

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

M.-P. d'Ortho

Fondé en 1986, le Diplôme d'Études Approfondies de Biologie et Physiologie de la Respiration et de la Circulation (sous cette dénomination depuis 1996), a accueilli cette année encore une cinquantaine d'étudiants qui ont souhaité 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 était 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 2003-2004 a été la suivante :

– Conseil pédagogique : Charles Advenier, Jean-François Bernaudin, Christine Clerici, Thierry Chinet, Bruno Crestani, Philippe Devillier, Marie-Pia d'Ortho, 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 2004 sont réunis dans les pages qui suivent, comme c'est désormais une tradition dans la *Revue des Maladies Respiratoires*.

La réforme « License-Mastère-Doctorat » décidée pour des raisons d'harmonisation européenne est maintenant mise en oeuvre dans de nombreuses universités. Le DEA connaît donc une année charnière en 2004-2005, qui voit sa co-existence à Paris XII sous sa forme de DEA, avec la spécialité de master « Biologie, Physiologie, Pharmacologie Cardiovasculaire, de la Respiration et de l'Hémostase » co-habilitée Paris V, Paris VII, Paris XI et Paris XII, du master « Biologie Cellulaire, Physiologie et Pathologie » de Paris V et VII. Les enseignements des ces deux diplômes, équivalents au regard de la loi, seront communs cette année entre le DEA et la spécialité

Service de Physiologie, Explorations Fonctionnelles,
Hôpital Henri Mondor, Créteil, France.

Correspondance : M.-P. d'Ortho
Service de Physiologie-Explorations Fonctionnelles, Hôpital Henri
Mondor, 51 avenue Maréchal de Lattre de Tassigny, 94000 Créteil.
marie-pia.dortho@creteil.inserm.fr

du master. Cette spécialité correspond à la fusion du DEA avec ceux de « Biologie et Pharmacologie de l'Hémostase et du Vaisseau » (Paris V, VII et XI), et de « Pharmacologie Expérimentale Clinique » (Paris XI).

La composition de l'équipe pilotant l'option Respiration du DEA pour la campagne 2004-2005 sera la suivante :

– Conseil pédagogique : Charles Advenier, Bruno Crestani, Christophe Delclaux, Philippe Devillier, Dominique Israël-Biet, Marie-Pia d'Ortho, Vincent Lagente, Frédéric Lofaso, Roger Marthan, Carole Planés, Christian Straus, Gérard Zalcman ;

– Conseil scientifique : membres du conseil pédagogique + Jean-François Bernaudin, Pascal Chanez, Christophe Delacourt, Didier Dreyfuss, Estelle Escudier, Philippe Godard, Christian Melot, Thomas Similowski.

Le DEA connaît donc sa dernière année avec cette année universitaire ... mais renaît dès la rentrée 2005-2006 sous la forme de la spécialité de master « Biologie, Physiologie, Pharmacologie Cardiovasculaire, de la Respiration et de l'Hémostase » co-habilitée Paris V, Paris VII et Paris XII, qui sera commune aux masters « Biologie Cellulaire, Physiologie et Pathologie » de Paris V et VII, et « Sciences de la vie » de Paris XII (ce dernier intitulé aura sans doute été modifié dans l'intervalle, sans aucun retentissement sur la spécialité).

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, ou la validation d'une première année de master ;
– 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 conseil de la spécialité de master.

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 quatre à cinq jours consécutifs. Quatre modules, d'une semaine chacun se succèdent pendant l'année universitaire :

– Tronc commun, responsables : M.-P. d'Ortho, B. Crestani, R. Marthan. Ce module général comprend une initiation à la biologie cellulaire et moléculaire, ainsi que des thèmes communs aux trois options Cardiovasculaire, Respiration et Hémostase, comme la circulation pulmonaire ;

– Module de biologie, responsables : D. Israël-Biet, C. Planés, G. Zalcman ;

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

– Module de physiologie, responsables : C. Delclaux, F. Lofaso, C. Straus.

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 DEA.

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.

Transfert de gènes dans les cellules épithéliales des voies aériennes de la souris par la polyéthylèneimine lactosylée (PEI-Lac)

Application à la mucoviscidose

M. Abdelkarim

(Travail réalisé sous la direction de I. Fajac)

Laboratoire de physiologie respiratoire UPRES EA 2511, Paris, France.

Introduction : La mucoviscidose est une maladie monogénique, autosomique et récessive sévère dont le pronostic vital est lié à l'atteinte respiratoire. Elle n'est traitée actuellement que de façon symptomatique et pourrait bénéficier d'un traitement par thérapie génique. Mon travail a consisté à étudier l'efficacité du transfert de gènes *in vitro* et *in vivo* chez la souris à l'aide de différents vecteurs appelés polyéthylèneimine (PEI) synthétisés par le laboratoire de glycobiologie à Orléans qui sont des PEI 25 KDa branchée substituée à 5 % par des résidus glycosylés (lactose, mannose, glucose). D'autre part, on a utilisé comme contrôle positif une PEI de 22 KDa linéaire commercialisés sous le nom d'ExGen 500, connue pour son efficacité *in vivo*.

Matériels et méthodes : *In vitro*, les complexes ADN/Vecteur ont été préparés dans des solutions concentrées (condition analogue à celle employée *in vivo*) et comparés à des concentrations plus diluées utilisées d'habitude dans les modèles *in vitro*. *In vivo*, des souris ont été instillées par voie nasale, par les différents vecteurs complexés avec le plasmide contenant le gène de la luciférase ou le gène codant pour la GFP (*green fluorescent protéine*). Différents paramètres ont été testés afin d'optimiser l'efficacité de transfert de gènes dans les voies aériennes des souris. D'autre part, on a marqué notre vecteur PEI lactosylée (PEI Lac) avec une molécule fluorescente (FITC) pour observer la localisation des complexes.

Résultats : *In vitro*, les résultats montrent une grande efficacité des différents vecteurs sur la lignée cellulaire immortalisée Σ CFTE29o- (cellules épithéliales des voies aériennes avec mutation Δ F508 homozygote du gène CFTR). D'autre part, l'utilisation de Glucose 5 % comme solvant, pour les solutions concentrées, s'avère plus favorable que le NaCl 0,15 M. *In vivo*, l'étude de l'efficacité de transfection de la PEI Lac montre une efficacité de transfert de gènes comparable, au niveau de la trachée, à celle obtenue avec l'ExGen 500. D'autre part, la localisation des complexes plasmide/PEI Lac montre qu'un nombre plus important de vecteur complexé avec l'ADN réussit à entrer dans la cellule par rapport au nombre de cellules transfectées.

Discussion : Cette étude a permis de montrer que la faible expression du transgène est due à des étapes limitantes au niveau du trafic intracellulaire.

Effet de la fraction inspirée d'oxygène sur le recrutement alvéolaire chez les patients atteints d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë

J. Aboab

(Travail réalisé sous la direction de L. Brochard)

Laboratoire de physiologie respiratoire, Service de Réanimation Médicale, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France.

Introduction : L'utilisation d'une fraction inspirée d'oxygène ($F_{I}O_2$) élevée peut être responsable d'atélectasie de dénitrrogénéation. Dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA), des $F_{I}O_2$ élevées sont utilisées. Dans cette pathologie, la réouverture des territoires alvéolaires collabés et leur maintien ouvert sont des objectifs thérapeutiques importants. L'influence de la $F_{I}O_2$ sur le dérecrutement de ces territoires est débattue. L'objectif de cette étude était d'étudier le dérecrutement induit par l'utilisation de hautes $F_{I}O_2$ et de préciser si l'augmentation de la pression expiratoire positive (PEP) permettait d'éviter la survenue de dérecrutement.

Matériels et méthodes : 4 séquences de ventilation étaient réalisées successivement dans un ordre randomisé : une séquence de ventilation en basse PEP et $F_{I}O_2$ 100 % (BP100), une séquence de ventilation en basse PEP et $F_{I}O_2$ 60 % (BP60), une séquence de ventilation en haute PEP et $F_{I}O_2$ 100 % (HP100), et une séquence de ventilation en haute PEP et $F_{I}O_2$ 60 % (HP60). Au début et à la fin de chaque séquence une analyse de la mécanique respiratoire et des échanges gazeux était réalisée. L'analyse de la mécanique respiratoire était basée sur des courbes pression volume faites avec et sans PEP avec la méthode des débit lent oscillant. La compliance linéaire (Clin), le point d'inflexion inférieur (Plip), et le volume expiré lors d'une expiration prolongée (Vexpi) étaient mesurés lors de la réalisation de la courbe sans PEP. Le volume recruté par la PEP était calculé comme la différence de volume entre la courbe en PEP et la courbe sans PEP mesuré à un niveau de pression donné.

Résultats : 14 patients atteints d'un SDRA ont été étudiés, l'âge était de 59 ± 13 ans, l'IGS II était de 62 ± 21 . Les niveaux de PEP utilisés étaient de 5 ± 1 cmH₂O et de 14 ± 2 cmH₂O. Le volume recruté (68 ± 53 vs 39 ± 43 ml ; $p = 0,02$), le volume expiré lors d'une expiration prolongée et le rapport $PaO_2/F_{I}O_2$ (196 ± 104 vs 153 ± 83 mmHg ; $p = 0,03$) diminuaient en BP100. En BP60, ces paramètres ne variaient pas. En haute PEP, les paramètres restaient inchangés quelque soit la $F_{I}O_2$.

Conclusion : Il existe un dérecrutement lors d'une $F_{I}O_2$ à 100 % et d'une faible PEP. L'augmentation de la PEP permet de l'éviter. Compte tenu de l'importance du recrutement alvéolaire dans la prise en charge du SDRA, la diminution de la $F_{I}O_2$ ou l'augmentation du niveau de PEP doivent faire partie des objectifs thérapeutiques.

Implication de la voie humorale dans la survenue de la bronchiolite en transplantation pulmonaire

Modélisation par allogreffe trachéale chez le rat

J.-M. Baste

(Travail réalisé sous la direction de D. Plissonnier)

Pharmacologie de l'adaptation endothéliale vasculaire et de la dysfonction cardiaque INSERM U644, Rouen, France.

Introduction : La bronchiolite oblitérante (BO) est la principale complication à long terme de la transplantation pulmonaire. L'étiologie de la BO n'est pas déterminée et des travaux cliniques ont montré un lien avec la voie humorale.

L'hypothèse est que le rejet humoral joue un rôle dans la survenue de la bronchiolite oblitérante.

Le but de notre travail est de montrer l'effet de la présensibilisation humorale (par transfert d'anticorps) sur un tissu bronchique mis en situation allogénique.

Matériels et méthodes : Le modèle expérimental est la transplantation hétérotopique intrapéritonéale de trachée chez le rat (donneur BN, receveur LEWIS ou NUDE). Les animaux receveurs sont présensibilisés par transfert passif d'anticorps (Ac) LEW antiBN. Les animaux sont sacrifiés à J3, J10, J21 et J30. Chaque date de sacrifice comprend 3 groupes : isogreffe (BN/BN), allogreffe (BN/LEW), allogreffe avec transfert humoral. Deux groupes supplémentaires à J10 : NUDE avec ou sans transfert. Les greffons sont analysés en histologie qualitative, semi-quantitative (score épithélial) et quantitative (mesure des rapports de surface des composants de la trachée : lumière trachéale, prolifération sous-épithéliale, infiltration inflammatoire périadventicielle). L'immunohistochimie a utilisé les anticorps : antiIgG, anticytokératine, anti- α actine, antimacrophage (CD68), TUNEL.

Résultats : Au 3^e jour, on note des lésions épithéliales importantes dans les groupes allogreffes. Au 10^e jour, la prolifération débute dans le groupe allogreffe avec transfert d'Ac *vs* sans transfert ($p < 0,01$). L'infiltration inflammatoire périadventicielle est importante dans les deux groupes d'allogreffes. Le marquage est actine + et macrophage +. Au 21^e jour la prolifération sous-épithéliale est importante dans les 2 groupes allogreffes *vs* isogreffe, où elle est inexistante ($p < 0,01$). Elle est oblitérative lors du transfert d'Ac ($p < 0,01$) (actine+). L'infiltration inflammatoire périadventicielle est entretenue par le transfert d'Ac *vs* sans transfert ($p < 0,01$). Au 30^e jour les 2 groupes d'allogreffes sont semblables, oblitérés. Chez les animaux NUDE receveurs d'une trachée BN, le transfert d'Ac provoque une destruction de l'épithélium au 10^e jour, (TUNEL+).

Conclusion : Ce modèle de greffe trachéale se comporte comme une réponse proliférative oblitérative à une agression immune de la paroi. Le transfert d'anticorps antidonneur accélère le remodelage trachéal et oriente vers un rôle de la voie humorale.

Régulation par l'hypoxie des protéines du cytosquelette et des protéines des jonctions serrées dans les cellules épithéliales alvéolaires

D. Bouvry

(Travail réalisé sous la direction de C. Clerici)

INSERM U426, Faculté de Médecine X-Bichat, Paris, France.

Introduction : Dans le poumon, la réabsorption du liquide intra-alvéolaire est nécessaire pour des échanges gazeux optimaux. Les pneumocytes II (PII) transportent activement le sodium (Na) par voie transcellulaire du secteur alvéolaire vers l'interstitium entraînant un passage paracellulaire passif d'eau. Les jonctions serrées intercellulaires et le cytosquelette garantissent la polarité épithéliale indispensable à ce transport trans-cellulaire vectorialisé de Na. Leur étude en hypoxie a pour but de comprendre les mécanismes impliqués dans la diminution du transport trans-cellulaire de Na dans cette situation.

Matériels et méthodes : Les PII de rat sont étudiés au 5^e jour de culture primaire. Deux conditions d'hypoxie sont réalisées, exposition 24 heures à 3 % d'O₂ et 18 heures à 0 % d'O₂. Les cultures hypoxiques sont comparées aux cultures normoxiques contrôles réalisées simultanément. Les protéines du cytosquelette et des jonctions serrées sont étudiées en microscopie confocale et en western blot.

Résultats : En microscopie confocale, il existe une désorganisation modérée du cytosquelette d'actine en hypoxie. La chaîne α de la spectrine est présente au pôle apical des PII et est clivée en hypoxie avec présence significative d'un fragment à 120 Kd. L'expression de ZO-1 est significativement augmentée en hypoxie sans modification morphologique. L'expression de l'occludine et la perméabilité épithéliale au mannitol ne sont pas diminuées en hypoxie.

Discussion : La diminution du transport trans-cellulaire de Na sensible à l'amiloride en hypoxie est liée à une diminution de l'expression membranaire apicale du canal sodique épithélial (ENaC). ENaC est lié au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de la spectrine. L'hypoxie entraîne un clivage de la chaîne α de la spectrine probablement lié à une calpaïne. Nos résultats suggèrent que la diminution de l'expression membranaire de ENaC en hypoxie est liée à ce clivage. L'intégrité des jonctions serrées observée concorde avec le fait que la voie paracellulaire n'est pas impliquée dans la diminution du transport de Na en hypoxie.

Conclusion : L'absence d'anomalie majeure des jonctions serrées en hypoxie témoigne du maintien d'une polarisation épithéliale correcte dans ces conditions et confirme la relative bonne tolérance des PII à l'hypoxie. Le rôle du clivage de la spectrine dans la diminution de l'expression membranaire de ENaC en hypoxie semble intéressant mais doit être précisé par des expériences complémentaires.

Influence de *Pseudomonas aeruginosa* sur le transport des antibiotiques à travers l'épithélium des voies aériennes

J. Buyck

(Travail réalisé sous la direction de R. Matran)

EA 2689, Lille, France.

Introduction : L'épithélium des voies aériennes modifie la composition hydrique du mucus par des transports d'eau et d'ions. Il assure aussi le transport des molécules organiques vers la lumière bronchique et en particulier le transport de certains antibiotiques. Ces propriétés peuvent être perturbées dans le cas d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

Matériels et méthodes : Nous avons développé un modèle de trachée de souris en chambres de Ussing afin d'étudier les effets d'une souche de PA (PA01) sur les propriétés bioélectriques de l'épithélium trachéal et le transport de la tétracycline.

Résultats et discussion : L'utilisation de nouvelles chambres de Ussing adaptées à la trachée de souris n'a pas permis d'obtenir de réponses reproductibles aux différents sécrétagogues (amiloride, forskoline, UTP). Nous avons plus particulièrement vérifié la viabilité des tissus, le fonctionnement de la chaîne de mesure et la conception des mini-chambres de Ussing. Le problème majeur semble venir de la conception des chambres utilisées dans cette expérimentation.

Conclusion : Le modèle de la trachée de souris en chambre de Ussing s'est révélé beaucoup plus difficile à réaliser que ce que laissait penser la littérature. Dans l'état actuel de nos travaux, la faisabilité de ce modèle n'est pas bonne et, malgré diverses solutions envisagées pour améliorer notre technique, nous n'avons pas obtenu de résultats reproductibles permettant d'atteindre notre objectif. Nous avons récemment développé les modèles de cultures de cellules épithéliales à partir de polypes humains et de trachées de souris afin de s'affranchir des conditions techniques rencontrées avec la trachée isolée de souris.

Expression des récepteurs et des enzymes impliquées dans la synthèse des leucotriènes dans l'asthme

A.-S. Carrie

(Travail réalisé sous la direction de M. Pretolani)

INSERM U408, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Paris, France.

Introduction : L'asthme est une maladie des voies aériennes caractérisée par une inflammation et un remodelage bronchique chronique. Les cystéine-leucotriènes (Cys-LTs) et le LTB₄ ont une action bronchoconstrictrice, pro-inflammatoire et fibrogénique. Nous avons centré nos travaux sur l'expression des enzymes (5-LO et FLAP) régulant la synthèse des LTs et sur la localisation de leurs récepteurs (CysLT1-R/CysLT2-R et BLT1-R respectivement) *in vivo* sur des biopsies bronchiques de sujets sains et asthmatiques et *in vitro* sur une lignée de cellules épithéliales bronchique (BEAS-2B).

Méthodologie : Les récepteurs des LTs, 5-LO et FLAP ont été détectés par immunohistochimie sur des biopsies bronchiques de témoins (n = 10), d'asthmatiques traités par les glucocorticoïdes (GC) (n = 15) et d'asthmatiques non traités (n = 10). Les LTs ont été dosés dans leur lavage bronchique (LB). Parallèlement, l'ARNm et les protéines des récepteurs et des enzymes ont été déterminés par RT-PCR en temps réel et immunoempreinte dans des cultures de BEAS-2B.

Résultats : CysLT2-R et FLAP étaient surexprimés dans l'épithélium bronchique et CysLT2-R et BLT1-R dans la muqueuse bronchique des asthmatiques traités avec les GC, comparativement aux autres groupes. Seule l'expression de CysLT2-R corrélait négativement avec le VEMS. Les taux de CysLTs étaient augmentés et ceux de LTB₄ étaient diminués dans les LB d'asthmatiques traités ou non avec les GC, par rapport aux sujets témoins. *In vitro*, les cellules BEAS-2B expriment de façon constitutive 5-LO, FLAP et l'ensemble des récepteurs des LTs.

Conclusions et perspectives : Les récepteurs des LTs et les enzymes impliquées dans leur synthèse sont exprimés et modulés positivement, chez les asthmatiques modérés et sévères traités par corticothérapie. L'interaction entre les Cys-LTs, dont la synthèse reste soutenue chez ces patients, et leurs récepteurs, dont l'expression épithéliale est augmentée, pourrait favoriser et/ou entretenir l'inflammation et le remodelage tissulaire. *In vitro*, la lignée BEAS-2B possède également les enzymes nécessaires à la synthèse des LTs et exprime l'ensemble de leurs récepteurs, rendant ainsi possible la réalisation d'études fonctionnelles. Ce travail ouvre également de nouvelles perspectives concernant le mode d'action des antagonistes des Cys-LTs et leur application dans le traitement au long cours de l'asthme modéré et/ou sévère en complément aux GC.

Étude de l'activité protéasique dans le plasma et les expectorations de patients adultes atteints de mucoviscidose, modulation *in vitro* par les inhibiteurs sélectifs des phosphodiesterases de type IV

S. Jouneau

(Travail réalisé sous la direction de V. Lagente)

Unité INSERM U620, Rennes, France.

Introduction : La mucoviscidose est caractérisée par une infiltration bronchopulmonaire à polynucléaires neutrophiles associée à un état inflammatoire chronique conduisant au final à l'insuffisance respiratoire chronique et au décès. Cette étude a pour but d'étudier le profil protéasique dans les expectorations et le sang circulant des patients adultes atteints de mucoviscidose pour déterminer son rôle dans les lésions parenchymateuses pulmonaires. De plus, nous avons évalué la capacité des cellules des expectorations et du sang circulant à réagir à différents stimulants, et testé l'efficacité des inhibiteurs de phosphodiesterases de type 4 (IPDE4).

Matériels et méthodes : Nous avons analysé 58 ECBC et 28 plasmas de patients adultes atteints de mucoviscidose. Les MMPs ont été mises en évidence par zymographie puis quantifiées par ELISA comme les TIMPs, l'IL-8 et le TNF-alpha. L'EMMPRIN a été analysée par western blot. La totalité des cellules des expectorations et du sang circulant a été incubée en présence ou en l'absence de LPS, fMLP, ou PMA, et en présence ou en l'absence de rolipram (IPDE4). Les MMPs, IL-8 et TNF-alpha ont été analysés comme précédemment décrit.

Résultats : Des quantités importantes de MMP-9, de MMP-2 d'EMMPRIN et d'IL-8 ont été observées dans les surnageants d'expectoration alors que le TNF-alpha n'est présent qu'à de très faible taux. Cependant, aucune corrélation entre ces marqueurs et la sévérité de la mucoviscidose n'a pu être mise en évidence. En revanche, au niveau sanguin, chez les patients adultes stables, les taux de MMP-2 sont négativement corrélés à la sévérité de la maladie et ceux d'EMMPRIN, positivement. Nous n'avons pas observé de stimulation de la production des cytokines ou des MMPs induite par le LPS dans les cellules de l'expectoration alors qu'il augmente leur production dans le sang circulant. Seule la production de TNF-alpha induite par le LPS est diminuée par le rolipram. Le fMLP et le PMA induisent une augmentation de la quantité de MMP-9 et des taux d'IL-8.

Discussion : Au niveau plasmatique, chez les patients adultes stables atteints de mucoviscidose, une forte corrélation relie les taux de MMP-2 et d'EMMPRIN aux critères de sévérité. La stimulation du sang circulant met en évidence une augmentation de la production de MMP-9, d'IL-8 et de TNF-alpha. Le rolipram inhibe la production de TNF-alpha induite par le LPS à des doses moindres par rapport à la BPCO.

Conclusion : Les MMPs jouent bien un rôle dans la mucoviscidose. Le rolipram constitue une perspective thérapeutique anti-inflammatoire dans cette maladie.

Mise au point d'un modèle d'inflammation au niveau du parenchyme pulmonaire isolé

Application à l'étude des effets de différentes substances pharmacologiques

D. Lavarde

(Travail réalisé sous la direction de C. Advenier

et P. Devillier)

UPRES EA 220, Laboratoire de pharmacologie respiratoire, Paris V, France.

Introduction : La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une pathologie inflammatoire pulmonaire associée à une morbidité et une mortalité importante. Sa résistance aux corticoïdes aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* doit faire développer de nouvelles approches thérapeutiques capables de freiner la progression de la maladie. Nous avons mis au point un modèle d'inflammation pulmonaire *in vitro* qui permet de reproduire l'inflammation retrouvée au cours de la maladie et de tester l'éventuel effet l'anti-inflammatoire de molécules pharmacologiques en dosant les concentrations de cytokines (TNF α , IL-8) et la densité relative de MMP-9 du milieu de survie.

Matériel et méthode : Le parenchyme pulmonaire est issu de patients opérés d'un cancer bronchopulmonaire, préparé dans les heures suivant l'opération et conservé une nuit à 5 °C dans du milieu de survie (RPMI 1 640 + 100 UI/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine). L'inflammation est créée par l'exposition au lipopolysaccharide (LPS) à 1 μ g/ml sur des fragments de parenchyme pulmonaire mis en culture pendant quatre heures. Les taux de cytokines sont mesurés par la technique ELISA, l'activité des MMP-9 par zymographie.

Résultats : Nous avons montré que l'exposition des fragments de parenchyme pulmonaire au LPS entraîne la libération de médiateurs de l'inflammation (IL-8, TNF α) et stimule la production de MMP-9 par rapport aux fragments de parenchyme pulmonaire témoin non exposé au LPS. La dexaméthasone entraîne une diminution du taux de TNF α ($p = 0,0035$) et d'IL-8 ($p = 0,0392$) à 10^{-6} M. Le rolipram (inhibiteur de phosphodiesterase 4) entraîne une diminution du taux de TNF α à 10^{-5} M ($p = 0,02$) et 10^{-6} M ($p = 0,03$), mais aucun effet sur le taux d'IL-8 et sur la densité relative de MMP-9. La gliotoxine entraîne une diminution de la densité relative de MMP-9 ($p = 0,02$). Aucun effet anti-inflammatoire n'a été retrouvé par l'utilisation des antagonistes des récepteurs aux tachykinines (SR 14 2801, SR 140 333, SR 48 968) et à la bradykinine (SSR 260 142A, HOE 140).

Conclusion : Nous avons mis au point un modèle d'inflammation pulmonaire *in vitro* sur parenchyme pulmonaire humain qui reproduit certains aspects de l'inflammation de la BPCO et qui pourrait permettre d'étudier l'activité de nouvelles thérapeutiques potentiellement intéressantes pour son traitement.

Influence du TGF- β 1 sur la restauration de la différenciation de cellules épithéliales nasales humaines en culture après fermeture d'une blessure mécanique

D. Lazard

(Travail réalisé sous la direction de E. Escudier, A. Coste)

Unité INSERM 492, Créteil, France.

Introduction : La physiopathologie de nombreuses maladies respiratoires a pour origine une inflammation chronique des voies aériennes de conduction. La polyposse naso-sinusienne (PNS) constitue un modèle pathologique. Une agression de l'épithélium dans un contexte inflammatoire chronique pourrait être le point de départ du développement des polypes.

Matériels et méthodes : Un modèle de blessure réalisé *in vitro* sur des cultures primaires de cellules épithéliales nasales humaines en interface air-liquide a permis d'étudier la restauration de la différenciation des cellules épithéliales situées au niveau de la blessure après fermeture de celle-ci, au cours du temps (2, 5 et 12 jrs après la fermeture). La détection des trois principaux types cellulaires (cellules basales, sécrétoires et ciliées) a été réalisée par immunomarquage de marqueurs spécifiques, respectivement la cytokératine 14, la mucine MUC 5AC, et la tubuline β IV. Secondairement, une cytokine inflammatoire, le *transforming growth factor* (TGF- β 1), surexprimé dans la PNS, a été rajouté au milieu de culture des cellules pour mimer l'environnement inflammatoire chronique des polypes. Son action sur la différenciation a été étudiée selon les mêmes modalités.

Résultats : La zone blessée était initialement constituée de cellules basales en grand nombre et de cellules sécrétoires. La différenciation ciliée s'installait plus progressivement. L'ajout de TGF- β 1 diminuait significativement, à partir du cinquième jour, le nombre de cellules sécrétoires et ciliées sur la zone blessée et sur le reste du puits. Les cellules basales avaient tendance à augmenter en nombre et en taille à partir du douzième jour.

Discussion : Une zone blessée mécaniquement, en milieu de culture standard, était capable d'acquiescer *in vitro* une différenciation sécrétoire et ciliée mais en quantité inférieure à celles des contrôles. La supplémentation en TGF- β 1 diminuait de façon significative les différenciations sécrétoires et ciliées de toutes les cellules soumises à son action.

Conclusion : Ces résultats peuvent être rapprochés de la physiopathologie de la PNS. La différenciation d'une zone blessée, plus lente et incomplète par rapport au reste de l'épithélium, ainsi que l'effet additif négatif du TGF- β 1 sont à rapprocher des anomalies de différenciation caractéristiques de l'épithélium des polypes.

Effet sur la circulation pulmonaire du croisement de 2 modèles d'inflammation vasculaire pulmonaire : la cirrhose biliaire secondaire (CBS) à la ligature de la voie biliaire, et l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) induite par la monocrotaline (MCT)

J. Le Pavec

(Travail réalisé sous la direction de P. Hermé)

UPRES UE 2705, Clamart, France.

Introduction : La cirrhose et l'HTAP sont associées en pratique clinique de manière relativement fréquente. La ligature de la voie biliaire chez le rat permet de reproduire une CBS en 15-21 jours, et l'injection unique de MCT s'associe à la survenue d'une HTAP en 14 jours. Ces 2 modèles alimentent chacun une inflammation vasculaire pulmonaire dont il est difficile de prédire quel sera le résultat de leur superposition : soit la cirrhose aggrave. L'inflammation pulmonaire de la MCT et accentue l'HTAP, soit la vasodilatation pulmonaire secondaire à la cirrhose atténue les effets hémodynamiques de la MCT.

Matériels et méthodes : Nous avons étudié 4 groupes de 5 rats : 1 groupe MCT (60 mg/kg), 1 groupe CBS, 1 groupe MCT (60 mg/kg à J0) + CBS (ligature voie biliaire à J7), et 1 groupe contrôle (C). Tous les rats sont sacrifiés à J28 pour étudier les variables hémodynamiques, l'hématose, le poids du foie, de la rate, et des cavités cardiaques (rapport VD/VG + septum), le métabolisme du monoxyde d'azote (NO) par le NO exhalé (NO ex), le GMPc pulmonaire, l'expression pulmonaire des NO synthases inducible (NOSi) et endothéliale (NOSe). On y associe une étude histologique du foie et des poumons pour le compte des macrophages intravasculaires pulmonaires (MIVP) et l'étude de la musculation des artérioles distales.

Résultats : Le groupe CBS développe une cirrhose histologique, accompagné d'une augmentation de la différence alvéolo-artérielle en oxygène (DAa O₂) (CBS : 54,4 ± 12 ; C : 24,3 ± 5,7) concomitante à l'installation d'un syndrome hépatopulmonaire. Le groupe MCT développe une HTAP avec élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) (MCT : 42,4 ± 3,4 mm Hg ; C : 10,4 ± 1,3 mm Hg), des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) (MCT : 2 017,5 ± 417,7 mm Hg/min/kg/l ; C : 437,8 ± 69,4 mm Hg/min/kg/l) et élévation du rapport VD/VG + septum (MCT : 0,34 ± 0 ; 012 ; C : 0,2 ± 0,006). L'HTAP est associée à une musculation des artérioles distales. Le groupe MCT + CBS présente une cirrhose histologique, sans élévation de la PAPm (MCT + CBS : 16,2 ± 2,2 mm Hg ; C : 10,4 ± 1,3 mm Hg) ni des RVP (MCT + CBS : 410,1 ± 124,9 mm Hg/min/kg/l ; C : 437,8 ± 69,4 mm Hg/min/kg/l) malgré l'augmentation du rapport VD/VG + septum (MCT + CBS : 0,30 ± 0,06 ; C : 0,2 ± 0,006) et une musculation des artérioles distales. Cet effet pourrait être dû à une vasodilatation induite par le NO dont la synthèse est augmentée dans le groupe CBS (NO ex : CBS : 6,2 ± 0,3 ppb ; C : 2,8 ± 0,3 ppb) et le groupe MCT + CBS (NO ex : MCT + CBS : 4,4 ± 0,2 ppb ; C : 2,8 ± 0,3 ppb) alors que sa synthèse est diminuée dans le groupe MCT (NO ex : MCT : 1,6 ± 0,2 ppb ; C : 2,8 ± 0,3 ppb). L'augmentation du NO dans le groupe CBS est due à l'augmentation de l'expression NOSe (280 % contrôle) et NOSi (330 % contrôle) mais n'est attribuable qu'à l'augmentation de NOSi (710 % contrôle) dans le groupe MCT + CBS. Cette surexpression de NOSi dans le groupe MCT + CBS pourrait avoir lieu au sein des MIVP dont la proportion est aussi accrue dans ce groupe.

Conclusion : L'injection chez le rat de MCT suivie d'une ligature de la voie biliaire s'accompagne d'une cirrhose, d'une hypertrophie du ventricule droit et d'une musculation des artérioles distales sans HTAP. Cet effet pourrait être dû à une vasodilatation pulmonaire secondaire à une hyperproduction de NO par la NOSi au sein d'une proportion accrue de MIVP.

Étude des effets diaphragmatiques des anesthésiques halogénés au cours du développement post-natal chez le rat

M. Le Guen

(Travail réalisé sous la direction de G. Orliaguet)

Laboratoire d'Anesthésiologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

Introduction : Le développement post-natal du muscle diaphragmatique conduit à de profondes modifications ultrastructurales et métaboliques. L'influence des agents volatiles halogénés (AVH) sur la contraction, la relaxation ou la cinétique des ponts d'actine-myosine (AM) au cours de cette maturation est actuellement méconnue et fait l'objet de cette étude.

Matériels et méthodes : La contraction de bandes diaphragmatiques prélevées à J3, J10 et 8 semaines, correspondant à des stades de maturation distincts, a été analysée en présence de différentes concentrations d'AVH.

Résultats : Des différences significatives de mécanique diaphragmatique sont relevées selon l'âge. De plus, l'administration d'AVH entraîne un effet inotrope positif modéré uniquement chez le nouveau-né. Il existe par contre un effet lusitrope négatif chez l'adulte, non retrouvé chez l'enfant quel que soit son âge.

Discussion : L'effet inotrope positif observé n'est pas lié à une augmentation du nombre de ponts AM ou de la force unitaire par pont, mais plutôt à une activité enzymatique plus élevée et à une plus grande disponibilité du calcium intra-cytosolique. La modification des isoformes des chaînes lourdes ou légères de myosine explique les différences observées en fonction de l'âge.

Conclusion : Les effets des AVH sur la bande diaphragmatique dépendent de l'âge de l'animal et se distinguent largement de ceux observés sur le myocyte.

Effet préventif d'un donneur de NO, le DETANONOate[®], sur les troubles du développement pulmonaire induits par l'hyperoxie chez le rat nouveau-né

E. Lopez

(Travail réalisé sous la direction de P.-H. Jarreau et C. Delacourt)

Unité INSERM 492, Créteil, France.

Introduction : La dysplasie broncho-pulmonaire humaine est une maladie du développement pulmonaire du prématuré humain avec atteinte de l'alvéolisation et de la microvasularisation. Ces troubles pourraient être partiellement liés à une diminution du taux de *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Dans un modèle expérimental de troubles du développement alvéolaire chez le rat nouveau-né, nous avons voulu tester les effets préventifs d'un donneur de NO (le DETANONOate[®]) capable de stimuler la synthèse de VEGF, sur la survie des animaux et les anomalies de développement pulmonaire.

Matériels et méthodes : Le DETANONOate[®] est administré par voie intrapéritonéale à des rats nouveaux-nés maintenus en hyperoxie de J0 à J6 ou J10. L'expression de VEGF est mesurée par ELISA pour la protéine et par RT-PCR pour le transcrite. L'évaluation des effets de l'hyperoxie et du DETANONOate[®] est réalisée d'une part sur la croissance pondérale et la survie et d'autre part sur l'étude de l'alvéolisation par morphométrie, de la microvascularisation par immunomarquage PECAM-1 et de l'inflammation par l'afflux cellulaire dans le lavage bronchoalvéolaire (LBA).

Résultats : L'hyperoxie provoque une surmortalité, une inflammation des voies aériennes et une diminution de la croissance pondérale, associées à des anomalies de l'alvéolisation, de la microvascularisation pulmonaire. Le DETANONOate[®] entraîne une augmentation de la protéine du VEGF ($p = 0,02$) et de son ARNm ($p = 0,01$) après 6 jours en hyperoxie, mais ne prévient pas les lésions induites par l'hyperoxie.

Discussion/Conclusion : Le DETANONOate[®] augmente le taux de VEGF à 6 jours d'hyperoxie. Cette augmentation de VEGF ne prévient pas les troubles du développement alvéolaire. L'importance de l'agression réalisée dans ce modèle ou une augmentation trop faible du VEGF expliquent peut-être l'absence d'effet biologique du VEGF.

Expression de la laminine-5 par les cellules épithéliales alvéolaires

B. Louadah

(Travail réalisé sous la direction de M.-P. d'Ortho)

Unité INSERM 492, Créteil, France.

Introduction : La laminine-5 ($\alpha3\beta3\gamma2$) est spécifiquement exprimée dans les lames basales des épithéliums ayant des fonctions de sécrétion ou de protection. Elle est essentielle pour l'ancrage des cellules épithéliales à la matrice extracellulaire. Son implication dans les processus de la migration cellulaire du kératinocyte a été démontrée. Notre objectif est l'étude de l'implication de la laminine-5 dans la réparation épithéliale alvéolaire.

Matériel, méthodes : Ce travail a été réalisé *in vivo* à partir de tissus pulmonaires prélevés chez le rat, normal et exposé à la bléomycine (à différents temps suivant l'injection), et *in vitro* sur culture primaire de cellules épithéliales alvéolaires de rat et culture de la lignée A549. La détection de la laminine-5 repose sur les techniques de western-blot, d'immunohistologie et immunocytochimie. Les anticorps utilisés sont un don généreux de P. Rousselle (ICBP, CNRS, Lyon).

Résultats : *In vivo*, nous avons montré la présence de la laminine-5 dans le parenchyme pulmonaire de rat normal, dans sa forme mature ainsi probablement que dans sa forme précurseur de haut poids moléculaire. Le marquage immunohistologique révèle un marquage diffus, intense et homogène dans l'ensemble des parois alvéolaires. L'étude *in vitro* a montré que la laminine-5 est synthétisée par les cellules épithéliales alvéolaires (CEA) de rat en culture primaire, ainsi que par les cellules de la lignée A549, et qu'elle est déposée dans leur matrice extracellulaire. Nous avons retrouvé un produit de clivage (LG 4/5) de la laminine-5 dans les milieux conditionnés de CEA et de A549, libéré au cours de la culture.

Discussion : La laminine-5 est présente dans les parois alvéolaires pulmonaires normales, synthétisée par les cellules épithéliales alvéolaires. Pour analyser l'expression de la laminine-5 au cours de la migration des cellules épithéliales alvéolaires, nous utiliserons d'une part un modèle de réparation *in vitro* après blessure mécanique de monocouche à confluence, d'autre part un modèle *in vivo* d'agression/réparation par injection de bléomycine. Des analyses par immunohistologie de coupes de tissu pulmonaire provenant des rats traités par la bléomycine ainsi qu'immunocytochimie sur des cultures analysées après la blessure sont en cours de réalisation, elles donneront des résultats plus précis concernant la modulation de l'expression de la laminine-5 au cours de la réparation *in vivo* et *in vitro*.

Régression des lésions d'hypertension artérielle pulmonaire par hyper-débit après traitement chirurgical chez le porc

O. Mercier

(Travail réalisé sous la direction de E. Fadel)

Laboratoire de chirurgie expérimentale, UPRES Maladies vasculaires pulmonaires, Université Paris-Sud, Le Plessis Robinson, 92, France.

Introduction : L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) post-embolique est liée à l'obstruction chronique d'une partie du lit artériel pulmonaire. Le territoire perfusé subit l'augmentation des pressions et reçoit tout le débit cardiaque. Il en résulte une vasculopathie par hyper-débit qui pourrait expliquer la persistance dans certains cas de l'HTAP après endartériectomie pulmonaire. Le but de cette étude est de reproduire chez le porc les conditions rencontrées après la levée de l'hyper-débit pulmonaire et d'étudier l'évolution des lésions de vasculopathie par hyper-débit.

Matériels et méthodes : La fistule aorto-pulmonaire provoquant l'HTAP par hyper-débit était maintenue 5 semaines. La levée de l'HTAP consistait en une fermeture de la fistule. 3 groupes de 10 porcs ont été comparés : un groupe HTAP, un groupe HTAP traité étudié 5 semaines après la levée de l'HTAP et un groupe témoin. Les comparaisons ont porté sur l'hémodynamique, la vasomotricité de l'artère pulmonaire gauche *in vitro*, la morphométrie et la quantification au sein d'homogénats pulmonaires gauches de l'endothéline-1 (ET-1), ETA, ETB, NOSe et NOSi par Western blot et RTQ-PCR, de l'angiotensinogène-1 et de son récepteur Tie2 par Western blot.

Résultats : L'HTAP par hyper-débit provoque un épaississement de la média des artérioles pulmonaires distales ($55,6\% \pm 1,2$, $p < 0,0001$), une diminution de leur relaxation endothélium-dépendante ($51,9\% \pm 5,42$) ainsi qu'une sur-expression de ET-1 ($p < 0,01$) et de l'angiotensinogène-1 ($p = 0,049$). Après traitement de l'HTAP, l'épaississement de la média régresse de 75 % ($p < 0,001$) avec une normalisation de la relaxation endothélium-dépendante ($67,6\% \pm 5,4$, $p = 0,044$), et du niveau d'expression de l'ET-1 et de l'angiotensinogène-1.

Conclusion : Un mois après la levée de l'HTAP par hyper-débit, il existe une régression de la vasculopathie acquise durant la période de shunt. Les systèmes endothéline-1 et angiotensinogène-1 semblent avoir un rôle prépondérant dans la formation et la régression de ces lésions. Ils sont donc des cibles thérapeutiques potentielles pour accélérer la régression de cette vasculopathie.

Hypersécrétion de mucus dans la mucoviscidose et les dilatations des bronches : Relation avec l'inflammation neutrophilique

M. David

(Travail réalisé sous la direction de D. Dusser et P.-R. Burgel)

Laboratoire de Physiologie Respiratoire, UPRES EA2511, Hôpital Cochin-Paris, France.

Introduction : La présence d'un mucus visqueux dans les voies respiratoires est caractéristique de la mucoviscidose. La contribution des mucines à l'hypersécrétion de mucus est controversée. L'infiltration de l'épithélium bronchique par des polynucléaires neutrophiles est décrite, mais ses relations avec la synthèse et la sécrétion de mucines n'ont pas été étudiées.

Matériels : Nous avons étudié les bronches distales issues de prélèvements pulmonaires chirurgicaux de sujets adultes atteints de mucoviscidose obtenus lors d'une transplantation pulmonaire (n = 18), de sujets atteints de dilatation des bronches localisée (n = 8), et de sujets témoins non-fumeurs (n = 10).

Méthodes : Les sections ont été colorées par le bleu d'Alcian/PAS, mettant en évidence les glycoprotéines de mucus, et marquées à l'aide d'anticorps dirigés contre la mucine MUC5AC et l'élastase neutrophile. L'analyse morphométrique du contenu endoluminal bronchique et des marquages épithéliaux pour le bleu d'Alcian/PAS, la mucine MUC5AC et l'élastase neutrophile, ont permis l'étude de l'hypersécrétion de mucines et des relations avec l'infiltration de l'épithélium par les polynucléaires neutrophiles.

Résultats : Un contenu endoluminal occupant plus de 50 % de la lumière bronchique est présent dans 147/231 bronches (63,6 %) des sujets atteints de mucoviscidose et n'est retrouvé que dans 22/85 bronches (25,8 %) des sujets atteints de dilatation des bronches et 1/39 bronches (2,6 %) des sujets témoins. Le volume d'épithélium coloré par le bleu d'Alcian/PAS ou marqué pour la mucine MUC5AC est augmenté chez les sujets atteints de dilatation des bronches et les sujets atteints de mucoviscidose ($P < 0,001$ par comparaison aux témoins). Le nombre de polynucléaires neutrophiles intraépithéliaux est augmenté chez les sujets atteints de mucoviscidose ($P < 0,001$ par comparaison aux témoins, $P < 0,05$ aux sujets atteints de dilatation des bronches). Pour les sujets atteints de dilatation des bronches et de mucoviscidose, le nombre de polynucléaires neutrophiles intraépithéliaux est inversement corrélé à la présence de glycoprotéine de mucus dans l'épithélium ($r = -0,57$; $P < 0,005$) et positivement corrélé au contenu endoluminal bronchique ($r = 0,56$; $P < 0,005$).

Conclusion : L'expression des glycoprotéines de mucus (dont la mucine MUC5AC) est augmentée dans l'épithélium des sujets atteints de mucoviscidose ou de dilatation des bronches. Le recrutement de polynucléaires neutrophiles dans l'épithélium pourrait contribuer à la synthèse et à la sécrétion des mucines.

Pharmacologie des monoamines et contrôle de la respiration au cours du sommeil

C. Prenat

(Travail réalisé sous la direction de P. Escourrou)

EA 3544 IFR 75 ISIT, Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry, France.

Introduction : Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil est une pathologie fréquente et encore incurable. La sérotonine joue un rôle important dans l'inhibition du circuit neuronal générant l'atonie musculaire au cours du sommeil. Or c'est l'atonie musculaire des muscles dilatateurs du pharynx qui est à l'origine des apnées obstructives. L'hypothèse est donc qu'une diminution de la transmission sérotoninergique serait responsable de ces apnées.

Matériel et méthodes : On utilise des souris sauvages et mutantes pour le récepteur 5-HT_{2A} à la sérotonine (prédominant sur les motoneurons de la respiration) et pour la monoamine oxydase A (qui dégrade la sérotonine). Afin de voir le nombre d'apnées de ces souris en fonction des stades de sommeil, on enregistre le sommeil (en implantant des électrodes d'électroencéphalogramme) et la respiration (en utilisant la pléthymographie corporelle totale). Les signaux sont envoyés sur ordinateur par système EMBLA. De plus, les souris sont traitées pharmacologiquement, ou mises en condition d'hypoxie.

Résultats : Les souris 5-HT_{2A} ont plus d'apnées et plus longues que les souris sauvages. Les sauvages traitées au MDL (antagoniste du récepteur 5-HT_{2A}) ont au contraire moins d'apnées et moins longues que les non traitées.

Les souris mutantes pour la MAO-A ont plus d'apnées que les souris sauvages. Les souris traitées à l' α -MPT ou à la pCPA (inhibiteurs de synthèse de la noradrénaline et de la sérotonine respectivement) ont moins d'apnées que les non traitées.

Discussion : On trouve des résultats inverses pour une invalidation génétique du récepteur 5-HT_{2A} et pour son blocage pharmacologique. Cela peut s'expliquer par une compensation par le récepteur 5-HT_{2C} ou par une anomalie de développement des mutantes.

Les souris mutantes pour la MAO-A ont moins d'apnées que les sauvages, ce qui est opposé à ce qu'on s'attendait à trouver. Ceci peut être dû à une compensation par la MAO-B.

Conclusion : L'étude du récepteur 5-HT_{2A} est donc très prometteuse : les souris mutantes pour ce récepteur sont un très bon modèle animal apnéique.

À long terme, cette étude devrait permettre de développer une pharmacologie de substances actives sur les apnées obstructives du sommeil.

Présence pulmonaire de sCD87 au cours du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)

J.-M. Pujalte

(Travail réalisé sous la direction de M. Chignard)

Défense Innée et inflammation IP/Inserm 0336 (Dir. : M. Chignard), Paris, France.

Introduction : Différents travaux montrent que la forme soluble du récepteur de l'urokinase (CD87) est surexprimée dans divers milieux biologiques lors de pathologies tumorales ou inflammatoires, pour lesquelles elle peut être un marqueur de gravité. Nous avons recherché sCD87 dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) au cours du SDRA et analysé les différentes formes solubles du récepteur, en relation avec divers paramètres clinicobiologiques.

Matériels et méthodes : Ce travail est réalisé à partir de LBA de patients souffrants de SDRA (n = 16). Un dosage ELISA de sCD87 est réalisé sur les LBA et les sérums. L'analyse des différents fragments du récepteur soluble est réalisée par une technique d'immunoprécipitation et d'immuno-empreinte appliquée au LBA et à l'urine des patients.

Résultats : sCD87 est présent dans les LBA de patients atteints de SDRA (moyenne : $4,01 \pm 5,82$ ng/mL). Sa concentration dans le LBA n'est pas corrélée à celle dans le sérum des patients, mais elle est corrélée à la concentration en protéines totales dans le LBA, ainsi qu'au nombre de polynucléaires neutrophiles. L'analyse qualitative de sCD87 dans les LBA montre une prédominance de la forme complète à 3 domaines (D1D2D3), alors que l'analyse des fragments retrouvés dans les urines de deux patients montre une répartition égale entre forme complète et forme tronquée (D2D3). Sur la population étudiée, nous ne trouvons pas de corrélation entre sCD87 dans le LBA et la sévérité et/ou la mortalité due(s) au SDRA.

Discussion : sCD87 est, pour une part, vraisemblablement produit spécifiquement au niveau pulmonaire au cours du SDRA, et les compartiments plasmatiques et urinaires ne reflètent pas cette production. Sa libération sous forme soluble est probablement secondaire au clivage de la forme membranaire par des protéinases, éventuellement leucocytaires, ou par des phospholipases.

Conclusion : À ce stade de notre étude, sCD87 n'apparaît pas être un marqueur de la sévérité et/ou un facteur de prédictibilité de la mortalité secondaire au SDRA, mais l'inclusion d'un plus grand nombre de patients permettrait de vérifier la validité de cette hypothèse.

Effet stimulant du liquide broncho-alvéolaire (LBA) au cours du Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (ARDS) sur la sécrétion de Keratinocyte Growth Factor (KGF) et d'Hepatocyte Growth Factor (HGF) par les fibroblastes pulmonaires

C. Quesnel

(Travail réalisé sous la direction de M. Dehoux)

Unité INSERM 408 (Directeur : M. Aubier), Paris, France.

Introduction : Les mécanismes responsables d'une évolution vers la fibrose dans l'ARDS sont peu connus. Une production inadaptée d'HGF et de KGF pourrait favoriser le défaut de réparation alvéolaire observé. Notre objectif a été de préciser lors des agressions alvéolaires aiguës (ALI) et des ARDS le rôle du LBA dans la production d'HGF et de KGF par les fibroblastes pulmonaires.

Matériels et méthodes : Nous avons analysé 37 LBA : témoins non ventilés (TNV, n = 9), témoins ventilés (TV, n = 7), ALI (n = 10), ARDS (n = 11). Ces LBA ont été utilisés, après analyse cytologique et dosage d'HGF et KGF, comme stimulant sur une culture de fibroblastes humains (MRC5). La sécrétion dans les surnageants de culture et l'expression de l'ARNm d'HGF et de KGF ont été évaluées par ELISA et RT-PCR quantitative en temps réel. L'effet de l'IL-1 β , TGF- β et PGE2 contenus dans les LBA a été étudié par blocage spécifique.

Résultats : Le LBA des ALI et ARDS stimulent la synthèse d'HGF (+177 %) et de KGF (+44 %) sans différence entre les 2 groupes. Cet effet n'est corrélé ni aux scores de gravité ni à la mortalité. La sécrétion d'HGF est corrélée à la concentration en IL-1 β du LBA ($r = 0,7$, $p < 0,0001$). L'inhibition de l'IL-1 β du LBA diminue la sécrétion de HGF (-35 %) et de KGF (-19 %), $p < 0,05$. Il existe une tendance à l'inhibition de cette sécrétion par blocage du récepteur TGF- β .

Discussion : L'absence de modification de l'effet stimulant en fonction du degré d'agression pourrait être due à un effectif de patient encore insuffisant. L'effet du LBA reste à évaluer sur les fibroblastes pulmonaires provenant de patient avec ALI et ARDS.

Conclusion : Le LBA des patients en ALI ou ARDS stimule la synthèse d'HGF et de KGF par les fibroblastes. Cet effet médié en partie par l'IL-1 β n'augmente pas en fonction de la sévérité de l'agression. Nos résultats renforcent l'hypothèse d'une production inadaptée d'HGF et de KGF dans l'ARDS et le rôle physiopathologique accordé à l'IL-1 β dans les mécanismes de réparation alvéolaire.

Expression de la protéine CFTR au niveau de l'épithélium des bronches, des bronchioles et des alvéoles du poumon humain

A. Régnier

(Travail réalisé sous la direction de T. Chinet)

UPRES EA 220, Boulogne, France.

Introduction : Nous avons observé que la sécrétion de chlore stimulée par la forskoline était significativement plus élevée au niveau de cellules épithéliales bronchiolaires qu'au niveau de cellules épithéliales bronchiques provenant du même patient. Une hypothèse est que cette différence proviendrait d'une hyperexpression de CFTR au niveau bronchiolaire. L'objectif principal de ce travail a été de comparer les expressions bronchique et bronchiolaire de CFTR par immunohistochimie. Les objectifs secondaires ont été de décrire cette expression au niveau des cellules épithéliales des bronches aux espaces alvéolaires et de comparer plusieurs anticorps et techniques d'immunomarquage.

Matériels et méthodes : Nous avons testé sur du tissu pulmonaire humain non mucoviscidose : 3 anticorps anti-CFTR (MAB 24-1, MAB 13-1, MATG 1104), 1 technique sur tissus paraffinés pour MAB 24-1 et MAB 13-1 (révélation en peroxydase) avec 2 modes de fixation (formol et Bouin), et 1 technique sur tissus congelés (révélation à l'APAAP) pour MATG 1104. Nous avons quantifié le marquage de façon semi-quantitative (de 0 à 4) à tous les étages (bronche, bronchiole, alvéole), et comparé ce marquage au niveau bronchique et bronchiolaire grâce à 2 lecteurs indépendants.

Résultats : Parmi les 3 anticorps utilisés, c'est MAB 24-1 qui donne la meilleure qualité d'immunomarquage (rapport spécificité/intensité), quel que soit le mode de fixation. La protéine CFTR est exprimée au pôle apical des cellules ciliées des épithéliums bronchique et bronchiolaire, et par les pneumocytes I et II. Il n'existe pas d'hyperexpression de CFTR au niveau bronchiolaire.

Discussion : L'expression de CFTR au pôle apical des cellules épithéliales ciliées bronchiques chez l'homme a été rapportée dans la littérature. En revanche, cette expression au niveau bronchiolaire et surtout alvéolaire a été peu étudiée. La différence d'effet de la forskoline sur la sécrétion de chlore dépendante de CFTR constatée sur les cultures bronchiques et bronchiolaires ne s'explique pas par une hyperexpression de CFTR au niveau bronchiolaire. Elle pourrait s'expliquer par : une différence d'effet (puissance) de la forskoline sur la concentration d'AMPc, une différence d'expression d'autres canaux chlore (ORCC ?), une différence de potentiel transmembranaire apicale ou une différence d'activité intracellulaire du chlore.

Conclusion : Il n'existe pas d'hyperexpression de la protéine CFTR au niveau bronchiolaire. Il existe une forte expression de CFTR au niveau alvéolaire

Évaluation d'un perfluorocarbone et du surfactant exogène comme vecteurs d'un traitement antibiotique intrapulmonaire dans un modèle de pneumopathie à *Pseudomonas aeruginosa* chez le rat

O. Tuil

(Travail réalisé sous la direction de G. Saumon et D. Dreyfuss)

IFR 02, EA-3512, Faculté Bichat, Paris, France.

Introduction : Les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique sont grevées d'une lourde morbi-mortalité. L'administration intratrachéale d'antibiotique permettrait une meilleure efficacité au site d'action et une moindre toxicité systémique. Mais, la délivrance de l'antibiotique au poumon profond est peu efficace et nécessite l'utilisation d'un vecteur. Dans ce travail, nous avons évalué l'efficacité d'un perfluorocarbone, le Perfluoro-octyl bromide (PFOB), et du surfactant exogène (S) comme vecteur de la colimycine (col) dans un modèle de pneumopathie à *Pseudomonas aeruginosa* chez le rat.

Matériels et méthodes : Après instillation dans la bronche souche droite d'une solution contenant $8,10^7$ colonies formant unité (cfu) de *Pseudomonas aeruginosa*, les rats étaient ventilés pendant 4 heures. Puis, ils recevaient par instillation intratrachéale différentes modalités thérapeutiques. À la 10^e heure, les rats étaient sacrifiés. Le poumon droit, le poumon gauche, la rate, le lobe médian du foie et une hémoculture étaient prélevés pour mise en culture. Les différents groupes étudiés étaient : PFOB seul, PFOB + col, 200 µl de S seul (Surf200), col dans 200 µl de S (Surf200 + col), 500 µl de S seul (Surf500), col dans 500 µl de S (Surf500 + col). La dose de col était toujours de 0,6 mg. La concentration de S était de 25 mg/ml.

Résultats : Dans les groupes PFOB + col et Surf500 + col, il y a une diminution significative du compte bactérien du poumon droit par rapport aux groupes PFOB ($0,4 \cdot 10^9$ versus $2,4 \cdot 10^9$ Log de cfu, $P = 0,04$) et Surf500 ($1,5 \cdot 10^7$ versus $7 \cdot 10^8$ Log de cfu, $P < 0,001$). Seul le groupe Surf500 + col présentait une diminution de la dissémination systémique. Il n'y a pas de différence entre les groupes Surf200 et Surf200 + col.

Discussion : La réduction du compte bactérien avec le PFOB semble insuffisante pour un usage clinique. De plus, la répétition des doses nécessite l'évaporation du PFOB. Le S est efficace, s'il est administré à un volume suffisant. L'efficacité du S pourrait être liée à une résorption systémique.

Conclusion : L'utilisation de PFOB et de S permet une délivrance de la col au parenchyme pulmonaire dans ce modèle de pneumopathie chez le rat.

Phénotype respiratoire des souriceaux mutants hétérozygotes *Phox2b* ± : un modèle du syndrome d'hypoventilation centrale congénitale ?

V. Vaubourg

(Travail réalisé sous la direction de J. Gallego)

Laboratoire de Neurophysiologie et de développement INSERM E9935,
Hôpital Robert Debré 48 Bd Serrurier 75019 Paris, France.

Introduction : Le gène *Phox2b* intervient dans la mise en place des structures dérivées des crêtes neurales. C'est le gène majeur du syndrome d'hypoventilation centrale congénitale (HVACC). Les nourrissons atteints de ce syndrome présentent des anomalies respiratoires (hypoventilations) pendant le sommeil. Notre objectif est d'étudier la respiration des mutants murins *Phox2b* à 0 et 2 jours de vie (P0, P2).

Matériels et Méthodes : Les souriceaux sont testés par une méthode non invasive de pléthysmographie corps entier barométrique qui permet de calculer les variables respiratoires (V_e , V_t , T_{tot}) et d'étudier les apnées. Ils sont soumis à un test hypercapnique (8 % CO_2) : 6 minutes d'air puis 6 minutes de gaz, la séquence est répétée trois fois.

Résultats : À P0 et à P2 les *Phox2b* ± présentent une durée d'apnées significativement plus longue que celle des témoins sauvages *Phox2b* +/+ ($p < 0,05$ et $p < 0,01$) respectivement, particulièrement en phase d'air ($p < 0,05$). Ces anomalies n'évoluent pas de façon significative entre P0 et P2. À P0 et à P2, les souriceaux *Phox2b* +/+ et *Phox2b* ±, augmentent V_e en réponse au CO_2 . Cette réponse ne présente pas de différence significative en fonction du génotype.

Discussion : La mutation hétérozygote *Phox2b* entraîne dès la naissance des anomalies du contrôle respiratoire chez le souriceau : ventilation diminuée et apnées, anomalies respiratoires observées dans l'HVACC. Ces anomalies ne présentent pas de changement au cours des deux premiers jours de vie. Cependant, l'augmentation de la ventilation en réponse au CO_2 n'est pas différente selon le génotype, ce qui distingue le phénotype murin *Phox2b* du HVACC. Cette différence peut être due au fait que la mutation de *Phox2b* chez la souris n'ait pas les mêmes conséquences fonctionnelles que les expansions d'alanine de *Phox2b* constatées chez les patients atteints d'HVACC.

Conclusion : Le phénotype HVACC et le phénotype murin *Phox2b* ± présentent certaines analogies qui peuvent permettre l'étude des mécanismes physiopathologiques de ce syndrome.