

Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) de Biologie et physiologie de la circulation et de la respiration, option Respiration

Présentation du DEA 2002

M.P. d'Ortho, A. Harf

Avec nos collègues « cardio-vasculaires », nous accueillons chaque année une cinquantaine d'étudiants qui souhaitent faire une initiation à la recherche. La coordination générale du DEA est faite par Alain Harf, et Jean-Jacques Mercadier (Physiologie, Bichat) est coordonnateur adjoint et responsable de l'option circulation. Marie Pia d'Ortho coordonne l'option Respiration.

La composition de l'équipe pilotant le DEA en 2001-2002 a été la suivante : Conseil pédagogique : Charles Advenier, Jean-François Bernaudin, Christine Clerici, Thierry Chinet, Bruno Crestani, Philippe Devillier, Marie Pia d'Ortho, Alain Harf, Vincent Lagente, Roger Marthan, Thomas Similowski, Gérard Zalczman.

Conseil scientifique : membres du conseil pédagogique + Christophe Delacourt, Estelle Escudier, Jean-François Mor-nex, Philippe Godard.

Chaque année, 25 étudiants sont admis à s'inscrire à l'option Respiration du DEA.

Les conditions d'admission sont :

— La validation d'une maîtrise de Sciences pour les étudiants de Faculté de Sciences ou d'une maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales pour les médecins, vétérinaires et pharmaciens.

— La possibilité de se dégager de toute obligation clinique pendant une année : le plein temps est une condition absolue, indispensable à la réalisation d'un stage de recherche de qualité.

— La rédaction d'un projet de recherche élaboré par le candidat en accord avec un laboratoire d'accueil agréé par le D.E.A.

Il est fortement recommandé de commencer les démarches d'inscription dès le mois de janvier précédant la rentrée

universitaire, de façon à pouvoir bâtir un projet de recherche et se mettre à la recherche du financement, toujours difficile à obtenir. Les dossiers peuvent être obtenus auprès de Marie Pia d'Ortho, Service de Physiologie — Explorations Fonctionnelles, Hôpital Henri Mondor, Créteil, Tél. : 01 49 81 26 96, E-mail : marie-pia.dortho@creteil.inserm.fr

L'enseignement a lieu sous la forme de conférences regroupées un jour par semaine. Quatre modules se succèdent pendant l'année universitaire :

— Tronc commun aux deux options, responsables : M.P. d'Ortho, B. Crestani, R. Marthan. Ce module général se représente un tiers de l'enseignement. Il comprend une initiation à la biologie cellulaire et moléculaire, ainsi que des thèmes communs aux deux options comme la circulation pulmonaire.

— Module de biologie, responsables : Th. Chinet, J.-F. Bernaudin, G. Zalczman

— Module de physiologie, responsables : C. Clerici, T. Similowski, A. Harf

— Module de pharmacologie, responsables : V. Lagente, Ph. Devillier, C. Advenier

Le stage de recherche donne lieu à la rédaction d'un mémoire et à un exposé oral des résultats obtenus devant un jury constitué des responsables d'enseignement. Dans la majorité des cas, une publication de niveau international est issue des travaux effectués pendant l'année de DEA.

Devant la qualité remarquable des travaux effectués et de façon à favoriser la diffusion des résultats obtenus par les étudiants au cours de cette année de DEA, nous avons souhaité réunir les résumés des mémoires et les rendre accessibles aux Pneumologues.

Un site Internet vient d'être mis en place : <http://www.dea-cardiopneumo.org>

Vous êtes invités à le consulter pour obtenir plus de renseignements sur le DEA.

Expression pulmonaire du VEGF au cours du Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë

Y. Abadie (sous la direction de Ch. Delclaux)

Unité INSERM 492 (Directeur : Serge Adnot), Créteil.

Introduction : Notre laboratoire a montré une diminution de la concentration de VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor, dans les lavages broncho-alvéolaires de patients atteints de Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (SDRA) [Maitre B et al. ERJ, 2001]. Notre hypothèse est que cette diminution puisse participer aux lésions endothéliales du SDRA du fait du rôle anti-apoptotique physiologique du VEGF. Dans cette étude, nous avons évalué l'expression pulmonaire du VEGF au cours du SDRA et analysé les causes (modification du nombre de cellules productrices — pneumocytes de type II) et conséquences (raréfaction vasculaire) possibles.

Matériels et méthodes : Ce travail est réalisé à partir de tissu pulmonaire de patients souffrants de SDRA. Des dosages de VEGF et VEGF-R2 (récepteur 2 du VEGF) sont effectués à partir d'homogénats pulmonaires par méthode ELISA. Des évaluations semi-quantitatives du nombre de pneumocytes de type II, de l'importance de la vascularisation pulmonaire et de l'apoptose endothéliale sont réalisées à partir d'immunomarquages.

Résultats : Les concentrations pulmonaires de VEGF sont significativement diminuées chez les patients par rapports aux témoins ($p = 0,03$), ce qui n'est pas le cas pour celles de VEGF-R2. Le nombre de pneumocytes II et de cellules endothéliales apoptotiques est plus élevé chez les patients.

Discussion : La diminution du VEGF pulmonaire dans le SDRA n'est pas nécessairement en contradiction avec les travaux qui mettent en évidence une augmentation des concentrations plasmatiques de VEGF chez ces patients (compartimentalisation des productions vasculaire et pulmonaire). Cette diminution semble avoir pour conséquence une majoration de l'apoptose endothéliale, qui participe à l'altération de la vascularisation pulmonaire, de mauvais pronostic dans le SDRA. Cependant, elle pourrait également participer à une limitation du shunt intra-pulmonaire.

Conclusion : Il existe au cours du SDRA une diminution du VEGF pulmonaire dont la cause n'est pas la baisse du nombre de pneumocytes II et dont une conséquence semble être l'augmentation des altérations vasculaires pulmonaires par majoration de l'apoptose endothéliale.

Rôle de la protéine IGFBP-2 dans les interactions mésenchyme-épithélium au niveau de la structure alvéolaire pulmonaire

S. Abouzahr (sous la direction d'Alexandra Henrion-Caude)

Unité INSERM E0213 (Directeur : Pr A. Clément).

L'interaction des cellules épithéliales avec les fibroblastes est un élément clé du développement du poumon et du remodelage du tissu de l'alvéole pulmonaire. Des travaux récents ont montré l'existence d'une régulation concertée de la prolifération des cellules de chaque type. Pour progresser dans la compréhension des processus de prolifération mis en jeu par ces interactions mésenchyme-épithélium, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux protéines associées aux facteurs de croissance des IGF : les insulin-like growth factor binding protein (IGFBP). Pour ce travail, nous avons choisi d'utiliser un modèle cellulaire de fibroblastes et de cellules épithéliales immortalisés de rat nouveau-né.

Les fibroblastes pulmonaires constituant une population très hétérogène, nous avons tout d'abord caractérisé la capacité proliférative de cette lignée et analysé l'expression de certains marqueurs du cytosquelette, à l'état normal comme en réponse à différents stress. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une inhibition de la prolifération de ces fibroblastes en réponse à une agression oxydante. Dans la poursuite des travaux menés au laboratoire, nous avons étudié les IGFBP produites par la lignée de fibroblastes. Les résultats obtenus indiquent que (i) IGFBP-2 est l'IGFBP majoritairement produite par les fibroblastes, comme par les cellules épithéliales alvéolaires de type 2, et (ii) l'induction d'IGFBP-2 est associée à une inhibition de la prolifération des fibroblastes. Afin de documenter le mécanisme d'action et le rôle d'IGFBP-2, nous avons étudié la localisation subcellulaire d'IGFBP-2 en fonction de l'état de prolifération des cellules par immunotransfert de matériel nucléaire et cytoplasmique.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'IGFBP-2 était présente dans le noyau des fibroblastes et des cellules épithéliales alvéolaires. Ces observations viennent conforter les résultats récemment publiés par notre laboratoire rapportant la localisation nucléaire d'IGFBP-2 dans une lignée de cellules épithéliales pulmonaires. De plus, ces expériences préliminaires mettent en évidence que contrairement à la forme sécrétée d'IGFBP-2, les formes intracellulaires, cytoplasmiques et nucléaires diminuent lors de l'inhibition de la prolifération.

Les travaux se poursuivent actuellement pour préciser le rôle d'IGFBP-2. Pour cela, ayant sous-cloné IGFBP-2 dans un vecteur d'expression, nous avons initié une stratégie de surexpression en lignées transitoire et stable.

Effet protecteur de la bilirubine au cours du choc septique chez le rat

S. Bloc (sous la direction du Dr. Jorge Boczkowski).

Unité INSERM 9920 (Directeur Christian Thuillez)
INSERM Unité 408 (Directeur Michel Aubier).

Introduction : La bilirubine, puissant antioxydant, jouerait un rôle protecteur dans des pathologies liées au stress oxydatif. Son rôle au cours du sepsis n'est pas connu. Le but de ce travail a été d'évaluer s'il existe un effet protecteur de l'hyperbilirubinémie dans un modèle d'endotoxémie chez le rat.

Matériels et méthodes : Dans une 1^{re} étude, nous avons utilisé une souche de rat hyperbilirubinémique : le rat Gunn (n = 50). Les rats homozygotes (J) ont une bilirubine plasmatique élevée alors qu'elle est normale chez les hétérozygotes (j). Ces animaux recevaient une injection intrapéritonéale d'endotoxine d'*E. Coli* (LPS) ou de sérum physiologique (.). Certains animaux ont été utilisés pour une étude de survie et de paramètres cliniques ; d'autres ont été sacrifiés à la 5^e heure post-inoculation pour des dosages plasmatiques (bilirubine, nitrite/nitrates [NOx], pouvoir antioxydant total, cytokines) et des biopsies tissulaires (enzymes antioxydantes — activité NOS). Dans une 2^e étude, un modèle d'hyperbilirubinémie induite a été élaboré chez des rats de souche Sprague Dawley (SD ; nt= 30). Les rats recevaient une injection intraveineuse (IV) soit de bilirubine (bili), soit de tampon phosphate (PBS), chaque groupe était alors inoculé avec du LPS ou du en IV. La tension artérielle (TA) était monitorée de façon invasive jusqu'à la 5^e heure post-inoculation ; ils étaient alors sacrifiés pour les dosages plasmatiques et les biopsies tissulaires.

Résultats : Dans les 2 études, l'inoculation de LPS entraîne une mortalité accrue, associée à une hypotension artérielle, une augmentation de taux plasmatiques de TNF, IL6, IL10, et de NOx, sans indice de défaillance multiviscérale ni de stress oxydatif tissulaire. Dans la deuxième étude, l'activité NOS constitutive est augmentée après le LPS. La bilirubinémie et le pouvoir antioxydant du plasma sont plus élevés chez le rat J et le rat SD-bili par rapport aux contrôles respectifs. Ils ne sont pas modifiés par l'inoculation de LPS. Dans les 2 études, la bilirubine protège vis à vis de la mortalité et de l'hypotension induites par le LPS, sans effet sur les taux de cytokines et sur les paramètres oxydatifs tissulaires. En revanche, l'effet de la bilirubine est associé à une atténuation des effets du LPS sur les taux plasmatiques de NOx et l'activité cNOS aortique.

Evaluation par scintigraphie de l'œdème pulmonaire par hyperinflation chez le rat. Effet de l'hypercapnie

F. Bouvet (sous la direction de G. Saumon et D. Dreyfuss)

EA 3512, Imagerie Fonctionnelle du Petit Animal, IFR02
Claude Bernard.

Introduction : Le concept de volutraumatisme découle d'études expérimentales qui ont montré qu'il existe un œdème pulmonaire lésionnel à la suite de ventilations agressives. Il a entraîné l'adoption d'une stratégie ventilatoire protectrice (petits volumes courants) chez les patients souffrant de SDRA, avec pour conséquence une hypercapnie. Cette hypercapnie pourrait protéger du volutraumatisme. Ce travail s'est attaché à étudier l'effet de celle-ci lors d'une ventilation agressive chez le rat, par une technique scintigraphique.

Méthodes : Deux groupes de rats ont été ventilés avec un volume courant de 38 ml/kg pendant 2 heures, l'un en normocapnie (PaCO₂ 40 mmHg), l'autre en hypercapnie (PaCO₂ 100 mmHg). Ces 2 groupes ont été comparés entre eux et à une population de rats témoins ventilés avec un volume courant de 8 ml/kg sur des critères scintigraphiques (accumulation pulmonaire de l'indium 111-transferrine) et mécaniques thoracopulmonaires (courbe de compliance inspiratoire, pression téléinspiratoire, volume du point d'inflexion supérieur).

Résultats : L'accumulation pulmonaire de l'indium-transferrine était augmentée chez 13 des 56 rats ventilés à haut volume pulmonaire. Elle est bien corrélée à la diminution de la compliance pulmonaire, ce qui est une validation indirecte de la valeur de la méthode par imagerie. L'hypercapnie n'influait pas l'accumulation pulmonaire d'indium-transferrine. Celle-ci est par contre très corrélée aux propriétés mécaniques thoracopulmonaires individuelles des animaux. La variabilité inter-individuelle de ces propriétés peut expliquer la diversité des réponses à la ventilation à haut volume.

Conclusion : L'imagerie par scintigraphie semble une méthode fiable, non invasive, pour étudier *in vivo* l'apparition de troubles de la perméabilité microvasculaire pulmonaire lors de l'hyperinflation pulmonaire, qui pourrait être utilisée de façon répétitive. Il reste à la valider dans d'autres modèles d'œdème lésionnel. D'autre part, l'hypercapnie n'a pas montré d'action bénéfique chez le rat ventilé de façon agressive.

Les éosinophiles humains induisent la synthèse de mucine dans l'épithélium respiratoire par activation du récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor)

P.-R. Burgel (sous la direction de J.A. Nadel).

Cardiovascular Research Institute, University of California San Francisco, USA.

Introduction : Le recrutement des éosinophiles et l'hypersecretion de mucus sont caractéristiques de l'inflammation des voies aériennes dans l'asthme, mais l'implication des éosinophiles dans la production de mucine n'a jamais été mise en évidence. L'expression du récepteur de l'EGF est également augmentée dans l'épithélium respiratoire de patients asthmatiques, et l'activation de ce récepteur dans les cellules épithéliales provoque la synthèse de la mucine MUC5AC.

Matériels et méthodes : Nous avons étudié le rôle des éosinophiles sur la synthèse de mucine MUC5AC dans les cellules NCI-H292 (une lignée de cellules épithéliales respiratoires produisant des mucines). Les éosinophiles ont été isolés à partir du sang périphérique de sujets allergiques, et leurs effets sur la synthèse du gène et de la protéine MUC5AC ont été évalués par hybridation *in situ* et ELISA.

Résultats : Quand les éosinophiles ont été incubés avec les cellules NCI-H292 en présence des associations de cytokines IL-3 plus GM-CSF ou IL-3 plus IL-5, la synthèse de la mucine MUC5AC par les cellules NCI-H292 a augmenté ; les éosinophiles seuls ou les cytokines seules n'ont eu aucun effet. Le surnageant des éosinophiles activés, obtenu en cultivant les éosinophiles en présence des associations de cytokines IL-3 plus GM-CSF ou IL-3 plus IL-5, a également augmenté la synthèse de mucine MUC5AC dans les cellules NCI-H292, un effet bloqué par des antagonistes sélectifs du récepteur de l'EGF (BIBX 1522, AG 1478). Le surnageant des éosinophiles activés a provoqué la phosphorylation du récepteur de l'EGF dans les cellules NCI-H292. Le surnageant des éosinophiles activés contenait des concentrations plus élevées de TGF- et a augmenté la synthèse et la sécrétion de TGF- par les cellules NCI-H292. Un anticorps bloquant anti-TGF- a diminué l'effet des éosinophiles activés sur la synthèse de mucine.

Conclusion : Ces résultats montrent que les éosinophiles humains activés induisent la synthèse de mucine dans les cellules épithéliales respiratoires par activation du récepteur de l'EGF. Ils impliquent le TGF- produit par les éosinophiles et par les cellules épithéliales dans l'activation du récepteur de l'EGF conduisant à la synthèse de mucine.

Maintien des télomères et activité télomérase dans l'adénocarcinome pulmonaire ovin rétroviro-induit

R.-P. Charles (sous la direction du Dr C. Leroux et V. Cottin)

UMR 754 INRA/UCBL/ENVL (Directeur : Pr JF Mornex).

L'adénocarcinome pulmonaire ovin est un cancer pulmonaire spontané et transmissible induit par le bêtarétrovirus JSRV (Jaagsiekte Sheep RetroVirus) ; les caractéristiques cliniques et histologiques de ce cancer en font un modèle pour l'étude des adénocarcinomes pulmonaires humains. Les mécanismes de transformation des cellules infectées (pneumocytes de type II et cellules de Clara) sont encore inconnus. Nous avons étudié la sénescence répllicative des cellules dans ces tumeurs.

Vingt-six prélèvements de poumons tumoraux et non tumoraux de mouton ont été étudiés. Quinze prélèvements comportaient un adénocarcinome mixte bronchioalvéolaire et papillaire, et 11 ne présentaient pas de lésions tumorales. Vingt et un prélèvements comportaient des infiltrations lymphocytaires, 6 présentaient des lésions histologiques de Maedi. La longueur des télomères a été mesurée par hybridation avec une sonde (TTAGGG)_n spécifique des télomères après Southern blot des ADN génomiques extraits des différents prélèvements digérés par RsaI/HinfI. La longueur des télomères des tissus tumoraux n'était pas significativement différente de celle des tissus non tumoraux (16,3 kb et 16,1 kb respectivement). L'activité enzymatique de la télomérase a été dosée par la méthode du TRAP sur 10 extraits protéiques de tissus pulmonaires. L'activité de la télomérase était détectable dans 7/7 prélèvements tumoraux et dans 2/3 des prélèvements non tumoraux. L'activité télomérase était plus élevée dans les tissus tumoraux que dans les tissus non tumoraux (p 0,01).

Nous avons donc observé un maintien des télomères dans les tissus tumoraux ainsi qu'une augmentation de l'activité télomérase. Cependant, cette activité ne peut être associée catégoriquement aux cellules tumorales à cause des lymphocytes infiltrés dans les tumeurs. L'interprétation de ce résultat nécessite de pouvoir isoler les cellules tumorales des lymphocytes et autres cellules du parenchyme afin de mesurer leur activité télomérase propre ; ceci sera réalisé par microdissection des tumeurs. Nous envisageons également de procéder à une hybridation *in situ* de l'ARN de la sous-unité catalytique de la télomérase sur des coupes histologiques de tumeurs afin de déterminer les cellules dont l'activité télomérase est présente au sein des tissus. Nous étudierons ensuite l'activation de la télomérase *in vitro* par infection de cellules en culture par un clone moléculaire de JSRV.

Rôle de la voie de signalisation NO/GMPc dans l'hypertension artérielle pulmonaire de la hernie diaphragmatique congénitale expérimentale chez le fœtus d'agneau

S. Coquery (sous la direction du Pr. A-T Dinh-Xuan)

Laboratoire de Physiologie, UPRES EA 2511, CHU Cochin-Port-Royal, Paris.

Introduction : Le GMPc est un second messenger important des cellules musculaires lisses permettant la modulation du tonus vasculaire. Son rôle est reconnu chez le nouveau-né, en particulier lors des variations de la résistance vasculaire pulmonaire impliquées dans l'adaptation à la vie extra-utérine et dans des pathologies telles que l'hypertension artérielle pulmonaire persistante du nouveau-né (HTAPPN) due à une hernie diaphragmatique. Notre but est d'étudier le tonus vasculaire pulmonaire de fœtus d'agneaux sous l'action de plusieurs molécules interférant avec la synthèse ou la dégradation du GMPc (respectivement par la GCs et la PDE 5).

Matériels : *In vivo*, sous l'action de l'acétylcholine (Ach), du nitroprussiate de sodium (SNP) et de deux inhibiteurs de la PDE 5, le T-1032 et le Zaprinast, nous avons mesuré la pression artérielle pulmonaire (PAP) et calculé la résistance vasculaire pulmonaire (RVP) de fœtus témoins et de fœtus chez lesquels une hernie diaphragmatique a été créée préalablement.

In vitro, nous avons étudié la force isométrique d'anneaux artériels pulmonaires précontractés avec la phényléphrine puis mis en présence des mêmes substances vasodilatatrices, ainsi que de l'YC-1, un activateur spécifique de la GCs indépendant du NO.

Résultats : L'Ach, le SNP, le T-1032 et le Zaprinast utilisés *in vivo* ont entraîné une diminution significative de la RVP et une chute de la PAP dans les deux groupes. La chute est plus importante dans le groupe hernié par rapport aux témoins, concernant le T-1032 uniquement. *In vitro*, la stimulation de la GCs par le SNP ou l'YC-1 a entraîné une relaxation significative dans les deux groupes, avec une différence significative entre les animaux herniés et témoins, concernant l'YC-1 et le T-1032. Le T-1032 potentialise les effets vasodilatateurs de l'YC-1.

Conclusion : Chez les animaux ayant une hernie diaphragmatique congénitale, il semble qu'aussi bien la GCs que la PDE 5 présentent des anomalies structurelles et/ou fonctionnelles. Le T-1032 fait disparaître la différence de vasodilatation en réponse à l'YC-1 entre les animaux herniés et témoins. En inhibant spécifiquement la PDE 5, le T-1032 augmente la concentration intracellulaire du GMPc, ce qui compenserait l'insuffisance de production de ce second messenger. Associé à d'autres substances vasodilatatrices, il ouvre une voie prometteuse dans la recherche de traitements de l'HTAPPN de la hernie diaphragmatique congénitale, dont la mortalité reste élevée malgré les progrès de la prise en charge réanimatoire et chirurgicale.

Effet de la position sur le travail respiratoire chez le patient en difficulté de sevrage de la ventilation : comparaison des positions couchée, demi-assise et assise

N. Deye (sous la direction du Pr. Laurent Brochard)

Service de Physiologie et des explorations fonctionnelles (Pr. Alain Harf), Unité INSERM 492 (Directeur : Pr. Serge Adnot), Créteil.

Introduction : L'influence de la position du patient dans son lit ou au fauteuil sur le travail respiratoire (W_{RESP}) n'a jamais été étudiée en réanimation chez les patients présentant des difficultés de sevrage de la ventilation.

Matériels et méthodes : Nous avons comparé chez 24 patients intubés et ventilés en aide inspiratoire et présentant des difficultés de sevrage (FR/VT 105 cycles.min⁻¹.L⁻¹ en ventilation spontanée, échec à un test de 2 heures en VS sur pièce en T et/ou échec d'extubation non rapporté à une étiologie cardiaque ou infectieuse) les effets physiologiques sur le W_{RESP} de 3 positions, dans un ordre randomisé : en décubitus dorsal (0°), en position demi-assise (45°) et assise au lit jambes pendantes (90°JP), simulant le fauteuil. Les mesures ont été faites grâce à une sonde à double ballonnets, œsophagien et gastrique, et à des capteurs de pression et de débit à l'entrée des voies aériennes.

Résultats : Ils sont exprimés en moyenne ± déviation standard.

	Auto-PEP (cmH ₂ O)	V _E (L/min)	W _{RESP} (J/L)	PTP _{œso} ,FR (cmH ₂ O*s/min)	P _{0,1} (cmH ₂ O)
0°	1,23 ± 1,4 (*, \$)	13,0 ± 4,7	0,54 ± 0,19	118,8 ± 42,8	2,1 ± 1,4
45°	0,91 ± 1,0	12,4 ± 3,7	0,48 ± 0,19 (*)	104,7 ± 44,8 (*)	1,9 ± 1,3
90°JP	1,05 ± 1,5	12,7 ± 3,0	0,52 ± 0,25	114,5 ± 54,5	2,3 ± 1,6 (€)
p (Friedman)	0,001	0,21	0,007	0,006	0,02

* p 0,05 entre 0° et 45° (Wilcoxon) \$ p 0,05 entre 0° et 90°JP (Wilcoxon)
 € p 0,05 entre 45° et 90°JP (Wilcoxon)

Discussion : A ventilation-minute constante, la position à 45° entraîne, par rapport à 0°, une diminution de l'auto-PEP et du W_{RESP} . Cet effet bénéfique sur le W_{RESP} n'est pas retrouvé à 90°JP pour l'ensemble des patients (sauf pour les 6 patients avec BPCO et les 5 avec atteinte phrénique), malgré une diminution de l'auto-PEP, possiblement par une augmentation de la commande centrale.

Conclusion : Le bénéfice clinique de la position demi-assise à 45° chez les patients dépendants du ventilateur et de la mise au fauteuil en cas de BPCO ou d'atteinte phrénique reste à déterminer.

Caractérisation des facteurs régulant le recrutement et l'état de maturation des cellules dendritiques dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules

F. El Hage (sous la direction de A.Tazi)

UPRES 3406 (Directeur : Martine Raphael), Bobigny.

Introduction : L'utilisation des CD pour l'immunothérapie anti-tumorale doit tenir compte de l'hétérogénéité des CD et des effets inhibiteurs de la tumeur sur le recrutement et la maturation de ces cellules qui conditionne leur capacité à induire une réponse immunitaire efficace. Dans ce travail, nous avons caractérisé les CD qui infiltrent les CBNPC et leur ganglion satellite et évalué les facteurs influençant leur recrutement et leur maturation *in situ*.

Matériels : Douze échantillons de CBNPC et 8 ganglions satellites ont été étudiés.

Méthodes : Les CD ont été caractérisés à l'aide d'anticorps spécifiques et des techniques immunohistochimiques. L'étude des chémokines impliquées dans leur recrutement et des médiateurs du micro-environnement tumoral a été réalisée à la fois par RT-PCR en temps réel et en immunohistochimie.

Résultats : Des CD myéloïdes, CD1a+, infiltrent de façon variable les travées tumorales pulmonaires. Une proportion de ces cellules étaient des CL, et elles exprimaient constamment un phénotype de surface de CD immatures. Dans certains cas, des CD CD1a- exprimant fortement le DC-SIGN étaient présentes au pourtour des travées tumorales. La production de CCL20 était corrélée au degré d'infiltration des tumeurs par les CD CD1a+, mais l'expression de CCR6 par ces cellules reste à confirmer. Dans les ganglions satellites, les CD CD1a+ étaient rares, sauf en cas de métastase ganglionnaire. Des CD CD1a- exprimant un phénotype mature étaient présentes. L'ARNm du VEGF était exprimé de façon identique dans les CBNPC et les ganglions.

Discussion : Les CD présentes dans les CBNPC sont immatures et comprennent différentes sous-populations. A côté du GM-CSF, le CCL20 semble contribuer au recrutement de ces cellules *in situ*. La présence de CD CD1a+ dans les ganglions métastatiques souligne l'importance de facteurs «épithélioaux» pour le recrutement de ces cellules. Le VEGF n'explique pas à lui seul le phénotype immature des CD intratumorales.

Conclusion : La meilleure connaissance des mécanismes régulant le recrutement et la maturation des CD dans les CBNPC devrait contribuer à l'élaboration de stratégies thérapeutiques utilisant des CD dans ce type de tumeurs.

Mesure des activités protéolytiques de surface des polynucléaires neutrophiles isolés à partir du sang et du liquide de lavage bronchoalvéolaire de patients atteints du SDRA

M. Ferrandiere (sous la direction de Sylvie Attucci)

EMI-U 00-10 (Directeur Francis Gauthier), Tours.

Introduction : Lors du SDRA, les protéases à sérine associées à la membrane des polynucléaires neutrophiles (PNN) activés participent à la réaction inflammatoire. Nous avons étudié l'activité protéolytique de PNN purifiés du sang et du liquide de lavage bronchoalvéolaire (LLBA) en corrélation avec leur activation mesurée par le CD63 en cytométrie en flux et leur morphologie en microscopie électronique à balayage.

Matériel et méthodes : Une méthode de purification préservant l'état d'activation des PNN a été mise au point à partir d'échantillons de sang et de LLBA. La pureté des fractions et le degré d'activation des PNN (double marquage CD16b-CD63) ont été analysés en cytométrie en flux. Les activités protéolytiques membranaires des 3 protéases : cathepsine G (Cat.G), élastase leucocytaire (HNE), protéinase 3 (PR3) ont été mesurées à l'aide de substrats fluorogéniques spécifiques.

Résultats : Les PNN sanguins de 7 patients atteints d'un SDRA et âgés de 21 à 89ans (PaO₂/FiO₂ médiane 74) ont été comparés à ceux de 8 témoins (23 à 65 ans) et pour chaque patient, les PNN du LLBA ont été analysés en parallèle. Les résultats montrent (*tableau*) qu'il existe une activité protéolytique des 3 protéases à la surface cellulaire quelque soit l'état d'activation. Les patients ayant un SDRA ont, dans le sang, un profil d'expression des protéases similaire à la population témoin. L'activité protéolytique dans le sang est exprimée sur des cellules de morphologie conservée. En revanche, le niveau d'activation et la quantité de protéases à sérine affichée à la surface des PNN du LLBA sont supérieurs (en particulier pour l'HNE et la Cat. G) à ce qui est observé sur les PNN du sang des mêmes patients, dans des conditions expérimentales identiques.

p < 0,05	Témoins n = 8	Patients SDRA n = 7	
† vs PNN sang SDRA	PN sang	PN sang	PN LLBA
Pureté en PNN (%)	95 [91-98]	98 [70-99]	90 [18-99]
Viabilité (%)	92 [75-100]	92 [82-96]	87 [62-96]
Activation (%)	6	20 [4-54]	78 [10-96] †
PR3 (pg/cellule)	0,26 [0,02-0,52]	0,21 [0,05-0,48]	0,32 [0,01-0,38]
HNE (pg/cellule)	0,17 [0,05-0,71]	0,23 [0,03-0,70]	0,61 [0,01-1,5] †
Cat.G (pg/cellule)	0,22 [0,04-0,80]	0,80 [0,01-1,40]	1,04 [0,03-1,16] †

Transfert de gène dans l'épithélium respiratoire du rat nouveau-né : faisabilité, efficacité et effets secondaires

E. Fleurence (sous la direction du Pr. C. Delacourt).

Unité INSERM U 492 (directeur : Pr. S. Adnot), Créteil.

Introduction : Malgré les récents progrès dans la prise en charge des prématurés, l'incidence de la bronchodysplasie, maladie respiratoire chronique, reste stable. Cette pathologie se caractérise par des troubles du développement pulmonaire qui pourraient être favorisés par un déficit de certains facteurs de régulation. Une perspective thérapeutique serait d'apporter à ces enfants ces facteurs déficitaires. Le transfert de gènes par vecteur viral est une perspective thérapeutique mais l'adénovirus, testé chez le rat nouveau-né, a été rendu responsable de troubles du développement pulmonaire pour les doses les plus élevées. L'objectif de cette étude est de tester un autre type de vecteur, les adenoassociated-virus de type 2 et de type 5, et d'évaluer leur efficacité et leurs effets secondaires potentiels.

Matériel et méthodes : Une instillation intratrachéale d'AAV2 ou d'AAV5-LacZ ou de solution témoin est effectuée chez des rats nouveau-nés (J3 de vie). La tolérance à ces AAV est évaluée à J8 (cellularité du liquide de lavage broncho-alvéolaire et histologie pulmonaire) et à J21 (morphométrie pulmonaire). L'efficacité des vecteurs en terme de transfection est évaluée d'une part de façon quantitative par étude histochimique, d'autre part de façon quantitative par dosage ELISA.

Résultats : L'AAV2 n'a pas permis de détecter une expression du transgène. L'AAV5 est capable de transfecter les cellules épithéliales respiratoires jusqu'au niveau alvéolaire et de façon dose-dépendante. A la plus forte dose de 4×10^9 pp/20 μ l, il n'a pas été retrouvé d'inflammation significative, ni de trouble du développement. En revanche, le niveau d'expression du transgène obtenu avec l'AAV5 est très inférieur à celui obtenu avec l'adénovirus.

Conclusion : L'AAV5 est un vecteur viral permettant la transfection des cellules épithéliales respiratoires *in vivo* chez le rat nouveau-né. Il n'entraîne pas d'effet secondaire significatif en terme d'inflammation ou de trouble du développement pulmonaire. Pourtant, le faible niveau d'expression du transgène obtenu limite son intérêt pour une perspective thérapeutique.

Etude de l'expression des gènes MRP1, -3, -4 et -5 dans les cellules de carcinomes bronchiques non à petites cellules et l'épithélium bronchique

V. Gazaille (sous la direction du Dr. Fajac A.).

Histologie-Biologie Tumorale, Pr. Bernaudin J-F., Hôpital Tenon, Paris.

Introduction : Les carcinomes non à petites cellules (CNPC) sont les plus fréquents des cancers broncho-pulmonaires. Peu de patients bénéficient d'une chirurgie curatrice. La principale alternative thérapeutique est la chimiothérapie. Or, différents mécanismes mal définis rendent ces tumeurs résistantes à ces traitements. Les MRPs (« Multidrug Resistance Protein »), découvertes récemment, appartiennent à la superfamille des transporteurs transmembranaires ABC (« ATP Binding Cassette ») et sont capables d'assurer l'efflux d'agents anti-cancéreux. Ce travail a pour objet d'évaluer le rôle éventuel des MRP1, -3, -4 et -5 dans la résistance à la chimiothérapie des CNPC et la carcinogénèse bronchique.

Matériels : Cette étude est réalisée à partir de coupes de CNPC (n=19) et de bronches (n=12) congelées provenant de patients opérés d'un CNPC.

Méthodes : L'utilisation de la microdissection par capture laser permet de ne prélever que les cellules tumorales sur les coupes de CNPC et que les cellules épithéliales sur les coupes de bronches, sans contamination par les structures voisines. L'expression génique est étudiée à partir de l'ARN extrait du matériel microdisséqué, analysé après transcription inverse, par RT-PCR en temps réel. Cette technique associe la sensibilité de la PCR à la simplicité de l'analyse en temps réel.

Résultats : Les gènes *MRP1*, -3, -4 et -5 sont exprimés dans les cellules épithéliales bronchiques et les cellules de CNPC, mais pour chaque gène, de façon variable d'un échantillon à l'autre. Les gènes *MRP1*, -4 et -5 sont hyper exprimés dans les cellules épithéliales bronchiques comparativement aux cellules tumorales, à l'inverse du gène *MRP3* qui est hypo exprimé.

Conclusion : L'originalité de cette étude est l'analyse des *MRP1*, -3, -4 et -5 sélectivement dans les cellules de CNPC et les cellules épithéliales bronchiques. Nous trouvons ces gènes *MRPs* exprimés dans les deux types cellulaires, avec pour chaque gène, des niveaux d'expression variables d'un échantillon à l'autre. L'hypo expression relative des *MRP1*, -4 et -5 dans les CNPC comparativement à l'épithélium bronchique pourrait avoir pour corollaire une moindre défense cellulaire vis-à-vis des carcinogènes. De plus, l'expression spontanée des *MRPs* dans les cellules tumorales suggèrent que les MRPs participent aux mécanismes de résistance des CNPC aux chimiothérapies anti-cancéreuses.

Transfert de gènes dans des cellules épithéliales des voies aériennes à l'aide de dérivés de la polyéthylèneimine : effet sur la transcription de la compaction du plasmide par le vecteur

I. Honore (sous la direction du Dr I. Fajac)

UPRES EA 2511, Paris.

Introduction : L'utilisation de vecteurs est nécessaire afin de compacter et de transporter l'ADN en thérapie génique. La polyéthylèneimine (PEI) et ses dérivés glycosylés sont des vecteurs d'une grande efficacité en thérapie génique *in vitro*. Les complexes formés avec l'ADN présentent une grande stabilité et la compaction de l'ADN plasmidique est susceptible d'inhiber la transcription.

Matériels et méthodes : Les complexes ADN/PEI sont formés par mélange dans du NaCl. Une étude par électrophorèse sur gel d'agarose a permis de vérifier la capacité des PEI à condenser l'ADN. La taille et la charge de surface des complexes ont été étudiées à l'aide d'un Zeta-Sizer®. Une analyse de leur efficacité de transfection a été réalisée avec le gène rapporteur de la luciférase et quantification par chimiluminescence sur une lignée de cellules épithéliales bronchiques. La transcription *in vitro* a utilisé des extraits nucléaires de cellules HeLa. Trois plasmides ont été utilisés, codant pour des gènes de tailles différentes. L'ARNm obtenu a été détecté par une méthode de *S1 mapping*.

Résultats : La capacité des PEI à condenser l'ADN nécessite un excès de polymère cationique. Les complexes obtenus ont alors une taille proche de 200 nm et leur potentiel de surface est fortement positif. Les PEI sont aussi efficaces pour le transfert de gènes qu'un vecteur lipidique commercialisé, la lipofectAMINE®. La transcription *in vitro* est partiellement inhibée lorsque le plasmide est complexé aux PEI ou à la lipofectAMINE. Cette inhibition est plus marquée lors de l'utilisation de quantités de PEI ne permettant pas une condensation complète de l'ADN ou à l'extrême, en cas d'excès de PEI. Il n'existe pas de différence nette entre la PEI et ses dérivés glycosylés. La transcription ne semble pas dépendante de la longueur du gène. Plusieurs étapes de la transcription (initiation et élongation) sont susceptibles d'être modifiées lors de la compaction de l'ADN plasmidique par la PEI.

Discussion et conclusion : La transcription du gène d'intérêt dans les cellules cibles pourrait constituer une dernière barrière limitant l'efficacité de la transfection génique à l'aide de la PEI et de ses dérivés glycosylés. Ces résultats demandent à être confirmés par des études *in vivo*.

Evaluation de l'intensité de la dyspnée chez les patients présentant une atteinte neuromusculaire

S. Hours (sous la direction du Pr.Lofaso).

Département universitaire de recherche clinique, Garches, EA 2495-Paris V.

Introduction : Un déficit de perception de la dyspnée pourrait exister chez les patients présentant un syndrome restrictif d'origine neuromusculaire. Le but de cette étude est de mettre en évidence cet éventuel trouble de perception lors de l'imposition d'une charge inspiratoire.

Matériel et méthodes : Dix-sept patients ayant une atteinte neuromusculaire d'étiologie variée, et indemnes de toute décompensation, âgés de 36 ± 12 ans (moy \pm SD), ont été inclus et appariés à 17 sujets témoins selon l'âge et le sexe. Les sujets ont été soumis à une pression inspiratoire négative, proportionnelle à leur pression inspiratoire maximale (P_Imax), au moyen d'une valve seuil. Quatre niveaux de charge différents, allant de 10 % à 40 % de la P_Imax des sujets, ont été imposés chacun 4 fois, selon un ordre randomisé. La dyspnée a été évaluée par l'échelle de Borg et une échelle visuelle analogique en fonction de différents niveaux de charge inspiratoire, exprimée sous forme de pression négative à la bouche en valeur absolue et en pourcentage de la pression inspiratoire maximale. Pour chaque patient, les paramètres ventilatoires, la pression à la bouche, le CO₂ expiré, et les scores de dyspnée ont été moyennés dans les 4 conditions de charge identiques. Les comparaisons entre les deux groupes ont été effectuées en utilisant une analyse de variance avec mesures répétées et un test à posteriori.

Résultats : Les patients neuromusculaires sont significativement moins dyspnéiques que des sujets témoins, lorsque la charge est proportionnelle à leur P_Imax ($p < 0,001$). Ils sont en revanche plus dyspnéiques à même niveau de charge respiratoire exprimée en valeur absolue. Par ailleurs, l'augmentation de la charge n'a pas entraîné de modification du mode ventilatoire ni des échanges gazeux dans les 2 groupes.

Conclusion : Les patients neuromusculaires présentent un déficit de perception de la dyspnée par rapport aux témoins, à niveau équivalent d'effort respiratoire exprimé en pourcentage de leur effort maximal. Ceci pourrait être dû à l'impossibilité de mise en jeu efficace de leurs tensio-récepteurs de Golgi, situés dans les tendons musculaires. En revanche, ces récepteurs présenteraient une meilleure sensibilité que ceux des témoins, les patients étant plus dyspnéiques pour une charge exprimée en valeur absolue, mais cette adaptation reste insuffisante : ils peuvent être exposés à une charge entraînant une fatigue respiratoire sans symptomatologie alarmante. L'évaluation respiratoire de ces patients doit donc toujours comporter des paramètres objectifs, même en l'absence de plainte dyspnéique.

Techniques de caractérisation des mutations, des polymorphismes et du niveau d'expression des principales enzymes du métabolisme de la gemcitabine chez l'homme

J. Hureaux (sous la direction de E. Gamelin et de Th. Urban).

Unité INSERM 564 — Equipe 3 (Directeur E. Gamelin), Angers.

Introduction : La gemcitabine (2',2'-difluorodéoxycytidine) est un analogue nucléosidique (AN) employé en oncologie médicale. Cette prodrogue doit subir un métabolisme intracellulaire complexe pour être activée puis dégradée. Il a été montré que des mutations et des polymorphismes ponctuels de type « Single Nucleotide Polymorphism » (SNP) modifiaient l'activité d'enzymes impliquées dans ces réactions. Le niveau d'expression de certaines enzymes a été corrélé avec la réponse clinique à des AN suivant les mêmes voies enzymatiques.

Matériels : Ce travail a été réalisé à partir d'ADN génomique et d'ARN messagers extraits de lymphocytes circulants provenant de sang total.

Méthodes : Pour trois enzymes métabolisant la gemcitabine, nous avons mis au point (1) des méthodes de mini-séquençage luminométrique en temps réel pour rechercher trois variations génétiques et (2) des méthodes d'étude du niveau d'expression enzymatique par quantification des ARNm par PCR en temps réel.

Résultats : Nous présentons (1) des protocoles de caractérisation de la mutation du codon 99 de la déoxycytidine kinase (DCK) et des polymorphismes A79C et G208A de la cytidine déaminase (CDA) et (2) des protocoles de quantification du niveau d'expression des ARNm de la DCK, de la CDA et de la pyrimidine 5'nucléotidase. Les résultats chez 9 sujets (3) indiquent que le polymorphisme A79C de la CDA serait fréquent dans la population caucasienne.

Discussion : Un travail de mise au point de techniques qualitatives et quantitatives, ensuite appliquées à un échantillon d'individus sains, a été initié. Ces approches sont susceptibles d'expliquer la survenue d'effets indésirables toxiques. La recherche des mêmes éléments sur des lignées cellulaires de tumeurs solides et des pièces opératoires pourrait permettre d'identifier des éléments qui déterminent la réponse tumorale à la gemcitabine.

Conclusion : Le métabolisme intracellulaire de la gemcitabine semble présenter des polymorphismes encore inconnus dans la population générale. Ces polymorphismes pourraient expliquer la survenue d'effets délétères et/ou la résistance tumorale à ce médicament. La poursuite de ces recherches sur des lignées cellulaires, des tumeurs et chez l'homme est nécessaire pour définir l'intérêt de ces éléments génétiques et génomiques en thérapeutique humaine.

Essai d'un traitement topique par la colimycine, avec un perfluorocarbure comme vecteur, d'une pneumopathie à *Pseudomonas aeruginosa* chez le rat

N. Limal (sous la direction de G.Saumon et D.Dreyfuss).

IFR 02, EA 3512, CHU Bichat.

Introduction : Les propriétés physiques des perfluorocarbures permettent d'assurer les échanges gazeux par ventilation liquide partielle. Des études pharmacocinétiques sur des modèles animaux ont suggéré qu'ils pourraient agir de cette façon comme vecteurs pour l'administration locale d'antibiotiques au poumon. Nous avons testé un traitement local de pneumopathies à *Pseudomonas aeruginosa* par la colimycine associée au perflubron chez le rat.

Méthodes : Nous avons testé différentes modalités thérapeutiques préventives : toutes reposaient sur l'instillation intratrachéale de préparations de colimycine en suspension ou en émulsion dans du perflubron 4 h après administration intratrachéale d'une suspension de germes produisant une pneumopathie documentée à 24 h : soit 1,5 ml d'une de ces préparations dans le territoire ayant reçu les germes à des rats en ventilation spontanée, soit 4 ml de préparation dans les deux poumons à des rats sous ventilation liquide partielle pendant 6 h. Les rats traités étaient comparés à des rats ayant reçu selon les mêmes modalités du perflubron pur, et à des rats non traités.

Résultats : L'ajout de colimycine au perfluorocarbure ne modifiait pas le nombre de bactéries dans les poumons, quelle que soit la modalité d'administration, et malgré une activité bactéricide *in vitro* des préparations testées sur *Pseudomonas aeruginosa*. Une faible proportion de la colimycine instillée était retrouvée dans le plasma.

Conclusion : Le perfluorocarbure bien que transportant la colimycine vers le poumon profond semble inhiber son action sur *Pseudomonas aeruginosa*. Le mécanisme de cette inhibition est incertain, mais est probablement lié à la rétention de la colimycine par le perfluorocarbure. Il est possible que seule une faible proportion d'antibiotique se solubilise en phase aqueuse et parvient à entrer en contact avec les bactéries avec les préparations étudiées.

Capacité de réparation des cellules épithéliales alvéolaires d'origine fœtale en hyperoxie : modulation par le Kératinocyte Growth Factor et la Dexaméthasone

S. Lorotte (sous la direction de PH. Jarreau et C. Delacourt)

Unité INSERM 492 (Directeur : Serge Adnot), Créteil.

Introduction : La dysplasie broncho-pulmonaire (DBP) est une maladie très fréquente en néonatalogie. Elle est la conséquence d'agressions pulmonaires multiples, notamment l'hyperoxie et la ventilation mécanique sur un terrain immature. Elle est caractérisée par des troubles de la réparation épithéliale alvéolaire et des anomalies de développement. Nous avons évalué dans ce travail le rôle de l'hyperoxie sur la capacité de réparation de cellules alvéolaires (CEA) fœtales en culture et sa modulation par le Kératinocyte Growth Factor (KGF) et la Dexaméthasone (DXM).

Matériels et méthodes : Les capacités de fermeture de blessure sur des cultures en monocouche de CEA fœtales de rats ont été évaluées en air et en hyperoxie, selon un modèle de "blessure-réparation" (mesure de la fermeture des "blessures" mécaniques après 24 heures de culture). Les capacités de réparation des CEA fœtales ont aussi été étudiées en présence de Kératinocyte Growth Factor (KGF) et de Dexaméthasone (DXM). La mort cellulaire (dosage LDH et coloration au bleu trypan), la viabilité cellulaire (dosage de MTT) et la prolifération cellulaire (dosage de Brd-U incorporé) ont été évaluées en normoxie et en hyperoxie.

Résultats : En hyperoxie, il existe une inhibition de la fermeture des blessures par augmentation de la mort cellulaire avec une diminution de la viabilité cellulaire sans modification de la prolifération cellulaire. Le KGF à la concentration de 100 ng/ml diminue la nécrose cellulaire, augmente la viabilité, sans modifications de la prolifération en hyperoxie. La DXM n'a aucun effet sur tous les paramètres étudiés.

Discussion : L'inhibition de la fermeture de la blessure dans notre modèle est probablement due à une nécrose cellulaire à laquelle pourrait être associé un mécanisme d'apoptose. Le rôle protecteur du KGF semble lié à une diminution de la nécrose (et peut-être à une diminution de l'apoptose qui n'a pas été étudiée ici). Nous n'avons pas retrouvé de rôle du KGF sur la prolifération cellulaire dans ce modèle. Malgré son rôle dans les modèles *in vivo* de développement pulmonaire, la DXM ne semble pas jouer de rôle dans notre modèle.

Conclusion : Cette étude a permis de montrer l'effet délétère de l'hyperoxie sur le modèle blessure-réparation de CEA fœtales de rat en monocouche et l'effet protecteur du KGF à la dose de 100 ng/ml.

Génétique moléculaire des dyskinésies ciliaires primitives et assemblage des chaînes de dynéine au cours de la ciliogénèse

A. Moore (sous la direction de E. Escudier)

Unité INSERM U492 (Directeur : S. Adnot), Créteil (en collaboration avec S. Amselem, unité INSERM U468 (Directeur : M. Goossens), Créteil).

Introduction : Les dyskinésies ciliaires primitives (DCP) sont des maladies génétiques rares caractérisées par des bronchites et des sinusites chroniques dues le plus souvent à une absence des bras de dynéine externes (BDE). Le gène *DNAI1* codant l'une des deux chaînes intermédiaires du BDE de l'axonème ciliaire et flagellaire humain a été le premier impliqué dans les DCP. L'expression des gènes *DNAI1* et *DNAI2* est spécifique à deux tissus : trachée et testicule. L'objectif de ce travail est d'identifier les facteurs contrôlant l'expression hautement régulée de ces gènes, et de caractériser les partenaires protéiques de *DNAI1* et *DNAI2* dont les mutations pourraient rendre compte de DCP.

Matériel et méthodes : L'étude de la régulation de l'expression de *DNAI2* a été réalisée en transfectant des cellules BEAS-2B (lignée épithéliale bronchique humaine) avec des vecteurs portant un fragment de la région 5' flanquante de *DNAI2* en amont d'un gène codant la luciférase (*luc+*), en présence ou en absence de TGF (5ng/ml), d'acide rétinolique (10^{-7} M) ou du facteur de transcription HFH4. La totalité des séquences codantes de *DNAI1* et *DNAI2* a été amplifiée à partir d'ADNc testiculaire ; des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées sur les produits de PCR clonés afin de corriger les erreurs introduites au cours de l'étape d'amplification, ce, dans l'objectif de sous-cloner ces séquences codantes dans les vecteurs de double-hybride.

Résultats : La transfection des BEAS-2B par les vecteurs portant un fragment de la région 5' flanquante de *DNAI2* induit une augmentation de l'activité luciférase par rapport à la transfection avec ces mêmes vecteurs dépourvus de région promotrice en amont de *luc+* ; cette augmentation n'a pas été modulée par un traitement avec du TGF ou de l'acide rétinolique, ou la cotransfection du vecteur codant HFH4.

Discussion et conclusion : Une activité promotrice a été mise en évidence dans le fragment de la région 5' flanquante du gène *DNAI2* cloné. Dans les conditions expérimentales testées, le TGF, l'acide rétinolique et HFH4 ne semblent pas avoir d'effet sur la région promotrice de *DNAI2*. Il est cependant envisagé d'évaluer de nouveau l'effet du TGF et de l'acide rétinolique à différentes concentrations. Les séquences codantes de *DNAI1* et *DNAI2* clonées sont maintenant prêtes à être transférées dans les vecteurs nécessaires au crible double-hybride.

Mécanique de la paroi thoracique au cours de l'agression pulmonaire aiguë chez l'homme

C. Pereira (sous la direction de C. Guerin)

Service de Réanimation Médicale, Hôpital de la Croix Rousse (C. Guerin) et EA 1896-Université Lyon 1 (G. Annat), Lyon.

Introduction : Le point d'inflexion inférieur (PII) déterminé sur la courbe pression volume (PV) du système respiratoire est proposé pour régler la pression expiratoire positive (PEP) chez les patients avec insuffisance respiratoire aiguë (IRA). Une participation significative de la paroi thoracique (cw) dans le PII est évoquée de telle sorte que celui-ci ne soit pas le reflet correct du PII pulmonaire. L'objectif de cette étude est de déterminer la prévalence du PII,cw et ses facteurs explicatifs sur un grand nombre de patients avec IRA.

Matériel : Sur une période de 7 mois, 33 patients intubés, ventilés pour IRA sont recrutés dans 6 services de réanimation du CHU de Lyon.

Méthodes : La mécanique de cw est évaluée par la pression oesophagienne à partir d'un ballonnet en latex descendu dans l'œsophage. Les courbes PV du système respiratoire, du poumon et de la paroi thoracique sont obtenues par deux méthodes non biaisées, l'une employant une série de régression linéaire (A) et l'autre un modèle mathématique utilisant une équation de sigmoïde (B). La comparaison des deux modèles est réalisée par un test de Bland et Altman.

Résultats : Un PII,cw supérieur à 1 cmH₂O est détecté chez 20 patients avec A et chez 24 patients avec B. Les valeurs moyennes de PII,cw sont de 2 ± 2 cmH₂O avec chaque méthode. Entre les deux méthodes, les valeurs de PII,cw sont significativement corrélées ($R = 0,87$, $p < 0,001$), non biaisées et précises. Toutefois, les coefficients de détermination de B pour la paroi thoracique sont influencés par les artefacts cardiaques chez certains patients. Aucun facteurs explicatif à PII,cw n'est mis en évidence. Le modèle B décrit de façon très satisfaisante (coefficients de détermination $< 0,99$) les courbes PV du système respiratoire et du poumon.

Discussion : Le PII,cw a une forte prévalence mais une valeur faible en moyenne et n'est que rarement situé de façon prédominante sur la courbe PV de la paroi thoracique. Une description satisfaisante de la courbe PV du poumon est obtenue par le modèle sigmoïde.

Conclusion : La mécanique pariétale peut être altérée chez des patients ventilés mécaniquement pour IRA, comme en témoigne la forte prévalence de PII,cw.

Infiltrats lymphocytaire et neutrophilique précoces, différenciation Th1 et bronchiolite oblitérante (BO) du transplanté pulmonaire

C. Picard (sous la direction de D. Israel-Biet)

UPRES EA 220 (Directeur Charles Advenier), Paris V.

Introduction : Les réactions inflammatoires précoces menant à la BO, facteur majeur de mortalité des transplantés pulmonaires, sont mal connues. Nous en avons réalisé une étude prospective sur les 12 premiers mois post-greffe.

Matériel : Les lavages bronchoalvéolaires, biopsies bronchiques et sérums de 23 patients prélevés de manière itérative sont analysés.

Méthodes : On quantifie les leucocytes bronchiques en immunohistochimie (IHC) (CD3, CD4, CD8, CD20, élastase). L'expression bronchique, alvéolaire et/ou sérique d'IL-10, -12, -18, -1 β , -6, -8, d'IFN γ , de TNF α est étudiée. FasR et FasL sériques et alvéolaires sont évalués, ainsi que l'apoptose *in situ* (IHC anti-P89).

Résultats : Deux groupes BO+ (n = 8) et BO- (n = 15) sont comparés. Les BO+ ont un infiltrat bronchique CD8+ supérieur après le 9^e mois, mais un infiltrat neutrophilique inférieur ($p = 0,04$). L'épithélium bronchique exprime l'IL12 et l'IL18 précocement dans les 2 groupes. L'IL18 est plus fortement exprimée par les PNN bronchiques et les cellules alvéolaires chez les BO+ ($p = 0,04$). Les cytokines inflammatoires sont comparables dans les deux groupes. FasR est inférieur dans les sérums des BO+ ($p = 0,03$). L'apoptose prédomine dans les deux groupes sur les cellules inflammatoires, épithéliales et endothéliales.

Discussion : La présence précoce d'un infiltrat bronchique CD8+ évoque des réactions alloimmunes dirigées contre l'épithélium. Cette alloréactivité pourrait être majorée par un défaut d'expression de FasR chez les BO+, ainsi que par l'expression chez eux d'IL18 par l'épithélium et les PNN bronchiques. Cela pourrait participer à l'apoptose constatée au sein des cellules résidentes.

Conclusion : Cette étude pourrait suggérer un rôle déterminant de l'IL18 produite dans la muqueuse bronchique dans la constitution des lésions tissulaires caractéristiques de la BO.

Etude des afférences respiratoires et de leur intégration cérébrale à l'éveil, par la méthode des potentiels évoqués, chez les patients souffrant de syndrome d'apnées obstructives du sommeil

C. Donzel-Raynaud (sous la direction de T. Similowski et C. Straus)

Laboratoire de Physiopathologie Respiratoire, Service de Pneumologie, GH Pitié-Salpêtrière -UPRES EA 2397, Université Paris VI Pierre et Marie Curie.

Introduction : Au cours du syndrome d'apnées obstructives du sommeil, des altérations des sensations respiratoires ont été décrites et objectivées par des méthodes psychophysiques. Ces altérations pourraient être liées à la sévérité de la maladie, en contribuant à prolonger la durée des événements obstructifs. Les potentiels évoqués respiratoires permettent d'étudier la transmission et l'intégration corticales d'informations relatives à des occlusions inspiratoires brèves. Nous avons étudié les caractéristiques des potentiels évoqués respiratoires de patients atteints de syndrome d'apnées obstructives du sommeil, à l'éveil.

Matériel et méthodes : Les caractéristiques des composantes précoces des potentiels évoqués respiratoires de 14 patients atteints de syndrome d'apnées obstructives du sommeil ont été comparées à celles de 7 sujets sains. Pour extraire les potentiels évoqués respiratoires du signal électroencéphalographique brut au niveau des dérivations C3-Cz et C4-Cz, au minimum 60 périodes d'enregistrement, s'étendant de 200 ms avant à 1 000 ms après une occlusion brève réalisée en milieu d'inspiration, étaient sélectionnées. La latence d'une composante était définie comme le temps écoulé entre le début du stimulus et le pic de cette composante. L'amplitude était mesurée entre la ligne de base du signal électroencéphalographique et le pic de la composante considérée.

Résultats : Les caractéristiques de la première composante P1 des potentiels évoqués respiratoires n'étaient pas différentes chez les patients et les sujets sains. La latence de la deuxième composante N1 des potentiels évoqués respiratoires étaient significativement allongée au niveau de la dérivation C4-Cz chez les patients souffrant de syndrome d'apnées obstructives du sommeil ($105,7 \pm 16$ ms) par rapport aux sujets sains ($85 \pm 14,2$ ms) ($p = 0,01$). La valeur de cette latence était significativement corrélée au nombre de désaturations nocturnes chez les patients ($R = 0,7$, IC95 % 0,135-0,924, $p = 0,020$).

Discussion : L'absence de modification de la première composante P1 des potentiels évoqués respiratoires suggère que la transmission au cortex des informations relatives à l'occlusion inspiratoire des voies aériennes est normale au cours du syndrome d'apnées obstructives du sommeil. Par contre le traitement cortical de telles informations semble anormal comme le suggère l'allongement de la composante N1, plus tardive.

Conclusion : L'intégration corticale de sensations liées à des événements respiratoires est altérée au cours du syndrome d'apnées obstructives du sommeil. Ce phénomène pourrait contribuer à la prolongation des apnées.

Récepteurs PAR2 et régulation du tonus musculaire bronchique

P.-A. Risse (sous la direction du Dr. N. Roche)

UPRES EA-220 (Directeur : Pr. C. Advenier), Paris.

Introduction : Le récepteur PAR2 (Protease Activated Receptor de type 2) a la particularité d'être activé par l'action protéolytique de la trypsine et de la tryptase mastocytaire, et par un agoniste peptidique (PAR2-AP). Il est présent sur le muscle lisse, l'épithélium, et les fibres nerveuses de type C des voies aériennes, chez l'Homme et le Cobaye. L'objectif de ce travail a été de déterminer : (i) le rôle du récepteur PAR2 dans la régulation du tonus musculaire bronchique chez le Cobaye et chez l'Homme, (ii) l'influence de conditions pro-inflammatoires sur ce rôle ainsi que (iii) les effecteurs secondaires éventuellement impliqués.

Matériels et méthodes : L'étude fonctionnelle du récepteur PAR2 a été menée *in vitro* sur la trachée de Cobaye et sur des bronches humaines. L'étude des effets directs a été conduite en réalisant des courbes concentration-réponses de trypsine ou de PAR2-AP. L'étude des effets indirects a été réalisée grâce à des courbes concentration-réponses d'histamine sur des tissus incubés en présence de trypsine (30 mU/mL, 15 h ou 15 U/mL, 30 min) ou de PAR2-AP 100 μ M (15 h ou 30 min). L'influence de conditions inflammatoires a été mise en évidence (i) en séparant les patients en fonction de leur statut tabagique ou (ii) en incubant des anneaux en présence d'IL-1beta (5 μ g/mL, 15 h).

Résultats : Chez le Cobaye, le PAR2 module directement le tonus bronchique : (i) les PAR2 épithéliaux peuvent limiter les contractions et/ou induire des relaxations en stimulant la production de prostanoïdes, (ii) les PAR2 du système NANCe, via la libération de tachykinines participent aux réponses contractiles. Chez l'Homme, le PAR2 module le tonus bronchique indirectement avec : (i) l'induction d'une hyperréactivité bronchique chez les non-fumeurs et (ii) un rôle protecteur en condition pro-inflammatoire.

Discussion : Les effets *in vitro* du PAR2 dans les voies respiratoires sont variables selon l'espèce animale et selon l'existence ou non de conditions inflammatoires. Il pourrait exister un équilibre entre les différents effets du PAR2 : protection épithéliale grâce à la PGE2, contraction du muscle lisse et inflammation neurogénique. L'existence d'un environnement inflammatoire paraît favoriser une sur-expression du PAR2 épithélial et donc l'effet protecteur du PAR2.

Conclusion : A ce stade, la complexité des effets du PAR2 ne permet pas d'impliquer ce récepteur de façon évidente dans une pathologie bronchique comme la BPCO ou l'asthme.

Localisation et distribution des récepteurs de l'endothéline dans les cellules musculaires lisses (CML) d'artères pulmonaires humaines : conséquences fonctionnelles au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

O. Sanchez (sous la direction de S. Eddahibi)

Unité INSERM 492 (Directeur : Serge Adnot), Créteil.

Introduction : L'HTAP primitive se caractérise par un important remodelage de la paroi artérielle pulmonaire. Plusieurs arguments plaident en faveur d'un rôle de l'endothéline-1 (ET-1) : (i) les patients atteints d'HTAPP ont des taux plasmatiques d'ET-1 plus élevés que les contrôles, (ii) l'ET-1 a une action vasoconstrictrice et mitogénique sur les CML, (iii) l'utilisation d'antagonistes spécifiques ou non des récepteurs ET-A et ET-B de l'ET-1 a une action bénéfique sur l'HTAP. Nous avons étudié l'expression et la répartition des récepteurs de l'ET-1 dans les tissus et vaisseaux pulmonaires de patients ayant une HTAPP et de contrôles, et étudié l'implication de ces récepteurs dans la prolifération et la migration des CML vasculaires.

Matériels : Les parenchymes et artères pulmonaires (AP) étaient obtenus au cours de transplantation cardiopulmonaire de patients ayant une HTAPP et au cours de d'exérèse d'un cancer bronchique (contrôles). Les CML d'AP étaient cultivées à partir d'explants.

Méthodes : L'ET-1 a été dosé par méthode ELISA. La distribution des récepteurs a été déterminée par étude de liaison de l' $[^{125}\text{I}]$ ET-1. L'effet prolifératif de l'ET-1 a été évalué par incorporation de ^3H thymidine. L'effet chémoattractant de l'ET-1 a été étudié avec des chambres de Boyden.

Résultats : Comparativement aux contrôles : (i) la concentration d'ET-1 est 2 fois plus importante dans l'homogénat de poumon d'HTAPP. Les CML d'HTAPP synthétisent 2 fois plus d'ET-1. (ii) la proportion des ET-A augmente significativement, et celle des ET-B diminue, dans le poumon d'HTAPP. La distribution des récepteurs est identique dans les CML des 2 groupes. (iii) l'effet prolifératif de l'ET-1 est modeste et identique dans les 2 groupes et est médié par ET-A. (iiii) l'ET-1 possède un effet pro-migratoire plus important pour les CML d'HTAPP médié par ET-A et ET-B.

Conclusion : Au cours de l'HTAPP, la synthèse d'ET-1 par les CML est augmentée et stimule la migration des CML de façon plus importante que les contrôles. Cette action combinée à l'effet prolifératif modeste de l'ET-1 permet d'expliquer en partie le remodelage vasculaire pulmonaire observé au cours de l'HTAPP.

Rôle de la translocation bactérienne dans le syndrome hépatopulmonaire

B. Sztrymf (sous la direction du Dr Ph. Herve)

LCE hôpital Marie Lannelongue UPRES-EA-980190. Dir : M Mazmanian.

Introduction : La cirrhose hépatique est à l'origine du syndrome hépatopulmonaire (SHP). Il a été démontré que le NO synthétisé en excès par des macrophages intravasculaires pulmonaires (MIVP) en est responsable. Ces cellules sont normalement absentes chez l'homme ou le rat mais recrutées à cette occasion. Le but de ce travail est d'étudier si la translocation bactérienne (BT) due à la cirrhose, et l'inflammation qui en découle sont à l'origine du recrutement de ces cellules et du syndrome hépatopulmonaire.

Matériels et méthodes : Une cirrhose biliaire par ligature de la voie biliaire principale est réalisée chez des rats. Nous mesurons la DAaO₂, le shunt isotopique, des prélèvements microbiologiques de ganglions mésentériques, le taux de TNF α , le recrutement de MIVP par morphométrie chez des rats de façon prospective et à différents stades du développement de l'hépatopathie. La pentoxifylline s'est montrée efficace dans la prévention du SHP. Nous observerons si cette efficacité est liée à la baisse des MIVP grâce à la scintigraphie de phagocytose et la morphométrie.

Résultats : Les animaux porteurs de BT (BT+) ont une DAaO₂ altérée par rapport aux animaux non porteurs de BT (BT-) (DAaO₂ = 22,5 15,63 mmHg versus 10,9 8,3 p = 0.02) ainsi qu'une élévation du TNF α (81,94 49,16 pg/ml versus 34,09 11,68 p = 0.005) du shunt isotopique (14,34 1.7 % versus 11,7 1.5 p = 0.04) et du recrutement des MIVP (58 % 18 % versus 33,1 17,3 p = 0.017). Il n'y a pas de différence d'hématose entre les animaux BT- et les animaux contrôles. Ces anomalies sont d'installation progressive et corrélées entre elles au cours du développement de l'hépatopathie. Les rats traités préventivement par PTX ont un recrutement moindre de MIVP constaté à la scintigraphie par une baisse de l'activité de phagocytose pulmonaire (P) rapportée à celle du foie (F) (ratio P/F 1,96 0,86 versus 3,47 0,90 p = 0.037).

Conclusion : Ce travail suggère que la translocation bactérienne est responsable du SHP chez le rat. Les bactéries et cytokines normalement épurés par le foie vont le traverser et induire le recrutement de macrophages au sein des vaisseaux pulmonaires. Ces macrophages sur-expriment la NO synthase inductible à l'origine d'une sur-production de NO et du syndrome hépatopulmonaire.

Prédisposition génétique aux infections mycobactériennes chez l'homme : étude des gènes qui contrôlent la production d'interféron

E. Catherinot (sous la direction de J.L. Casanova et encadré par Cl. Fieschi)

*INSERM U550 (Directeurs : J.L. Casanova et L. Abel),
Faculté Necker-Enfants Malades, Paris.*

Introduction : Les mycobactéries environnementales et le BCG sont rarement pathogènes chez l'homme. Des infections par ces mycobactéries et par le bacille de Koch sont observées notamment chez des individus présentant le syndrome de prédisposition Mendélienne aux infections mycobactériennes. Des mutations de 5 gènes (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *STAT1*, *IL12B*, *IL12RB1*) ont été décrites, toutes à l'origine d'une perturbation de l'immunité médiée par l'interféron (IFN). Chez environ la moitié des patients, aucun défaut moléculaire n'a été identifié. L'objectif de mon travail porte sur la recherche de défauts touchant le contrôle en *trans* de la production d'IFN par la réalisation d'un criblage permettant l'identification de défauts d'expression d'IL12R1, une des 2 chaînes du récepteur de l'IL12, et par la recherche de défauts d'autres gènes contrôlant la production d'IFN, notamment T-bet.

Méthodes : Le laboratoire dispose de lignées B-EBV de 234 patients, incluant des infections disséminées et localisées à mycobactéries peu virulentes, ainsi que des tuberculoses graves. Nous avons mis au point la détection d'IL12R1 en surface des cellules B-EBV par cytométrie de flux puis recherché un défaut d'expression chez les 234 patients. Nous avons enfin séquencé *TBX21*, codant T-bet, un facteur de transcription nécessaire à la production d'IFN par les lymphocytes T et NK activés chez les 234 patients.

Résultats : Nous avons pu identifier 5 nouveaux patients ayant un défaut complet d'IL12R1 avec absence complète

d'expression du récepteur en surface chez 4 d'entre eux. Le 5^e patient a une expression détectable mais faible par un seul anticorps spécifique. Les 4 patients vaccinés par le BCG ont présenté une infection disséminée. 3 patients ont présenté des infections à salmonelles, seule manifestation infectieuse chez un des patients. Les résultats du séquençage de *TBX21* sont en attente pour les exons 1, 4 et 6. Aucune anomalie n'a été identifiée dans les exons 2, 3 et 5. Nous avons mis en évidence chez un patient adulte ayant présenté une tuberculose disséminée une substitution G > C hétérozygote 6 paires de base avant le début de l'exon 5. Des explorations sont en cours pour déterminer si cette substitution a un caractère pathogène.

Discussion : Les patients ayant un défaut complet d'IL12R1 ont une symptomatologie infectieuse débutant habituellement dans l'enfance, généralement par une atteinte disséminée liée à des mycobactéries peu virulentes. Ce nouveau criblage des défauts d'expression d'IL12R1 ne permet pas de détecter les défauts conservant l'expression, complets ou partiels. Aucun défaut d'expression d'IL12R1 n'a été détecté chez les patients ayant une atteinte localisée à mycobactérie environnementale, enfants ou adultes. Il est possible que certains de ces patients aient un défaut partiel d'IL12R1. Nous cherchons actuellement à mettre au point un criblage fonctionnel de la voie de signalisation de l'IL12. Cela devrait nous permettre de détecter des défauts partiels d'IL12R1 et des autres molécules impliquées dans la voie de signalisation de l'IL12.

Conclusion : Les défauts complets sans expression d'IL12R1 sont associés à des infections disséminées à BCG, mycobactéries atypiques ou bacille de Koch se révélant dans l'enfance. La recherche de défauts plus subtils de réponse à l'IL12 nous permettra peut-être d'identifier les défauts moléculaires incriminés chez les patients présentant des infections localisées, notamment pulmonaires à mycobactéries environnementales ou des tuberculose disséminées de l'adulte.