

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 vingt-cinq d'étudiants dans l'option Respiration, qui ont souhaité faire une initiation à la recherche. La coordination générale du DEA était assurée par 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 2004-2005 a été la suivante :

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

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

Cette composition est reconduite pour l'année 2005-2006.

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 2005 sont réunis dans les pages qui suivent, comme c'est désormais une tradition dans la Revue des Maladies .

La réforme "License-Mastère-Doctorat" décidée pour des raisons d'harmonisation européenne est maintenant mise en oeuvre dans l'ensemble des universités. 2004-2005 était la dernière année d'existence du D.E.A.... qui renaît sous une forme de spécialité de deuxième année de Master (dite M2), intitulée « Biologie, Physiologie, Pharmacologie Cardiovasculaire, de l'Hémostase et de la Respiration » co-habituée Paris V, Paris VII, Paris XI et Paris XII. 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). Trois parcours sont individualisés au sein de cette spécialité : Car-

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

diovasculaire, Hémostase et Respiration, correspondant chacun à la validation d'une Unité d'Enseignement (UE) commune aux trois parcours (tronc commun d'Intégration), de trois UE spécifiques (Biologie, Physiologie et Pharmacologie Respiratoire) et d'une UE libre à choisir parmi les UE des autres spécialités de Master offertes par chacune des universités partenaires. 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 en laboratoire reste un élément essentiel de la validation de la formation, puisqu'il représente deux tiers de la note finale. Il 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 cette année.

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 encore, 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

La spécialité de M2 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 elle.

Étude de la toxicité pulmonaire de l'oxygène dans le syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA), rôle du monoxyde d'azote (NO)

C. Hafsaoui

(Travail réalisé sous la direction de G. Capellier et de F. Deschaseaux)

EA 3920 « Physiologie et cardiovasculaire et prévention » Pr J. Regnard,
FR 133 « ingénierie biologie cellulaire et tissulaire » Pr P. Tiberghien.

Introduction : Le SDRA est une pathologie fréquente en réanimation, grevée d'une forte mortalité. Du fait d'une atteinte sévère de la membrane alvéolo-capillaire, cette pathologie nécessite de fortes concentrations d'oxygène en ventilation mécanique pour corriger l'hypoxémie. Cette hyperoxie génère des radicaux libres de l'oxygène. Le NO, sécrété au cours de l'exposition à l'oxygène ou des agressions inflammatoires, pourrait avoir un rôle toxique ou protecteur. Nous nous proposons d'étudier chez des patients SDRA, le rôle du NO dans ce processus inflammatoire sous hyperoxie

Matériels : Nous avons collecté le sang et les lavages broncho-alvéolaires (LBA) de patients SDRA (n = 6), non SDRA (n = 4) selon les critères de l'ARDS network et de patients de pneumologie non ventilés (n = 3).

Méthodes : Des analyses anatomopathologiques de chaque LBA ont été réalisées. Par ailleurs, nous avons quantifié le NO intra-cellulaire par cytométrie de flux (CF) via le Diaminofluorescéine, et extra-cellulaire par chimiluminescence. L'étude de l'expression de la NO synthétase inductible a également été évaluée par CF. Les cytokines intervenant dans le processus inflammatoire ont été quantifiées par une technique d'immunofluorescence.

Résultats : La cellularité des LBA des patients non SDRA et SDRA était significativement augmentée comparée à celle du groupe pneumologie. La majorité des cellules étaient des polynucléaires neutrophiles à la différence du groupe pneumologie où l'on retrouve essentiellement des macrophages. Cette cellularité semble spécifique de la gravité de l'inflammation et a diminué à 72 heures. De fortes quantités de NO intra-cellulaire (corrélées au NO extra-cellulaire) ainsi que d'IL-8 et d'IL-6 ont été détectées dans le groupe SDRA et non SDRA contrairement aux malades de pneumologie. Il existait une corrélation entre PNN, NO intra-cellulaire et rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$.

Conclusion : Une proportion importante de PNN, une forte concentration de NO intra-cellulaire et de cytokines pro-inflammatoires IL-8, voire IL-6, sont le signe d'un SDRA grave (corrélation au rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$).

Perspectives : Ces relations permettent d'asseoir le rôle du NO dans ces circonstances. La poursuite de l'étude de sa cinétique au cours du temps préciserait sa relation avec l'hyperoxie.

Interaction entre différentes modalités de ventilation mécanique et un foyer alvéolaire radiomarqué

N. de Prost

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

EA 3512 (directeur : D. Le Guludec), faculté Xavier Bichat, Université Paris VII.

Introduction : Les différentes stratégies employées lors de la ventilation mécanique influencent considérablement l'évolution des patients. Ceci est lié à la survenue de lésions pulmonaires spécifiquement liées à la ventilation, mais aussi à la façon dont la ventilation affecte l'évolution des pneumonies bactériennes. Certains adjuvants (surfactant, perfluorocarbones (PFC)) pouvant interférer avec le foyer pulmonaire ont été envisagés pour le traitement topique des pneumonies. Pour l'ensemble de ces raisons, nous avons documenté par scintigraphie chez le rat les modifications d'un foyer d'œdème alvéolaire radio-marqué en fonction de différentes modalités de ventilation mécanique.

Méthodes : Les rats étaient trachéotomisés. Une solution d'albumine marquée au ^{99m}Tc était instillée de façon à obtenir une inondation alvéolaire focalisée. Après trente minutes de ventilation conventionnelle (VC), les rats étaient ventilés pendant trois heures selon différentes modalités : groupe témoin VC 8 ml/kg (n = 10), ventilation spontanée (n = 8), ventilation liquide partielle à 2 (n = 8) ou 4 (n = 8) mL de PFC, instillation de 500 μl de surfactant (n = 8) ou de sérum salé isotonique (n = 6) en VC, pression expiratoire positive (PEP) à 8 cmH_2O (n = 8), volume courant élevé (30 ml/kg, n = 8) sans PEP, volume courant élevé (24 ml/kg) avec (n = 6) et sans PEP (n = 5). La dissémination intrapulmonaire et systémique du traceur était ensuite étudiée.

Résultats : La VC, la ventilation spontanée, l'administration de surfactant ou de sérum salé n'affectaient pas le foyer. L'utilisation d'un volume courant élevé associé à un volume télé-expiratoire faible (sans PEP) favorisait la redistribution homo et controlatérale du foyer alvéolaire. L'utilisation d'une PEP permettait de stabiliser le foyer. Les modes de ventilation à haut volume courant favorisaient la fuite systémique du traceur. L'administration de PFC (4 ml) entraînait une redistribution transitoire du traceur et une fuite systémique.

Conclusion : Certaines modalités ventilatoires affectent l'évolution spatiale d'un foyer alvéolaire et la perméabilité alvéolaire à l'albumine (fuite systémique). Ces résultats donnent des arguments supplémentaires pour l'utilisation de la PEP lors de la ventilation des pneumonies, suggèrent que l'interaction du PFC avec le foyer est limitée, et donc que de la recherche de nouvelles préparations pour le traitement topique des pneumonies est indispensable.

Effets des variations de pH sur la régulation du tonus musculaire de la trachée de Cobaye

B. Planquette

(Travail réalisé sous la direction du Dr Christophe Faisy)

UPRES EA 220 : Mécanismes moléculaires et Pharmacologiques de l'inflammation bronchique, Faculté de médecine Paris-Ouest. Paris.
Pr Charles Advenier.

Introduction : L'acidose tissulaire provoquée par l'inflammation des voies aériennes favorise l'hyperréactivité bronchique (HRB) dans l'asthme et la bronchite chronique obstructive. Les fibres neurosensorielles C de la muqueuse bronchique sont sensibles aux H^+ . Leur stimulation provoque la libération de tachykinines. Les ASIC (*Acid Sensing Ion Channel*) sont des canaux activés par les ions H^+ présents sur ces fibres C qui participent à la nociception chez l'Homme. Ils sont inhibés par les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) indépendamment des cyclo-oxygénases. Le but de notre travail est d'étudier les mécanismes impliquant des ASIC dans la réactivité bronchique en milieu acide.

Matériels : Des trachées de Cobaye sont utilisées pour étudier l'effet d'une baisse de pH sur la tonicité et la réponse musculaire à l'acétylcholine (ACh).

Méthodes : Les segments trachéaux sont placés dans des cuves à organes. Après équilibrage, le pH est abaissé à 6,8 pendant 10 minutes. La réponse contractile à l'ACh avec ou sans inhibiteurs des tachykinines ou des ASIC est étudiée.

Résultats : L'acidité induit une relaxation (-0,42 g ; $p < 0,05$) via une synthèse de NO puisque celle-ci est inhibée par le L-NAME. L'implication des ASIC est suggérée par l'absence de relaxation après traitement par certains de leurs inhibiteurs. L'épithélium et les tachykinines ne sont pas impliqués dans cet effet. Il existe une hyperréactivité à l'ACh à pH 6,8 dépendante des tachykinines ($p < 0,05$) car celle-ci est inhibée par leurs antagonistes. Les antagonistes des ASIC (amiloride, gadolinium) inhibent aussi cette HRB.

Discussion : La baisse du pH à 6,8 active un mécanisme broncho-protecteur relaxant liée à une probable stimulation d'ASIC musculaires (ASIC 1a ou 1a/3). L'acidose provoque une sécrétion de tachykinines responsable d'HRB par le biais d'une ou plusieurs isoforme(s) d'ASIC présente(s) sur les fibres C.

Conclusion : L'acidose tissulaire favorise l'HRB malgré l'activation d'un mécanisme protecteur. Les ASIC transmettent le signal acide après activation par les ions H^+ . La distribution tissulaire des isoformes d'ASIC correspondrait à un polymorphisme fonctionnel témoignant de rôles physiologiques distincts et spécifiques.

Jonctions communicantes et hypertension artérielle pulmonaire hypoxique chronique

M. Lafargue

(Travail réalisé sous la direction de C. Guibert)

Laboratoire de Physiologie Cellulaire Respiratoire, INSERM E 356,
(Pr. R. r Marthan) – Université Victor Segalen – Bordeaux II.

Introduction : L'exposition à une hypoxie chronique conduit au développement d'une hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) chronique. Les cellules musculaires lisses (CMLs) et leur coordination par les jonctions communicantes permettant un couplage direct cellulaire semblent jouer un rôle important. Nous avons cherché à valider un modèle de cinétique d'HTAP chez des rats hypoxiques chroniques puis vérifié l'expression et la localisation des connexines (Cx) 37, 40 et 43 au niveau d'extraits de petites artères intrapulmonaires en fonction de la durée d'exposition à l'hypoxie.

Matériel et méthodes : Les rats hypoxiques sont obtenus par utilisation d'un caisson hypobare à 0,5 atm pour différentes durées de séjours (2, 4, 7, 14 et 21 jours). La pression artérielle pulmonaire moyenne est mesurée par cathétérisme. L'expression et la localisation des Cx sont recherchées par Western Blot (WB) sur prélèvements d'artères et marquage immunofluorescent sur culture cellulaire.

Résultats : L'hypoxie chronique induit une modification de pression artérielle pulmonaire moyenne significative à partir d'une semaine d'hypoxie : $15,6 \pm 0,81$ vs. $18,8 \pm 0,37$ (J + 7) et $30,4 \pm 1,02$ mmHg (J + 21). Les 3 isoformes de Cx sont retrouvées sur les marquages sans différence significative d'expression en fonction de la durée d'exposition à l'hypoxie. Le marquage Cx 37 est négatif sur la culture de CMLs.

Conclusion et perspectives : Ce travail a permis de valider un modèle d'HTAP hypoxique chronique chez le rat, ainsi que sa cinétique d'apparition. On retrouve par WB la présence des Cx 37, 40, et 43. Par immunofluorescence, nous avons pu observer que le muscle lisse n'exprime pas la Cx 37 confirmant sa spécificité endothéliale. Des études portant sur le rôle fonctionnel des Cx dans la vasomotricité en condition normoxique et hypoxique pourront se révéler particulièrement intéressantes.

Chemosensibilité à l'oxygène des souriceaux nouveau-nés présentant une mutation hétérozygote pour le facteur de transcription *Phox2b*

N. Ramanantsoa

(Travail réalisé sous la direction de J. Gallego)

INSERM U676 (Directeur : P. Gressens), Paris.

Introduction : Le gène *Phox2b* est déterminant dans le développement du système nerveux autonome. C'est le gène majeur du syndrome d'hypoventilation alvéolaire centrale congénitale (SHACC), une maladie rare caractérisée par une hypoventilation pendant le sommeil, une absence de réponse au CO₂ et une réponse à l'hypoxie variable selon les patients. Les études antérieures montrent que les souriceaux mutants *Phox2b +/-* ont une réponse atténuée au CO₂ et une hypoventilation pendant le sommeil. La réponse à l'hypoxie est normale. Notre objectif est d'évaluer l'activité tonique des chémorécepteurs périphériques des souriceaux *Phox2b +/-* par inhalation d'oxygène pur.

Matériels et méthodes : Dans l'expérience 1, les variables respiratoires et les apnées de 67 souriceaux *Phox2b +/-* et 69 souriceaux sauvages *Phox2b +/+* sont mesurées à deux jours de vie par pléthysmographie barométrique corporelle totale balayée. Chaque souriceau est soumis à deux tests hyperoxiques (12 minutes d'air puis 3 minutes 100 % O₂) suivi de 12 minutes d'air. L'inhibition ventilatoire à l'hyperoxie est évaluée par le minimum de VE en pourcentage de la valeur de base sur les 3 minutes d'hyperoxie. Dans l'expérience 2, la température centrale des 21 souriceaux est enregistrée de manière invasive durant le même protocole expérimental.

Résultats : L'inhibition ventilatoire à l'hyperoxie est plus importante chez les mutants que chez les sauvages ($p < 0,0001$) et résulte de l'augmentation significative de TTOT, plus importante chez les mutants. L'inhibition est brève chez les sauvages alors qu'elle se prolonge au-delà du retour à la normoxie chez les mutants. L'hyperoxie ne modifie pas de façon significative la température corporelle.

Discussion : L'activité tonique des chémorécepteurs périphériques est épargnée par la mutation. L'inhibition ventilatoire plus forte et plus longue chez les mutants montre une instabilité ventilatoire importante qui peut être une conséquence de leur sensibilité diminuée au CO₂. L'hyperoxie soutenue modifie d'autres facteurs (métabolisme, circulation cérébrale) augmentant la PCO₂ tissulaire et ainsi stimulant les chémorécepteurs centraux.

Conclusion : Le phénotype des *Phox2b +/-* est conforme au phénotype des patients atteints du SHACC dans son expression modérée.

Inhibition du développement des lésions de bronchiolite oblitérante par thérapie cellulaire dans un modèle murin d'allogreffe trachéale hétérotopique

E. Brian

(Travail réalisé sous la direction du Pr. D. Plissonnier, CHU Rouen).

Unité INSERM U644. Pr. Thuillez, Faculté de médecine et pharmacie Rouen.

Introduction : Notre hypothèse est que, en transplantation pulmonaire, la bronchiolite oblitérante (BO) est une prolifération cellulaire endoluminale survenant en réponse à une agression immunologique de l'épithélium respiratoire. Le but de ce travail était de prévenir la prolifération par une thérapie cellulaire autologue au receveur de façon à provoquer une cicatrisation épithéliale précoce du greffon.

Matériels et méthodes : Le modèle expérimental était la greffe de trachée hétérotopique entre rats de souches Brown-Norway (BN) et Lewis (Lew). La thérapie cellulaire consistait en l'injection de 10⁶ cellules médullaires mononuclées Lew aux receveurs Lew. Six groupes ont été réalisés : allogreffes avec thérapie cellulaire intra-veineuse (IV) à J0 et J2, allogreffes avec thérapie cellulaire intra-péritonéale (IP) à J0 et J2, allogreffes avec traitement par le surnageant acellulaire du prélèvement médullaire à J0 et J2, allogreffes sans traitement, isogreffes avec thérapie cellulaire IV à J0 et J2, isogreffes sans traitement. Les rats furent sacrifiés à J10, J30 ou J45. L'analyse histologique était qualitative et quantitative par morphométrie, centrée sur l'obstruction de la lumière du greffon.

Résultats : Les isogreffes ne présentaient pas d'obstruction, avec ou sans thérapie cellulaire autologue. Comparativement, les allogreffes sans traitement étaient obstruées à $92 \pm 4\%$ à J30 et à $87,67 \pm 5,68\%$ à J45. La thérapie cellulaire IV permettait de réduire significativement et de manière spécifique l'obstruction trachéale des allogreffes à J30 ($66,9 \pm 10,4\%$ $p = 0,049$) et à J45 ($63,86 \pm 4\%$ $p = 0,034$).

Conclusion : Ce modèle murin d'allogreffe trachéale hétérotopique a permis dans cette étude de tester de façon efficace l'idée originale d'une thérapie cellulaire autologue au receveur pour prévenir la survenue des lésions oblitérantes du rejet au moins jusqu'à 45 jours.

Modulation de l'expression de métalloprotéase matricielle 1 (MMP-1) par l'hème oxygénase 1 (HO-1) dans les cellules épithéliales alvéolaires

M. Desmard
(Travail réalisé sous la direction de J. Boczkowski)

Unité INSERM 700 (Directeur : Marina Pretolani), Paris.

Introduction : La MMP-1 est une protéase impliquée dans le développement de l'emphysème pulmonaire post-tabagique, et dont l'expression est induite par des stimuli oxydants et inflammatoires. L'HO-1 est une enzyme qui dégrade l'hème d'une part en fer et bilirubine, molécules anti-oxydantes, d'autre part en CO, doté des propriétés anti-inflammatoires. Des données de la littérature suggèrent que l'HO-1 pourrait avoir un rôle protecteur *vis-à-vis* du développement de l'emphysème pulmonaire. L'objectif de ce travail est d'évaluer *in vitro*, sur la lignée humaine A549, et *in vivo* chez la souris, si l'HO-1 module négativement l'expression de la MMP-1. Cette modulation pourrait expliquer l'effet protecteur de l'HO-1 *vis-à-vis* de l'emphysème.

Matériels et méthodes : L'expression et l'activité de l'HO-1 ont été modulées pharmacologiquement par des porphyrines et par transfection des cellules avec le cDNA de l'HO-1. L'expression de MMP-1 a été induite par l'interleukine-1 β (IL-1 β). Les expressions d'HO-1 et de MMP-1 ont été évaluées aux niveaux ARNm, protéine et activité enzymatique.

Résultats : L'expression, basale et stimulée par l'IL-1 β , de MMP-1 est diminuée *in vitro* par l'induction de HO-1, sans modification concomitante de l'expression des inhibiteurs de MMPs, TIMP-1 et -2. Ces résultats sur la MMP-1 ne sont pas retrouvés *in vivo*. *In vitro*, l'effet de l'HO-1 n'est *a priori* pas lié à ses propriétés antioxydantes, car il n'est pas reproduit par un antioxydant, la N-acetylcysteine. En revanche, l'effet de l'HO-1 est mimé par un donneur de CO, le CORM-2, qui diminue en plus directement l'activité de la MMP-1.

Discussion-conclusion : Ces résultats montrent que l'HO-1 diminue *in vitro* l'expression de la MMP-1, probablement *via* le CO. Des études complémentaires devront être effectuées afin notamment d'examiner la pertinence de ces données *in vivo* dans un modèle d'emphysème pulmonaire

Détection par RT-PCR des micrométastases ganglionnaires cervicales au cours des cancers ORL

M. Lefevre
(Travail réalisé sous la direction du Pr J-F Bernaudin)

Service d'Histologie-Biologie tumorale, Hôpital Tenon, UPRES EA3499, Paris.

Introduction : L'atteinte ganglionnaire est le facteur pronostique des cancers ORL. L'étude anatomopathologique est le standard de référence mais méconnaît les micrométastases. Le but de notre travail est la mise en évidence d'une éventuelle dissémination micrométastatique ganglionnaire cervicale au cours des cancers ORL par une technique de biologie moléculaire (RT-PCR).

Matériels : 31 patients présentant un carcinome ORL, soit 42 curages cervicaux et 1 328 ganglions.

Méthodes : RT-PCR (détection de l'ARNm de la cytokeratine 19) comparée à l'étude anatomopathologique (HES).

Résultats : La RT-PCR révèle 15,3 % de ganglions micrométastatiques. Les quantités relatives détectées dans les ganglions HES-/PCR + sont significativement plus faibles que celle détectées dans les ganglions HES +/RT-PCR +.

Discussion : La RT-PCR a permis de révéler la présence de micrométastases dans des proportions statistiquement plus élevées que par l'étude anatomopathologique. Ce taux de micrométastases est comparable aux données de littérature. Pour près d'un tiers des patients cette étude par RT-PCR a modifié leur statut ganglionnaire, nombre d'entre eux passant même d'un statut N0 à N + (N0 mol +). Un suivi prolongé est nécessaire afin d'évaluer la valeur pronostique de ces micrométastases et de pouvoir éventuellement adapter leur prise en charge thérapeutique.

Conclusion : La technique de RT-PCR est très sensible pour détecter les micrométastases cervicales. La présente série de ganglions cervicaux en rapport avec un cancer ORL est, à l'heure actuelle, celle qui comporte le plus de patients, le plus de ganglions et le plus grand nombre de ganglions par curage. Il serait donc d'un très grand intérêt de suivre l'évolution de cette cohorte, et tout particulièrement les patients dont le statut ganglionnaire a été modifié après étude moléculaire. Si actuellement l'examen anatomopathologique HES demeure le « Gold Standard » pour l'évaluation du statut ganglionnaire et la prise en charge thérapeutique, la technique de RT-PCR pourrait à terme devenir la nouvelle référence.

Étude de la mécanique et de l'énergétique diaphragmatique au cours du diabète chez le rat

N. Salvi

(Travail réalisé sous la direction de O Langeron)

Laboratoire d'anesthésiologie (Directeur : Pr B Riou), Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, Paris VI.

Introduction : Le diabète est associé à une atteinte des fibres musculaires striées squelettiques périphériques et une cardiopathie, mais l'atteinte du muscle diaphragmatique reste méconnue. Nous avons étudié les fonctions mécaniques et énergétiques du diaphragme chez le rat diabétique au cours du repos et de la fatigue.

Matériel et méthodes : Nous avons comparé des rats témoins à des rats diabétiques à 4 et 8 semaines d'évolution de la maladie. Des bandes de diaphragme ont été stimulées en tétanus *in vitro* (solution de Krebs-Henseleit, 29 °C, pH 7,40). Les caractéristiques mécaniques ont été mesurées. Les caractéristiques énergétiques ont été calculées par les équations de Hill et Huxley.

Résultats : Les performances diaphragmatiques (contraction et relaxation) sont altérées au cours du diabète à 8 semaines. Cette atteinte est associée à une meilleure résistance à la fatigue et une récupération plus rapide.

Discussion : L'association de l'altération des performances et de la meilleure résistance à la fatigue pourrait s'expliquer par des modifications ultra-structurales des cellules diaphragmatiques au cours de la maladie (augmentation du contingent de fibres musculaires lentes de type I). Ces modifications pourraient être médiées par une activation de la voie métabolique cellulaire du récepteur nucléaire PPAR δ .

Conclusion : Le diabète est à l'origine d'un remodelage musculaire qui touche le myocarde, les muscles striés squelettiques mais aussi le diaphragme. Ce remodelage dépend du stade de la maladie et est à l'origine d'une atteinte de la contraction et de la relaxation de ces muscles.

Étude *in vivo* de l'interaction intra-pulmonaire entre une bactérie, *Pseudomonas aeruginosa*, et une levure, *Candida albicans*, chez le rat

D. Roux

(Travail réalisé sous la direction de G. Saumon et J-D. Ricard)

EA 3512 (Directeur : Dominique Le Guludec), Université Paris VII.

Introduction : Des données cliniques suggèrent une interaction entre *C. albicans* et *P. aeruginosa* chez les malades ventilés présentant une pneumopathie. Nous avons étudié si la présence de l'un de ces deux micro-organismes favorisait une pneumopathie à l'autre germe chez le rat.

Matériels et méthodes : Les deux types d'interaction ont été étudiés en évaluant l'effet de l'instillation de *C. albicans* chez des rats présentant une pneumopathie à *P. aeruginosa* par rapport à des rats sains et l'effet de l'instillation d'une faible quantité de *P. aeruginosa* chez des rats présentant ou non une colonisation broncho-pulmonaire à *C. albicans*. Les poumons des rats ont été évalués du point de vue macroscopique, microscopique et microbiologique. Des dosages pulmonaires et plasmatiques de TNF- α et d'IL-6 ont été effectués.

Résultats : Aucune pneumopathie à *C. albicans* n'a pu être produite chez les rats ayant une pneumopathie à *P. aeruginosa*. En présence d'une colonisation broncho-pulmonaire à *C. albicans*, l'incidence de la pneumopathie à *P. aeruginosa* était plus importante (33 % contre 4 %, $p < 0,05$). Les dosages de TNF- α et d'IL-6 étaient plus élevés dans les groupes colonisés à *Candida albicans*.

Discussion : L'impossibilité de produire une pneumopathie à *C. albicans* peut être due à son inexistence chez le rat immunocompétent ou à un manque de recul lié à la mortalité de ce modèle de pneumopathie à *P. aeruginosa*. La présence du *C. albicans* dans les voies aériennes favorise la survenue de la pneumopathie à *P. aeruginosa*. Cet effet pourrait s'expliquer soit par une interaction directe entre les deux germes, soit par le biais des cytokines sécrétées en présence de *C. albicans*.

Conclusion : La colonisation broncho-pulmonaire à *C. albicans* est un facteur de risque de pneumopathie à *P. aeruginosa*.

Le SOM230, un analogue de la somatostatine, inhibe le développement de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris

R. Borie

(Travail réalisé sous la direction de B. Crestani)

INSERM unité 700, Faculté de médecine Paris 7, Paris.

Introduction : Les fibroses pulmonaires se caractérisent par la prolifération et l'activation des fibroblastes. La somatostatine est un peptide endogène qui inhibe la prolifération de différents types cellulaires. L'octreotide (Sandostatine®), un analogue stable de la somatostatine, lie essentiellement les récepteurs SST2, possède des propriétés anti-fibrosantes dans différents modèles et inhibe in vitro la prolifération et la synthèse de TGF β par les fibroblastes pulmonaires humains. Le SOM230 (Novartis), un nouvel agoniste de la somatostatine, lie les récepteurs SST1, 2, 3 et 5. Nous avons recherché un effet protecteur de l'octreotide et du SOM230 au cours de la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris.

Méthodes : Après instillation de bléomycine (80 μ g) par voie IT, les souris ont reçu : de l'octreotide (10 μ g/kg toutes les 12 heures s/c, n = 38) ou du SOM 230 (25 μ g/kg une fois par jour s/c, n = 36). Les souris témoins recevaient du sérum physiologique (1 ou 2 injections/j, n = 42 par groupe). Les souris étaient sacrifiées à J0, ou J3, J7 ou J14 après l'instillation de bléomycine. Le score histologique de fibrose était évalué à J14. On pratiquait à chaque temps un lavage broncho-alvéolaire (LBA) pour étude cytologique et dosage du TGF β (ELISA R & D). Le collagène était dosé dans le broyat pulmonaire par le test de Sircol®. L'expression pulmonaire des ARNm d'intérêt était quantifiée par PCR quantitative en temps réel et rapportée à l'expression du gène RPL13.

Résultats : Le SOM230 améliorait la survie des souris à J14 (70 % vs 43 %, P = 0,024). L'octreotide tendait à améliorer la survie (53 % vs. 38 %, P = 0,22). Le SOM230 diminuait le score histologique de fibrose et le contenu pulmonaire en collagène à J14, et réduisait le contenu en ARNm de la chaîne β 2 du collagène 1 à J7. SOM 230 diminuait la cellularité du LBA et le nombre total de lymphocytes et de macrophages alvéolaires à J3. Le SOM 230 réduisait l'expression pulmonaire de l'ARNm de CTGF à J7 (-70 %) et les concentrations de TGF β -1 dans le LBA à J14 (-17%). L'octreotide n'avait pas d'effet significatif sur ces paramètres.

Principales « macro-asynchronies » au cours de la ventilation mécanique assistée

A. Thille

(Travail réalisé sous la direction du L. Brochard)

Réanimation médicale, INSERM U651, Hôpital Henri Mondor, Créteil.

Contexte : L'incidence, la physiopathologie et les conséquences des asynchronies patient-ventilateur sont mal connues.

Objectif : Evaluer la prévalence des principales asynchronies patient-ventilateur au cours de la ventilation mécanique assistée et déterminer les facteurs associés.

Méthodes : Soixante-deux patients consécutifs ayant nécessité plus de 24 heures de ventilation mécanique ont été explorés de façon prospective dès qu'ils avaient retrouvé une ventilation spontanée. Les principales asynchronies étaient détectées visuellement à partir des signaux de débit et de pression des voies aériennes. Les signaux étaient enregistrés sur une période de 30 minutes. Les asynchronies étaient quantifiées par un index d'asynchronie.

Résultats : Quinze patients (24 %) présentaient un index d'asynchronie supérieur à 10 % des efforts respiratoires. Les efforts inefficaces et les doubles déclenchements étaient les 2 principales asynchronies détectées. Les asynchronies, en général, étaient plus fréquentes en ventilation assistée contrôlée (VAC) qu'en ventilation spontanée en aide inspiratoire (VSAI), avec un nombre médian d'asynchronies par patient de 72 [13-215] versus 16 [4-47] pendant les 30 minutes d'enregistrement, p = 0,04. Les doubles déclenchements étaient plus fréquents en VAC, alors que la fréquence des efforts inefficaces était identique quel que soit le mode ventilatoire. Les efforts inefficaces étaient associés à un trigger inspiratoire moins sensible, un niveau d'aide inspiratoire plus élevé (15 [12-16] cmH₂O versus 17,5 [16-20], p = 0,007), un plus grand volume courant et un pH plus alcalin. Une plus grande prévalence d'asynchronies était aussi associée à une durée de ventilation mécanique plus longue (7,5 [3-20] jours versus 25,5 [9,5-42,5], p = 0,005).

Conclusions : Un quart des patients présentent des asynchronies avec une prévalence élevée au cours de la ventilation assistée. Les patients avec des asynchronies fréquentes ont une assistance ventilatoire excessive et une durée

Étude des propriétés mécaniques des cellules épithéliales alvéolaires dans le syndrome de détresse respiratoire aiguë par la méthode de magnétoctométrie

L. Chalumeau-Lemoine
(Travail réalisé sous la direction de B. Maitre et D. Isabey).
INSERM U651

(Directeur S. Adnot). Faculté de médecine de Créteil, Université Paris XII.

Introduction : Le Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (SDRA) se définit par une atteinte inflammatoire intense localisée au poumon et sa principale caractéristique mécanique consiste en une baisse de la compliance. Le traitement repose essentiellement sur la ventilation mécanique, celle-ci pouvant induire des lésions inflammatoires et aggraver les lésions pulmonaires préexistantes. Dans ce contexte nous avons étudié, dans un modèle cellulaire *in vitro*, les interactions entre contrainte mécanique et médiateurs de l'inflammation dans le SDRA.

Matériels : La magnétoctométrie est utilisée afin de générer un stress mécanique sur des cellules en culture et d'en mesurer certaines propriétés mécaniques. Les cellules utilisées sont des cellules épithéliales alvéolaires humaines (A549). Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est prélevé chez des patients atteints de SDRA (groupe SDRA) et chez des sujets témoins atteints d'œdème pulmonaire cardiogénique (groupe OAP). Le TNF α correspond à du TNF α recombinant humain. Un marquage de l'actine par la rhodamine phalloïdine a également été réalisé sur les cultures cellulaires, permettant une analyse de la réorganisation du cytosquelette.

Méthodes : Les cultures cellulaires sont exposées à du surnageant de LBA de patients SDRA, patients OAP ou à du TNF α à différentes concentrations (1 000, 5 000 et 10 000 pg/mL). Dans ces conditions, la magnétoctométrie permet de mesurer la rigidité globale et des compartiments cortical et profond du cytosquelette. Le marquage de l'actine est effectué dans les mêmes conditions permettant d'étudier la formation de fibres de stress.

Résultats : La rigidité globale et des compartiments cortical et profond du cytosquelette des cellules est significativement augmentée dans le groupe SDRA par rapport au groupe OAP ($p < 0,0004$). Cet effet sur la rigidité est associé à la formation de fibres de stress. Le TNF α n'induit pas de modification des propriétés mécaniques du cytosquelette dans ce modèle.

Discussion et conclusion : Nous avons trouvé une majoration de la rigidité du cytosquelette des cellules épithéliales alvéolaires exposées à un environnement reproduisant le SDRA. Des études sont en cours pour rechercher les facteurs ou médiateurs responsables de cet effet

Balance NOS/arginase et régulation de la réponse bronchomotrice à l'acétylcholine *ex vivo*

J.-M. Tadie
(Travail réalisé sous la direction de C. Delclaux)

UPRES EA 220, Université PARIS V, UFR Biomédicale des Saints-Pères
(Directeur : Pr D. Israel-Biet).

Introduction : La régulation de la production de NO est très complexe et fait appel à un système enzymatique compétitif : d'une part, les NO synthases produisant le NO et d'autre part, les arginases produisant notamment des précurseurs de la matrice extra-cellulaire. Le but de notre étude est d'évaluer le rôle *ex vivo* de la balance NOSs/arginases dans la régulation de la bronchomotricité à l'acétylcholine chez l'homme sain ou tabagique.

Matériels : Étude de la réactivité *ex vivo* d'anneaux bronchiques humains. Réalisation de courbes dose-reponse à l'acétylcholine avec et sans inhibiteurs de NO synthases et d'arginases puis, étude des effets de ces inhibiteurs sur la ligne de base, le tonus maximal en les comparant à la condition témoin.

Inhibiteurs utilisés : L-NAME (inhibiteur non spécifique des NOSs), le 1 400 W (inhibiteur spécifique de la iNOS) et le ω N-propyl-L-Arginine (inhibiteur spécifique de la nNOS). Les inhibiteurs spécifiques des arginases utilisés sont le BEC et la nor-NOHA.

Résultats : 22 patients étudiés. L'analyse des données montre que l'on peut diviser les patients en deux phénotypes fonctionnels :

1) un phénotype « producteur de NO » après la 1^{re} CDR à l'acétylcholine, présentant un moindre tabagisme. Le tonus maximal de ce groupe diminue de façon plus importante lors de l'addition de L-arginine et diminue de façon plus importante lors de l'inhibition des arginases par le BEC et la nor-NOHA (production accrue de NO). L'inhibition de la nNOS diminue la tension maximale suggérant un effet bronchoconstricteur de la nNOS lors de la contraction, tandis que l'inhibition de la iNOS diminue la tension de base, suggérant un effet bronchoconstricteur de la iNOS sur le tonus basal. On peut par ailleurs en déduire que l'effet bronchodilatateur du NO sur la tension maximale est sans doute lié à l'activation de la eNOS lors de la contraction et/ou la mise en tension. 2) un phénotype « non producteur de NO » chez des sujets au tabagisme plus important. Ces sujets présentent de moindres variations de tensions lors de l'administration des différents inhibiteurs.

Mécanismes neurophysiologiques de la dyspnée : recherche d'un phénomène de contre-irritation induit par une charge métabolique

J. Mayaux

(Travail réalisé sous la direction de C. Morelot-Panzini, C. Straus et de T. Similowski)

UPRES EA 2397, Université Paris 6 (Directeur : M. ZELTER), Paris

Introduction : La dyspnée présente de nombreuses analogies avec la douleur : c'est un signe d'alarme, elle est soumise à des influences variées, elle correspond à l'activation de zones cérébrales situées dans le cortex limbique. L'induction d'une dyspnée expérimentale (charge inspiratoire mécanique) entraîne un phénomène dit de « contre-irritation », c'est-à-dire l'atténuation de la perception d'une douleur préexistante. Ce résultat implique que des fibres C sont mises en jeu dans les sensations de la dyspnée. Nous avons cherché à mettre en évidence un phénomène de contre-irritation lors de l'application d'un autre type de dyspnée, induit par une charge métabolique « soif d'air ».

Matériel et méthodes : Neuf volontaires sains ont participé à l'étude. Le protocole comportait deux séances expérimentales. La première évaluait l'effet sur la perception douloureuse d'une dyspnée induite par l'inhalation d'un mélange hypercapnique (CO₂ 5 %) hyperoxique (O₂ 95 %) et de sa majoration secondaire par une hypoventilation volontaire. La seconde servait de contrôle évaluant, l'influence de l'activité neurale nécessaire à la réduction volontaire du volume courant. Le critère de jugement était l'amplitude du réflexe spinal de retrait RIII.

Résultats : L'application d'une charge métabolique associée à une hypoventilation volontaire induisait une sensation de dyspnée intense de type « soif d'air ». Ceci n'était associé à aucune modification significative du réflexe RIII. De même l'activité corticale lors de la séance contrôle ne provoquait pas d'inhibition de la réponse réflexe nociceptive.

Conclusion : Par opposition à une charge mécanique à seuil, une charge métabolique n'induit pas un phénomène de contre-irritation et par conséquent pas d'activation notable des fibres C par ce type de dyspnée. Ces résultats apportent un substrat neurophysiologique à la distinction traditionnelle qui oppose fréquemment dyspnée induite par une charge métabolique (« soif d'air ») et dyspnée induite par une charge mécanique (« effort excessif »).

Modulation pharmacologique du chimiotactisme mastocytaire induit par les cellules musculaires lisses bronchiques : approches *in vitro* et *in vivo*

W. Pujol

(Travail réalisé sous la direction du Pr. J. M. Tunon de Lara)

INSERM E356 Laboratoire de Physiologie Respiratoire Cellulaire, – Université Victor Segalen (Directeur : Pr. R. Marthan, Bordeaux)

Introduction : Les objectifs de ce travail sont d'étudier *in vitro* le chimiotactisme mastocytaire induit par les cellules musculaires lisses bronchiques humaines (CML) et sa modulation pharmacologique par la dexaméthasone et certains inhibiteurs des voies ERK et p38 des MAP kinases. L'étude *in vivo* consiste à mettre au point un modèle asthmatique murin avec infiltration mastocytaire, permettant l'étude de leurs effets sur l'inflammation bronchique.

Matériels et méthodes : L'étude *in vitro* est réalisée en chambre de Boyden à 48 puits. Les mastocytes de la lignée HMC-1 migrent en présence de surnageants de CML avec ou sans inhibiteurs (dexaméthasone ; UO126 ; SB203580 ; SB706504). L'étude *in vivo* consiste en une immunisation longue (75 j) à l'ovalbumine de 10 souris rendues asthmatiques *versus* 10 souris témoins. L'évaluation est réalisée en pléthysmographie et histochimie.

Résultats : Nous obtenons une augmentation significative du chimiotactisme mastocytaire induit par le SCF ($p = 0,001$) par rapport à l'ITS seul, ainsi que celui induit par la présence de CML non stimulées ou stimulées par du TNF- α . Ce chimiotactisme est partiellement inhibé par la dexaméthasone et un des inhibiteurs de la voie p38 testé (SB203575). *In vivo*, les souris immunisées présentent une hyperréactivité bronchique, une surface de muscle lisse et une infiltration mastocytaire dans les bronches non cartilagineuses significativement supérieures aux souris témoins.

Discussion : Ces observations suggèrent l'existence possible d'une boucle d'activation impliquant le mastocyte, les MAP kinases et la CML.

Conclusion : Nous avons validé un modèle murin permettant de tester *in vivo* l'effet pharmacologique des inhibiteurs de MAP kinases sur le chimiotactisme mastocytaire induit par les CML.

Influence du tabagisme sur la modulation du tonus vasculaire artériel pulmonaire humain par l'endothéline-1

P. Dao

(Travail réalisé sous la direction du Pr. A.T. Dinh Xuan)

UPRES-EA 2511, Cochin Paris V

Introduction : La fumée de tabac entraîne un remodelage vasculaire au cours de la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). L'endothéline-1 (ET-1) est un agent vaso-actif, dérivé de l'endothélium, doué de propriétés mitogéniques dont la synthèse est augmentée par le tabagisme, suggérant un rôle de l'ET-1 dans le remodelage vasculaire. Les effets du tabac sur la modulation du tonus vasculaire par l'ET-1 sont connus dans la circulation générale. À notre connaissance, ses effets sur la circulation pulmonaire restent à étudier.

Matériels et méthodes : Les artères pulmonaires de troisième et de quatrième générations ont été prélevées chez des patients opérés pour une néoplasie pulmonaire. Les anneaux artériels ont été montés en chambre d'organe isolé et la tension isométrique induite par des doses croissantes d'ET-1 a été mesurée en présence, ou non, d'antagonistes sélectifs des récepteurs de l'endothéline. L'expression des récepteurs de l'endothéline type A (ET-A) et type B (ET-B) a été examinée en immunohistochimie. L'expression de l'ARNm des récepteurs ET-A et ET-B a été évaluée par RTQ-PCR.

Résultats : La réponse vasoconstrictrice à l'ET-1 est plus forte chez les patients atteints de BPCO sans hypoxémie chronique par rapport aux patients non-fumeurs ($p < 0,05$). La vasoconstriction induite par la stimulation du récepteur ET-B observée chez les patients non-fumeurs ($p < 0,05$) n'est plus retrouvée chez les patients fumeurs avec une fonction respiratoire normale. Ces modifications de la modulation du tonus vasculaire pulmonaire ne s'accompagnent pas de variations de l'expression des récepteurs ET-A et ET-B, et de leur ARNm respectif.

Conclusion : Nos résultats démontrent que le tabagisme induit une hypercontractilité des artères pulmonaires à l'ET-1 et réduit la vasoconstriction physiologique médiée par le récepteur ET-B. Ces modifications fonctionnelles ne s'accompagnent pas de variations de l'expression des récepteurs ET-A et ET-B, suggérant une altération dans la transduction du signal couplée aux récepteurs de l'endothéline.

Rôle du récepteur de l'Epidermal Growth Factor (EGF) dans la synthèse de mucine par l'épithélium des polypes naso-sinusiens

C. Martin

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

UPRES EA 2511, Cochin Paris V

Introduction : L'activation du récepteur de l'EGF provoque la synthèse de mucine dans des modèles animaux d'hypersécrétion de mucus des voies aériennes. L'hyperplasie des cellules à mucus dans l'épithélium des polypes s'accompagne d'une surexpression de la mucine MUC5AC et du récepteur de l'EGF, suggérant un lien de causalité.

Matériels et méthodes : Les cellules épithéliales nasales humaines issues de patients atteints de polyposse naso-sinusiennes ont été isolées et cultivées en interface air-liquide (culture primaire). À confluence, les cellules ont été traitées par un ligand du récepteur de l'EGF, le TGF- α , et/ou par le TNF- α . Dans certaines expériences les cellules ont été prétraitées par un inhibiteur sélectif de la tyrosine kinase du récepteur de l'EGF, l'AG1478 ou par un composé inactif l'AG9. L'expression de la protéine MUC5AC a été évaluée par immunohistochimie et par dosage ELISA dans les lysats cellulaires. L'expression de l'ARNm de MUC5AC a été étudiée par RTPCR.

Résultats : Après 24 heures de traitement par TGF- α , le nombre de cellules marquées en immunohistochimie pour MUC5AC et les concentrations de mucine MUC5AC sont augmentés par rapport au Contrôle (cellules de la même culture non traitées) ($P < 0,05$, $n = 5$). L'augmentation du nombre de cellules exprimant MUC5AC se fait sans modification du nombre total de cellules. Le TNF- α n'a pas d'effet sur l'expression de la mucine MUC5AC et ne potentialise pas le TGF- α . Le prétraitement des cellules par l'AG1478, mais pas par l'AG9, prévient l'effet du TGF- α sur la synthèse de la protéine MUC5AC ($P < 0,05$ par rapport au TGF- α seul). Les expériences testant l'effet du TGF- α sur la synthèse du gène MUC5AC par RT-PCR sont en cours de réalisation.

Conclusion : Nos résultats démontrent que l'activation du récepteur de l'EGF par son ligand le TGF- α augmente la synthèse de la mucine MUC5AC dans l'épithélium des polypes naso-sinusiens humains. Cette augmentation se fait sans variation du nombre total de cellules, suggérant un mécanisme de différenciation cellulaire. Un essai clinique évaluant l'effet d'antagonistes du récepteur de l'EGF chez des patients atteints de polyposse naso-sinusiennne permettra d'évaluer la pertinence clinique de ces observations

Mise au point d'une méthode de mesure des eicosanoïdes dans les condensats de l'air exhalé d'adultes non tabagiques et tabagiques

G. Prevot

(Travail réalisé sous la direction de J. RamI, A. Didier)

Unité INSERM EA 2405 (Directeur : B. Pipy), Toulouse.

Introduction : Des marqueurs de l'inflammation, tels que les eicosanoïdes, sont dosables par analyse ELISA dans les condensats de l'air exhalé. La condensation permet le recueil de la phase liquide de l'air expiré mais aussi de la vapeur d'eau qui dilue l'échantillon. L'objectif de ce travail était d'évaluer la reproductibilité de la mesure des eicosanoïdes dans le condensat et de déterminer si la mise au point d'une méthode d'extraction du recueil et le calcul d'un coefficient de dilution du condensat permettaient de l'améliorer. Nous avons également évalué les conséquences du tabagisme actif sur les résultats.

Matériels et méthodes : Trois recueils de condensat étaient effectués pour chacun des 20 adultes sains non tabagiques. Quatre eicosanoïdes étaient dosés : le leucotriène B₄ (LTB₄), les cystéinyl leucotriènes (Cys-LT), la prostaglandine E₂ (PGE₂) et le 8-isoprostane (8-iso). Les dosages étaient réalisés avant et après extraction du condensat. Le calcul du coefficient de dilution reposait sur la mesure de la conductibilité de l'échantillon lyophilisé. Pour les 10 adultes tabagiques, un unique condensat était recueilli.

Résultats : Avant extraction, le coefficient de variation des résultats était de 8 % pour LTB₄, 20 % pour Cys-LT, 10 % pour PGE₂, 15 % pour 8-iso. Contrairement à l'extraction, la prise en compte du coefficient de dilution améliorait la reproductibilité ($p > 0,05$). Chez les tabagiques, les concentrations de 8-iso étaient significativement augmentées ($p = 0,008$) et les concentrations de PGE₂ étaient diminuées ($p = 0,004$).

Discussion : La reproductibilité des résultats n'est pas satisfaisante en particulier pour les Cys-LT. La méthode d'extraction mise au point ne permet pas de l'améliorer, probablement par la perte d'une proportion variable et imprévisible d'eicosanoïdes lors de l'évaporation, étape finale de l'extraction. Le coefficient de dilution pourrait présenter un intérêt mais notre effectif semble trop faible pour le prouver. Le 8-iso mesuré dans le condensat serait un marqueur du stress oxydatif induit par la fumée de tabac.

Conclusion : Le manque de reproductibilité de la technique des condensats semble aujourd'hui peu compatible avec une utilisation en pratique courante

Cellules progénitrices endothéliales et thérapeutique expérimentale des troubles du développement alvéolaire en période néonatale

C. Tassel

(Travail réalisé sous la direction de Ch. Delacourt)

Unité INSERM 651 (Directeur : S. Adnot), Créteil

Introduction : La dysplasie bronchopulmonaire humaine est une maladie du développement pulmonaire du prématuré humain avec atteinte de l'alvéolisation et de la microvascularisation. Les cellules endothéliales progénitrices stimulent la néovascularisation par colonisation des vaisseaux. Dans un modèle expérimental de troubles du développement alvéolaire chez la souris nouveau-né, nous avons voulu évaluer si l'injection systémique de cellules endothéliales progénitrices contenues dans la moelle osseuse, était susceptible de prévenir les anomalies du développement alvéolaire induites par l'hyperoxie en restaurant une maturation normale de la microvascularisation pulmonaire.

Matériels et méthodes : La moelle de souris adultes donneuses C57BL/6J est extraite et les cellules sont administrées par voie systémique à des souriceaux de trois jours (6.10^6 cellules par souriceau) de même lignée, maintenus en hyperoxie de J0 à J10. L'évaluation des effets de l'hyperoxie et des cellules de moelle est réalisée sur la survie, par l'analyse histologique des poumons et l'évaluation de l'infiltrat pulmonaire à polynucléaires neutrophiles par le dosage de la myéloperoxydase (ELISA). Pour étudier la colonisation pulmonaire des cellules, nous avons disposé de souris donneuses surexprimant la protéine GFP permettant ainsi une localisation des cellules par immunohistochimie.

Résultats : Comme attendu, l'hyperoxie s'accompagne d'une mortalité significative ($p < 0,0001$). L'injection systémique de cellules médullaires a pu être réalisée de façon reproductible chez le souriceau. À l'inverse de l'effet bénéfique espéré, elle s'est accompagnée d'un surcroît significatif de mortalité ($p < 0,0001$). La colonisation des cellules issues de moelle GFP semble marginale. L'analyse des coupes histologiques a révélé la présence d'alvéolites majeures chez les souriceaux ayant reçu de la moelle sous hyperoxie et les premiers résultats du dosage de la myéloperoxydase semblent en faveur d'une majoration de la réaction inflammatoire pulmonaire.

Discussion/Conclusion : L'absence apparente de colonisation pulmonaire significative par les cellules progénitrices injectées et l'induction d'une réaction inflammatoire pulmonaire peuvent expliquer ces résultats. D'autres travaux sont nécessaires pour augmenter le degré de colonisation endothéliale et limiter l'induction d'une réaction inflammatoire

Influence des polymorphismes du gène *TGF- β_1* sur la fonction pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose

C. Vallet^{1,2}, H. Corvol^{1,2}, PY Boelle³, J. Brouard⁴,
N. Knauer⁵, A. Henrion-Caude¹, K. Chadelat^{1,2},
M. Boule^{1,2}, B. Fauroux^{1,2}, F. Ratjen⁵, H. Grasemann⁵,
A. Clement^{1,2}

¹ Unité Inserm U719, Hôpital Armand Trousseau, Paris, France.

² Service de Pneumologie Pédiatrique, Hôpital Armand Trousseau, Paris, France.

³ Département de Biostatistiques, Unité Inserm U707, Hôpital St-Antoine, Paris, France.

⁴ Service de Pédiatrie, Hôpital Georges Clémenceau, Caen, France.

⁵ Hôpital pour enfants, Université d'Essen, Essen, Allemagne.

Introduction : La dégradation de la fonction respiratoire est le facteur de morbidité et de mortalité le plus important dans la mucoviscidose. L'hétérogénéité phénotypique de cette maladie suggère l'intervention de gènes modificateurs situés en dehors du locus *CFTR*. Étant donné le rôle clé du TGF- β dans le remodelage tissulaire, nous avons recherché une association entre des variations de production de TGF- β_1 secondaires à des polymorphismes et la variabilité de l'évolution clinique chez des patients atteints de mucoviscidose.

Matériel : La population étudiée comprend 374 patients atteints de mucoviscidose. Les données phénotypiques ont été recueillies à partir des dossiers des patients. Deux polymorphismes fonctionnels du gène *TGF- β_1* en position + 869 et - 509 ont été étudiés.

Méthodes : Le génotype des patients a été déterminé en utilisant une technique de discrimination allélique par méthode de fluorescence. Les taux plasmatiques de TGF- β_1 ont été déterminés par dosage ELISA chez 56 patients.

Résultats : Nous avons observé des taux plasmatiques de TGF- β_1 significativement plus élevés chez les patients de génotype + 869TT par rapport aux patients + 869CT et + 869 cm³ ($p = 0,05$). Ce génotype « haut producteur » + 869TT était également associé à un déclin significativement plus rapide de la fonction respiratoire avec un déclin annuel moyen du VEMS (\pm SD) de : - 1,8 % (\pm 0,5) pour les patients + 869 cm³ vs. - 1 % (\pm 0,6) pour les patients + 869CT et - 2,5 % (\pm 0,6) pour les patients + 869TT ($p = 0,03$). Aucune association significative n'a été retrouvée entre les données cliniques, les taux de TGF- β_1 et le polymorphisme en position - 509.

Discussion : Ces résultats démontrent une association entre la progression de l'atteinte respiratoire dans la mucoviscidose, la production de TGF- β_1 et le polymorphisme en position + 869 T/C. Dans la littérature, ce polymorphisme, décrit comme « fonctionnel » car associé à des taux variables de TGF- β_1 , a également été associé à une majoration de la fibrose pulmonaire ou à un déclin de la fonction respiratoire dans des pathologies respiratoires chroniques.

Conclusion : Cette étude génétique et fonctionnelle suggère que le polymorphisme du gène *TGF- β_1* en position + 869 influence le taux de TGF- β_1 plasmatique et prédispose à un déclin accéléré de la fonction respiratoire chez les patients atteints de mucoviscidose.