

Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA) de Biologie et Physiologie de la Respiration et de la Circulation, option Respiration

Marie-Pia d'Ortho

Fondé en 1986, le Diplôme d'Etudes Approfondies de Biologie et Physiologie de la Respiration et de la Circulation (sous cette dénomination depuis 1996), accueille chaque année une cinquantaine d'étudiants qui souhaitent faire une initiation à la recherche, répartis pour moitié dans l'option Respiration et pour moitié dans l'option Circulation. La coordination générale du DEA est assurée par Jean-Jacques Mercadier (Physiologie, Bichat) pour l'option Circulation, et Marie-Pia d'Ortho (Biologie Cellulaire, Créteil), pour l'option Respiration. La composition de l'équipe pilotant l'option Respiration du DEA pour la campagne 2002-2003 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, Frédéric Lofaso, Roger Marthan, Thomas Similowski, Gérard Zalcman.
– Conseil scientifique : Membres du conseil pédagogique, Christophe Delacourt, Estelle Escudier, Jean-François Mornex, Pascal Chanez.

Devant la qualité remarquable des travaux effectués, et de façon à favoriser la diffusion au sein de la communauté pneumologique des résultats obtenus par les étudiants, les résumés des mémoires de recherche présentés lors de la session de septembre 2003 sont réunis dans les pages qui suivent, comme c'est désormais une tradition dans la *Revue des Maladies Respiratoires*.

En attendant la mise en place de la réforme « License-Mastère-Doctorat », en gestation actuellement pour des raisons d'harmonisation européenne, le DEA continue bien sûr pour l'année universitaire 2003-2004, et sera reconduit en 2004-2005.

Les conditions à remplir pour pouvoir s'inscrire 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, 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. Zalcman ;

– module de physiologie, responsables : C. Clerici, T. Similowski, F. Lofaso ;

– module de pharmacologie, responsables : V. Lagente, Ph. Devillier, C. Advenier.

De plus, deux séminaires d'initiation aux biostatistiques sont prévus, l'un « général » en début d'année, l'autre « appliqué et personnalisé » quelques mois plus tard.

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 D.E.A.

Le DEA dispose d'un site Internet dont l'adresse est la suivante : <http://www.dea-cardiopneumo.org> Vous êtes invités à le consulter pour obtenir plus de renseignements sur le DEA.

Infiltration inflammatoire et expression bronchiques du *Stem Cell Factor* (SCF) chez les transplantés pulmonaires

M. Adda

(travail réalisé sous la direction de D. Israel-Biet)

UPRES EA 220 UFR Biomédicale des Saints-Pères, Paris V, France.

Introduction : Les réactions cellulaires inflammatoires bronchiques au décours de la transplantation pulmonaire sont mal connues. Elles conditionnent l'avenir fonctionnel du greffon. Les mastocytes pourraient y jouer un rôle clé.

Matériel et méthodes : Les biopsies bronchiques de 16 patients ont été analysées à M3 et à M12, et comparées à celles d'un groupe témoin (n = 10). Nous avons quantifié en immunohistochimie les infiltrats de mastocytes, lymphocytes T CD8+ et polynucléaires neutrophiles (PN) (respectivement par marquage anti-tryptase/chymase, -CD8 et -élastase) et la prolifération épithéliale par marquage anti-Ki-67. L'expression des transcrits de *Stem Cell Factor* (SCF) et de c-kit a été quantifiée par PCR quantitative en temps réel (RQ-PCR).

Résultats : L'infiltrat mastocytaire augmente au cours de la première année post-greffe ($p = 10^{-4}$). A M3, l'expression de chymase est plus importante et est corrélée à l'infiltrat de lymphocytes T CD8+, qui est essentiellement épithélial. L'index de prolifération épithéliale est aussi plus marqué à cette période ($p < 0,05$). Après un an d'évolution post-greffe, les infiltrats de PN et de CD8+ diminuent sensiblement ($p = 10^{-4}$). Il existe par ailleurs une hyperexpression de SCF chez les transplantés, plus marquée à la phase précoce ($p = 10^{-4}$), alors que le c-kit augmente à un an, mais reste peu différent des témoins.

Discussion : La nature des infiltrats à la phase précoce traduit une réaction immune et inflammatoire importante, avec lésions et prolifération épithéliales. L'hyperexpression locale de SCF n'est pas corrélée à la nature ni à l'importance de cette inflammation.

Conclusion : Cette étude permet l'analyse au niveau bronchique de la cinétique inflammatoire et immune de la première année post-greffe. Le suivi prolongé des patients permettra de mieux appréhender le rôle du SCF dans la transplantation pulmonaire, bénéfique dans la réparation tissulaire ou délétère, par le biais des mastocytes.

Mise en évidence d'une baisse du monoxyde d'azote suite à une infection chez l'animal drépanocytaire : rôle dans la physiopathologie de la crise drépanocytaire ?

P. Bartolucci

(travail réalisé sous la direction de C. Delclaux)

Unité INSERM U49, Directeur Serge Adnot, Créteil, France.

Introduction : Le monoxyde d'azote (NO) a des propriétés vasodilatatrices, anti-inflammatoires et anti-thrombotiques qui pourraient limiter le risque vaso-occlusif lié à la maladie drépanocytaire. Sa diminution a en outre été suggérée lors des crises drépanocytaires. Le but de cette étude expérimentale était d'étudier la synthèse de NO chez l'animal drépanocytaire à l'état basal puis au décours d'un événement infectieux (péritonite), situation connue comme étant à risque de crise vaso-occlusive. Notre hypothèse était qu'il pouvait exister un déficit en NO après une infection chez l'animal drépanocytaire, pouvant contribuer à la survenue de complications vaso-occlusives.

Matériel et méthodes : Notre modèle expérimental a consisté en la réalisation de péritonites par ponction et ligature cæcale chez des souris transgéniques drépanocytaires SAD et des souris témoins C57BL6. L'évaluation des animaux a été réalisée 24 heures après la réalisation de la péritonite. Nous avons dosé les métabolites du NO (nitrites et nitrates) dans le poumon et la rate, ainsi que le NO expiré, par chimioluminescence. L'expression protéique des NO synthases (NOS) inductible (iNOS) et endothéliale (eNOS) du poumon a été évaluée par western blot et l'activité enzymatique a été mesurée par la transformation de [H3] L-Arginine en [H3] L-Citrulline. L'évaluation des ARN par RT PCR est en cours.

Résultats : Nous avons mis en évidence une baisse statistiquement significative des métabolites du NO et du NO expiré chez les souris SAD après péritonite. L'évolution des souris témoins est opposée à celle des souris SAD avec une tendance à l'augmentation des métabolites du NO et une augmentation significative du NO expiré. L'expression protéique de iNOS existe à l'état basal chez la souris SAD et disparaît après péritonite ; à l'inverse elle n'est pas retrouvée avant péritonite et apparaît après péritonite chez les souris témoins. La protéine eNOS est exprimée chez toutes les souris, mais son expression est moins marquée chez les souris témoins. Les résultats des Western Blot sont corrélés à l'activité des NOS.

Conclusions : Nos résultats démontrent que la synthèse de NO diminue au décours d'une agression infectieuse et chirurgicale dans un modèle murin de drépanocytose. Cette baisse pourrait être néfaste et contribuer à l'apparition de manifestations vaso-occlusives. Nous allons poursuivre cette étude afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles de cette diminution sur l'apparition de phénomènes vaso-occlusifs.

Expression et rôle du transporteur de la sérotonine dans l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) induite par la monocrotaline chez le rat

R. Benferhat

(travail réalisé sous la direction de S. Eddahibi)

Unité INSERM U492.

Introduction : La monocrotaline (MCT) est un alcaloïde pyrrolizidique extrait de la plante *Crotalaria Spectabilis*. L'administration de la MCT par voie sous cutanée à des rats entraîne le développement d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). L'augmentation de la pression artérielle pulmonaire est accompagnée de lésions vasculaires pulmonaires et d'hypertrophie du ventricule droit. Les lésions vasculaires sont caractérisées par l'hypertrophie de la média des artères pulmonaires et la muscularisation des artères pulmonaires distales. Le but de ce travail était d'étudier l'expression du transporteur de la sérotonine 5HTT ainsi que les effets de la Fluoxétine et des antagonistes des récepteurs à la sérotonine dans ce modèle.

Matériels et méthodes : Nous avons évalué la pression artérielle pulmonaire, l'hypertrophie du ventricule droit (Index de Fulton), la muscularisation et l'expression de 5HTT dans le poumon après injection de la monocrotaline et le traitement par la Fluoxétine et par les antagonistes des récepteurs à la sérotonine.

Résultats : Comparativement aux rats contrôles, le traitement par la monocrotaline est à l'origine (i) d'une augmentation de l'index de Fulton à partir de la deuxième semaine (ii) d'une augmentation du nombre des artères pulmonaires muscularisées avec une hypertrophie de la média et infiltration adventitielle (iii) d'une expression précoce de 5HTT. Les rats injectés par la MCT et traités quotidiennement par la Fluoxétine présentent un index de Fulton, une PAP et une muscularisation normaux par rapport aux rats traités aux antagonistes des récepteurs à la sérotonine chez qui ces paramètres sont augmentés.

Conclusion : Au cours de l'HTAP induite par la MCT, l'expression de 5HTT est précoce et son inhibition par la Fluoxétine a un effet protecteur. Ces résultats suggèrent le rôle important de 5HTT dans l'HTAP induite par la MCT.

Caractérisation de l'activité pro-proliférative de la protéinase 3 : effet potentiel sur l'épithélium respiratoire de sujets atteints de mucoviscidose

A. Blondeau

(travail réalisé sous la direction de C. Danel)

UPRES EA 220, Paris, France.

Introduction : Il a été récemment démontré que la PR3, sérine protéase du polynucléaire neutrophile (PN), clive *in vitro* la p21 (CKI) entraînant une augmentation de la prolifération cellulaire. Chez les patients mucoviscidosiques (CF), malgré l'inflammation permanente dominée par les PN, l'épithélium respiratoire est le plus souvent parfaitement conservé. Nous avons recherché si la PR3 en clivant la p21 pourrait avoir un rôle dans la régénération de l'épithélium respiratoire.

Matériels et méthodes : Cette étude a été réalisée à partir de prélèvements pulmonaires provenant de 33 patients CF, 11 témoins sains non CF et 8 sujets atteints d'une pathologie inflammatoire pulmonaire chronique non CF. Il a été effectué une étude immunohistochimique de l'antigène nucléaire Ki-67 à l'étage bronchique, bronchiolaire et alvéolaire pour déterminer la prolifération cellulaire ; ainsi que des analyses biochimiques sur les fractions solubles et extraites : dosages de l'activité myéloperoxydase (MPO) et sérine protéasique (PR3 et élastase) et Western Blot de la PR3 et de la p21.

Résultats : La prolifération cellulaire est plus importante chez les patients CF. Elle est corrélée avec l'activité MPO et sérine protéasique sur les fractions extraites. La prolifération paraît donc être liée à un facteur membranaire issu des PN et doté d'une activité sérine protéasique. Chez la moitié des patients CF, il existe une corrélation inverse entre la p21 et la PR3.

Discussion : Nos travaux tendent à montrer qu'il existe un lien entre la prolifération des cellules épithéliales respiratoires et les sérine protéases. Des études complémentaires sont nécessaires pour savoir si cette prolifération est liée à l'activité PR3 et/ou élastase, ces 2 protéases étant probablement impliquées.

Conclusion : Si la PR3 et/ou l'élastase se révèlent des facteurs importants pour la régénération de l'épithélium respiratoire, il sera alors légitime de se poser la question de l'utilisation des antiprotéases dans le traitement de la mucoviscidose.

La protéine MRP1 a-t-elle une fonction canal chlorure ?

L. Bouhamyia

(travail réalisé sous la direction de A. Fajac)

Histologie-Biologie Tumorale, Hôpital Tenon, Paris, France.

Introduction : La fonction de CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), déficiente dans la mucoviscidose, ne pouvant rendre compte à elle seule de la variabilité clinique de la maladie, l'implication de gènes dits modificateurs dans la physiopathologie est admise. Outre l'homologie structurale de CFTR avec MRP1 (*Multidrug Resistance associated Protein 1*), une homologie fonctionnelle de type canal chlorure pourrait être possible entre ces deux protéines. Le présent travail a pour objet de tester l'hypothèse que la protéine MRP1 a une fonction canal chlorure.

Matériels et méthodes : Afin de déterminer des modèles d'étude adéquats, l'expression de la protéine MRP1 a été étudiée dans différentes lignées cellulaires (n = 11) par cytométrie en flux, immunocytochimie et Western blot. La conductance chlorure a été analysée dans ces modèles en utilisant un indicateur fluorescent pour le chlorure, le SPQ.

Résultats : La protéine MRP1 est exprimée dans les lignées cellulaires analysées avec les trois techniques utilisées. La lignée ayant le niveau d'expression de MRP1 le plus élevé (HeLa) est aussi celle pour laquelle le pourcentage de cellules ayant une conductance chlorure est le plus élevé, que ce soit en conditions isotoniques ou hypotoniques. Les lignées ayant un niveau d'expression faible (T47D) et intermédiaire (HTB80) sont celles pour lesquelles le pourcentage de cellules est bas et intermédiaire, respectivement.

Conclusion : Ces résultats suggèrent que la protéine MRP1 est associée à une fonction canal chlorure volume-dépendante. Elle pourrait à ce titre constituer un gène candidat modificateur du phénotype de la mucoviscidose.

Inflammation ou remodelage des voies aériennes distales : intérêt du test de rinçage à l'azote

A. Bourdin

(travail réalisé sous la direction de P. Chanez)

Service des Maladies Respiratoires, CHU Montpellier, France.

Introduction : Les voies aériennes distales sont le siège initial des lésions dans la BPCO, qui peuvent être de deux types : inflammatoires et potentiellement réversibles, et structurales, à ce jour irréversibles. Difficiles à explorer en routine, les petites voies aériennes peuvent être appréciées indirectement par TDM-HR, par l'histopathologie et, de manière non invasive, par le test de rinçage à l'azote (SBNT). Il apparaît primordial de trouver des outils non invasifs pour appréhender précocement et mieux traiter les anomalies des voies aériennes distales chez ces patients. Nous proposons d'étudier la relation entre la phase III du SBNT et les anomalies structurales des petites voies aériennes appréciées par TDM et histomorphométrie, et la phase IV du SBNT et les anomalies inflammatoires bronchiolaires appréciées par SpiroTDM et immuno-histochimie.

Matériels et méthodes : Sept patients souffrant de BPCO et 6 patients fumeurs sans trouble ventilatoire obstructif programmés pour une chirurgie pulmonaire carcinologique ont été investigués (TDM-HR et SpiroTDM, SBNT, EFR complètes). Un morceau de parenchyme pulmonaire récupéré pendant la chirurgie a été analysé en GMA et en paraffine pour des critères morphométriques et inflammatoires (Anticorps anti CD68, Anti CD8, Anti NE, Anti Tryptase, Anti EG2).

Résultats : Les patients BPCO et fumeurs sans BPCO ne se différenciaient que par leurs courbes débit-volumes et leurs scores symptomatiques ; le SBNT ne différenciait pas les deux groupes, les petites voies aériennes étant probablement atteintes très précocement. La pente de la phase III était corrélée aux anomalies de type remodelage sur la TDM (R 0,68, p.01) alors que la phase IV était corrélée à l'intensité du trapping en expiration (R 0.68, p.03). Les analyses histopathologiques en cours pourraient venir confirmer ces données.

Discussion : Le SBNT apparaît comme un test fiable, simple, pour explorer le poumon profond. Il semble assez bien corrélé aux anomalies TDM et pourrait trouver une indication dans la prise en charge des patients fumeurs avec trouble ventilatoire obstructif. Les techniques histopathologiques imposent une rigueur importante et un apprentissage long pour être fiables.

Conclusion : Le SBNT est corrélé aux anomalies inflammatoires et structurales et pourrait trouver une indication diagnostique, pronostique et thérapeutique dans l'exploration des voies aériennes distales dans la BPCO.

Effet de la protéine C activée recombinante humaine dans l'agression pulmonaire aiguë par *Pseudomonas aeruginosa*

F. Collet

(travail réalisé sous la direction de B. Guery)

Unité EA 2689, Lille, France.

Introduction : Au cours de la phase précoce de l'agression pulmonaire aiguë, il existe un déséquilibre entre fibrino-formation et fibrinolyse pulmonaire pouvant favoriser l'évolution fibrosante. Le but de notre étude a donc été d'évaluer l'effet de l'inhibition de la formation de fibrine au cours de l'agression pulmonaire à *P. Aeruginosa*, par la protéine C activée recombinante humaine (PCArh).

Matériels et méthodes : L'étude a été menée chez le rat *in vivo* sur un modèle d'agression pulmonaire aiguë par *P. Aeruginosa* (0,5 mL/Kg, 1×10^9 ufc/mL). La PCArh a été administrée IV (300 g/Kg/h). La perméabilité a été caractérisée par l'injection d'un traceur vasculaire (111In-Alb). Une heure après l'instillation d'125I-Alb intratrachéale, la concentration des protéines marquées ou natives du liquide alvéolaire recueillis permettait une estimation de la clairance liquidienne alvéolaire. Le taux de cytokines (TNF, IL-1, IL-6 et IL-10) était mesuré dans le sérum et le liquide de lavage broncho-alvéolaire à 4 heures. Quatre groupes ont été constitués : témoins sains (CTR), témoins positifs de pneumonie à *P. aeruginosa* non traités (PNP), témoins positifs de traitement par PCArh (PCA) et rats inoculés à *P. aeruginosa* co-traités par PCArh (PCA-PNP).

Résultats : L'administration de *P. Aeruginosa* induit un trouble de perméabilité alvéolo-capillaire, majoré par l'administration de PCArh. La clairance liquidienne pulmonaire est significativement augmentée dans le groupe PNP alors qu'elle s'effondre dans le groupe PCA-PNP, témoin d'une lésion endothéliale surajoutée. Ceci induit une décompartmentalisation de la réponse inflammatoire. L'étude de la coagulation montre un effet anti-coagulant systémique lors du traitement par PCArh.

Discussion : Lors de la phase précoce de la pneumonie à *P. Aeruginosa*, la co-administration de PCArh conduit à une aggravation du trouble de perméabilité essentiellement sur le versant endothélial, avec décompartmentalisation de la réponse inflammatoire. L'inhibition de la fibrino-formation induite par la PCArh, insistant sur le rôle fondamental de ce phénomène dans la limitation des lésions et du trouble de perméabilité lors de l'agression pulmonaire aiguë.

Rôle de la ferritine dans la physiopathologie de l'emphysème dans un modèle de souris exposée à la fumée de cigarette

S. de Miranda

(travail réalisé sous la direction de J. Bozkowski)

Unité INSERM 408, Paris, France.

Introduction : L'emphysème est une pathologie associée à une mortalité et une morbidité importantes. Ses mécanismes sont complexes mais le déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases en partie lié à l'effet des métabolites dérivés de l'oxygène, occupe une place importante. L'isoforme H de la ferritine possède des propriétés antioxydantes, elle est augmentée dans les macrophages alvéolaires de sujets fumeurs avec et sans BPCO. Dans ce travail, nous avons évalué la contribution de l'isoforme H de la ferritine à la physiopathologie de l'emphysème.

Matériels et méthodes : Nous avons exposé des souris dont l'un des allèles du gène de l'isoforme H de la ferritine est délété (Fth+/-) à la fumée de cigarette pendant une semaine, un mois et trois mois. Nous avons évalué le niveau de stress oxydant par dosage des protéines complexées au 4-hydroxynonanal en western-blot, étude de l'hème oxygénase par western-blot et RT-PCR, étude de la catalase en RT-PCR. Nous avons également analysé le lavage broncho-alvéolaire. Les MMP-2, 9 et 12 et les TIMP-1 et 4 ont été évaluées par RT-PCR.

Résultats : Les souris Fth+/- ont un niveau de stress oxydant basal supérieur aux contrôles mais l'augmentation en réponse à la fumée de cigarette n'est pas plus importante. Les cellularités du lavage broncho-alvéolaire basale et après exposition à la fumée de cigarette sont comparables à celles des contrôles. MMP-2, 9 et 12, TIMP-1 et 4 sont exprimées à des niveaux comparables chez les souris Fth+/- et les contrôles et augmentent discrètement en réponse au tabac.

Discussion : L'haplo-insuffisance en isoforme H de la ferritine ne semble pas modifier la réponse à la fumée de cigarette en termes d'inflammation pulmonaire et de balance protéases/anti-protéases. En revanche, elle participe à la diminution des défenses antioxydantes à l'état basal et après exposition à la fumée de cigarette.

Conclusion : L'isoforme H de la ferritine semble jouer un rôle dans la protection contre l'agression oxydante représentée par l'exposition à la fumée de cigarette. Toutefois, sa diminution n'engendre pas, dans ce modèle, d'accélération de la destruction du parenchyme pulmonaire.

L'infection ante natale altère le développement alvéolaire post natal en dépit d'une antibiothérapie maternelle précoce

C. Denis
(travail réalisé sous la direction de C. Gras-Le Guen)

Unité UPRES, Nantes, France.

Introduction : Alors que certaines études cliniques et épidémiologiques ont établi une association entre infection ante natale et dysplasie bronchopulmonaire, nous avons étudié *in vivo* l'influence de l'infection ante natale sur le développement pulmonaire néonatal chez le lapin à partir d'un modèle expérimental d'infection materno-foetale déjà validé.

Matériels et méthodes : Nous avons infecté 5 lapines en fin de gestation (J29/31) par 103 colonies d'*Escherichia coli* K1 par voie intra-utérine après laparotomie. Une antibiothérapie maternelle intraveineuse par ceftriaxone (300 mg/kg/j) a été débutée 12 heures après l'inoculation et poursuivie sur un total de 8 jours. Un groupe témoin (n = 5) a été inoculé par du sérum physiologique stérile dans les mêmes conditions et a reçu la même antibiothérapie. Les lapereaux (n = 88) sont nés par voie basse 48 à 72 heures après inoculation et ont été allaités par leur mère. Des sacrifices à J0, J1, J5, J8 et J15 ont permis d'étudier les liquides de lavages broncho-alvéolaires et de réaliser une étude morphométrique sur les poumons prélevés. Des hémocultures quantitatives ont été prélevées chez tous les animaux.

Résultats : Une diminution significative de la surface alvéolaire totale ($p < 0,05$ à J1, J5 et J8), de la densité de surface alvéolaire ($p < 0,05$ à J1, J5 et J8) et de la densité volumétrique de l'interstitium alvéolaire ($p < 0,05$ à J1, J5 et J8) est retrouvée, ainsi qu'une augmentation significative de la densité volumétrique de la lumière alvéolaire ($p < 0,05$ à J1, J5 et J8). Ces observations sont faites principalement de J1 à J8. La comparaison de la cellularité des liquides de lavages broncho-alvéolaires n'a pu mettre en évidence de différence significative, étant donnée la petite taille des groupes. Toutes les hémocultures étaient stériles.

Discussion : L'infection antenatale chez le lapin, probablement par un mécanisme inflammatoire entraîne des lésions pulmonaires correspondant à des anomalies de l'alvéolarisation, semblables à celles observées chez l'homme dans la bronchodysplasie pulmonaire.

Conclusion : L'infection ante-natale est responsable d'anomalies du développement pulmonaire, malgré la mise en place précoce d'une antibiothérapie adaptée chez la mère.

Propriétés mécaniques du muscle lisse trachéal isolé dans un modèle de rats Fisher-Lewis. Effets de l'isoflurane après précontraction par la méthacholine

C. Duracher
(travail réalisé sous la direction de Y. Lecarpentier)

Unité INSERM 572, Paris, France.

Introduction : L'effet des agents halogénés sur les protéines contractiles n'ont jamais été étudiées dans le muscle lisse. L'objectif de l'étude est de préciser, *in vitro*, l'effet de l'isoflurane sur la mécanique du muscle lisse trachéal, en approchant les mécanismes responsables d'une modification des interactions actine-myosine. L'originalité de ce travail est de comparer ces effets sur deux souches de rats qui possèdent une réactivité bronchique spontanée différente.

Matériels et Méthodes : L'action de l'isoflurane (2 MAC) est étudiée, *in vitro*, sur des bandes de muscle trachéal isolé, prélevées sur les deux souches de rats (n = 40), stimulés électriquement, après précontraction par la méthacholine (10-6 M). Les variations de force, de longueur et de vitesse sont mesurées sur tout le continuum de charge. Une adaptation des équations d'AF Huxley appliquées au muscle lisse nous permet d'analyser les interactions actine-myosine (force, nombre et cinétiques des ponts actine-myosine).

Résultats : A l'échelon moléculaire, l'effet de l'isoflurane se traduit par i) une diminution du nombre de ponts actifs ii) sans modification de la force unitaire des ponts et iii) un allongement des phases d'attachement et de détachement de la tête de myosine sur le filament d'actine.

Discussion : L'effet bénéfique de l'isoflurane sur le contrôle de l'hyperréactivité des voies aériennes se traduit dans notre étude par un effet plus marqué dans la souche Fisher dite « hyperréactive ».

Conclusion : L'effet bronchodilatateur de l'isoflurane est, en autre effet, lié à son action sur le cycle actine-myosine. Par l'étude mécanique comparée de deux souches de rats de réactivité bronchique différente, nous avons pu montrer, après précontraction par la méthacholine, l'effet de l'isoflurane sur le nombre et la force des ponts actine-myosine et sur leurs cinétiques.

Effets du *keratinocyte growth factor* (KGF) sur les troubles du développement alvéolaire induits par l'hyperoxie chez le rat nouveau-né

X. Durrmeyer

(travail réalisé sous la direction de C. Delacourt)

Unité INSERM 492, Créteil, France.

Introduction : Chez le prématuré humain, des troubles du développement alvéolaire peuvent survenir et sont décrits sous le terme de dysplasie bronchopulmonaire (DBP). Des taux élevés de *keratinocyte growth factor* (KGF) dans les effluents trachéaux de ces prématurés sont associés à un moindre risque de survenue de DBP. Dans un modèle expérimental de troubles du développement alvéolaire chez le rat nouveau-né, nous avons voulu tester les effets préventifs du KGF recombinant humain (rhKGF) sur la mortalité des animaux et les anomalies d'alvéolisation.

Matériels et méthodes : Le rhKGF est administré par voie intra-péritonéale à des rats nouveau-nés maintenus en hyperoxie de J4 à J10. L'étude des poumons en morphométrie et des lavages bronchoalvéolaires sont réalisés à J10. La prolifération cellulaire est étudiée de façon semi-quantitative par incorporation de BrdU.

Résultats : L'administration de rhKGF par voie intra-péritonéale permet une diffusion du produit au niveau pulmonaire. L'administration du rhKGF à 2×5 mg/kg (J4 et J5) n'a pas d'effet sur les paramètres mesurés en dehors d'une diminution de la croissance pondérale. Sur un modèle d'hyperoxie plus précoce (dès J0), le KGF à la dose de 5×2 mg/kg (J0, J1, J3, J5, J7) améliore significativement la survie des animaux (74 % vs 33 % ; $p = 0,004$) et diminue le pourcentage de polynucléaires dans le LBA (médianes 1,7 % vs 62,7 % ; $p = 0,045$). En revanche, on n'observe aucun effet sur l'alvéolisation, ni sur la prolifération cellulaire en analyse semi-quantitative.

Discussion/Conclusions : Chez le rat nouveau-né exposé à l'hyperoxie précoce, le rhKGF prévient significativement la mortalité mais pas les troubles du développement alvéolaire. Le bénéfice observé est associé à une réduction de l'inflammation, mais pas à une préservation de la prolifération cellulaire intense observée à cette période. Les effets sur l'apoptose et sur le développement microvasculaire pulmonaire restent à déterminer.

Conséquences de l'inactivation du gène de la desmine sur le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire hypoxique chez la souris

C. Farges

(travail réalisé sous la direction de S. Eddahibi)

Unité INSERM 492, Créteil, France.

Introduction : La desmine est un filament intermédiaire du cytosquelette dont la mutation du gène entraîne chez l'homme une myopathie et une cardiopathie. Des souris déficientes en desmine ont été obtenues par recombinaison homologe. Ces souris présentent une cardiopathie et une myopathie semblables à la pathologie humaine. Il est décrit également des anomalies de la microvascularisation et de l'adaptation aux changements de flux chez les souris *Des*^{-/-}. Nous nous proposons d'évaluer et de localiser l'expression de la desmine dans les artères pulmonaires des souris et d'étudier les conséquences de l'inactivation du gène de la desmine sur la réactivité vasculaire et sur le développement de l'HTAP en réponse à une hypoxie chronique.

Matériels et méthodes : Nous avons étudié la conséquence de l'inactivation du gène sur la fonction cardiaque des souris avec une échocardiographie cardiaque ainsi que la réactivité vasculaire pulmonaire. Le rôle de la desmine sur le développement de l'HTAP hypoxique est évalué à partir de paramètres anatomiques et d'études immunohistologiques avec des marqueurs de la différenciation des cellules musculaires lisses : actine, vimentine et desmine.

Résultats : Notre étude confirme chez les souris *Des*^{-/-} la présence d'une cardiomyopathie hypertrophique et hypokinétique. Il n'y a pas de différence de réactivité des artères pulmonaires entre les souris *Des*^{-/-} et *Des*^{+/+}. En hypoxie chronique, les souris *Des*^{-/-} développent une musculation des artères pulmonaires supérieure aux souris sauvages avec une prolifération de CML plus importante avec essentiellement des CML marquées à la vimentine. Le remodelage vasculaire excessif est secondaire à une prolifération des CML et non pas à une accumulation de matrice extra cellulaire.

Discussion : La cardiopathie des souris *Des*^{-/-} est bien décrite dans la littérature. Par contre, à notre connaissance, c'est le premier travail qui s'intéresse à la fonction de la desmine au niveau des artères pulmonaires et sur le développement de l'HTAP hypoxique chez la souris.

Conclusion : Nous avons pu mettre en évidence le rôle de la desmine dans la prolifération des CML au cours de l'hypoxie chronique. Ce filament intermédiaire semble jouer un rôle essentiel au niveau du cytosquelette pour la communication inter cellulaire et la transduction des signaux.

Contributions respectives de la commande automatique et de la commande corticale au comportement chaotique de la ventilation chez l'homme

M.-N. Fiamma

(travail réalisé sous la direction de C. Straus, T. Similowski et S. Thibault)

UPRES EA 2397, Université Paris 6, Paris, France.

Laboratoire PRETA-TIMC, Université Joseph Fourier, Grenoble.

Introduction : La ventilation humaine dépend simultanément d'un contrôle automatique sous-cortical (CA), dont l'activité nécessite une PCO_2 télé-expiratoire ($PetCO_2$) > 25 mmHg, et d'un contrôle cortical (CC). Variable dans le temps, la ventilation se comporte comme un système dynamique complexe qui peut être caractérisé par les outils mathématiques non-linéaires issus de la théorie du Chaos. L'objectif de l'étude était d'évaluer les responsabilités respectives des CA et CC dans le comportement chaotique de la ventilation.

Matériels et méthodes : Le débit ventilatoire spontané a été enregistré à la bouche au moyen d'un pneumotachographe chez 8 sujets sains, en hypocapnie ($PetCO_2 < 25$ mmHg, CC prédominant) induite par hyperventilation semi-passive préalable, en normocapnie (CA prédominant) et en hypercapnie (7 % CO_2 , CA stimulé). Le débit ventilatoire a aussi été enregistré à la trachéotomie d'un patient tétraplégique ventilé par stimulation phrénique implantée. La variabilité ventilatoire a été évaluée par les méthodes linéaires. Le degré du Chaos ventilatoire a été évalué par le plus grand des exposants de Lyapunov (EL), sa complexité par la dimension de corrélation (DC), son imprédictibilité par l'entropie de Kolmogorov-Sinai (EKS) et sa structure, de manière graphique, par les portraits de phases et les sections de Poincaré.

Résultats : La variabilité linéaire des sujets sains était similaire aux données de la littérature, mais diminuée chez le patient. La ventilation des sujets sains était chaotique selon tous les indicateurs, celle du patient ne l'était pas. EL et EKS étaient plus petits en hypocapnie que dans les autres conditions (ANOVA, $p = 0,008$ et $p = 0,01$). DC augmentait avec la $PetCO_2$ (ANOVA, $p = 0,0001$). L'analyse graphique était cohérente avec les résultats numériques.

Discussion : La ventilation adopte un comportement chaotique dont le système respiratoire périphérique n'est probablement pas la cause. Le Chaos de la ventilation est moindre lorsque le CC est prédominant et sa complexité augmente lorsque le CA est stimulé. Le comportement chaotique pourrait donc résulter de l'interaction de plusieurs oscillateurs neuronaux du tronc cérébral.

Conclusion : Le Chaos dans la ventilation humaine semble provenir principalement du CA du tronc cérébral et être atténué par le CC. gène de la desmine sur la réactivité vasculaire et sur le développement de l'HTAP en réponse à une hypoxie chronique.

Mise en place et caractérisation d'une inflammation pulmonaire de type BPCO chez la souris : rôle de la MMP-12 et effets d'anti-inflammatoires

O. Leclerc

(travail réalisé sous la direction de F. Schmidlin, Fresnes et V. Lagente)

INSERM U456, Rennes.

Introduction : La bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une affection respiratoire caractérisée par une inflammation chronique responsable de nombreux changements physiopathologiques au niveau des voies aériennes. Le but de cette étude est de mettre en place un modèle expérimental d'étude de la BPCO chez la souris afin de mieux comprendre les mécanismes du développement de l'inflammation pulmonaire liée à cette pathologie.

Matériel et méthodes : Nous avons exposé des souris à la fumée de cigarette sur une période de 3 jours et nous avons évalué le recrutement des neutrophiles, la production de chimiokines (KC et de MIP-2) et l'activité de la métalloprotéinase matricielle (MMP) -9 dans les lavages bronchoalvéolaires. Nous avons aussi étudié l'implication de la métalloélastase du macrophage (MMP-12) en exposant à la fumée de cigarette des souris transgéniques déficientes en MMP-12 (souris MME-/-). Enfin, nous avons évalué l'efficacité d'un glucocorticoïde (dexaméthasone) et d'un inhibiteur sélectif de la phosphodiesterase (PDE) -4 (ariflo) sur cette inflammation pulmonaire.

Résultats : Trois jours d'expositions à la fumée de 2 cigarettes, 2 fois par jour, provoque un afflux de neutrophiles et une augmentation de KC, MIP-2 et MMP-9 dans les LBA et le tissu pulmonaire des souris C57bl/6J. L'exposition des souris MME-/- entraîne un afflux de neutrophiles et une libération de MMP-9 significativement diminuée par comparaison au LBA de souris MME+/+. Cet afflux de neutrophiles provoqué par la fumée de cigarette est réduit par un traitement avec l'ariflo. Par contre, aucune activité anti-inflammatoire n'est observée après un traitement par la dexaméthasone.

Conclusion : Nous avons pu mettre en évidence chez la souris exposée à la fumée de cigarette, l'apparition de nombreux paramètres caractéristiques d'une inflammation de type BPCO. Cette étude suggère l'implication de la MMP-12 dans le processus de recrutement des neutrophiles lors de cette inflammation. Enfin, l'ariflo mais pas la dexaméthasone permet de réduire l'inflammation après exposition des souris à la fumée de cigarettes. Par conséquent, les inhibiteurs sélectifs de PDE-4 représentent une nouvelle opportunité de traitement de la BPCO.

Etablissement et caractérisation de lignées de cellules tumorales de patients atteints de mésothéliome pleural malin : intérêt pour une immunothérapie anticancéreuse

M. Marcq

(travail réalisé sous la direction de M. Grégoire)

Unité INSERM U419, Nantes, France.

Le mésothéliome pleural malin (MPM), tumeur primitive de la plèvre, est un cancer encore rare, généralement lié à une exposition professionnelle à l'amiante, dont l'incidence va augmenter de façon importante dans les prochaines années. Le diagnostic est difficile et repose sur l'examen histologique, le plus souvent de biopsies de plèvre avec étude immunohistochimique. Le pronostic est sombre, la survie étant souvent inférieure à 1 an, peu influencé par les traitements classiques tels que la chirurgie ou la chimiothérapie. La recherche d'autres voies thérapeutiques prend ici tout son intérêt. Une nouvelle orientation thérapeutique, l'immunothérapie active basée sur l'injection de cellules présentant des antigènes de tumeur comme les cellules dendritiques (DC), a montré des résultats encourageants dans d'autres types de cancers. Son développement pour le traitement du MPM peut constituer un espoir thérapeutique. La plupart de ces essais de vaccination, envisagés pour d'autres cancers, utilisent pour charger les DC des peptides antigéniques, ce qui nécessite l'identification d'antigènes tumoraux. Dans le cas du MPM, la connaissance des antigènes spécifiques tumeurs est limitée. C'est pourquoi l'approche d'immunothérapie active envisagée et développée par notre laboratoire repose sur le chargement de DC par des cellules tumorales induites en apoptose. Nous avons donc, d'une part, mis en culture et caractérisé des cellules tumorales issues de prélèvements de liquide pleural de patients atteints de MPM qui vont servir au chargement des DC. D'autre part, nous avons recherché par RT-PCR la présence d'antigènes associés aux tumeurs (TAA) exprimés par le MPM et notamment dans nos lignées cellulaires. Les résultats montrent l'expression fréquente de quelques antigènes immunogéniques : MAGE 6, MUC-1, GAGE 3-6,8 ainsi que de l'antigène de la mésothéline. L'identification de ces antigènes va permettre de pouvoir juger de la réponse immunologique à cette vaccinothérapie par l'évaluation de l'activation de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'antigènes. Ces travaux vont permettre d'aboutir à la réalisation prochaine sur le CHU de Nantes d'une immunothérapie antitumorale pour les patients.

Intérêt de l'étude des potentiels évoqués respiratoires dans l'évaluation de la gravité de l'atteinte respiratoire dans l'asthme et la mucoviscidose de l'enfant

F. Nicot

(sous la direction de B. Fauroux et F. Renault)

Inserm E 213, Service de Pneumologie pédiatrique, Hôpital Armand-Trousseau, Paris, France.

Introduction : Certains enfants souffrant d'asthme ou de mucoviscidose évaluent mal leur état dyspnéique, ce qui suggère l'existence d'une anomalie de l'intégration corticale d'afférences somesthésiques d'origines respiratoires. Les potentiels évoqués respiratoires (PER) provoqués par l'occlusion des voies aériennes est une méthode récemment décrite qui permet d'investiguer cette voie.

Matériels et méthodes : Nous avons enregistré les PER chez 28 enfants âgés de 8 à 18 ans atteints d'asthme modéré (8), ou grave (4), de mucoviscidose modérée (9), ou grave (7). La gravité était définie pour les asthmatiques par un antécédent d'hospitalisation en réanimation, et pour les enfants atteints de mucoviscidose par un volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS) 45 % des valeurs attendues. Le recueil des PER sur le scalp était effectué en C3-Cz et C4-Cz par sommation des réponses à 80 stimulations. Le stimulus était une occlusion brève (400 ms) des voies aériennes supérieures. Les PER obtenus comportaient 4 composantes P1, N1, P2, N2 dont nous avons relevé les latences et mesuré l'amplitude N1-P2. Les résultats ont été étudiés sur la population complète et dans les 4 groupes déterminés selon le type de maladie et la gravité.

Résultats : Les PER étaient absents chez 2/3 des patients avec mucoviscidose. La latence de P1 était plus longue dans les asthmes graves ($46,7 \pm 5,9$ ms) que dans les asthmes modérés ($39,2 \pm 3,7$ ms) ($p = 0,045$). Dans l'asthme comme dans la mucoviscidose, il existait une corrélation entre la distension pulmonaire évaluée par la capacité résiduelle fonctionnelle par pléthysmographie et l'absence des composantes N1 et P2 des PER ($p = 0,03$).

Discussion : Ainsi, certains enfants atteints d'asthme ou de mucoviscidose présentent des altérations des PER, qui sont différentes selon la maladie. Une distension pulmonaire chronique semble être une des raisons de l'altération de l'intégration corticale d'informations d'origine respiratoire.

Conclusion : Une distension pulmonaire est associée à une absence des composantes N1 et P2 des PER chez l'enfant atteint d'asthme ou de mucoviscidose.

Monoxyde d'azote et tolérance à la toxicité pulmonaire de l'oxygène

D. Perez

(travail réalisé sous la direction de Gilles Capellier)

Equipe d'accueil EA479, Besançon, France.

Introduction : La protection contre la toxicité pulmonaire de l'O₂ induite par l'endotoxine pourrait résulter de la synthèse du NO via la stimulation de la NOS₂.

Matériels et méthodes : Etude expérimentale randomisée en 2 phases chez le rat.

- huit groupes : Témoin Air ou O₂ (TA/O), endotoxine tolérant (ETA/O), endotoxine (EA/O), endotoxine tolérant + endotoxine (ETEA/O) ;
- étude de la survie sur 7 jours ;
- protocole après 54 h : thoracotomie, prélèvements (sang, pleural, LBA, poumons) ;
- dosages : NO plasmatique, pleural et dans le LBA : NO, LDH et micro-albumine ;
- hybridation *in situ* (HIS) après fabrication de la sonde d'ADNc NOS₂ ;
- immunohistochimie : marquage avec des anticorps anti-NOS₂ ;
- étude anatomopathologique : indice lésionnel égal à la somme de 6 critères.

Résultats : - survie augmentée chez EO : EO (7j), ETO (96h) et TO (72h), $p < 0,0001$;

- NO plasmatique augmenté sous O₂ (TA (7,5) *versus* TO (10,7 $\mu\text{mol/L}$), $p < 0,01$) ;
- HIS et Immunohistochimie : marquage significativement augmenté par O₂+E ;
- l'indice lésionnel : augmenté par la tolérance (ETO *versus* TO : $p < 0,01$; ETO *versus* EO : $p < 0,005$) et stable chez les rats EO (TO *versus* EO : NS).

Discussion et conclusion : Nos données concernant :

- l'effet protecteur de l'endotoxine sur la survie des rats en hyperoxie ;
- la survie intermédiaire des rats tolérants à l'endotoxine ;
- la modulation de la NOS2 (transcription et traduction) chez les rats tolérants ;
- l'augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine NOS2 par l'endotoxine, synergique avec l'oxygène ;
- l'importance des lésions anatomopathologiques chez les rats tolérants ;
- la « stabilisation » des lésions à 54 heures chez les rats recevant une dose protectrice d'endotoxine suggèrent que l'endotoxine stimule la NOS₂ et que le NO exercera *in situ* son effet protecteur envers la toxicité pulmonaire de l'oxygène.

Caractérisation des fibroblastes d'emphysème humain : phénotype, prolifération, sécrétion de *Hepatocyte growth factor* et de *Keratinocyte Growth Factor*

L. Plantier

(travail réalisé sous la direction de B. Crestani)

Unité INSERM 408, Paris, France.

Introduction : L'emphysème pulmonaire est la conséquence d'une destruction du parenchyme et d'un défaut des mécanismes de réparation alvéolaire. Le fibroblaste joue un rôle-clé dans la réparation alvéolaire. L'objectif de ce travail est de rechercher s'il existe une dysfonction des fibroblastes au cours de l'emphysème chez l'homme. Nous avons centré nos travaux sur l'étude de la prolifération des fibroblastes et de leur sécrétion de deux facteurs impliqués dans la réparation alvéolaire : le *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) et le *Keratinocyte Growth Factor* (KGF), ainsi que sur la régulation de ces phénomènes par les rétinoïdes.

Matériels et méthodes : Des fibroblastes de poumon emphysemateux humain ont été obtenus par culture à partir d'explants. Le phénotype des cellules a été étudié par immunocytochimie. La prolifération a été étudiée par le test de réduction du MTT. La sécrétion de HGF et KGF a été quantifiée par ELISA à l'état basal et après stimulation.

Résultats : Les fibroblastes d'emphysème présentent un phénotype caractérisé par une différenciation myofibroblastique et une prolifération plus lente et plus facilement inhibable par les rétinoïdes. Leur sécrétion de HGF est diminuée mais reste stimulable par l'IL-1 α et la PGE2. Leur sécrétion basale de KGF est comparable à celle des témoins mais n'est pas stimulable par l'IL-1 α . Les rétinoïdes n'ont pas eu d'effet sur la libération d'HGF ni de KGF.

Discussion : L'expression fréquente de l' α -actine rapproche les fibroblastes d'emphysème des fibroblastes de fibrose pulmonaire idiopathique. Leur prolifération d'emblée inférieure est inhibée de façon marquée par de faibles concentrations de rétinoïdes. Une sécrétion basale faible de HGF et un défaut de stimulation de la sécrétion de KGF par les fibroblastes pourraient contribuer à un défaut de la réparation alvéolaire.

Conclusion : Nous avons identifié plusieurs altérations des propriétés fonctionnelles des fibroblastes d'emphysème qui pourraient contribuer à la physiopathologie de cette maladie.

Influence de la nature « volontaire » ou « non-volitionnelle » de la commande respiratoire sur le recrutement motoneuronal diaphragmatique : application à l'évaluation non volitionnelle des pressions respiratoires maximales chez l'homme sain

M. Raux

(travail réalisé sous la direction de T. Similowski)

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

Introduction : La réponse d'un muscle à la stimulation nerveuse (secousse unique) est d'autant moins ample que ce muscle est actif. Au maximum, la secousse unique disparaît lorsque la contraction sous-jacente est maximale (recrutement motoneuronal complet). Ce phénomène (dit « extinction de la secousse unique » ou « *twitch occlusion* »), linéaire, vaut pour une activité sous-jacente volontaire. Appliqué au diaphragme (stimulation phrénique magnétique), il donne accès à une évaluation de la pression transdiaphragmatique (Pdi) maximale à partir d'efforts sous-maximaux. Nous avons évalué la validité d'une technique dérivée de TO dans le but de prédire la Pdi maximale (Pdi, max), mais aussi la pression oesophagienne (Poes) maximale (Poes, max) en s'affranchissant de la participation volontaire du sujet.

Matériel et méthodes : 9 sujets sains et naïfs de toute exploration diaphragmatique ont participé à l'étude. Les Pdi, max et Poes, max ont été mesurées par méthode statique, puis comparées aux valeurs prédites par l'application de la technique de TO lors d'efforts produits par le sujet de manière volontaire, orientés vers la production de Pdi puis de Poes (VOL) ; involontaire lors du premier (UNVOL1) puis du 10^e (UNVOL10) cycle inspiratoire suivant l'application d'une charge à seuil. Parallèlement, le degré de participation du diaphragme à l'effort produit a été évalué par le calcul du rapport pression gastrique (Pgas) divisée par Pdi.

Résultats : La secousse unique décroît de manière linéaire avec l'augmentation de l'effort inspiratoire au cours des procédures VOL et UNVOL1 mais pas au cours de la procédure UNVOL10, ne permettant pas de prédire de pressions maximales pour cette dernière. La Pdi, max peut être prédite par VOL, mais pas par UNVOL1. La Poes, max peut être prédite par UNVOL1 mais pas par VOL. Les rapports Pgas/Pdi ne sont jamais affectés par l'augmentation de l'effort. Le rapport Pgas/Pdi de la procédure UNVOL10 est significativement inférieur à celui des autres procédures.

Discussion : Le manque de puissance, déterminé par un effectif insuffisant, semble expliquer l'identité des Poes, max statique et prédite par UNVOL1, de même que l'identité des pentes des régressions linéaires VOL et UNVOL1. La Poes, max ne semble pas pouvoir être prédite par cette technique en raison du caractère inframaximal de la stimulation des muscles respiratoires extradiaphragmatiques. Le moindre recrutement motoneuronal, de même que la moindre participation diaphragmatique au cours de la procédure UNVOL10 semblent s'inscrire dans une stratégie d'épargne du diaphragme face à une charge prolongée.

Effets de la sérotonine sur les influx calciques indépendants du potentiel dans les cellules musculaires lisses de micro vaisseaux intra pulmonaires de rats en conditions normoxiques et hypoxiques

L. Rodat

(travail réalisé sous la direction de J.-P. Savineau et C. Guibert)

INSERM E 0356, Bordeaux, France.

Introduction : Deux phénomènes caractérisent la circulation pulmonaire : une faible pression (10 à 25 mmHg) et la vasoconstriction hypoxique pulmonaire (VHP). Lorsqu'elle se généralise, la VHP entraîne une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) qui concerne en premier les vaisseaux de résistance. Une augmentation de la concentration plasmatique en sérotonine (5-HT) pourrait être à l'origine de l'HTAP, mais la signalisation calcique à la 5-HT reste méconnue.

Matériel et méthodes : Cette étude s'appuie sur la comparaison du signal calcique à la 5-HT dans des cellules musculaires lisses (CMLs) de micro vaisseaux pulmonaires de rats sains (normoxie) et remaniés (séjour de trois semaines dans un caisson hypobare – condition d'hypoxie chronique). Des marquages immunofluorescents aux TRPC1,3, 4,5 et 6 ont été effectués.

Résultats : Les récepteurs 5-HT_{2A} semblent être impliqués dans la réponse calcique à la 5-HT en normoxie comme en hypoxie. L'intervention du calcium extracellulaire est manifeste, particulièrement en hypoxie chronique où son absence abolit toute réponse à la 5-HT. L'inhibition de la production d'acide arachidonique supprime la réponse à la 5-HT en condition normoxique. Les marquages anti-TRPCs sont plus faibles en condition hypoxique, et le marquage anti-TRPC1 disparaît complètement.

Discussion : Notre étude montre l'importance des influx de calcium extracellulaires dans la réponse à la 5-HT. Ces influx interviennent dans la VHP, ce qui suggère un rôle prédominant de la 5-HT dans l'HTAP.

Conclusion : La réponse calcique à la 5-HT en condition d'hypoxie chronique fait intervenir le calcium extracellulaire. Cet influx pourrait se faire via la voie de l'acide arachidonique par le biais de structures type TRPCs.

Etude de la viabilité de l'endothélium pulmonaire après ischémie chronique-reperfusion du poumon gauche chez le porc

E. Sage

(travail réalisé sous la direction de E. Fadel)

LCE, UPRES, Hôpital Marie Lannelongue, Plessis-Robinson, France.

Introduction : L'ischémie chronique du poumon est rencontrée dans la maladie thromboembolique pulmonaire chronique dont le traitement curatif est la thromboendartériectomie. Cette procédure reste cependant associée à un fort taux de morbi-mortalité du fait de l'apparition en post-opératoire d'un œdème pulmonaire et de l'absence de diminution des résistances pulmonaires malgré le succès de la désobstruction. Nous avons déjà montré que cet œdème était un œdème de reperfusion (Fadel E et coll. AJRCCM 1998) et que l'ischémie chronique altérait la fonction de l'endothélium des artères pulmonaires (Fadel E et coll. AJRCCM 2000). Le but de cette étude est d'explorer la viabilité des cellules endothéliales dans l'ischémie chronique et dans la reperfusion pulmonaire afin d'expliquer l'altération de la fonction endothéliale.

Matériels et méthodes : L'ischémie pulmonaire était obtenue par ligature de l'artère pulmonaire gauche du porc par sternotomie. La réanastomose de l'artère liée dans le tronc de l'artère pulmonaire a permis une reperfusion *in situ* du poumon ischémié. L'ischémie a été étudiée à 24 heures (Ischémie aiguë) et à 5 semaines (Ischémie chronique) après la ligature. Après 5 semaines d'ischémie, la reperfusion a été étudiée à 24 heures (IC-Reperfusion aiguë) et à 5 semaines (IC-Reperfusion chronique). Ces groupes ont été comparés à un groupe témoin. L'apoptose a été étudiée sur le lit artériel pulmonaire proximal et distal par immunomarquage (TUNEL) et par le dosage de l'activité Caspase3, après marquage des cellules endothéliales par le facteur VIII.

Résultats : Le taux de cellules apoptotiques augmente significativement dans les groupes ischémiés (IA 16,61 % ; $p < 0,0001$) (IC 14,81 % ; $p < 0,0001$) par rapport au groupe témoin (8,12 %). 24 heures après la reperfusion, l'apoptose va encore s'aggraver (IC-RA 42,92 % ; $p < 0,0001$) avant de revenir à la normale (IC-RC $p = NS$). Il existe une corrélation entre le taux de cellules apoptotiques du lit artériel proximal et distal ($R = 0,97$ et $p < 0,0001$).

Conclusion : L'obstruction chronique du lit artériel pulmonaire est associée à une augmentation de la mort par apoptose des cellules endothéliales pulmonaires. Durant la période qui suit la reperfusion du poumon ischémié, il existe une aggravation des phénomènes apoptotiques avant un retour à la normale à distance de la reperfusion. Cette altération de la viabilité des cellules endothéliales peut expliquer la dysfonction endothéliale pulmonaire rencontrée au décours de la thromboendartériectomie.

Effets du blocage du TNF α sur le développement des syndromes hépatopulmonaire et hyperkinétique chez le rat cirrhotique

L. Savale

(travail réalisé sous la direction de P. Hervé)

LCE, hôpital Marie Lannelongue, UPRES-EA-2705, France.

Introduction : La cirrhose biliaire secondaire provoque chez le rat cirrhotique le développement d'un syndrome hépatopulmonaire (SHP) associé à un syndrome hyperkinétique (SHK). Ces anomalies vasculaires pulmonaires et systémiques s'installent dans un contexte inflammatoire marqué d'une part par une élévation du taux de TNF α due à la translocation bactérienne et d'autre part par le recrutement de macrophages intra vasculaires pulmonaires (MIVP). Ces cellules sont le siège d'une induction de la NOS 2 pouvant être à l'origine de la production excessive de NO pulmonaire, médiateur central dans la physiopathologie du SHP. Le TNF α , dont l'implication dans le SHK a été démontrée est un puissant inducteur de la NOS2. Le but de ce travail est de tester l'effet du blocage du TNF α sur les isoformes 2 et 3 de la NO synthase pulmonaire et son influence sur le développement du SHP et du SHK.

Matériels et méthodes : Une ligature de la voie biliaire principale est réalisée chez des rats. Un groupe est traité par anticorps polyclonaux anti TNF α , un autre par IgG non spécifiques. On réalise après 5 semaines de traitement une étude hémodynamique, gazométrique et biochimique. Enfin, on étudie l'effet du traitement sur le recrutement des MIVP et sur l'expression protéique des NO synthases inductible et endothéliale pulmonaires.

Résultats : Les Ac anti TNF α ne préviennent pas mais diminuent la sévérité du SHP et du SHK. On note une diminution de la DAaO $_2$ ($19,5 \pm 10,7$ mmHg *vs* $25,2 \pm 10,7$, $P = 0,0266$), une diminution de l'index cardiaque (267 ± 59 *vs* $390 \pm 75,5$ ml/min/kg, $P < 0,0001$) et une augmentation des résistances pulmonaires totales (657 ± 145 *vs* 416 ± 104 mmHg/l/min/kg, $P < 0,0001$). Les Ac anti TNF α n'empêchent pas le recrutement de MIVP. Ils diminuent la surexpression protéique de la NOS2 mais également de la NOS 3 pulmonaire constatée chez le rat cirrhotique non traité.

Conclusion : Le traitement chronique par Ac anti TNF α diminue la surexpression des NO synthases inductible et endothéliale pulmonaires chez le rat cirrhotique et permet de réduire la sévérité des syndromes hépatopulmonaire et hyperkinétique.

Amélioration du débit expiratoire de toux par l'augmentation du volume inspiratoire

G. Trebbia

(travail réalisé sous la direction de F. Lofaso)

EA 2495 Département Universitaire de Recherche Clinique, Garches, France.

Introduction : Le déficit neuromusculaire s'accompagne d'une faiblesse des muscles respiratoires responsable d'une diminution de la capacité de tousser. A l'hôpital R. Poincaré, plusieurs méthodes d'aide à la toux associant kinésithérapie respiratoire et ventilation mécanique sont utilisées alors que leur utilité n'a jamais été validée. Une étude précédente suggérant que l'amélioration du Débit Expiratoire de Toux dépendait surtout de l'augmentation du volume inspiratoire, nous avons voulu montrer que l'utilisation des ventilateurs de domicile de nos patients pouvait améliorer leur (DET).

Matériels et méthodes : Nous avons testé les trois modes ventilatoires les plus couramment utilisés par nos patients : la ventilation volumétrique (Eole 3), la ventilation barométrique (Onyx) et la ventilation en relaxation de pression (Alpha 200 C). Ces trois modes ont été testés séparément puis en association avec la kinésithérapie respiratoire (méthode d'accélération du flux expiratoire [AFE]). Leurs effets séparés puis en association avec les AFE ont été testés sur la capacité vitale (CV) et le DET.

Résultats : Onze patients présentant un déficit neuromusculaire grave (CV < 40 %) ont été inclus. Un seul a été exclu en cours d'étude en raison de la survenue d'un épuisement respiratoire. La CV et le DET sont améliorés par les AFE et la ventilation mécanique, tous modes confondus, par rapport à l'état basal ($p < 0,02$). Bien que l'association des AFE à la ventilation n'améliore pas la CV, cette association améliore le DET ($p < 0,01$). En analyse séparée, chacun des trois modes améliore la CV par rapport à l'état basal, ce pendant, seul l'Alpha améliore le DET ($p < 0,08$).

Discussion : L'effet des AFE sur le DET est lié à l'augmentation de la pression motrice et non pas à l'augmentation des volumes inspirés comme c'est le cas pour la ventilation mécanique. La supériorité de l'Alpha sur l'amélioration du DET vis à vis des autres modes pourrait être expliquée par des conditions d'utilisation différentes (interface buccale et non nasale) et par le plus grand confort lié à la méthode d'insufflation du volume inspiratoire (débit inspiratoire adaptable, absence de pression de plateau).

Conclusion : Chacun des trois modes ventilatoires améliore la CV. Ce pendant, seule la ventilation en relaxation de pression améliore le DET qui reste le seul mode à confirmer l'hypothèse initiale. L'association de la ventilation et des AFE améliore la CV et le DET.

Les cellules dendritiques pulmonaires au cours des processus fibrosants –

Caractérisation et étude de l'interaction avec les fibroblastes

Y. Uzunhan

(travail réalisé sous la direction de P. Soler)

Unité INSERM U408, Paris, France.

Introduction : Les cellules dendritiques (CDs) jouent un rôle prépondérant dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire. Il est très probable qu'elles interviennent dans la physiopathologie des processus fibrosants. Notre travail a consisté à 1) caractériser par immunohistochimie la population des CDs dans les poumons de fibrose, en précisant leur nombre et leur état de maturation et 2) évaluer *in vitro* l'influence des fibroblastes pulmonaires sur la maturation des CDs.

Matériels et méthodes : 10 biopsies pulmonaires de fibroses (F) et 5 biopsies de témoins (T) ont été étudiées. Les co-cultures ont été réalisées avec des fibroblastes cultivés à partir de poumons T ou de F et des précurseurs CD34+ issus du sang de cordon. Les CDs ont été caractérisées *in situ* à l'aide d'anticorps spécifiques. Le phénotype des CD34+ a été analysé en cytométrie en flux après co-culture avec des fibroblastes à confluence.

Résultats : Trois populations de CDs ont été identifiées dans le poumon de fibrose : 1) de nombreuses CDs immatures CD1c+, DC-SIGN+, infiltrant l'interstitium, parfois au contact de fibroblastes, 2) des CDs matures moins nombreuses, exprimant le CD83, le CD86, ou le DC-LAMP, quasi-exclusivement dans les amas lymphocytaires et 3) des cellules de Langerhans (CD1a+ et Langerin+), présentes en grand nombre et exclusivement localisées à l'épithélium alvéolaire hyperplasique. Les fibroblastes semblent moduler *in vitro* le phénotype des CDs en diminuant l'expression de HLA DR et en favorisant le développement de cellules DC-SIGN+.

Discussion/Conclusion : Dans la fibrose, les CDs immatures DC-SIGN+ sont majoritaires. Ces cellules, plutôt impliquées dans la tolérance immunitaire pourraient rendre compte de la persistance et de la progression de la fibrose. Les CDs matures sont peu représentées *in situ*, sans qu'il soit possible d'exclure une migration importante de ces cellules vers les ganglions satellites. L'étude *in vitro* des interactions entre CDs et fibroblastes suggère que ces derniers seraient capables d'induire l'expression de DC-SIGN sur les CDs, et de réduire l'expression des molécules HLA de classe II et de costimulation (CD86).

Post extubation de patients BPCO : pression expiratoire négative (NEP) et pression d'occlusion (P0.1), ventilation non invasive par percussions intra pulmonaire (IPV)

F. Vargas

(travail réalisé sous la direction de G. Hilbert)

Laboratoire de physiologie EA 518, Bordeaux 2, France.

Introduction : L'échec d'une extubation programmée est responsable chez le patient BPCO, d'une augmentation de la morbidité et de la mortalité. Ainsi il serait utile : 1°) d'individualiser précocement les patients à haut risque de nouvelle insuffisance respiratoire aiguë (IRA) à l'issue du sevrage en recherchant une limitation du débit expiratoire (LDE) par la technique de NEP et en mesurant la P0.1 paramètre corrélé au travail respiratoire. 2°) d'évaluer une intervention thérapeutique précoce comme l'IPV.

Matériel et méthodes : Les patients BPCO sont inclus de façon prospective après l'extubation. L'hématose, P0.1 et LDE sous NEP sont mesurées, chez un patient, en position demi assise, ventilant spontanément, à la 1^e, 6^e, 24^e et 48^e heure en post extubation. Si une limitation de débit apparaît à un temps donné, les mesures suivantes ne sont pas réalisées et une séance de 30 minutes d'IPV est réalisée. Après la séance d'IPV, l'hématose, P0.1 et LDE sont mesurées.

Résultats : 18 patients ont été inclus. 14/18 (78 %) ont présenté une LDE dans un délai de 8 ± 10 heures. Il existe une relation entre LDE et P0.1 ($y = 9,7x + 26$; $r = 0,88$; $p < 0,05$). Huit patients vont présenter une IRA en post extubation dans un délai de 54 ± 17 heures. Ces 8 patients avaient une LDE plus importante et des chiffres de P0.1 plus élevés que ceux n'ayant pas d'IRA en post extubation (respectivement $79,4 \pm 10,1$ % vs $47,5 \pm 14,4$ % ; $5,2 \pm 0,6$ cmH₂O vs $1,9 \pm 0,7$ cmH₂O ; $p < 0,05$). 4 patients (22 %) n'avaient pas de LDE et n'ont pas présenté d'IRA en post extubation. Une séance d'IPV améliore la PaCO₂, la LDE et la P0.1 (respectivement $7,4 \pm 1,2$ kPa vs $7,0 \pm 1,1$ kPa ; $65,7 \pm 20,1$ % vs $31,2 \pm 24,1$ % ; $3,9 \pm 1,8$ cmH₂O vs $2,8 \pm 1,1$ cmH₂O ; $p < 0,05$).

Conclusions : La LDE et la mesure de P0.1 sont facilement réalisables chez des patients BPCO en post extubation. Une LDE sous NEP > 70 % associée à une P0.1 > 4 cmH₂O semblent être prédictifs d'IRA en post extubation. L'IPV serait susceptible d'améliorer la ventilation et de diminuer DE et la P0.1.