg/mL in control, P8RI and sham groups respectively (NS). The plasma levels of cf-DNA remained stable in the sham group throughout the procedure but they increased in both I/R and P8RI groups. Although non-significant, administration of the CD31 agonist tended to

decrease plasma cell-free DNA levels after 3 and 4 hours of reperfusion as compared to I/R control group levels ($p < 0.05$).

Evaluation of bacterial translocation

Assessment of bacterial translocation was made PCR quantification of *E.Coli* DNA in the blood (Figure 11). The quantity of detected E.coli genetic material in I/R rats was higher than P8RI rats ($p < 0.05$).

Blood neutrophil counts (Figure 12)

Peripheral blood neutrophil counts significantly increased with mesenteric I/R injury in both I/R control and P8RI groups after SMA clamping as compared with the sham group (two-way ANOVA). There was no significant difference between neutrophil numbers in blood of I/R and P8RI groups.

Assessment of CD31 cleavage

Flow cytometry results of cleaved CD31 in plasma are shown in Figure 13. Before laparotomy, plasma cleaved CD31 levels were 19.04 ± 2.26 ng/mL, 20.25 ± 1.45 ng/mL and 20.46 ± 2.20 ng/mL in control, P8RI and sham groups respectively (NS). Mesenteric I/R without treatment increased the plasma cleaved CD31 with a peak at 1 h of reperfusion while P8RI treatment significantly diminished the plasma cleaved CD31 ($p < 0.01$).

Correlations

The bivariable correlations between plasma MMP-9 level at 3 h of reperfusion, cleaved CD31 level at 1 h of reperfusion and epithelial thickness with other variables are presented in Figures 14, 15, and 16. We found strong, significant and positive correlations between plasma MMP-9 level at 3 h of reperfusion and plasma cleaved CD31 at 1 h and 4 h of reperfusion, intestinal MMP-9 and MPO levels, plasma cf-DNA level after 30 min of ischemia, and blood *E. coli* genetic material level. Plasma cleaved CD31 level at 1 h of reperfusion presented strong, significant, positive correlations with plasma MMP-9 levels at 3 and 4 h of reperfusion, plasma cf-DNA level after 30 min of ischemia, and a strong, significant, negative correlation with epithelial thickness. Epithelial thickness had the strongest, significant negative correlation with plasma cleaved CD31 level at 1 h of reperfusion, intestinal MMP-9 and MPO levels, plasma cf-DNA levels after 30 min of ischemia and at 1 h of reperfusion, and intraluminal Hb level. Results of all bivariable correlations are presented in the data supplement (Index).

DISCUSSION

In I/R, hypoxia and blood stagnation occur during ischemia, but reperfusion injury occurs after the reconstitution of blood flow.[23] Although several studies have investigated mesenteric I/R mechanisms, the kinetics of biological parameters have been poorly evaluated. With the aim of better understanding the pathophysiology of mesenteric I/R and to evaluate a new therapeutic approach, we designed a preclinical experimental model for indirect and direct assessment of gut injury and its local consequences and peripheral biomarkers. Plasma and peritoneal parameters were measured at respectively 6 and 4 standardized time points of ischemia and reperfusion in order to evaluate time-dependent specific changes and effects of P8RI. Analysis of the kinetics of mesenteric ischemia and reperfusion injury may be useful for developing new therapeutic molecules in certain surgical conditions like thoracic or abdominal aortic surgery, which can induce small bowel injuries.

The potential protective effect of P8RI on the gut epithelial layer was confirmed by morphometric analysis of epithelial layer thickness. Morphometric analysis of mucosal and muscle thickness was also performed by Kallakuri et al.[24] In our model, mesenteric I/R led to marked smooth muscle and epithelial damage. Histologic analysis revealed changes in the mucosa, smooth muscle, and neurons in mesenteric I/R injury. Little effect on the muscle is detectable in histologic analysis at 3h after ischemia. Pontell et al. noted that longitudinal muscle degeneration was apparent at 3-12h of reperfusion, but little effect on the circular layer was noted. The mucosa was sloughed off at 1-3h of reperfusion.[25] Interestingly, in our study, the epithelial layer thickness was significantly greater in the P8RI-treated group but we found no difference in smooth muscle layer thickness between I/R and P8RI-treated rats. Beside the classical histologic grading described by Chiu et al[20], morphometric quantification may be useful for evaluating the severity of experimental mesenteric I/R injury. The histologic grading system of Chiu et al. is easy to use but does not quantify specific epithelial or muscle layer injuries. However, we found a good correlation between normalized epithelial thickness and Chiu's score of histologic grading. Thus, the normalized epithelial thickness may be considered as a reliable morphometric parameter of mesenteric I/R injury.

Small bowel goblet cell count at 4h of reperfusion in the P8RI group was also significantly higher than in I/R and sham groups. The involvement of goblet cells in the process of epithelial restitution after intestinal I/R injury was demonstrated by Ikeda et al.[26] Accumulation of goblet cells at the villi tips was observed after ischemic injury of relatively short duration (from 15 to 45 min).[26] Goblet cells are found throughout the overall length of the gut where they are able to produce and maintain the protective mucous blanket by

synthesis and secretion of high-molecular-weight mucins. Since mucins are highly glycosylated hydrophilic molecules, they are easily identified by Alcian blue, a polysaccharide stain. We found a greater number of goblet cells in P8RI-treated rats, which may contribute to the ability of P8RI to prevent I/R epithelial injury and complications. Although Ikeda et al[26] reported that the goblet cells are less sensitive to noxious effects than are absorptive cells because of more limited exposure and differences in the integrin family between these two cell types, the primary mechanism of goblet cell recruitment resulting in increased numbers in small bowel in our study is not clearly understood.

Gastrointestinal (GI) bleeding is a known complication of mesenteric I/R injury.[27] In the model, GI bleeding comes from abrasion of the epithelial villi involving the most distal capillaries of the villi. Evaluation of GI bleeding is usually performed by analysis of fecal haemoglobin levels in human.[28,29] In this study, intraluminal hemoglobin was markedly increased in I/R rats, but to a significantly lesser degree in P8RI-treated rats. This suggests an early protective effect against I/R injury of the gut mucosa by the CD31 agonist therapy.

Since neutrophil activation and migration are important pathophysiological elements in I/R, we first tested markers of neutrophil activation (MMP-9, MPO and cf-DNA) in tissue, peritoneal fluid and plasma. Reperfusion of ischemic intestine results in a dramatic increase in tissue neutrophil margination.[30] Activated neutrophils play a critical role in intestinal inflammation induced by ischemia and reperfusion.[31] Tissue-associated MPO activity reflects the presence of marginated and/or extravasated leukocytes of myeloid origin (neutrophils, eosinophils, and monocytes). The use of MPO to quantify intestinal innate immune aggression has been shown to correlate well with the appearance of neutrophils in the intestinal mucosa.[30] In our study, intestinal MPO concentration was significantly diminished in P8RI-treated I/R rats as compared to I/R positive controls. On the other hand, P8RI significantly reduced intestinal MMP-9 compared with the I/R group. This suggests that P8RI prevents, at least in part, neutrophil margination and degranulation in the mesenteric I/R model.

MMP-9 is the main protease stored in the gelatinase granules of PMNs, and is rapidly released following stimulation.[32] Moreover MMP-9 is highly diffusible from tissue to plasma.[33] MMP activation by I/R injury has been demonstrated by several studies.[34] Elevated plasma MMP-9 levels were noted in mesenteric ischemia and reperfusion periods in a rat model of 1h ischemia and 1h reperfusion.[23] The impact of MMPs in various tissue I/R has

been demonstrated in several studies involving leukocyte margination, regulation of pro-inflammatory mediators, disruption of cell-matrix contacts, nuclear proteolysis, modulation of death receptor signaling, angiogenesis, and compensatory tissue remodeling.[34] In mesenteric I/R, Kocael et al. suggested that MMP-9 in the intestinal wall is largely associated with neutrophils.[23] Our data on tissue MMP-9 concentration confirmed this observation. Our study showed a marked decrease in plasma MMP-9 in P8RI-treated I/R rats as compared to I/R positive controls. The agonistic effect of P8RI on CD31 may, at least in part, limit MMP-9 secretion by neutrophils. Analysis of peritoneal fluid is a valuable aid in the diagnosis of a variety of intra-abdominal diseases.[35] Different peritoneal biomarkers have been proposed for the diagnosis of acute mesenteric ischemia.[36] DeLaurier et al. demonstrated a near linear increase of peritoneal fluid lactic acid levels in a dog model of acute mesenteric ischemia.[35] Furthermore, Hosseinpour et al. noted a decrease in pH and an increase in potassium in peritoneal fluid from a small bowel ischemia model.[36] Indeed, acute mesenteric ischemia leads to impaired fluid balance and leakage at both mucosal and serosal sides of the bowel When the bowel becomes necrotic, peritonitis develops.[37] In our study, analysis of peritoneal fluid and intestinal MMP-9 levels was performed in order to study neutrophil activation by I/R injury and measure the diffusion/efficacy of the CD31 agonist in the peritoneal space and in the small bowel. Our results showed a significant increase in peritoneal MMP-9 levels in all I/R rats, with a significantly reduced increase in P8RI-treated ones. This suggests a protective effect of P8RI on local innate immune injury in the mesenteric I/R model.

Cf-DNA represents a non-specific marker of tissue injury released into the circulation from necrotic and apoptotic cells.[38] It is a useful independent predictor of mortality and sepsis in intensive care patients.[39-41] In human acute mesenteric ischemia, increased plasma levels of cf-DNA are associated with severity of bowel inflammation and with necrosis.[42] Moreover, in out-of-hospital cardiac arrest survivors, plasma cf-DNA concentration at ICU admission and 24h post-admission were associated with hospital overall mortality.[43] In our experimental study, a marked increase in circulating cf-DNA was observed in all I/R rats. However in the treated group, levels of cf-DNA were significantly reduced at 3h and 4h of reperfusion compared to the untreated I/R group.. This suggests that the CD31 agonist infusion could limit the toxic effects of PMN death and release during reperfusion injury. Acute ischemia causes mitochondrial dysfunction, loss of ion transfer regulation and intracellular acidosis in target tissue. In parallel, blood stagnation greatly facilitates cell-cell interactions. Changes in cell membrane permeability and release of free radicals and degradative enzymes lead to cell

death and tissue necrosis that triggers the inflammatory cascade activation similar to that observed in severe sepsis.[44] Plasma DNA is likely to be released from damaged tissues, and in this context it might act as a marker for predicting the early outcome of patients with acute mesenteric ischemia.[42] Cf-DNA is also released from activated neutrophils. In the setting of intestinal I/R injury, activated neutrophils play a pivotal role in the severe inflammatory response[45] and are one of the primary mediators of local and remote tissue damage.[46] Moreover in clinical studies, levels of cf-DNA/neutrophil extracellular traps (NETs) are predictive of post-traumatic complications in the setting of intensive care medicine.[45]

A potential protective effect of P8RI on the gut epithelial layer may explain the reduced E.coli translocation in P8RI-treated group. Bacterial translocation is a frequent complication of mesenteric I/R injury. The injured intestinal mucosa loses its barrier function to indigenous enteric microorganisms, resulting in translocation via mesenteric lymph nodes, liver, spleen, and blood.[47] Our results showed that E.coli DNA was not found at all time points after I/R. The comparison of the mean 1/Ct values demonstrated higher levels of E.coli DNA in the blood of untreated I/R rats than in P8RI-treated ones. PCR is more sensitive than blood cultures for assessing bacterial translocation from the intestine.[48] Real-time PCR used in our study may determine the quantity of E.coli DNA in blood and may be a quantitative marker of bacterial invasion in mesenteric I/R injury.

Prior studies showed that CD31 is cleaved between domain 5 and 6 and released in biological fluid by activated human T cells.[15] We therefore measured the concentration of plasma soluble CD31 in order to evaluate if the measure could reflect the extent of leukocyte activation during I/R injury. Our data showed that plasma soluble CD31 is rapidly increased after mesenteric I/R with a peak at 1 h of reperfusion. The raise of CD31 plasma levels is such a short time cannot be due to a *de novo* synthesis of its soluble form[49] and are most likely due to the extensive cleavage and released into circulation from the inflamed bowel. This finding supports the use of P8RI with the aim to uphold the activation threshold of CD31+ cells which is abolished by the shedding of the endogenous molecule. On the other hand, P8RI perfusion caused a diminution of cleaved CD31 in plasma during mesenteric I/R. This significant difference associated with other results in our study provided evidence of a protective mechanism of P8RI via the prevention of neutrophil activation reflected by a lower extent of CD31 cleavage.

We found a strong, significant and positive correlation between plasma MMP-9 and cleaved CD31 levels in this study. These results support the relationship between CD31 cleavage and neutrophil activation. Prior studies demonstrated that neutrophils lose CD31 surface expression after *in vitro* transendothelial migration or extravasation in human skin transplanted to severe combined immunodefiency mice.[50,51] On the other hand, plasma cf-DNA levels correlated significantly with plasma MMP-9 and cleaved CD31, intestinal MMP-9 and MPO levels. These findings provide evidence of a major role of PMN margination and activation in mesenteric I/R. MMP-9 and MPO are the principal proteases in the primary and secondary granules of neutrophils.[52] Significant positive correlations between plasma MMP-9 and intestinal MMP-9 and MPO levels and significant negative correlations between epithelial thickness and intestinal MMP-9 and MPO levels show that the degranulation of infiltrated and activated neutrophils plays a major role in small bowel I/R injury. This conclusion corresponds to the results of the study of Daly et al. who reported a role of MMP-8, another collagenase of neutrophil granules, in the mediation of injury in mesenteric IR.[53] Two biomarkers of digestive consequences, epithelial thickness and intraluminal Hb, are strongly, significantly and negatively correlated. Hemorrhagic abrasion of intestinal villi is a manifestation of mucosal injury in mesenteric I/R.[54] We showed that the measurement of epithelial thickness on transverse sections of small bowel may be a good choice for evaluating intestinal injury in experimental mesenteric I/R.

This study has some limitations which should be pointed out. First, we did not analyze the hemodynamic, respiratory and renal failure associated with mesenteric I/R, but we used a short period of ischemia (30 min) which did not significantly alter blood pressure and diuresis in our experimental model. Second, the pathophysiological consequences of mesenteric I/R were focused on neutrophil activation. The roles of cytokines, reactive oxygen species, complement and Toll-like receptors have also been reported in the pathogenesis of I/R injury.[38,55] Nevertheless, recent studies have reinstated the role of neutrophils as key players in the pathophysiology of I/R injury.[56]

In conclusion, our results showed that the use of the CD31 agonist P8RI reduces the intestinal I/R injury in a rat model of SMA occlusion. The beneficial effect of this CD31 was associated with less local neutrophil activation, intestinal histological lesions and complications such as bleeding and bacterial translocation. These beneficial effects may be attributed mainly to its effect on surface CD31 expressed by the cells involved in the acute inflammatory process

generated by the I/R sequence, mainly the neutrophils. Further studies are however needed for detailing in dept the molecular mechanisms underlying the beneficial effects of CD31 agonists in the setting of I/R injury.

Acknowledgements:

This study was funded by the France-Vietnam Alain Carpentier Foundation, France. Dr HOANG was supported by the grant from the France-Vietnam Alain Carpentier Foundation, France and by a Research Grant 2012 of World Federation of Societies of Anesthesiologists. Dr NUZZO was supported by the grant of the Structure d'URgences Vasculaires Intestinales (SURVI), CHU Beaujon, Clichy, France.

References

1. Leone M, Bechis C, Baumstarck K, et al. Outcome of acute mesenteric ischemia in the intensive care unit: a retrospective, multicenter study of 780 cases. *Intensive care medicine.* 2015;41(4):667-676.
2. Acosta S, Wadman M, Syk I, Elmstahl S, Ekberg O. Epidemiology and prognostic factors in acute superior mesenteric artery occlusion. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract.* 2010;14(4):628-635.
3. Abboud B, Daher R, Boujaoude J. Acute mesenteric ischemia after cardio-pulmonary bypass surgery. *World journal of gastroenterology.* 2008;14(35):5361-5370.
4. Porcellini M, Renda A, Selvetella L, Bernardo B, Baldassarre M. Intestinal ischemia after aortic surgery. *International surgery.* 1996;81(2):195-199.
5. Alsaigh T, Chang M, Richter M, Mazor R, Kistler EB. In vivo analysis of intestinal permeability following hemorrhagic shock. *World journal of critical care medicine.* 2015;4(4):287-295.
6. Ende N. Infarction of the bowel in cardiac failure. *The New England journal of medicine.* 1958;258(18):879-881.
7. Grootjans J, Lenaerts K, Derikx JP, et al. Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model. *The American journal of pathology.* 2010;176(5):2283-2291.
8. Haglund U, Abe T, Ahren C, Braide I, Lundgren O. The intestinal mucosal lesions in shock. II. The relationship between the mucosal lesions and the cardiovascular derangement following regional shock. *European surgical research Europaische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes.* 1976;8(5):448-460.
9. Landow L, Andersen LW. Splanchnic ischaemia and its role in multiple organ failure. *Acta anaesthesiologica Scandinavica.* 1994;38(7):626-639.
10. Liu KX, Li YS, Huang WQ, Li C, Liu JX, Li Y. Immediate but not delayed postconditioning during reperfusion attenuates acute lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: comparison with ischemic preconditioning. *The Journal of surgical research.* 2009;157(1):e55-62.
11. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Digestive diseases and sciences.* 2004;49(9):1359-1377.
12. Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 2001;36(1):55-65.
13. Marelli-Berg FM, Clement M, Mauro C, Caligiuri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *Journal of cell science.* 2013;126(Pt 11):2343-2352.
14. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6):1133-1138.
15. Fornasa G, Groyer E, Clement M, et al. TCR stimulation drives cleavage and shedding of the ITIM receptor CD31. *J Immunol.* 2010;184(10):5485-5492.
16. Murohara T, Delyani JA, Albelda SM, Lefer AM. Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury in cats. *J Immunol.* 1996;156(9):3550-3557.
17. Newman PJ, Newman DK. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2003;23(6):953-964.

18. Torimoto Y, Rothstein DM, Dang NH, Schlossman SF, Morimoto C. CD31, a novel cell surface marker for CD4 cells of suppressor lineage, unaltered by state of activation. *J Immunol.* 1992;148(2):388-396.
19. Caligiuri G, Groyer E, Khallou-Laschet J, et al. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in the blood of atherosclerotic mice with plaque thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2005;25(8):1659-1664.
20. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg.* 1970;101(4):478-483.
21. Oldham KT, Guice KS, Gore D, Gourley WK, Lobe TE. Treatment of intestinal ischemia with oxygenated intraluminal perfluorocarbons. *American journal of surgery.* 1987;153(3):291-294.
22. Garrick LM, Sharma VS, McDonald MJ, Ranney HM. Rat haemoglobin heterogeneity. Two structurally distinct alpha chains and functional behaviour of selected components. *Biochem J.* 1975;149(1):245-258.
23. Kocael A, Inal BB, Guntas G, et al. Evaluation of matrix metalloproteinase, myeloperoxidase, and oxidative damage in mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Human & experimental toxicology.* 2015.
24. Kallakuri S, Ascher E, Pagala M, et al. Protective effect of glycine in mesenteric ischemia and reperfusion injury in a rat model. *Journal of vascular surgery.* 2003;38(5):1113-1120.
25. Pontell L, Sharma P, Rivera LR, et al. Damaging effects of ischemia/reperfusion on intestinal muscle. *Cell and tissue research.* 2011;343(2):411-419.
26. Ikeda H, Yang CL, Tong J, et al. Rat small intestinal goblet cell kinetics in the process of restitution of surface epithelium subjected to ischemia-reperfusion injury. *Digestive diseases and sciences.* 2002;47(3):590-601.
27. Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, Edmonds HJ, Burger CD. Acute mesenteric ischemia: a clinical review. *Archives of internal medicine.* 2004;164(10):1054-1062.
28. Berlanga J, Prats P, Remirez D, et al. Prophylactic use of epidermal growth factor reduces ischemia/reperfusion intestinal damage. *The American journal of pathology.* 2002;161(2):373-379.
29. Watanabe T, Tanigawa T, Kobata A, et al. Toll-like receptor 2 mediates ischemia-reperfusion injury of the small intestine in adult mice. *PloS one.* 2014;9(10):e110441.
30. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *The American journal of physiology.* 1986;251(4 Pt 1):G567-574.
31. Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, et al. Suppression of intestinal ischemia-reperfusion injury by a specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, pioglitazone, in rats. *Redox report : communications in free radical research.* 2002;7(5):294-299.
32. Chakrabarti S, Zee JM, Patel KD. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *Journal of leukocyte biology.* 2006;79(1):214-222.
33. Borges LF, Touat Z, Leclercq A, et al. Tissue diffusion and retention of metalloproteinases in ascending aortic aneurysms and dissections. *Human pathology.* 2009;40(3):306-313.
34. Dejonckheere E, Vandenbroucke RE, Libert C. Matrix metalloproteinases as drug targets in ischemia/reperfusion injury. *Drug discovery today.* 2011;16(17-18):762-778.

35. DeLaurier GA, Cannon RM, Johnson RH, Jr., Sisley JF, Baisden CR, Mansberger AR, Jr. Increased peritoneal fluid lactic acid values and progressive bowel strangulation in dogs. *American journal of surgery.* 1989;158(1):32-35.
36. Hosseinpour M, Khamechian T, Shahrokh S. Peritoneal Potassium and pH Measurement in Early Diagnosis of Acute Mesenteric Ischemia in Rats. *Archives of trauma research.* 2014;3(3):e20957.
37. Haglund U. Mesenteric ischemia. In: Holzheimer RG, Mannick JA, eds. *Surgical Treatment - Evidence-based and problem-oriented*: Zuckschwerdt; 2001.
38. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research.* 2001;61(4):1659-1665.
39. Saukkonen K, Lakkisto P, Varpula M, et al. Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients. *Intensive care medicine.* 2007;33(9):1624-1627.
40. Saukkonen K, Lakkisto P, Pettila V, et al. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clinical chemistry.* 2008;54(6):1000-1007.
41. Rhodes A, Wort SJ, Thomas H, Collinson P, Bennett ED. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit Care.* 2006;10(2):R60.
42. Arnalich F, Maldifassi MC, Ciria E, et al. Association of cell-free plasma DNA with perioperative mortality in patients with suspected acute mesenteric ischemia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2010;411(17-18):1269-1274.
43. Gornik I, Wagner J, Gasparovic V, et al. Prognostic value of cell-free DNA in plasma of out-of-hospital cardiac arrest survivors at ICU admission and 24h post-admission. *Resuscitation.* 2014;85(2):233-237.
44. Grotz MR, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G. Intestinal cytokine response after gut ischemia: role of gut barrier failure. *Annals of surgery.* 1999;229(4):478-486.
45. Liu FC, Chuang YH, Tsai YF, Yu HP. Role of neutrophil extracellular traps following injury. *Shock.* 2014;41(6):491-498.
46. Kalia N, Brown NJ, Wood RF, Hopkinson K, Fairburn B, Pockley AG. Effects of intestinal ischemia-reperfusion injury on rat peripheral blood neutrophil activation. *Digestive diseases and sciences.* 2003;48(9):1677-1684.
47. Berber I, Aydin C, Cevahir N, et al. Tempol reduces bacterial translocation after ischemia/reperfusion injury in a rat model of superior mesenteric artery occlusion. *Surgery today.* 2009;39(5):407-413.
48. Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleva R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *Journal of gastroenterology and hepatology.* 2007;22(4):464-471.
49. Goldberger A, Middleton KA, Oliver JA, et al. Biosynthesis and processing of the cell adhesion molecule PECAM-1 includes production of a soluble form. *The Journal of biological chemistry.* 1994;269(25):17183-17191.
50. Romer LH, McLean NV, Yan HC, Daise M, Sun J, DeLisser HM. IFN-gamma and TNF-alpha induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. *J Immunol.* 1995;154(12):6582-6592.
51. Christofidou-Solomidou M, Nakada MT, Williams J, Muller WA, DeLisser HM. Neutrophil platelet endothelial cell adhesion molecule-1 participates in neutrophil recruitment at inflammatory sites and is down-regulated after leukocyte extravasation. *J Immunol.* 1997;158(10):4872-4878.

52. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49(9):1618-1631.
53. Daly MC, Atkinson SJ, Varisco BM, et al. Role of matrix metalloproteinase-8 as a mediator of injury in intestinal ischemia and reperfusion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2016;30(10):3453-3460.
54. Schoenberg MH, Poch B, Younes M, et al. Involvement of neutrophils in postischaemic damage to the small intestine. *Gut.* 1991;32(8):905-912.
55. Arumugam TV, Okun E, Tang SC, Thundyil J, Taylor SM, Woodruff TM. Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury. *Shock.* 2009;32(1):4-16.
56. Wu MC, Brennan FH, Lynch JP, et al. The receptor for complement component C3a mediates protection from intestinal ischemia-reperfusion injuries by inhibiting neutrophil mobilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(23):9439-9444.

Table 1. Histologic grading system[20]

Grade	Histologic appearance
0	Normal
1	Subepithelial edema, partial separation of apical cells
2	Epithelial cell sloughing from tips of villi
3	Progression of sloughing to base of villi
4	Partial mucosal necrosis of lamina propria
5	Total mucosal necrosis

Table 2. Intestinal mucosal injury scores of the three groups

	I/R	P8RI	Sham
Intestinal mucosal injury scores	3.571 ± 00.297 (3 - 5)	1.857 ± 0.404 (1 - 4)*	0.833 ± 0.307 (0 - 2)

* *P = 0.0128* vs I/R group; *P = 0.0788* vs Sham group

Figure 1. Morphometric analysis of small bowel I/R injury with QWin software. Transverse section of small bowel of a sham rat (A) was scanned by Nanozoomer® and after analyzing with QWin software (B). In B, the red region: muscle layer, green: epithelial (mucosal) layer, blue: luminal surface, and brown dots: goblet cells.

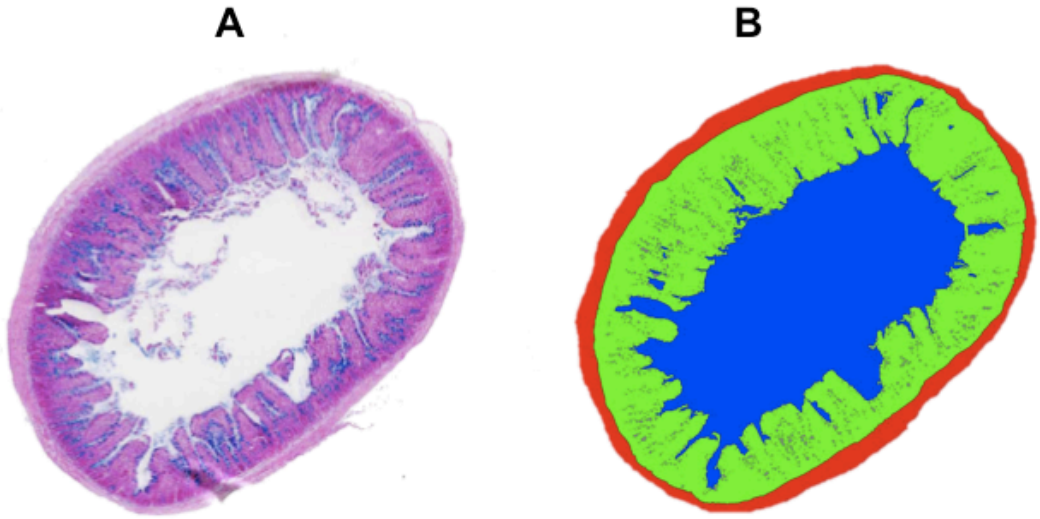


Figure 2. Decrease in normalized muscle thickness (A) and epithelial thickness (B) of small bowel in I/R and P8RI groups compared with the sham group (one-way ANOVA, A: *p < 0.01; B: **p < 0.001). There was no significant difference between normalized muscle thicknesses of I/R and P8RI groups. Normalized epithelial thickness (B) of I/R rats decreased significantly more than in P8RI rats (Mann-Whitney test, B: ***p < 0.01).

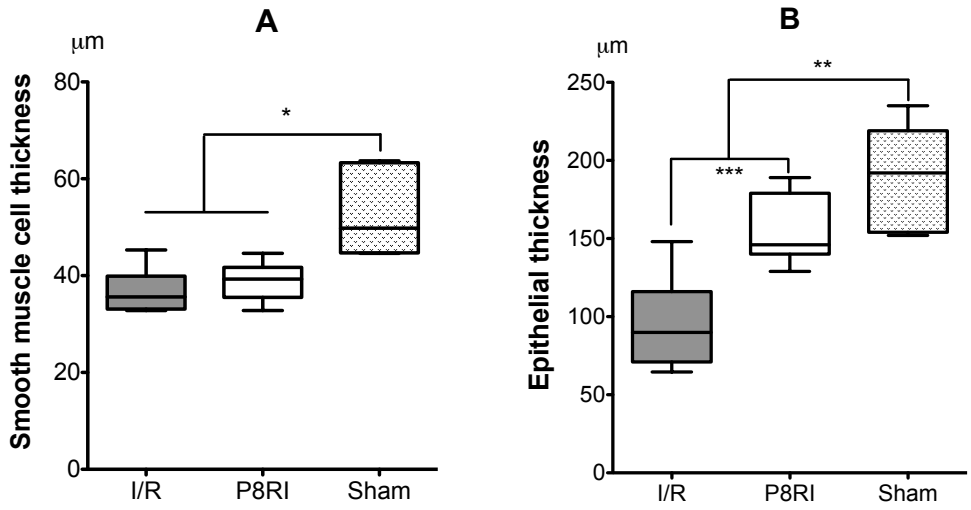


Figure 3. Goblet cell quantity in the transversal slide. Number of goblet cells of the P8RI group was significantly higher than in I/R and sham groups (one-way ANOVA, C: *p < 0.01). Qualitative histologic image showed an increased number of Goblet cells in the intestinal crypts of the P8RI group as compared to I/R and sham groups.

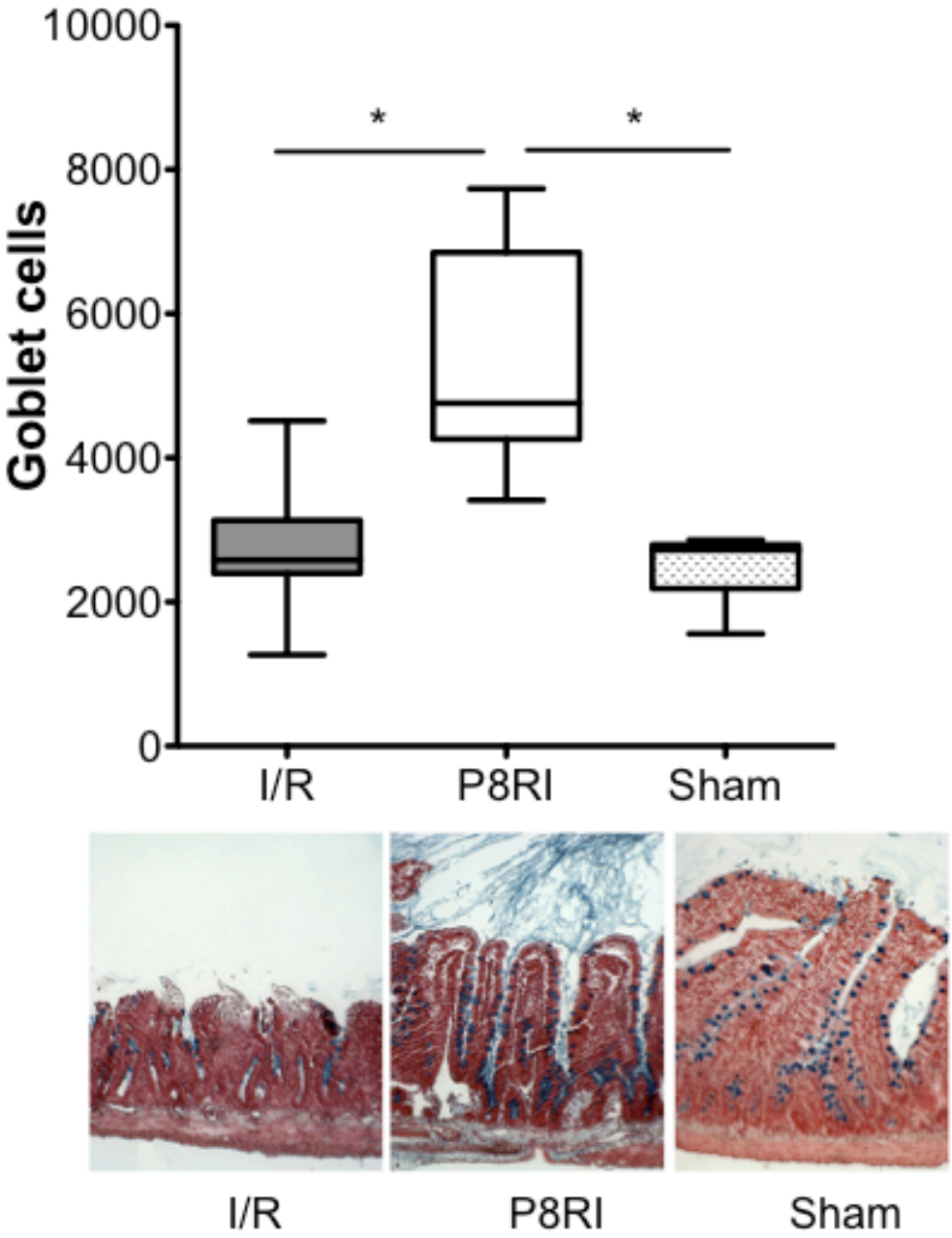


Figure 4. Spearman's correlation coefficient analysis of the relation between normalized epithelial thickness and Chiu's score of histologic grading of mesenteric I/R injury. Epithelial layer thickness was inversely correlated with Chiu's score (Spearman r = - 0.7245, p < 0.001).

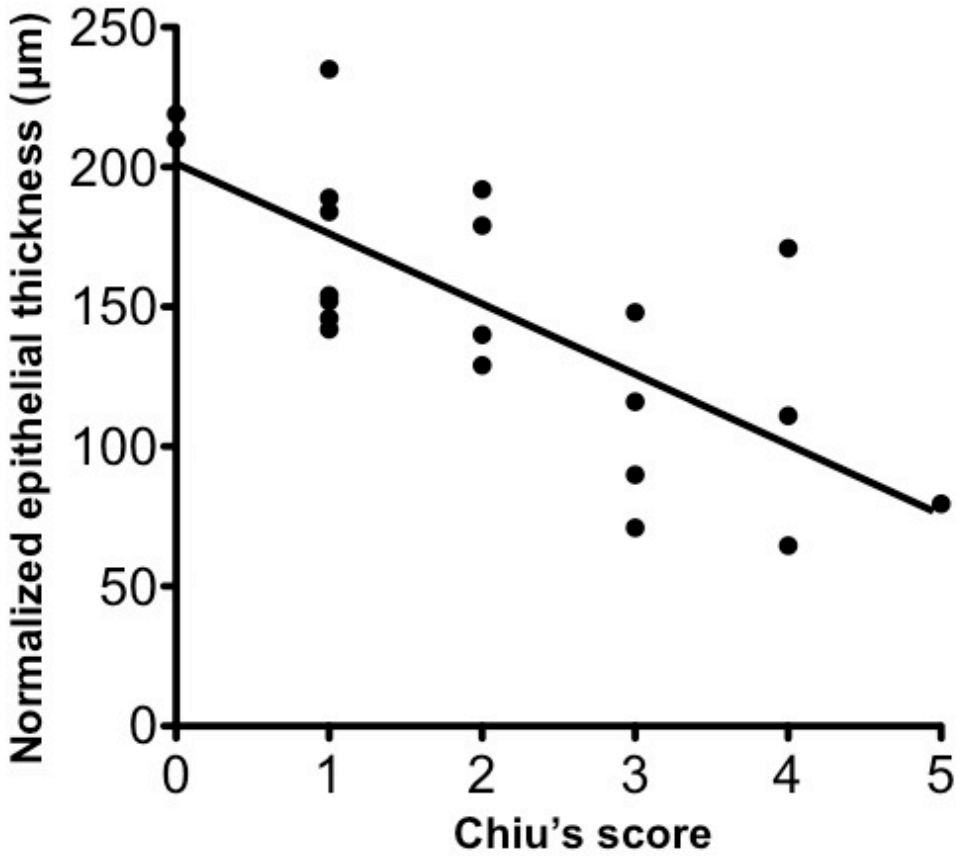


Figure 5. Effect of P8RI on digestive bleeding. Mean hemoglobin concentration in luminal content was normalized by dividing by total protein concentration. Hb levels of I/R and P8RI groups were compared using the Mann-Whitney test (*p < 0.01).

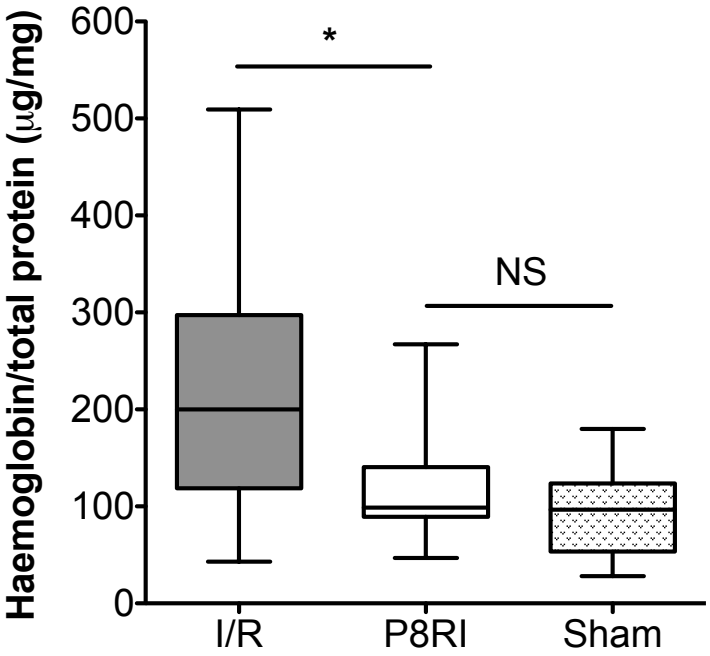


Figure 6. Effect of P8RI on intestinal MPO. Mean MPO concentration in small bowel tissue was normalized by dividing by total protein concentration. MPO levels of I/R and P8RI groups were compared using the Student t test (*p < 0.05).

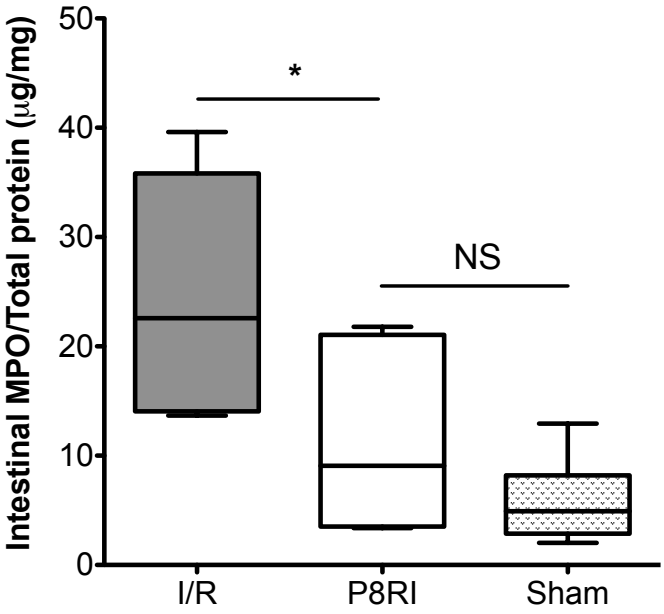


Figure 7. Effect of P8RI on intestinal MMP-9. Mean MMP-9 concentration in small bowel tissue was normalized by dividing by total protein concentration. MMP-9 levels of I/R and P8RI groups were compared using the Student t test (*$p < 0.05$).

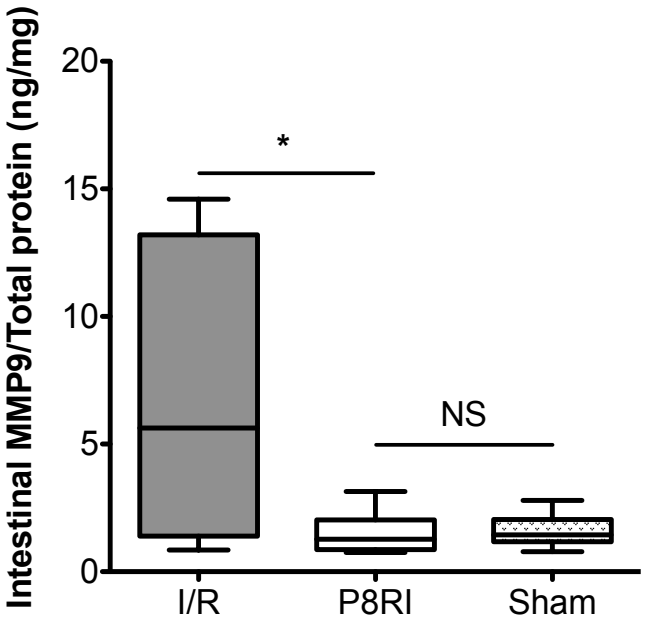


Figure 8. Peritoneal MMP-9 levels in I/R (●), P8RI (■) and sham (▲) rats before ischemia and during reperfusion. MMP-9 levels in peritoneal fluid were normalized by dividing by total protein concentration. Data are presented as means ± SEM. Using two-way ANOVA analysis, dynamics of peritoneal MMP-9 levels of the 3 groups were significantly different ($p < 0.001$), as were those of I/R and P8RI groups ($p < 0.01$).

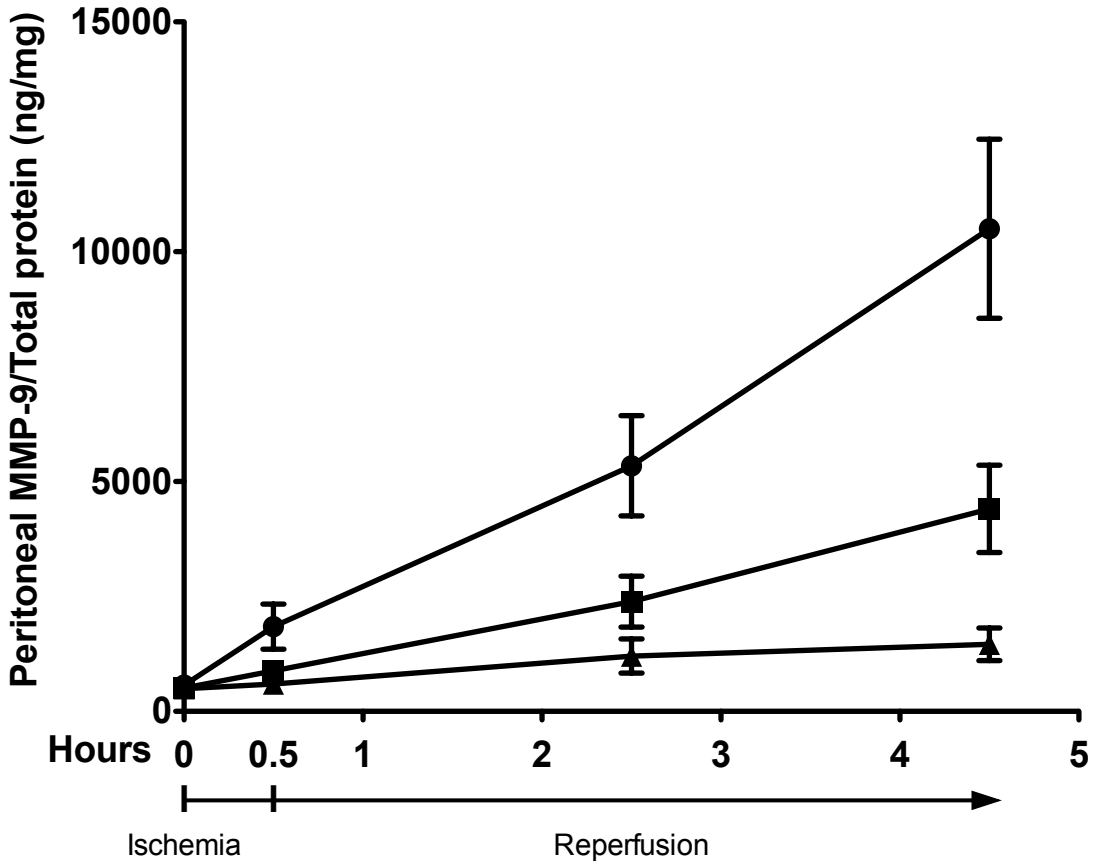


Figure 9. Plasma MMP-9 levels in I/R (●), P8RI (■) and sham (▲) rats before ischemia and during reperfusion. Data are presented as means ± SEM. Using two-way ANOVA analysis, dynamics of plasma MMP-9 levels of the 3 groups were significantly different ($p < 0.001$) as were those of I/R and P8RI groups ($p < 0.05$).

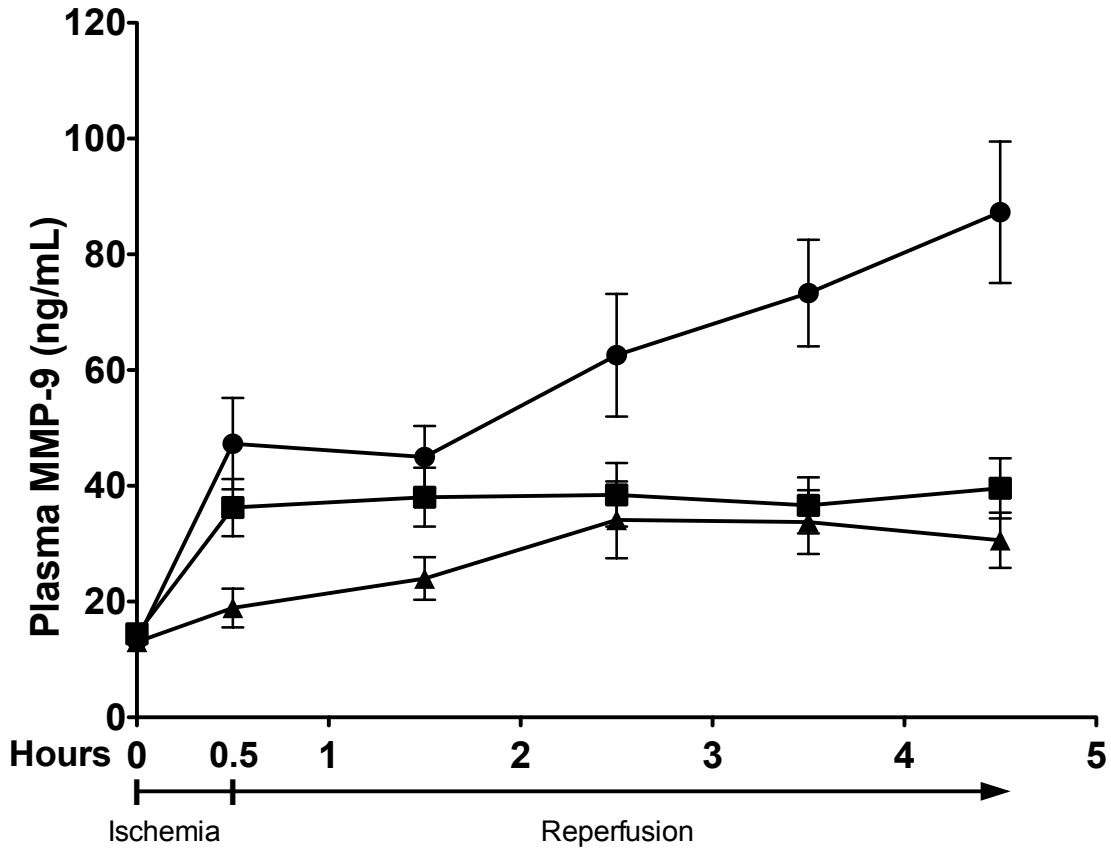


Figure 10. Plasma cf-DNA levels in I/R (●), P8RI (■) and sham (▲)rats before ischemia and during reperfusion. Data are presented as means ± SEM. Dynamics of plasma cf-DNA levels of the 3 groups were significantly different with two-way ANOVA analysis ($p < 0.01$). Plasma cf-DNA levels of each time point of I/R and P8RI groups were compared using the Mann-Whitney test (* $p < 0.05$).

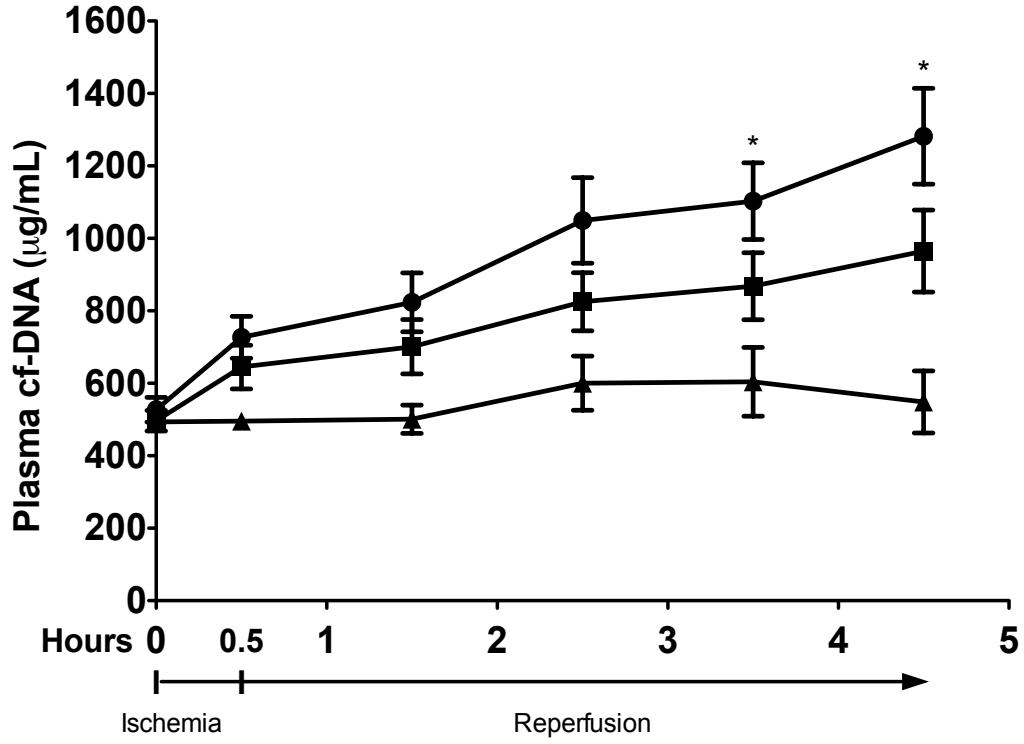


Figure 11. Mean value 1/Ct in qPCR for the detection of E.coli DNA in total blood of the I/R and P8RI groups (7 rats for each group) after release of SMA clamp and during reperfusion. Value 1/Ct should be zero if the Ct is not detected by qPCR (meaning the number of cycles taken to detect a real signal is infinite). Data are presented as dot plots with median (thick line) and upper and lower quartiles (whiskers). Comparison was performed using the Mann-Whitney test ($p < 0.05$).

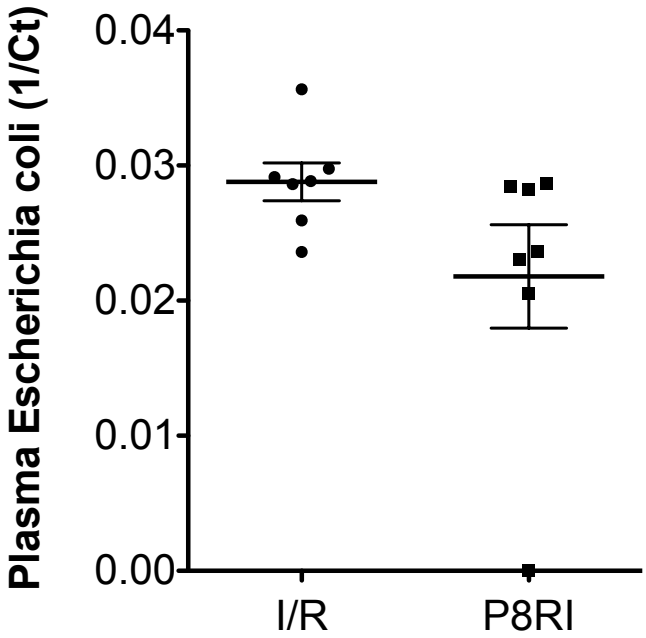


Figure 12. Neutrophil counts in I/R (●), P8RI (■) and sham (▲) rats. Data are presented as means ± SEM. Neutrophil counts before ischemia and at different time points during reperfusion were compared by two-way ANOVA ($p < 0.05$). There are no significant differences between I/R and P8RI groups but the Bonferroni post hoc test showed significant differences between cell counts of I/R and sham groups (* $p < 0.0101$; ** $p < 0.05$) and between P8RI and sham groups (*** $p < 0.05$).

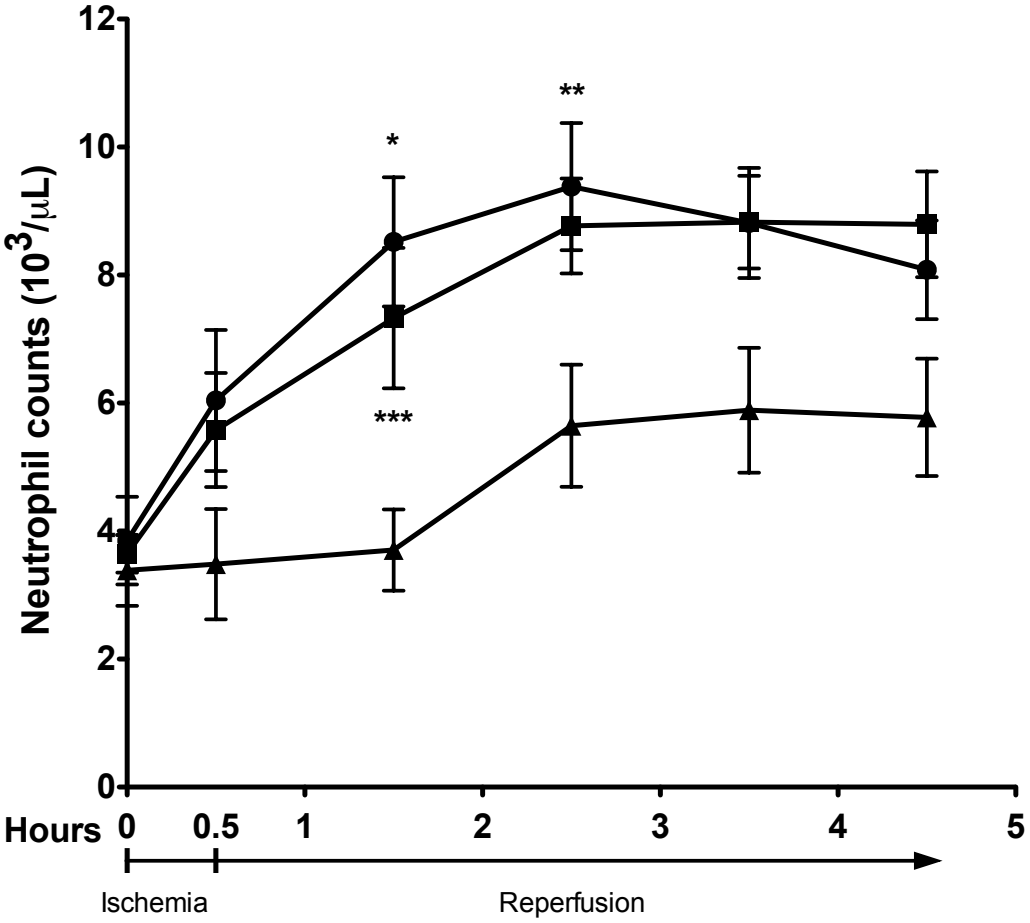


Figure 13. Cleaved CD31 levels in plasma of I/R (●), P8RI (■) and sham (▲) rats before ischemia and during reperfusion. Data are presented as means ± SEM. Two-way ANOVA analysis showed that the dynamics of plasma cleaved CD31 levels of the 3 groups were significantly different ($p < 0.01$) as were those of I/R and P8RI groups ($p < 0.01$).

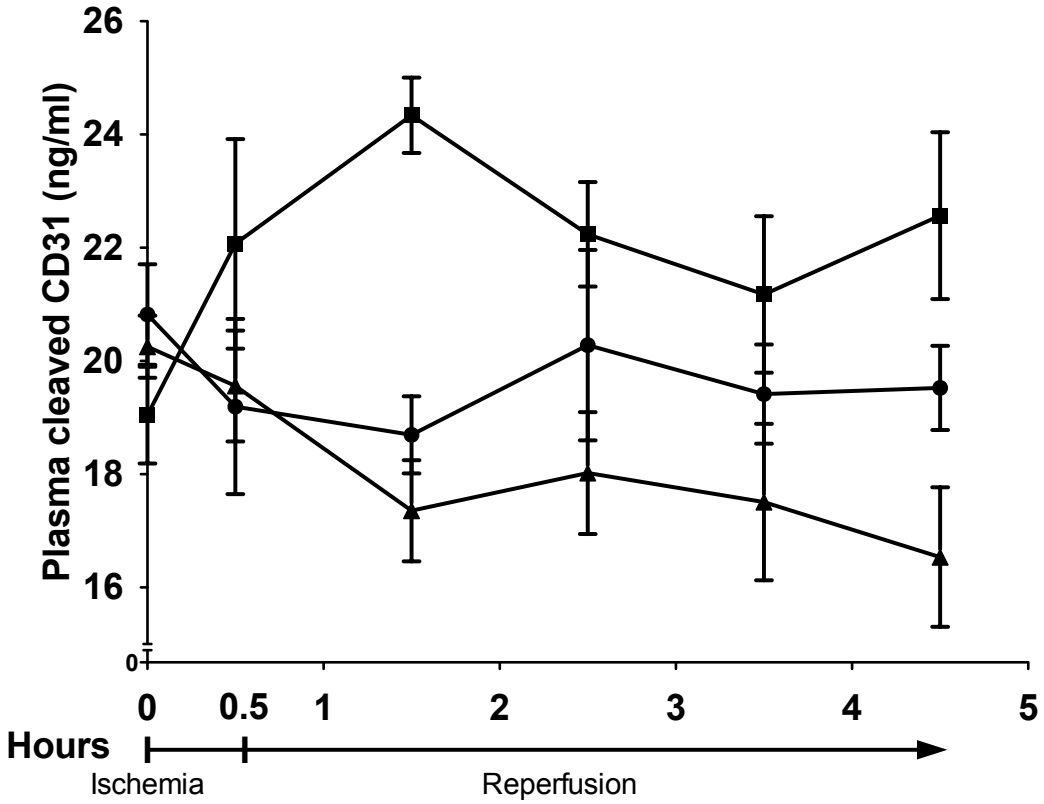


Figure 14. Pearson's correlation coefficients of plasma MMP-9 level at 3 h of reperfusion. Data are presented as white (significant correlation) and black (non-significant correlation) bars. The position of the bar shows a negative (left) or positive (right) correlation with other variables. i: after 30 min of ischemia; r1, r2, r3, r4: after 1, 2, 3, and 4 hours of reperfusion, respectively.

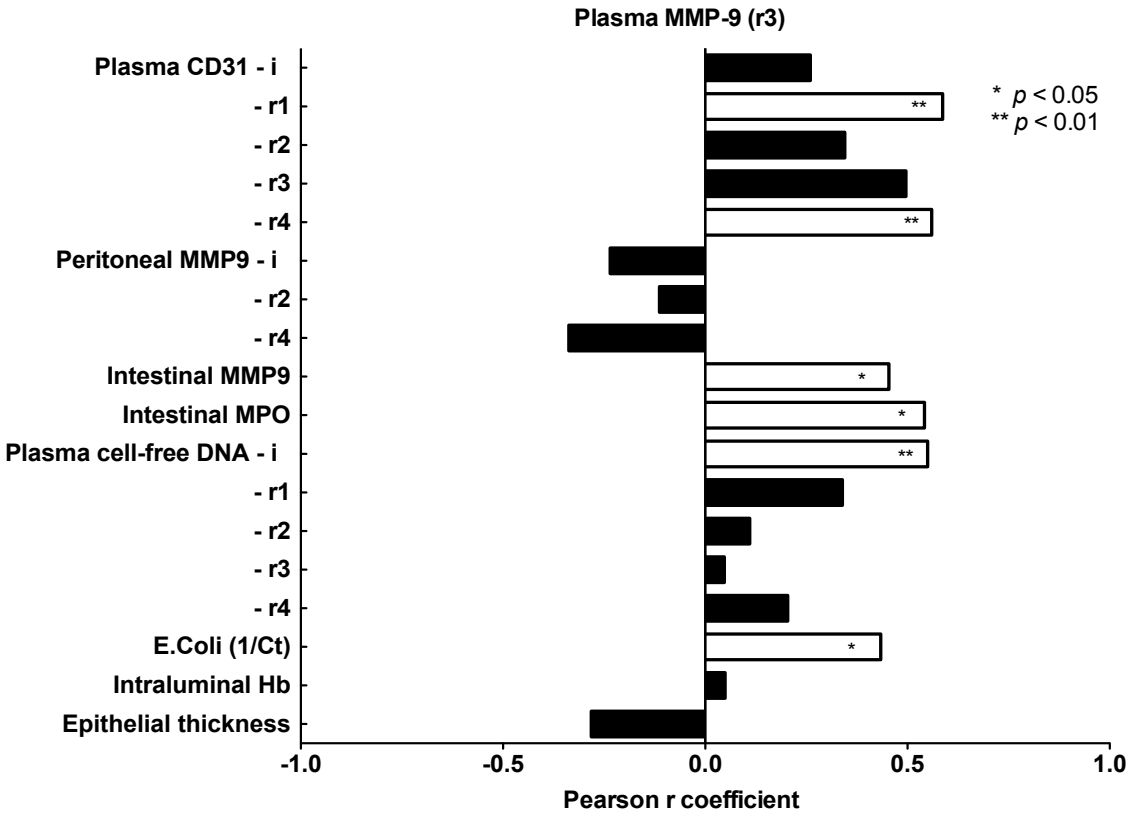


Figure 15. Pearson's correlation coefficients of plasma cleaved CD31 level after 1 h of reperfusion. Data are presented as white (significant correlation) and black (non-significant correlation) bars. The position of the bar shows a negative (left) or positive (right) correlation with other variables. i: after 30 min of ischemia; r1, r2, r3, r4: after 1, 2, 3, and 4 hours of reperfusion, respectively.

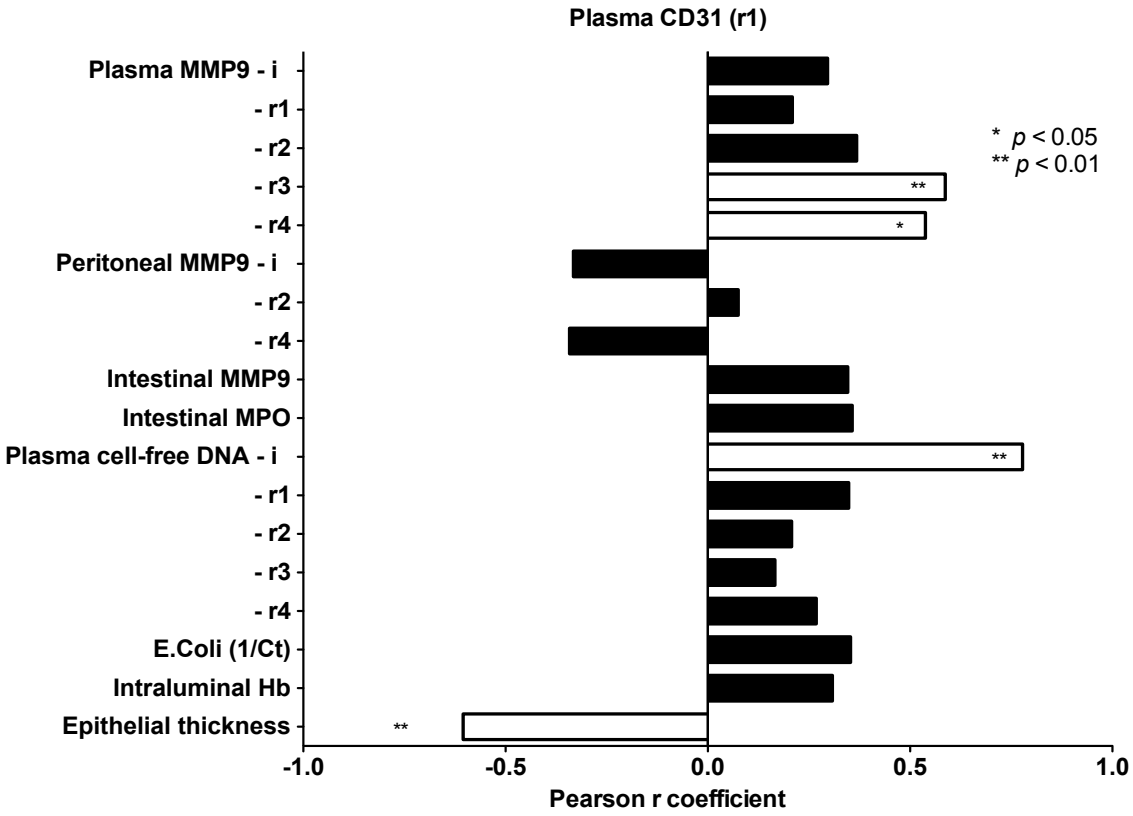
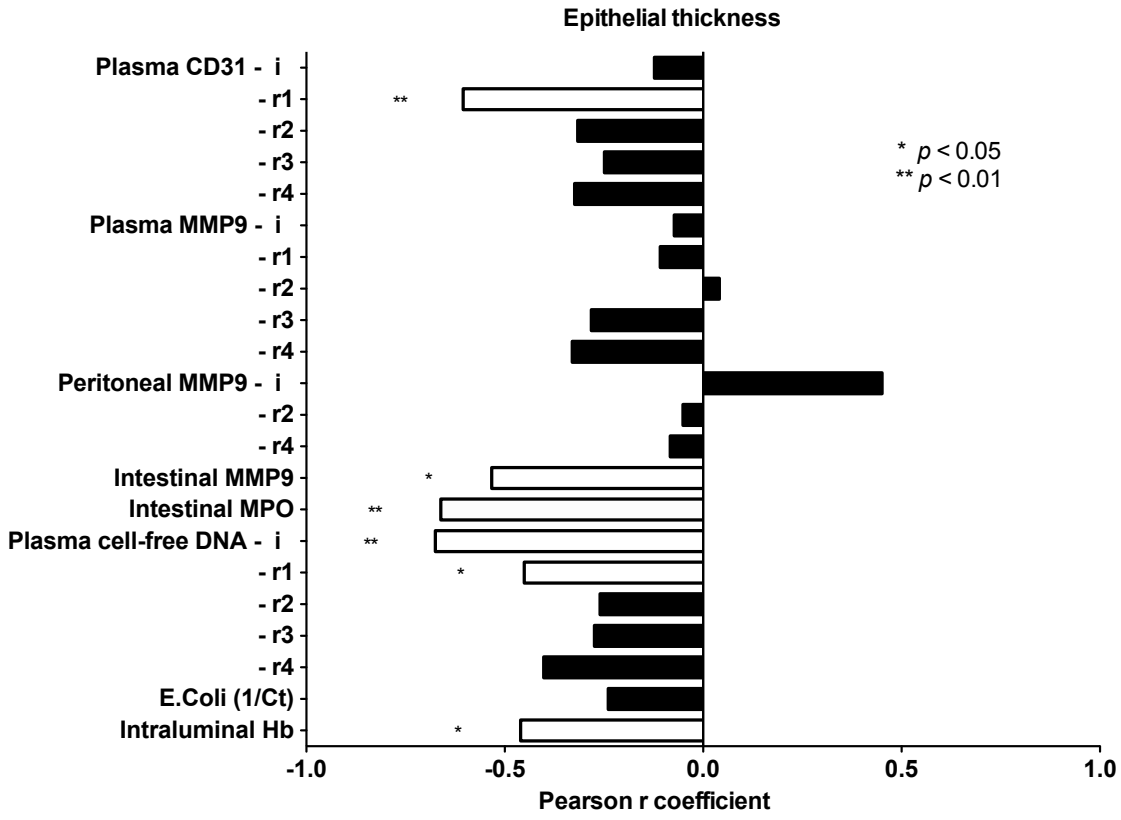


Figure 16. Pearson's correlation coefficients of epithelial thickness. Data are presented as white (significant correlation) and black (non-significant correlation) bars. The position of the bar shows a negative (left) or positive (right) correlation with other variables. i: after 30 min of ischemia; r1, r2, r3, r4: after 1, 2, 3, and 4 hours of reperfusion, respectively.



Index: Table of bivariable correlations between all variables.

Pearson Correlation Coefficients
p value
n

Epithelial thickness (µm)	Plasma MMP9 (ng/mL)					Peritoneal MMP9 (ng/mL)			Intestinal MMP9 (ng/mg)	Intestinal MPO (µg/mg)	Intraluminal Hb (µg/mg)	Plasma cell-free DNA (µg/mL)					Plasma CD31 (ng/mL)					E.Coli (1/Ct)	
	i	r1	r2	r3	r4	i	r2	r4				i	r1	r2	r3	r4	i	r1	r2	r3	r4		
1 21	-0.07 *0.75* 21	-0.11 *0.64* 21	0.04 *0.86* 21	-0.282 *0.22* 21	-0.330 *0.15* 21	0.451 *0.053* 19	-0.051 *0.84* 19	-0.083 *0.73* 19	**-0.533** ***0.013*** 21	**-0.661** ***0.001*** 21	**-0.460** ***0.036*** 21	**-0.675** ***0.001*** 21	**-0.451** ***0.04*** 21	-0.260 *0.25* 21	-0.274 *0.23* 21	-0.402 *0.07* 21	-0.123 *0.60* 21	**-0.605** ***0.004*** 21	-0.316 *0.18* 20	-0.249 *0.28* 21	-0.324 *0.15* 21	-0.239 *0.30* 21	Epithelial thickness (µm)
	1 21	0.319 *0.16* 21	**0.543** ***0.011*** 21	**0.637** ***0.002*** 21	0.279 *0.22* 21	-0.081 *0.74* 19	-0.183 *0.45* 19	-0.282 *0.24* 19	0.073 *0.75* 21	0.321 *0.16* 21	-0.127 *0.58* 21	0.375 *0.09* 21	-0.043 *0.85* 21	-0.162 *0.48* 21	-0.121 *0.60* 21	-0.070 *0.76* 21	0.220 *0.34* 21	0.296 *0.19* 21	0.314 *0.18* 21	0.232 *0.31* 21	0.300 *0.19* 21	0.230 *0.32* 21	Plasma MMP-9 i (ng/mL)
		1 21	**0.458** ***0.04*** 21	**0.543** ***0.01*** 21	0.365 *0.10* 21	**0.502** ***0.03*** 19	**0.471** ***0.04*** 19	-0.039 *0.87* 19	**0.556** ***0.009*** 21	**0.485** ***0.03*** 21	0.118 *0.61* 21	0.186 *0.42* 21	0.213 *0.35* 21	-0.048 *0.84* 21	-0.051 *0.83* 21	-0.031 *0.89* 21	0.132 *0.57* 21	0.209 *0.36* 21	**0.476** ***0.03*** 20	0.332 *0.14* 21	**0.495** ***0.02*** 21	0.060 *0.796* 21	Plasma MMP-9 r1 (ng/mL)
			1 21	**0.818** ***0.000*** 21	**0.563** ***0.008*** 21	-0.036 *0.88* 19	0.075 *0.76* 19	-0.317 *0.19* 19	0.347 *0.12* 21	0.384 *0.09* 21	0.058 *0.80* 21	0.339 *0.13* 21	**0.440** ***0.046*** 21	0.331 *0.14* 21	0.071 *0.76* 21	0.162 *0.48* 21	0.321 *0.16* 21	0.368 *0.10* 21	0.317 *0.17* 20	**0.443** ***0.04*** 21	**0.476** ***0.03*** 21	0.286 *0.21* 21	Plasma MMP-9 r2 (ng/mL)
				1 21	**0.835** ***0.000*** 21	-0.235 *0.33* 19	-0.113 *0.65* 19	-0.337 *0.16* 19	***0.454*** ***0.04*** 21	**0.542** ***0.01*** 21	0.049 *0.83* 21	**0.550** ***0.01*** 21	0.339 *0.13* 21	0.110 *0.64* 21	0.047 *0.84* 21	0.204 *0.38* 21	0.260 *0.26* 21	**0.587** ***0.005*** 21	0.345 *0.14* 20	**0.496** ***0.02*** 21	**0.560** ***0.008*** 21	**0.434** ***0.049*** 21	Plasma MMP-9 r3 (ng/mL)
					1 21	-0.269 *0.27* 19	-0.184 *0.45* 19	-0.281 *0.24* 19	0.255 *0.27* 21	0.312 *0.17* 21	0.120 *0.60* 21	**0.563** ***0.008*** 21	0.280 *0.22* 21	-0.005 *0.98* 21	0.044 *0.85* 21	0.258 *0.26* 21	0.361 *0.11* 21	**0.538** ***0.01*** 21	0.237 *0.32* 20	**0.439** ***0.047*** 21	0.403 *0.07* 21	0.303 *0.18* 21	Plasma MMP-9 r4 (ng/mL)
						1 19	**0.632** ***0.005*** 18	0.278 *0.26* 18	-0.056 *0.82* 19	-0.189 *0.44* 19	-0.035 *0.89* 19	-0.259 *0.29* 19	-0.087 *0.72* 19	-0.161 *0.51* 19	-0.210 *0.39* 19	-0.244 *0.31* 19	0.142 *0.56* 19	-0.332 *0.17* 19	0.422 *0.07* 19	0.129 *0.60* 19	-0.076 *0.76* 19	**-0.492** ***0.03*** 19	Peritoneal MMP-9 i (ng/mL)
							1 19	**0.537** ***0.02*** 19	0.409 *0.08* 19	0.306 *0.20* 19	0.190 *0.435* 19	-0.133 *0.58* 19	**0.490** ***0.03*** 19	0.313 *0.19* 19	0.106 *0.67* 19	0.182 *0.46* 19	0.170 *0.49* 19	-0.075 *0.76* 19	**0.645** ***0.003*** 19	0.409 *0.08* 19	0.231 *0.34* 19	-0.238 *0.33* 19	Peritoneal MMP-9 r2 (ng/mL)
								1 19	0.121 *0.62* 19	0.108 *0.66* 19	0.189 *0.44* 19	-0.452 *0.052* 19	0.075 *0.76* 19	0.054 *0.83* 19	0.139 *0.57* 19	0.100 *0.68* 19	-0.371 *0.12* 19	-0.342 *0.15* 19	0.352 *0.14* 19	0.055 *0.82* 19	-0.296 *0.22* 19	0.082 *0.74* 19	Peritoneal MMP-9 r3 (ng/mL)
									1 21	**,785** ***0.000*** 21	0.282 *0.22* 21	0.247 *0.28* 21	0.686 ***0.001*** 21	**0.567** ***0.007*** 21	0.372 *0.10* 21	0.411 *0.06* 21	-0.114 *0.62* 21	0.346 *0.12* 21	0.389 *0.09* 20	0.405 *0.07* 21	**0.521** ***0.02*** 21	0.185 *0.42* 21	Intestinal MMP-9 (ng/mg)
										1 21	0.321 *0.16* 21	0.332 *0.14* 21	**0.569** ***0.007*** 21	0.384 *0.09* 21	0.311 *0.17* 21	0.410 *0.07* 21	-0.103 *0.66* 21	0.357 *0.11* 21	**0.506** ***0.02*** 20	**0.506** ***0.02*** 21	0.393 *0.078* 21	0.379 *0.09* 21	Intestinal MPO (µg/mg)
											1 21	0.241 *0.29* 21	0.308 *0.18* 21	0.216 *0.34* 21	0.142 *0.54* 21	0.074 *0.75* 21	-0.060 *0.80* 21	0.308 *0.18* 21	0.169 *0.48* 20	0.023 *0.92* 21	-0.041 *0.86* 21	0.177 *0.44* 21	Intraluminal Hb (µg/mg)
												1 21	0.370 *0.10* 21	0.154 *0.51* 21	0.067 *0.77* 21	0.275 *0.23* 21	**0.619** ***0.003*** 21	**0.778** ***0.000*** 21	0.368 *0.11* 20	0.326 *0.15* 21	**0.484** ***0.03*** 21	0.172 *0.46* 21	Plasma cell-free DNA i (µg/mL)
													1 21	**0.826** ***0.000*** 21	**0.489** ***0.02*** 21	**0.688** ***0.001*** 21	0.379 *0.09* 21	0.348 *0.12* 21	0.411 *0.07* 20	**0.528** ***0.01*** 21	**0.476** ***0.03*** 21	0.114 *0.62* 21	Plasma cell-free DNA r1 (µg/mL)
														1 20	**0.729** ***0.000*** 21	**0.730** ***0.000*** 21	0.060 *0.80* 21	0.207 *0.37* 21	0.130 *0.58* 20	0.406 *0.07* 21	0.307 *0.18* 21	0.096 *0.68* 21	Plasma cell-free DNA r2 (µg/mL)
															1 21	**0.900** ***0.000*** 21	-0.119 *0.61* 21	0.166 *0.47* 21	0.000 *1.00* 20	0.393 0.08 21	0.268 *0.24* 21	0.003 *0.99* 21	Plasma cell-free DNA r3 (µg/mL)
																1 21	0.157 *0.50* 21	0.268 *0.24* 21	0.196 *0.41* 20	**0.535** ***0.01*** 21	0.356 *0.11* 21	0.081 *0.73* 21	Plasma cell-free DNA r4
																	1 21	0.407 *0.07* 21	0.328 *0.16* 20	0.322 *0.25* 21	**0.471** ***0.03*** 21	-0.260 *0.26* 21	Plasma CD31 i (ng/mL)
																		1 21	0.240 *0.31* 20	**0.442** ***0.045*** 21	**0.745** ***0.000*** 21	0.353 *0.12* 21	Plasma CD31 r1 (ng/mL)
																			1 21	**0.613** ***0.004*** 20	0.291 *0.21* 20	0.004 *0.99* 20	Plasma CD31 r2 (ng/mL)
																				1 21	**0.533** ***0.01*** 21	0.049 *0.83* 21	Plasma CD31 r3 (ng/mL)
																					1 21	0.023 *0.92* 21	Plasma CD31 r4 (ng/mL)

Conclusion

L'ischémie - reperfusion mésentérique est un syndrome grave avec une mortalité élevée, de 60 - 80%.[9,11-13] Il n'y a eu que peu de changement sur le taux de survie au cours de quatre dernières décennies.[3] Du fait que l'ischémie mésentérique est rarement évitable, la majorité des études sur ce domaine ont proposé le développement de nouvelles approches thérapeutiques qui ciblent la lésion post-ischémique. Sur la base de recherches dédiées à la lésion d'ischémie - reperfusion, il semble que l'atténuation de la réponse immune innée serait essentielle à des approches thérapeutiques futures visant à réduire la destruction tissulaire[255] en ciblant l'activation neutophilaire et ses effecteurs. Les études expérimentales ont montré l'efficacité du traitement bloquant les neutrophiles dans la réduction de la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique.[101-103] Le rôle physiophathologique de l'activation neutrophilaire et de son inhibition pharmacologique dans l'ischémie - reperfusion mésentérique est l'objectif actuel des recherches pré-cliniques dans ce domaine.

Les Fucoidans représentent une classe de polysaccharide riche en fucose, purifiés à partir de la matrice extracellulaire d'algues brunes. Les Fucoidans diminuent l'extravasation neutrophilaire en antagonisant la P-selectin dans plusieurs études expérimentales.[261,262,265]

Nous avons testé l'efficacité thérapeutique du Fucoidan à travers le mécanisme proposé de l'inhibition de la P-selectin, molécule principale dans l'initiation de l'adhésion des neutrophiles sur l'endothélium, sur le modèle d'une heure d'ischémie mésentérique et 4 heures de reperfusion. Notre hypothèse était que le Fucoidan atténue l'adhésion neutrophilaire - endothéliale en bloquant la P-selectin. Uhm et coll. ont montré que l'effet protecteur de Fucoidan est dose dépendant avec l'efficacité maximale entre 50-100 mg/kg dans le modèle d'encéphalopathie ischémique - hypoxique périnatale chez les rats.[266] Li et coll ont justifié aussi l'effet de Fucoidan à dose de 50 - 200 mg/kg sur le modèle d'ischémie - reperfusion myocardique chez les rats. Le Fucoidan a diminué la taille d'infarctus du myocardique, la numération neutrophilaire et l'activité de MPO dans le myocarde, et aussi le score histologique.[265] Nous avons choisi la dose initiale de 40 mg/kg/h en continue en raison de l'élimination rapide du Fucoidan à faible poids moléculaire. Le poids moléculaire de Fucoidan utilisé dans notre étude était d'environ 6000 Da, comme la sienne de produit qui a montré son efficacité thérapeutique dans une étude d'ischémie du myocarde réalisée auparavant dans le laboratoire.[267]

La concentration d'ADN libre circulant, un marqueur de l'activation neutrophilaire, et le taux d'Hb intraluminale ne montre cependant pas d'effet du Fucoidan à 40 mg/kg/h sur l'activation neutrophilaire. Le modèle d'une heure d'ischémie puis reperfusion mésentérique est très agressif pour une étude expérimentale avec la mortalité supérieure de 30%. Ces résultats nous ont fait diminuer le temps d'ischémie en 30 minutes et changer la posologie de Fucoidan en 80 mg/kg/h et 4 mg/kg/h.

Les fortes (80 mg/kg/h) et faibles (4 mg/kg/h) doses ont augmenté la concentration d'ADN libre circulant dans le plasma dans le modèle de 30 minutes d'ischémie - 4 heures de reperfusion. Nous avons trouvé par contre une diminution significative de l'Hb intraluminale, marqueur de l'hémorragie digestive, dans le groupe Fucoidan à forte dose. La diminution de l'hémorragie digestive dans le groupe de Fucoidan à forte dose est probablement liée à son effet de protection vasculaire. Le traitement avec le Fucoidan a été montré réduire l'inflammation vasculaire et le stress oxidant causé par l'expression d'iNOS par un mécanisme d'augmentation de la production de NO en activant l'eNOS et la phosphorylation de la protéine kinase B (Akt).[268]

Les Fucoidans sont une classe importante de polysaccharide qui ont des bioactivités multiples et remarquables: anti-inflammatoire, anti-angiogénique, anti-coagulant et anti-adhésive cellulaire.[258,259,261] Ses propriétés bioactives peuvent varier en fonction de la source d'algues, la composition, les caractéristiques structurelles, la charge, la distribution et la liaison des substitutions de sulfate, et la pureté du Fucoidan.[259] L'effet thérapeutique de Fucoidan a été montré dose-dépendant par Uhm et coll. La dose supérieure de 100 mg/kg a augmenté la mortalité des rats dans l'encéphalopathie ischémique - hypoxique.[266] La grande variabilité de la bioactivité et de la dose du Fucoidan est probablement l'explication de l'aggravation du modèle d'ischémie - reperfusion mésentérique observée sous Fucoidan. Il est nécessaire d'élargir cette étude en recherchant la dose appropriée du Fucoidan qui a montré un effet de protection partielle sur l'hémorragie digestive.

Le traitement avec l'agoniste du récepteur cellulaire CD31 qui cible l'activation et l'infiltration neutrophilaire tissulaire a été principalement évalué dans notre étude. Le sauvetage de la signalisation CD31 avec son peptide agoniste dans l'activation lymphocytaire a été démontré par une autre équipe du laboratoire.[178] Dans notre étude, nous avons mis en évidence que l'administration preventive du P8RI diminue les paramètres biologiques de l'activation neutrophilaire et les lésions digestives. Les MMP-9 (protéolyse) et MPO (oxidation) sont des enzymes des granules libérées dès l'activation neutrophilaire.[107] La MMP-9 est très diffusible

du tissu au plasma.[269] La concentration élevée de MMP-9 a été notée dans un modèle d'ischémie - reperfusion mésentérique chez les rats.[124] Notre étude montre une diminution nette de la MMP-9 dans le plasma sous traitement par le P8RI par rapport au groupe de contrôles.

L'ischémie mésentérique aigüe conduit à des troubles de l'équilibre des fluides dans l'intestin, la muqueuse ainsi que la séreuse. Quand l'intestin nécrose, la péritonite se développe.[270] Dans notre étude, l'analyse de la concentration de MMP-9 dans le liquide péritonéal et dans le tissu intestinal a été réalisée comme témoin de l'activation neutrophilaire *in situ.* Notre résultat a montré une augmentation significative de la MMP-9 péritonéale chez les rats contrôles positives avec une diminution significative dans le groupe traité. La perfusion de P8RI a réduit également la MMP-9 intestinale par rapport le groupe contrôle positive. Çes résultats suggèrent que le P8RI limite la sécrétion de MMP-9 en antagonisant l'activation neutrophilaire.

La reperfusion de l'intestin ischémique résulte une augmentation de l'infiltration neutrophilaire.[271] Les neutrophiles activées jouent un rôle crucial dans les lesions intestinales induites par l'ischémie - reperfusion.[33,100] L'activité de la MPO tissulaire reflète la présence de la margination et l'extravasation des leucocytes d'origine myéloïde. L'utilisation de la MPO pour quantifier l'inflammation intestinale a montré une bonne corrélation avec l'apparition de neutrophiles dans la muqueuse intestinale.[271] Ce dosage associé à la MMP-9 intestinale suggère un effet protecteur de P8RI contre l'infiltration tissulaire des neutrophiles dans notre modèle. Cette hypothèse est également supportée par les diminutions significatives de la concentration d'ADN libre plasmatique à 3 h et 4 h de reperfusion.

L'hémorragie digestive est une des complications connues de l'ischémie - reperfusion mésentérique dont l'origine est l'abrasion des villosités épithéliales, lésant les capillaires les plus distaux. L'évaluation de l'hémorragie digestive est réalisée par la mesure du taux d'Hb fécale.[11,272,273] Les rats contrôles de cette étude ont une nette augmentation d'Hb intraluminale par rapport aux rats traités par P8RI et aux témoins non-clampés. Le P8RI a probablement un effet protecteur précoce sur la muqueuse intestinale.

La translocation bactérienne est une autre conséquence très fréquente de la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique. La muqueuse intestinale lésée perd sa fonction de barrière anti-microbienne dont résulte le passage de micro-organismes entériques dans les lymphatiques du mésentère, le foie, la rate puis le sang.[274] La PCR quantitative est une méthode qui a une sensibilité de detection plus élevée que les hémocultures pour évaluer la translocation bactérienne d'origine intestinale.[191] Nous montrons que l'ADN d'*E.coli* n'a pas été retrouvé

dans le plasma à tous les temps de prélèvements sanguins durant l'ischémie - reperfusion. La comparaison de la moyenne des valeurs 1/Ct a cependant montré des niveaux circulants plus élevés d'ADN de *E.coli* dans le sang des rats non traités que les rats traités. Elle serait un marqueur quantitatif de la translocation bactérienne dans l'ischémie - reperfusion mésentérique. La translocation bactérienne plus faible dans le groupe de P8RI peut être expliquée par l'effet protecteur potentiel de P8RI sur la muqueuse intestinale améliorant les paramètres morphométriques intestinaux. Nos quantifications morphométriques utilisant le logiciel Qwin sur les coupes histologique transversales ont montré qu'un temps d'ischémie de 30 minutes suiv de reperfusion réduit l'épaisseur de la musculeuse et de l'épithélium de l'intestin. Les épaisseurs de la musculeuse intestinale des groupes traités et non traités sont comparables tandis que le P8RI protège significativement l'épaisseur épithéliale contre l'agression de l'ischémie suivie de reperfusion. Des analyses histologiques précédentes montraient des changements dans la muqueuse, la musculeuse et les neurones tissulaires de la lésion d'ischémie - reperfusion. Peu d'effet sur la musculeuse est détectable histologiquement à 3 heures après reperfusion. Pontell et coll. ont noté que la dégénérescence musculaire longitudinale était apparente entre de 3 - 12 heures de reperfusion, avec peu d'effet sur les muscles circulaires. La muqueuse intestinale était dénudée à 1 - 3h de reperfusion.[45] À côté du score histologique classique de Chiu qui est largement utilisé, la quantification morphométrique sur les coupes transversales réalisée dans notre étude est utile pour évaluer la sévérité des lésions tissulaires. Le score de Chiu est facile à utiliser mais ne nous permet pas de quantifier la lésion spécifique de l'épithélium et de la musculeuse. La coupe transversale nous permet avoir une vision complète de la paroi intestinale et une mesure facilement numérisée du contour des différentes couches. L'épaisseur épithéliale est bien corrélée au score de Chiu et est un bon paramètre morphologique de la lésion lesion intestinale.

Dans l'analyse morphométrique, nous avons constaté un taux plus élevé de cellules caliciformes (Goblet cell, cellules à mucine) chez les rats traités par P8RI. Ce résultat peut être interprété comme la capacité du P8RI à prévenir la lésion épithéliale et à renforcer son système de défense. Les cellules caliciformes se trouvent tout le long de l'épithélium intestinal. Par la libération de mucine elles protègent la muqueuse. Les mucines formant mucus, sont de glycoprotéines de haut poids moléculaires très hydrophiles. L'implication des cellules caliciformes dans le processus de restitution épithéliale après ischémie - reperfusin a été montrée par Ikeda et coll. L'accumulation des cellules caliciformes aux extrémités des villosités a été observée après une lésion ischémique de courte durée (de 15 à 45 minutes).[51] Bien qu'Ikeda et coll aient rapporté une sensibilité moins grande des cellules caliciformes que

des cellules d'absorption à l'ischémie, en raison de l'exposition et les différences dans la famille des intégrines entre les 2 types de cellules, le mécanisme principal de recrutement des cellules caliciformes et d'accumulation de mucine reste à définir.

Nous avons dosé la concentration de CD31 clivé dans le plasma dans l'objectif d'associer un marqueur direct de la cible moléculaire associé au traitment (cible thérapeutique et diagnostique). Chaque domaine de CD31 joue des rôles distincts dans les interactions cellulaires. Le CD31 perd ses motifs d'expression de jonction intercellulaire après l'exposition endothéliale aux cytokines inflammatoire.[141] Les études antérieures ont montré que le CD31 est clivé entre le domaine 5 et 6, et relargué dans le milieu de culture des lymphocytes T ou des cellules de la lignée de T humaine en activant ces cellules.[178] Un manque de signalisation de CD31 conduit l'activation lymphocytaire T et augmente l'infiltration des lymphocytes T aux artères athérosclérotiques.[275,276] Nous avons observé du CD31 plasmatique clivé et libéré dans la circulation sanguine par l'ischémie mésentérique avec un pic à 1 heure de reperfusion. La perfusion de P8RI a diminué le CD31 clivé plasmatique en réponse à l'ischémie - reperfusion mésentérique. Ces différences significatives associées aux autres résultats démontrent le mécanisme protecteur de P8RI la prevention d'activation et d'infiltration neutrophilaire en stabilisant et évitant le clivage du CD31.

Nous avons trouvé une bonne corrélation positive et significative entre les concentrations plasmatiques de MMP-9 et de CD31 clivés. Ces résultats supportent la relation entre le clivage du CD31 et l'activation neutrophilaire dans l'ischémie - reperfusion mésentérique. Les études antérieures ont justifié que les neutrophiles perdent l'expression membranaire du CD31 après leur migration transendothéliale *in vitro* ou leur extravasation dans la peau humaine transplantée aux souris en immunodépression sévère combinée.[179,277] Le taux d'ADN libre circulant est corrélé de manière significative avec les concentrations de MMP-9 et CD31 clivé plasmatiques, de MMP-9 et de MPO intestinale. Ils sont probablement des arguments biologiques de l'association entre le taux d'ADN libre circulant et la formation des NETs dans l'ischémie - reperfusion. La production de NETs a été corrélée à l'ADN libre *in vitro* et dans le plasma d'un modèle d'anévrysme aortique abdominale.[114,115] La MMP-9 et la MPO sont des enzymes principaux des granules primaires et secondaires des neutrophiles.[107] Les corrélations fortes, positives et significatives entre le taux de MMP-9 plasmatique et MMP-9 tissulaire, et les corrélations fortes, négatives et significatives entre l'épaisseur épithéliale et la MMP-9 et MPO tissulaire ont montré que la dégranulation des neutrophiles activés et infiltrés jouent le rôle important dans la lésion intestinale d'ischémie - reperfusion. Cette conclusion correspond bien à l'étude de Daly et coll. qui ont montré le rôle de MMP-8, une autre

collagénase de granules neutrophilaires, comme un des médiateurs de la lésion intestinale d'ischémie - reperfusion.[278] Deux biomarqueurs des conséquences digestives, épaisseur épithéliale et Hb intraluminale, ont une corrélation forte, négative et significative. La mesure de l'épaisseur épithéliale sur la section transversale de l'intestin grêle est un bon choix pour évaluer la lésion intestinale dans l'ischémie - reperfusion mésentérique expérimentale.

Ces travaux présentent quelques limites:
- Premièrement, nous n'avons pas encore analysé les défaillances multiviscérales associées au modèle d'ischémie - reperfusion mésentérique.
- Deuxièmement, le CD31 est présent sur les plaquettes mais nous n'avons pas quantifié l'activation plaquettaire faute de kit spécifique du rat dans le commerce.
- Troisièmement, l'origine de CD31 clivé circulant n'est pas encore bien déterminée et le mécanisme précis de l'effet protecteur de P8RI sur ce paramètre n'est pas mis en évidence. Il est nécessaire d'élargir cette étude en analysant le mécanisme de cet effet thérapeutique. Une méthode proposée est de chercher et mesurer *in vitro* les récepteurs CD31 clivé et persistant sur les neutrophiles isolés après leur activation en comparant avec les plaquettes et les cellules endothéliales.

En conclusion, nos résultats suggèrent que la perfusion d'un agoniste peptidique du récepteur CD31, le peptide P8RI, peut réduire la lésion intestinale d'ischémie - reperfusion mésentérique dans le modèle expérimental chez le rat. Ce peptide réduit l'activation et l'infiltration neutrophilaire, la lésion histologique et les complications tel que l'hémorragie digestive et la translocation bactérienne. Cet effet bénéfique peut être expliqué majoritairement par son adhésion et sa stabilisation sur le domaine 1 du récepteur CD31 activé et clivé sur les neutrophiles. D'autres études sont necessaires pour détailler le mécanisme moléculaire de cet effet thérapeutique du P8RI sur la lésion d'ischémie - reperfusion mésentérique.

Bibliographie

1. Jacobson ED. Physiology of the mesenteric circulation. *The Physiologist.* 1982;25(5):439-443.
2. Rosenblum JD, Boyle CM, Schwartz LB. The mesenteric circulation. Anatomy and physiology. *The Surgical clinics of North America.* 1997;77(2):289-306.
3. Sise MJ. Mesenteric ischemia: the whole spectrum. *Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society.* 2010;99(2):106-110.
4. Dewitte A, Biais M, Coquin J, et al. [Diagnosis and management of acute mesenteric ischemia]. *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation.* 2011;30(5):410-420.
5. Kolkman JJ, Mensink PB. Non-occlusive mesenteric ischaemia: a common disorder in gastroenterology and intensive care. *Best practice & research Clinical gastroenterology.* 2003;17(3):457-473.
6. Dorweiler B, Pruefer D, Andrasi TB, et al. Ischemia-Reperfusion Injury : Pathophysiology and Clinical Implications. *European journal of trauma and emergency surgery : official publication of the European Trauma Society.* 2007;33(6):600-612.
7. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology.* 2012;298:229-317.
8. Guan Y, Worrell RT, Pritts TA, Montrose MH. Intestinal ischemia-reperfusion injury: reversible and irreversible damage imaged in vivo. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2009;297(1):G187-196.
9. Wyers MC. Acute mesenteric ischemia: diagnostic approach and surgical treatment. *Seminars in vascular surgery.* 2010;23(1):9-20.
10. Acosta S. Epidemiology of mesenteric vascular disease: clinical implications. *Seminars in vascular surgery.* 2010;23(1):4-8.
11. Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, Edmonds HJ, Burger CD. Acute mesenteric ischemia: a clinical review. *Archives of internal medicine.* 2004;164(10):1054-1062.
12. Clair DG, Beach JM. Mesenteric Ischemia. *The New England journal of medicine.* 2016;374(10):959-968.
13. Chang RW, Chang JB, Longo WE. Update in management of mesenteric ischemia. *World journal of gastroenterology.* 2006;12(20):3243-3247.
14. Leone M, Bechis C, Baumstarck K, et al. Outcome of acute mesenteric ischemia in the intensive care unit: a retrospective, multicenter study of 780 cases. *Intensive care medicine.* 2015;41(4):667-676.
15. Collange O, Tamion F, Meyer N, et al. Early detection of gut ischemia-reperfusion injury during aortic abdominal aneurysmectomy: a pilot, observational study. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia.* 2013;27(4):690-695.
16. Groesdonk HV, Klingele M, Schlempp S, et al. Risk factors for nonocclusive mesenteric ischemia after elective cardiac surgery. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 2013;145(6):1603-1610.
17. Ultee KH, Zettervall SL, Soden PA, et al. Incidence of and risk factors for bowel ischemia after abdominal aortic aneurysm repair. *Journal of vascular surgery.* 2016.
18. Chen Y, Wu JM, Lin TY, et al. Tetrandrine ameliorated reperfusion injury of small bowel transplantation. *Journal of pediatric surgery.* 2009;44(11):2145-2152.

19. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation.* 2009;16(1):3-11.
20. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annual review of physiology.* 2010;72:19-44.
21. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2009;40(5):e331-339.
22. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 2008;132(1):27-42.
23. Gottlieb RA, Mentzer RM. Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy. *Annual review of physiology.* 2010;72:45-59.
24. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics.* 2009;43:67-93.
25. Vandenabeele P, Declercq W, Van Herreweghe F, Vanden Berghe T. The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Science signaling.* 2010;3(115):re4.
26. Smith CC, Yellon DM. Necroptosis, necrostatins and tissue injury. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2011;15(9):1797-1806.
27. Moquin D, Chan FK. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. *Trends in biochemical sciences.* 2010;35(8):434-441.
28. Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic research in cardiology.* 2009;104(2):181-188.
29. Baines CP. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2009;46(6):850-857.
30. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2009;46(6):821-831.
31. Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Experimental neurology.* 2009;218(2):193-202.
32. Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Susin SA. AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle.* 2007;6(21):2612-2619.
33. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Digestive diseases and sciences.* 2004;49(9):1359-1377.
34. Pierro A, Eaton S. Intestinal ischemia reperfusion injury and multisystem organ failure. *Seminars in pediatric surgery.* 2004;13(1):11-17.
35. Sisley AC, Desai T, Harig JM, Gewertz BL. Neutrophil depletion attenuates human intestinal reperfusion injury. *The Journal of surgical research.* 1994;57(1):192-196.
36. Huang CY, Kuo WT, Huang CY, et al. Distinct cytoprotective roles of pyruvate and ATP by glucose metabolism on epithelial necroptosis and crypt proliferation in ischemic gut. *The Journal of physiology.* 2016.
37. Lenaerts K, Ceulemans LJ, Hundscheid IH, Grootjans J, Dejong CH, Olde Damink SW. New insights in intestinal ischemia-reperfusion injury: implications for intestinal transplantation. *Current opinion in organ transplantation.* 2013;18(3):298-303.
38. Azuara D, Sola A, Hotter G, Calatayud L, de Oca J. Apoptosis inhibition plays a greater role than necrosis inhibition in decreasing bacterial translocation in experimental intestinal transplantation. *Surgery.* 2005;137(1):85-91.
39. Huang CY, Hsiao JK, Lu YZ, Lee TC, Yu LC. Anti-apoptotic PI3K/Akt signaling by sodium/glucose transporter 1 reduces epithelial barrier damage and bacterial translocation in intestinal ischemia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 2011;91(2):294-309.

40. Little D, Dean RA, Young KM, et al. PI3K signaling is required for prostaglandin-induced mucosal recovery in ischemia-injured porcine ileum. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2003;284(1):G46-56.
41. Shah KA, Shurey S, Green CJ. Apoptosis after intestinal ischemia-reperfusion injury: a morphological study. *Transplantation.* 1997;64(10):1393-1397.
42. Vaishnava S, Behrendt CL, Ismail AS, Eckmann L, Hooper LV. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(52):20858-20863.
43. Grootjans J, Hodin CM, de Haan JJ, et al. Level of activation of the unfolded protein response correlates with Paneth cell apoptosis in human small intestine exposed to ischemia/reperfusion. *Gastroenterology.* 2011;140(2):529-539 e523.
44. Lee HT, Kim M, Kim JY, et al. Critical role of interleukin-17A in murine intestinal ischemia-reperfusion injury. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2013;304(1):G12-25.
45. Pontell L, Sharma P, Rivera LR, et al. Damaging effects of ischemia/reperfusion on intestinal muscle. *Cell and tissue research.* 2011;343(2):411-419.
46. Haglund U. Gut ischaemia. *Gut.* 1994;35(1 Suppl):S73-76.
47. Mei F, Guo S, He YT, et al. Apoptosis of interstitial cells of Cajal, smooth muscle cells, and enteric neurons induced by intestinal ischemia and reperfusion injury in adult guinea pigs. *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* 2009;454(4):401-409.
48. Piao DX, Jiang HC, Kosaka M, Shibata T, Ohtsuka A, Murakami T. Cytoplasmic delayed neuronal death in the myenteric plexus of the rat small intestine after ischemia. *Archives of histology and cytology.* 1999;62(4):383-392.
49. Yano K, Hosokawa K, Hata Y. Quantitative morphology of Auerbach's plexus in rat intestinal wall undergoing ischemia. *Journal of reconstructive microsurgery.* 1997;13(4):297-301.
50. Lindestrom LM, Ekblad E. Structural and neuronal changes in rat ileum after ischemia with reperfusion. *Digestive diseases and sciences.* 2004;49(7-8):1212-1222.
51. Ikeda H, Yang CL, Tong J, et al. Rat small intestinal goblet cell kinetics in the process of restitution of surface epithelium subjected to ischemia-reperfusion injury. *Digestive diseases and sciences.* 2002;47(3):590-601.
52. Nalini S, Mathan MM, Balasubramanian KA. Oxygen free radical induced damage during intestinal ischemia/reperfusion in normal and xanthine oxidase deficient rats. *Molecular and cellular biochemistry.* 1993;124(1):59-66.
53. Szocs K. Endothelial dysfunction and reactive oxygen species production in ischemia/reperfusion and nitrate tolerance. *General physiology and biophysics.* 2004;23(3):265-295.
54. Ozel SK, Yuksel M, Haklar G, Durakbasa CU, Dagli TE, Aktan AO. Nitric oxide and endothelin relationship in intestinal ischemia/reperfusion injury (II). *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids.* 2001;64(4-5):253-257.
55. Andrasi TB, Kekesi V, Blazovics A, Dobi I, Szabo G, Juhasz-Nagy A. ET(A) receptor blockade protects the small intestine against ischaemia/reperfusion injury in dogs via an enhancement of antioxidant defences. *Clin Sci (Lond).* 2002;103 Suppl 48:59S-63S.
56. Oktar BK, Gulpinar MA, Bozkurt A, et al. Endothelin receptor blockers reduce I/R-induced intestinal mucosal injury: role of blood flow. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2002;282(4):G647-655.

57. Wolfard A, Szalay L, Kaszaki J, et al. Dynamic in vivo observation of villus microcirculation during small bowel autotransplantation: effects of endothelin-A receptor inhibition. *Transplantation.* 2002;73(9):1511-1513.
58. Oktar BK, Coskun T, Bozkurt A, et al. Endothelin-1-induced PMN infiltration and mucosal dysfunction in the rat small intestine. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2000;279(3):G483-491.
59. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *The Journal of pathology.* 2003;199(1):8-17.
60. Stanek A, Gadowska-Cicha A, Gawron K, et al. Role of nitric oxide in physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Mini reviews in medicinal chemistry.* 2008;8(14):1549-1560.
61. Suzuki Y, Deitch EA, Mishima S, Lu Q, Xu D. Inducible nitric oxide synthase gene knockout mice have increased resistance to gut injury and bacterial translocation after an intestinal ischemia-reperfusion injury. *Critical care medicine.* 2000;28(11):3692-3696.
62. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Caputi AP. Role of constitutive nitric oxide synthase and peroxynitrite production in a rat model of splanchnic artery occlusion shock. *Life sciences.* 1998;63(9):789-799.
63. Wu B, Iwakiri R, Tsunada S, et al. iNOS enhances rat intestinal apoptosis after ischemia-reperfusion. *Free radical biology & medicine.* 2002;33(5):649-658.
64. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free radical biology & medicine.* 1998;25(4-5):434-456.
65. de Groot H, Rauen U. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *Transplantation proceedings.* 2007;39(2):481-484.
66. Ito K, Ozasa H, Kojima N, et al. Pharmacological preconditioning protects lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rat. *Shock.* 2003;19(5):462-468.
67. Attuwaybi BO, Kozar RA, Moore-Olufemi SD, et al. Heme oxygenase-1 induction by hemin protects against gut ischemia/reperfusion injury. *The Journal of surgical research.* 2004;118(1):53-57.
68. Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, et al. Carbon monoxide inhalation protects rat intestinal grafts from ischemia/reperfusion injury. *The American journal of pathology.* 2003;163(4):1587-1598.
69. Squiers EC, Bruch D, Buelow R, Tice DG. Pretreatment of small bowel isograft donors with cobalt-protoporphyrin decreases preservation injury. *Transplantation proceedings.* 1999;31(1-2):585-586.
70. Katori M, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation.* 2002;74(7):905-912.
71. Vachharajani TJ, Work J, Issekutz AC, Granger DN. Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2000;278(5):H1613-1617.
72. Coito AJ, Buelow R, Shen XD, et al. Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury. *Transplantation.* 2002;74(1):96-102.
73. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *The Journal of surgical research.* 2002;105(2):248-258.
74. Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Critical care medicine.* 2003;31(1 Suppl):S105-111.

75. Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *American journal of respiratory cell and molecular biology.* 1997;17(1):3-9.
76. Barnes PJ. Nuclear factor-kappa B. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 1997;29(6):867-870.
77. Spiecker M, Darius H, Kaboth K, Hubner F, Liao JK. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *Journal of leukocyte biology.* 1998;63(6):732-739.
78. Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *The Journal of biological chemistry.* 1995;270(23):14214-14219.
79. Heller T, Hennecke M, Baumann U, et al. Selection of a C5a receptor antagonist from phage libraries attenuating the inflammatory response in immune complex disease and ischemia/reperfusion injury. *J Immunol.* 1999;163(2):985-994.
80. Kimura T, Andoh A, Fujiyama Y, Saotome T, Bamba T. A blockade of complement activation prevents rapid intestinal ischaemia-reperfusion injury by modulating mucosal mast cell degranulation in rats. *Clinical and experimental immunology.* 1998;111(3):484-490.
81. Wada K, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of complement C5 reduces local and remote organ injury after intestinal ischemia/reperfusion in the rat. *Gastroenterology.* 2001;120(1):126-133.
82. Riedemann NC, Ward PA. Complement in ischemia reperfusion injury. *The American journal of pathology.* 2003;162(2):363-367.
83. Gibbs SA, Weiser MR, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. P-selectin mediates intestinal ischemic injury by enhancing complement deposition. *Surgery.* 1996;119(6):652-656.
84. Montalto MC, Hart ML, Jordan JE, Wada K, Stahl GL. Role for complement in mediating intestinal nitric oxide synthase-2 and superoxide dismutase expression. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2003;285(1):G197-206.
85. Erces D, Nogrady M, Varga G, et al. Complement C5a inhibition improves late hemodynamic and inflammatory changes in a rat model of nonocclusive mesenteric ischemia. *Surgery.* 2016;159(3):960-971.
86. Rodrigues SF, Granger DN. Role of blood cells in ischaemia-reperfusion induced endothelial barrier failure. *Cardiovascular research.* 2010;87(2):291-299.
87. Sun Z, Wang X, Deng X, et al. The influence of intestinal ischemia and reperfusion on bidirectional intestinal barrier permeability, cellular membrane integrity, proteinase inhibitors, and cell death in rats. *Shock.* 1998;10(3):203-212.
88. Olanders K, Sun Z, Borjesson A, et al. The effect of intestinal ischemia and reperfusion injury on ICAM-1 expression, endothelial barrier function, neutrophil tissue influx, and protease inhibitor levels in rats. *Shock.* 2002;18(1):86-92.
89. Cooper D, Chitman KD, Williams MC, Granger DN. Time-dependent platelet-vessel wall interactions induced by intestinal ischemia-reperfusion. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2003;284(6):G1027-1033.
90. Petnehazy T, Cooper D, Stokes KY, Russell J, Wood KC, Granger DN. Angiotensin II type 1 receptors and the intestinal microvascular dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2006;290(6):G1203-1210.
91. Tailor A, Cooper D, Granger DN. Platelet-vessel wall interactions in the microcirculation. *Microcirculation.* 2005;12(3):275-285.

92. El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Seminars in immunopathology.* 2008;30(3):279-289.
93. Ge L, Zhou X, Ji WJ, et al. Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow: therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2015;308(5):H500-509.
94. Zarbock A, Ley K. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *The American journal of pathology.* 2008;172(1):1-7.
95. Liu FC, Chuang YH, Tsai YF, Yu HP. Role of neutrophil extracellular traps following injury. *Shock.* 2014;41(6):491-498.
96. Schofield ZV, Woodruff TM, Halai R, Wu MC, Cooper MA. Neutrophils--a key component of ischemia-reperfusion injury. *Shock.* 2013;40(6):463-470.
97. Chen LW, Chang WJ, Chen PH, Liu WC, Hsu CM. TLR ligand decreases mesenteric ischemia and reperfusion injury-induced gut damage through TNF-alpha signaling. *Shock.* 2008;30(5):563-570.
98. Wu MC, Brennan FH, Lynch JP, et al. The receptor for complement component C3a mediates protection from intestinal ischemia-reperfusion injuries by inhibiting neutrophil mobilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2013;110(23):9439-9444.
99. Shigematsu T, Wolf RE, Granger DN. T-lymphocytes modulate the microvascular and inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion. *Microcirculation.* 2002;9(2):99-109.
100. Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, et al. Suppression of intestinal ischemia-reperfusion injury by a specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, pioglitazone, in rats. *Redox report : communications in free radical research.* 2002;7(5):294-299.
101. Kaneko H, Tamura A, Ishii T, et al. Bacterial translocation in small intestinal ischemia-reperfusion injury and efficacy of Anti-CINC antibody treatment. *European surgical research Europaische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes.* 2007;39(3):153-159.
102. Tsuruma T, Yagihashi A, Tarumi K, Hirata K. Anti-rat IL-8 (CINC) monoclonal antibody administration reduces ischemia-reperfusion injury in small intestine. *Transplantation proceedings.* 1998;30(6):2644-2645.
103. Yagihashi A, Tsuruma T, Tarumi K, et al. Prevention of small intestinal ischemia-reperfusion injury in rat by anti-cytokine-induced neutrophil chemoattractant monoclonal antibody. *The Journal of surgical research.* 1998;78(2):92-96.
104. Ley K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. *Immunological reviews.* 2002;186:8-18.
105. Chen Y, Junger WG. Measurement of oxidative burst in neutrophils. *Methods Mol Biol.* 2012;844:115-124.
106. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews Immunology.* 2006;6(3):173-182.
107. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford).* 2010;49(9):1618-1631.
108. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Advances in wound care.* 2013;2(7):379-388.

109. Lacy P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology.* 2006;2(3):98-108.
110. Amulic B, Hayes G. Neutrophil extracellular traps. *Current biology : CB.* 2011;21(9):R297-298.
111. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-1535.
112. Hakkim A, Fuchs TA, Martinez NE, et al. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation. *Nature chemical biology.* 2011;7(2):75-77.
113. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature reviews Immunology.* 2011;11(8):519-531.
114. Delbosc S, Alsac JM, Journe C, et al. Porphyromonas gingivalis participates in pathogenesis of human abdominal aortic aneurysm by neutrophil activation. Proof of concept in rats. *PloS one.* 2011;6(4):e18679.
115. Alsac JM, Delbosc S, Rouer M, et al. Fucoidan interferes with Porphyromonas gingivalis-induced aneurysm enlargement by decreasing neutrophil activation. *Journal of vascular surgery.* 2013;57(3):796-805.
116. Saukkonen K, Lakkisto P, Varpula M, et al. Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients. *Intensive care medicine.* 2007;33(9):1624-1627.
117. Saukkonen K, Lakkisto P, Pettila V, et al. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clinical chemistry.* 2008;54(6):1000-1007.
118. Rhodes A, Wort SJ, Thomas H, Collinson P, Bennett ED. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit Care.* 2006;10(2):R60.
119. Arnalich F, Maldifassi MC, Ciria E, et al. Association of cell-free plasma DNA with perioperative mortality in patients with suspected acute mesenteric ischemia. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2010;411(17-18):1269-1274.
120. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 1997;89(10):3503-3521.
121. Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2005;102(2):431-436.
122. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of leukocyte biology.* 2005;77(5):598-625.
123. Parker H, Winterbourn CC. Reactive oxidants and myeloperoxidase and their involvement in neutrophil extracellular traps. *Frontiers in immunology.* 2012;3:424.
124. Kocael A, Inal BB, Guntas G, et al. Evaluation of matrix metalloproteinase, myeloperoxidase, and oxidative damage in mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Human & experimental toxicology.* 2015.
125. Kato Y. Neutrophil myeloperoxidase and its substrates: formation of specific markers and reactive compounds during inflammation. *Journal of clinical biochemistry and nutrition.* 2016;58(2):99-104.
126. Lin TC, Li CY, Tsai CS, et al. Neutrophil-mediated secretion and activation of matrix metalloproteinase-9 during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Anesthesia and analgesia.* 2005;100(6):1554-1560.
127. Dejonckheere E, Vandenbroucke RE, Libert C. Matrix metalloproteinases as drug targets in ischemia/reperfusion injury. *Drug discovery today.* 2011;16(17-18):762-778.

128. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research.* 2006;69(3):562-573.
129. Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical reviews in biochemistry and molecular biology.* 2002;37(6):375-536.
130. Kuyvenhoven JP, Molenaar IQ, Verspaget HW, et al. Plasma MMP-2 and MMP-9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 during human orthotopic liver transplantation. The effect of aprotinin and the relation to ischemia/reperfusion injury. *Thrombosis and haemostasis.* 2004;91(3):506-513.
131. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends in molecular medicine.* 2003;9(6):263-268.
132. Hayward R, Lefer AM. Time course of endothelial-neutrophil interaction in splanchnic artery ischemia-reperfusion. *The American journal of physiology.* 1998;275(6 Pt 2):H2080-2086.
133. Hayward R, Lefer AM. Acute mesenteric ischemia and reperfusion: protective effects of recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-1. *Shock.* 1999;12(3):201-207.
134. Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, et al. Inflammatory roles of P-selectin. *The Journal of clinical investigation.* 1993;92(2):559-570.
135. Bevilacqua MP, Nelson RM. Selectins. *The Journal of clinical investigation.* 1993;91(2):379-387.
136. Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *The Journal of experimental medicine.* 2003;197(10):1355-1363.
137. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6):1133-1138.
138. Panes J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *British journal of pharmacology.* 1999;126(3):537-550.
139. Stockinger H, Gadd SJ, Eher R, et al. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J Immunol.* 1990;145(11):3889-3897.
140. Newman PJ. The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1994;714:165-174.
141. Liu L, Shi GP. CD31: beyond a marker for endothelial cells. *Cardiovascular research.* 2012;94(1):3-5.
142. Privratsky JR, Paddock CM, Florey O, Newman DK, Muller WA, Newman PJ. Relative contribution of PECAM-1 adhesion and signaling to the maintenance of vascular integrity. *Journal of cell science.* 2011;124(Pt 9):1477-1485.
143. Privratsky JR, Newman DK, Newman PJ. PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life sciences.* 2010;87(3-4):69-82.
144. Muller WA, Ratti CM, McDonnell SL, Cohn ZA. A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *The Journal of experimental medicine.* 1989;170(2):399-414.
145. Vaporciyan AA, DeLisser HM, Yan HC, et al. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science.* 1993;262(5139):1580-1582.
146. Wakelin MW, Sanz MJ, Dewar A, et al. An anti-platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 antibody inhibits leukocyte extravasation from mesenteric microvessels in vivo by blocking the passage through the basement membrane. *The Journal of experimental medicine.* 1996;184(1):229-239.

147. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature.* 2005;437(7057):426-431.
148. Falati S, Patil S, Gross PL, et al. Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood.* 2006;107(2):535-541.
149. Newman DK, Hamilton C, Newman PJ. Inhibition of antigen-receptor signaling by Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31) requires functional ITIMs, SHP-2, and p56(lck). *Blood.* 2001;97(8):2351-2357.
150. Newton-Nash DK, Newman PJ. A new role for platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31): inhibition of TCR-mediated signal transduction. *J Immunol.* 1999;163(2):682-688.
151. Patil S, Newman DK, Newman PJ. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 serves as an inhibitory receptor that modulates platelet responses to collagen. *Blood.* 2001;97(6):1727-1732.
152. Rui Y, Liu X, Li N, et al. PECAM-1 ligation negatively regulates TLR4 signaling in macrophages. *J Immunol.* 2007;179(11):7344-7351.
153. Wilkinson R, Lyons AB, Roberts D, Wong MX, Bartley PA, Jackson DE. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31) acts as a regulator of B-cell development, B-cell antigen receptor (BCR)-mediated activation, and autoimmune disease. *Blood.* 2002;100(1):184-193.
154. Wong MX, Roberts D, Bartley PA, Jackson DE. Absence of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) leads to increased severity of local and systemic IgE-mediated anaphylaxis and modulation of mast cell activation. *J Immunol.* 2002;168(12):6455-6462.
155. Carrithers M, Tandon S, Canosa S, Michaud M, Graesser D, Madri JA. Enhanced susceptibility to endotoxic shock and impaired STAT3 signaling in CD31-deficient mice. *The American journal of pathology.* 2005;166(1):185-196.
156. Goel R, Boylan B, Gruman L, Newman PJ, North PE, Newman DK. The proinflammatory phenotype of PECAM-1-deficient mice results in atherogenic diet-induced steatohepatitis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2007;293(6):G1205-1214.
157. Maas M, Stapleton M, Bergom C, Mattson DL, Newman DK, Newman PJ. Endothelial cell PECAM-1 confers protection against endotoxic shock. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology.* 2005;288(1):H159-164.
158. Biswas P, Canosa S, Schoenfeld D, et al. PECAM-1 affects GSK-3beta-mediated beta-catenin phosphorylation and degradation. *The American journal of pathology.* 2006;169(1):314-324.
159. Ferrero E, Ferrero ME, Pardi R, Zocchi MR. The platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) contributes to endothelial barrier function. *FEBS letters.* 1995;374(3):323-326.
160. Graesser D, Solowiej A, Bruckner M, et al. Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice. *The Journal of clinical investigation.* 2002;109(3):383-392.
161. Paddock C, Zhou D, Lertkiatmongkol P, Newman PJ, Zhu J. Structural basis for PECAM-1 homophilic binding. *Blood.* 2016;127(8):1052-1061.
162. Wu Y, Stabach P, Michaud M, Madri JA. Neutrophils lacking platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 exhibit loss of directionality and motility in CXCR2-mediated chemotaxis. *J Immunol.* 2005;175(6):3484-3491.
163. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 1998;392(6676):565-568.

164. Wang S, Dangerfield JP, Young RE, Nourshargh S. PECAM-1, alpha6 integrins and neutrophil elastase cooperate in mediating neutrophil transmigration. *Journal of cell science.* 2005;118(Pt 9):2067-2076.
165. Dangerfield J, Larbi KY, Huang MT, Dewar A, Nourshargh S. PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *The Journal of experimental medicine.* 2002;196(9):1201-1211.
166. Mamdouh Z, Chen X, Pierini LM, Maxfield FR, Muller WA. Targeted recycling of PECAM from endothelial surface-connected compartments during diapedesis. *Nature.* 2003;421(6924):748-753.
167. Mamdouh Z, Mikhailov A, Muller WA. Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment. *The Journal of experimental medicine.* 2009;206(12):2795-2808.
168. Mamdouh Z, Kreitzer GE, Muller WA. Leukocyte transmigration requires kinesin-mediated microtubule-dependent membrane trafficking from the lateral border recycling compartment. *The Journal of experimental medicine.* 2008;205(4):951-966.
169. Bogen S, Pak J, Garifallou M, Deng X, Muller WA. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *The Journal of experimental medicine.* 1994;179(3):1059-1064.
170. Bird IN, Spragg JH, Ager A, Matthews N. Studies of lymphocyte transendothelial migration: analysis of migrated cell phenotypes with regard to CD31 (PECAM-1), CD45RA and CD45RO. *Immunology.* 1993;80(4):553-560.
171. Tada Y, Koarada S, Morito F, et al. Acceleration of the onset of collagen-induced arthritis by a deficiency of platelet endothelial cell adhesion molecule 1. *Arthritis and rheumatism.* 2003;48(11):3280-3290.
172. Duncan GS, Andrew DP, Takimoto H, et al. Genetic evidence for functional redundancy of Platelet/Endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *J Immunol.* 1999;162(5):3022-3030.
173. Gumina RJ, el Schultz J, Yao Z, et al. Antibody to platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 reduces myocardial infarct size in a rat model of ischemia-reperfusion injury. *Circulation.* 1996;94(12):3327-3333.
174. Murohara T, Delyani JA, Albelda SM, Lefer AM. Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury in cats. *J Immunol.* 1996;156(9):3550-3557.
175. Valentini X, Gossiaux A, Caron N, Nonclercq D, Legrand A, Toubeau G. Monoclonal antibody to CD31 (PECAM-1) inhibits tubular regeneration after ischemia reperfusion injury in the rat. *Nephron Experimental nephrology.* 2011;118(3):e60-68.
176. Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 2001;36(1):55-65.
177. Demeure CE, Byun DG, Yang LP, Vezzio N, Delespesse G. CD31 (PECAM-1) is a differentiation antigen lost during human CD4 T-cell maturation into Th1 or Th2 effector cells. *Immunology.* 1996;88(1):110-115.
178. Fornasa G, Groyer E, Clement M, et al. TCR stimulation drives cleavage and shedding of the ITIM receptor CD31. *J Immunol.* 2010;184(10):5485-5492.
179. Christofidou-Solomidou M, Nakada MT, Williams J, Muller WA, DeLisser HM. Neutrophil platelet endothelial cell adhesion molecule-1 participates in neutrophil

recruitment at inflammatory sites and is down-regulated after leukocyte extravasation. *J Immunol.* 1997;158(10):4872-4878.
180. Hart SP, Ross JA, Ross K, Haslett C, Dransfield I. Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes. *Cell death and differentiation.* 2000;7(5):493-503.
181. Guzik K, Bzowska M, Smagur J, et al. A new insight into phagocytosis of apoptotic cells: proteolytic enzymes divert the recognition and clearance of polymorphonuclear leukocytes by macrophages. *Cell death and differentiation.* 2007;14(1):171-182.
182. Kuenzler KA, Pearson PY, Schwartz MZ. Interleukin-11 enhances intestinal absorptive function after ischemia-reperfusion injury. *Journal of pediatric surgery.* 2002;37(3):457-459.
183. Prasad R, Alavi K, Schwartz MZ. GLP-2alpha accelerates recovery of mucosal absorptive function after intestinal ischemia/reperfusion. *Journal of pediatric surgery.* 2001;36(4):570-572.
184. Rajeevprasad R, Alavi K, Schwartz MZ. Glucagonlike peptide-2 analogue enhances intestinal mucosal mass and absorptive function after ischemia-reperfusion injury. *Journal of pediatric surgery.* 2000;35(11):1537-1539.
185. Sileri P, Morini S, Schena S, et al. Intestinal ischemia/reperfusion injury produces chronic abnormalities of absorptive function. *Transplantation proceedings.* 2002;34(3):984.
186. Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *The Australian and New Zealand journal of surgery.* 1998;68(8):554-561.
187. Van Leeuwen PA, Boermeester MA, Houdijk AP, et al. Clinical significance of translocation. *Gut.* 1994;35(1 Suppl):S28-34.
188. Iijima S, Shou J, Naama H, Calvano SE, Daly JM. Beneficial effect of enteral glycine in intestinal ischemia/reperfusion injury. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract.* 1997;1(1):61-67; discussion 67-68.
189. Aksoyek S, Cinel I, Avlan D, et al. Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Shock.* 2002;18(5):476-480.
190. Vaishnavi C. Translocation of gut flora and its role in sepsis. *Indian journal of medical microbiology.* 2013;31(4):334-342.
191. Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleva R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *Journal of gastroenterology and hepatology.* 2007;22(4):464-471.
192. Ceppa EP, Fuh KC, Bulkley GB. Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock. *Current opinion in critical care.* 2003;9(2):127-132.
193. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British medical bulletin.* 2004;70:71-86.
194. Koksoy C, Kuzu MA, Kuzu I, Ergun H, Gurhan I. Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion. *The British journal of surgery.* 2001;88(3):464-468.
195. Xiao F, Eppihimer MJ, Young JA, Nguyen K, Carden DL. Lung neutrophil retention and injury after intestinal ischemia/reperfusion. *Microcirculation.* 1997;4(3):359-367.
196. Karkkainen JM, Lehtimaki TT, Manninen H, Paajanen H. Acute Mesenteric Ischemia Is a More Common Cause than Expected of Acute Abdomen in the Elderly. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract.* 2015;19(8):1407-1414.
197. Acosta S. Mesenteric ischemia. *Current opinion in critical care.* 2015;21(2):171-178.

198. Hmoud B, Singal AK, Kamath PS. Mesenteric venous thrombosis. *J Clin Exp Hepatol.* 2014;4(3):257-263.
199. Hagspiel KD, Flors L, Hanley M, Norton PT. Computed tomography angiography and magnetic resonance angiography imaging of the mesenteric vasculature. *Tech Vasc Interv Radiol.* 2015;18(1):2-13.
200. Oliva IB, Davarpanah AH, Rybicki FJ, et al. ACR Appropriateness Criteria (R) imaging of mesenteric ischemia. *Abdom Imaging.* 2013;38(4):714-719.
201. Bjornsson S, Resch T, Acosta S. Symptomatic mesenteric atherosclerotic disease-lessons learned from the diagnostic workup. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract.* 2013;17(5):973-980.
202. Di Minno MN, Milone F, Milone M, et al. Endovascular Thrombolysis in Acute Mesenteric Vein Thrombosis: a 3-year follow-up with the rate of short and long-term sequaelae in 32 patients. *Thromb Res.* 2010;126(4):295-298.
203. Arthurs ZM, Titus J, Bannazadeh M, et al. A comparison of endovascular revascularization with traditional therapy for the treatment of acute mesenteric ischemia. *Journal of vascular surgery.* 2011;53(3):698-704; discussion 704-695.
204. Meilahn JE, Morris JB, Ceppa EP, Bulkley GB. Effect of prolonged selective intramesenteric arterial vasodilator therapy on intestinal viability after acute segmental mesenteric vascular occlusion. *Annals of surgery.* 2001;234(1):107-115.
205. Acosta S, Nilsson T. Current status on plasma biomarkers for acute mesenteric ischemia. *Journal of thrombosis and thrombolysis.* 2012;33(4):355-361.
206. Rifai N, Gerszten RE. Biomarker discovery and validation. *Clinical chemistry.* 2006;52(9):1635-1637.
207. Jakob SM, Merasto-Minkkinen M, Tenhunen JJ, Heino A, Alhava E, Takala J. Prevention of systemic hyperlactatemia during splanchnic ischemia. *Shock.* 2000;14(2):123-127.
208. Murray MJ, Barbose JJ, Cobb CF. Serum D(-)-lactate levels as a predictor of acute intestinal ischemia in a rat model. *The Journal of surgical research.* 1993;54(5):507-509.
209. Duzgun AP, Gulgez B, Ozmutlu A, et al. The relationship between intestinal hypoperfusion and serum d-lactate levels during experimental intra-abdominal hypertension. *Digestive diseases and sciences.* 2006;51(12):2400-2403.
210. Murray MJ, Gonze MD, Nowak LR, Cobb CF. Serum D(-)-lactate levels as an aid to diagnosing acute intestinal ischemia. *American journal of surgery.* 1994;167(6):575-578.
211. Poeze M, Froon AH, Greve JW, Ramsay G. D-lactate as an early marker of intestinal ischaemia after ruptured abdominal aortic aneurysm repair. *The British journal of surgery.* 1998;85(9):1221-1224.
212. Nielsen C, Mortensen FV, Erlandsen EJ, Lindholt JS. L- and D-lactate as biomarkers of arterial-induced intestinal ischemia: an experimental study in pigs. *Int J Surg.* 2012;10(6):296-300.
213. Khurana S, Corbally MT, Manning F, Armenise T, Kierce B, Kilty C. Glutathione S-transferase: a potential new marker of intestinal ischemia. *Journal of pediatric surgery.* 2002;37(11):1543-1548.
214. Delaney CP, O'Neill S, Manning F, Fitzpatrick JM, Gorey TF. Plasma concentrations of glutathione S-transferase isoenzyme are raised in patients with intestinal ischaemia. *The British journal of surgery.* 1999;86(10):1349-1353.

215. Matsumoto S, Sekine K, Funaoka H, et al. Diagnostic performance of plasma biomarkers in patients with acute intestinal ischaemia. *The British journal of surgery.* 2014;101(3):232-238.
216. Gollin G, Marks C, Marks WH. Intestinal fatty acid binding protein in serum and urine reflects early ischemic injury to the small bowel. *Surgery.* 1993;113(5):545-551.
217. Cronk DR, Houseworth TP, Cuadrado DG, Herbert GS, McNutt PM, Azarow KS. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) for the detection of strangulated mechanical small bowel obstruction. *Current surgery.* 2006;63(5):322-325.
218. Kanda T, Fujii H, Tani T, et al. Intestinal fatty acid-binding protein is a useful diagnostic marker for mesenteric infarction in humans. *Gastroenterology.* 1996;110(2):339-343.
219. Lieberman JM, Sacchettini J, Marks C, Marks WH. Human intestinal fatty acid binding protein: report of an assay with studies in normal volunteers and intestinal ischemia. *Surgery.* 1997;121(3):335-342.
220. Thuijls G, van Wijck K, Grootjans J, et al. Early diagnosis of intestinal ischemia using urinary and plasma fatty acid binding proteins. *Annals of surgery.* 2011;253(2):303-308.
221. Kanda T, Tsukahara A, Ueki K, et al. Diagnosis of ischemic small bowel disease by measurement of serum intestinal fatty acid-binding protein in patients with acute abdomen: a multicenter, observer-blinded validation study. *Journal of gastroenterology.* 2011;46(4):492-500.
222. Corcos O, Nuzzo A. Gastro-intestinal vascular emergencies. *Best practice & research Clinical gastroenterology.* 2013;27(5):709-725.
223. Cosse C, Sabbagh C, Kamel S, Galmiche A, Regimbeau JM. Procalcitonin and intestinal ischemia: a review of the literature. *World journal of gastroenterology.* 2014;20(47):17773-17778.
224. Quaedackers JS, Beuk RJ, Bennet L, et al. An evaluation of methods for grading histologic injury following ischemia/reperfusion of the small bowel. *Transplantation proceedings.* 2000;32(6):1307-1310.
225. O'Donnell KA, Caty MG, Zheng S, Rossman JE, Azizkhan RG. Oxygenated intraluminal perfluorocarbon protects intestinal muscosa from ischemia/reperfusion injury. *Journal of pediatric surgery.* 1997;32(2):361-365.
226. Oldham KT, Guice KS, Gore D, Gourley WK, Lobe TE. Treatment of intestinal ischemia with oxygenated intraluminal perfluorocarbons. *American journal of surgery.* 1987;153(3):291-294.
227. Acosta S, Bjorck M. Modern treatment of acute mesenteric ischaemia. *The British journal of surgery.* 2014;101(1):e100-108.
228. Resch TA, Acosta S, Sonesson B. Endovascular techniques in acute arterial mesenteric ischemia. *Seminars in vascular surgery.* 2010;23(1):29-35.
229. Acosta S, Sonesson B, Resch T. Endovascular therapeutic approaches for acute superior mesenteric artery occlusion. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2009;32(5):896-905.
230. Bjornsson S, Bjorck M, Block T, Resch T, Acosta S. Thrombolysis for acute occlusion of the superior mesenteric artery. *Journal of vascular surgery.* 2011;54(6):1734-1742.
231. Heiss P, Loewenhardt B, Manke C, et al. Primary percutaneous aspiration and thrombolysis for the treatment of acute embolic superior mesenteric artery occlusion. *Eur Radiol.* 2010;20(12):2948-2958.
232. Milner R, Woo EY, Carpenter JP. Superior mesenteric artery angioplasty and stenting via a retrograde approach in a patient with bowel ischemia--a case report. *Vasc Endovascular Surg.* 2004;38(1):89-91.

233. Wyers MC, Powell RJ, Nolan BW, Cronenwett JL. Retrograde mesenteric stenting during laparotomy for acute occlusive mesenteric ischemia. *Journal of vascular surgery.* 2007;45(2):269-275.
234. Nuzzo A, Corcos O. L'ischémie mésentérique aigue en 2013 : un approche multimodale et multidisciplinaire coordonnée par le gastroentérologue. *Hépato-Gastro et Oncologie Digestive.* 2013;20(6):452-461.
235. Ackland G, Grocott MP, Mythen MG. Understanding gastrointestinal perfusion in critical care: so near, and yet so far. *Crit Care.* 2000;4(5):269-281.
236. Alverdy JC, Laughlin RS, Wu L. Influence of the critically ill state on host-pathogen interactions within the intestine: gut-derived sepsis redefined. *Critical care medicine.* 2003;31(2):598-607.
237. Husain KD, Stromberg PE, Woolsey CA, et al. Mechanisms of decreased intestinal epithelial proliferation and increased apoptosis in murine acute lung injury. *Critical care medicine.* 2005;33(10):2350-2357.
238. Almac E, Siegemund M, Demirci C, Ince C. Microcirculatory recruitment maneuvers correct tissue CO2 abnormalities in sepsis. *Minerva anestesiologica.* 2006;72(6):507-519.
239. Ince C, Sinaasappel M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Critical care medicine.* 1999;27(7):1369-1377.
240. Alverdy JC, Chang EB. The re-emerging role of the intestinal microflora in critical illness and inflammation: why the gut hypothesis of sepsis syndrome will not go away. *Journal of leukocyte biology.* 2008;83(3):461-466.
241. Deitch EA. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? *Surgery.* 2002;131(3):241-244.
242. Sorkine P, Szold O, Halpern P, et al. Gut decontamination reduces bowel ischemia-induced lung injury in rats. *Chest.* 1997;112(2):491-495.
243. de Smet AM, Kluytmans JA, Blok HE, et al. Selective digestive tract decontamination and selective oropharyngeal decontamination and antibiotic resistance in patients in intensive-care units: an open-label, clustered group-randomised, crossover study. *The Lancet Infectious diseases.* 2011;11(5):372-380.
244. de Jonge E, Schultz MJ, Spanjaard L, et al. Effects of selective decontamination of digestive tract on mortality and acquisition of resistant bacteria in intensive care: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2003;362(9389):1011-1016.
245. Daneman N, Sarwar S, Fowler RA, Cuthbertson BH. Effect of selective decontamination on antimicrobial resistance in intensive care units: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious diseases.* 2013;13(4):328-341.
246. Canter RR, Harvey SE, Harrison DA, Campbell MK, Rowan KM, Cuthbertson BH. Observational study of current use of selective decontamination of the digestive tract in UK critical care units. *British journal of anaesthesia.* 2014;113(4):610-617.
247. Houben AJ, Oostdijk EA, van der Voort PH, Monen JC, Bonten MJ, van der Bij AK. Selective decontamination of the oropharynx and the digestive tract, and antimicrobial resistance: a 4 year ecological study in 38 intensive care units in the Netherlands. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2014;69(3):797-804.
248. Hasan S, Ratnatunga C, Lewis CT, Pillai R. Gut ischaemia following cardiac surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2004;3(3):475-478.
249. Burgener D, Laesser M, Treggiari-Venzi M, et al. Endothelin-1 blockade corrects mesenteric hypoperfusion in a porcine low cardiac output model. *Critical care medicine.* 2001;29(8):1615-1620.

250. Kiefer P, Tugtekin I, Wiedeck H, et al. Hepato-splanchnic metabolic effects of the stable prostacyclin analogue iloprost in patients with septic shock. *Intensive care medicine.* 2001;27(7):1179-1186.
251. Tamion F, Richard V, Bonmarchand G, et al. Reduced synthesis of inflammatory cytokines by a free radical scavenger after hemorrhagic shock in rats. *Critical care medicine.* 2000;28(7):2522-2527.
252. Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, De Sarro A, Caputi AP. Effects of n-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovascular research.* 2000;47(3):537-548.
253. Kles KA, Wallig MA, Tappenden KA. Luminal nutrients exacerbate intestinal hypoxia in the hypoperfused jejunum. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2001;25(5):246-253.
254. Kozar RA, Hu S, Hassoun HT, DeSoignie R, Moore FA. Specific intraluminal nutrients alter mucosal blood flow during gut ischemia/reperfusion. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2002;26(4):226-229.
255. Gonzalez LM, Moeser AJ, Blikslager AT. Animal models of ischemia-reperfusion-induced intestinal injury: progress and promise for translational research. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2015;308(2):G63-75.
256. Blikslager AT, Roberts MC, Rhoads JM, Argenzio RA. Is reperfusion injury an important cause of mucosal damage after porcine intestinal ischemia? *Surgery.* 1997;121(5):526-534.
257. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg.* 1970;101(4):478-483.
258. Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules.* 2008;13(8):1671-1695.
259. Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine drugs.* 2011;9(10):2106-2130.
260. Fitton JH. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. *Marine drugs.* 2011;9(10):1731-1760.
261. Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya ME, et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology.* 2007;17(5):541-552.
262. Granert C, Raud J, Waage A, Lindquist L. Effects of polysaccharide fucoidin on cerebrospinal fluid interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in pneumococcal meningitis in the rabbit. *Infection and immunity.* 1999;67(5):2071-2074.
263. Zehnder JL, Shatsky M, Leung LL, Butcher EC, McGregor JL, Levitt LJ. Involvement of CD31 in lymphocyte-mediated immune responses: importance of the membrane-proximal immunoglobulin domain and identification of an inhibiting CD31 peptide. *Blood.* 1995;85(5):1282-1288.
264. Chen Y, Schlegel PG, Tran N, Thompson D, Zehnder JL, Chao NJ. Administration of a CD31-derived peptide delays the onset and significantly increases survival from lethal graft-versus-host disease. *Blood.* 1997;89(4):1452-1459.
265. Li C, Gao Y, Xing Y, Zhu H, Shen J, Tian J. Fucoidan, a sulfated polysaccharide from brown algae, against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via regulating the inflammation response. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association.* 2011;49(9):2090-2095.

266. Uhm CS, Kim KB, Lim JH, et al. Effective treatment with fucoidin for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Neuroscience letters.* 2003;353(1):21-24.
267. Manzo-Silberman S, Louedec L, Meilhac O, Letourneur D, Michel JB, Elmadbouh I. Therapeutic potential of fucoidan in myocardial ischemia. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 2011;58(6):626-632.
268. Li X, Li J, Li Z, et al. Fucoidan from Undaria pinnatifida prevents vascular dysfunction through PI3K/Akt/eNOS-dependent mechanisms in the l-NAME-induced hypertensive rat model. *Food & function.* 2016;7(5):2398-2408.
269. Borges LF, Touat Z, Leclercq A, et al. Tissue diffusion and retention of metalloproteinases in ascending aortic aneurysms and dissections. *Human pathology.* 2009;40(3):306-313.
270. Haglund U. Mesenteric ischemia. In: Holzheimer RG, Mannick JA, eds. *Surgical Treatment - Evidence-based and problem-oriented*: Zuckschwerdt; 2001.
271. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *The American journal of physiology.* 1986;251(4 Pt 1):G567-574.
272. Berlanga J, Prats P, Remirez D, et al. Prophylactic use of epidermal growth factor reduces ischemia/reperfusion intestinal damage. *The American journal of pathology.* 2002;161(2):373-379.
273. Watanabe T, Tanigawa T, Kobata A, et al. Toll-like receptor 2 mediates ischemia-reperfusion injury of the small intestine in adult mice. *PloS one.* 2014;9(10):e110441.
274. Berber I, Aydin C, Cevahir N, et al. Tempol reduces bacterial translocation after ischemia/reperfusion injury in a rat model of superior mesenteric artery occlusion. *Surgery today.* 2009;39(5):407-413.
275. Caligiuri G, Groyer E, Khallou-Laschet J, et al. Reduced immunoregulatory CD31+ T cells in the blood of atherosclerotic mice with plaque thrombosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2005;25(8):1659-1664.
276. Torimoto Y, Rothstein DM, Dang NH, Schlossman SF, Morimoto C. CD31, a novel cell surface marker for CD4 cells of suppressor lineage, unaltered by state of activation. *J Immunol.* 1992;148(2):388-396.
277. Romer LH, McLean NV, Yan HC, Daise M, Sun J, DeLisser HM. IFN-gamma and TNF-alpha induce redistribution of PECAM-1 (CD31) on human endothelial cells. *J Immunol.* 1995;154(12):6582-6592.
278. Daly MC, Atkinson SJ, Varisco BM, et al. Role of matrix metalloproteinase-8 as a mediator of injury in intestinal ischemia and reperfusion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2016;30(10):3453-3460.