

Université de Sherbrooke

**Implication de l'interleukine-8 et du monoxyde d'azote dans la
caractéristique inflammatoire de la mucoviscidose.**

Caroline Francoeur

Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences (M.Sc.)

juin 1995



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-612-09466-9

Canada

*A ceux et celles qui ont cru à
la noblesse de la science et qui
ont su persévérer dans le respect
de la vocation...*

Liste des publications

- 1) Bédard, Marie; McClure, Carol D.; Schiller, Neal L.; **Francoeur, Caroline**, Cantin, André and Denis, Michel; (1993); Release of interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6), and colony stimulating factor (CSF) by upper airway epithelial cells: implication for cystic fibrosis.; Am J Respir Cell Mol Biol 9(4):455-462

- 2) Pheng, Leng Hong; **Francoeur, Caroline** and Denis, Michel; (1995); The involvement of nitric oxide in a mouse model of adult respiratory distress syndrome.; Inflammation (sous presse)

- 3) **Francoeur, Caroline** and Denis, Michel; (1995); Nitric oxide and interleukin-8 as inflammatory components of cystic fibrosis.; Inflammation (sous presse)

- 4) **Francoeur, Caroline** and Denis, Michel; (1995); The bidirectional role of interleukin-8 in host defense against *Pseudomonas aeruginosa*.; (en préparation)

Table des matières

Liste des publications.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Résumé.....	xi

I. INTRODUCTION

1.1 Description générale de la mucoviscidose.....	1
1.2 Implication de la bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
1.3 Régulation de la réponse immunitaire chez les patients FK.....	10
1.4 Historique et propriétés physico-chimiques de l'interleukine-8.....	13
1.5 Effets biologiques de l'IL-8.....	15
1.6 Modulation de la production d'IL-8.....	17
1.7 Monoxyde d'azote et ses dérivés.....	18
1.8 Rôles physiologiques du NO.....	21
1.9 Hypothèses de travail.....	23

II. MATERIELS et METHODES

2.1 Cellules épithéliales.....	26
2.2 Stimulation des cellules épithéliales.....	27

2.3 Infection des cellules épithéliales.....	28
2.4 Population de patients FK.....	28
2.5 Récolte des expectorations.....	29
2.6 Neutrophiles sanguins.....	30
2.7 Mesure de l'interleukine-8.....	30
2.8 Standard interne d'IL-8.....	32
2.9 Mesure du nitrite.....	33
2.10 Constitution d'un stock de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
2.11 Synthèse et purification de la pyocyanine.....	35
2.12 Croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
2.13 Statistiques.....	39

III. RESULTATS

3.1 Caractérisation des cellules épithéliales selon leur phénotype FK et non FK.....	40
3.2 Production d'IL-8 et de nitrite par les cellules épithéliales en culture.....	40
3.3 Mesure des taux d'IL-8 et de nitrite dans la phase soluble des expectorations de sujets FK.....	49
3.4 Production d'IL-8 et de nitrite par les neutrophiles isolés des expectorations.....	50
3.5 Production de nitrite par les neutrophiles sanguins de patients FK.....	50
3.6 Stimulation des neutrophiles sanguins par <i>P. aeruginosa</i>	53
3.7 Implication des cellules épithéliales dans la production d'IL-8 et de nitrite chez les patients FK.....	56
3.8 Utilisation du nitrite par la bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58

3.9 Utilisation de l'IL-8 comme facteur de croissance par <i>P. aeruginosa</i> cultivée dans un milieu bactériostatique.....	65
IV DISCUSSION.....	67
V CONCLUSION.....	81
VI REMERCIEMENTS.....	83
VII REFERENCES.....	84

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique d'un canal chlorique CFTR.....	2
Figure 2. Schématisation des quatre classes de mutation du CFTR.....	5
Figure 3. Courbe étalon de la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
Figure 4. Courbes concentration-réponse de la production d'IL-8 par les cellules épithéliales de la lignée 56.13 en réponse à des stimuli pro-inflammatoires.....	42
Figure 5. Courbes concentration-réponse de la production d'IL-8 par les cellules épithéliales de la lignées 13.21 en réponse à des stimuli pro-inflammatoires.....	43
Figure 6. Production d'IL-8 par les cellules de la lignée 56.13 exposées à des cytokines pro-inflammatoires.....	45
Figure 7. Production d'IL-8 par les cellules de la lignée 13.21 exposées à des cytokines pro-inflammatoires.....	46
Figure 8. Effet anti-inflammatoire de l'IFN γ sur les cellules épithéliales 13.21.....	47
Figure 9. Effet anti-inflammatoire de l'IFN γ sur les cellules épithéliales 56.13.....	48
Figure 10. Production de nitrite et d'IL-8 par les neutrophiles d'expectorations de patients FK.....	52
Figure 11. Production de nitrite par les neutrophiles sanguins de patient FK.....	54
Figure 12. Production de nitrite par les neutrophiles de sujets FK et normaux exposés à <i>P. aeruginosa</i>	55
Figure 13. Courbe de la croissance de <i>P. aeruginosa</i> dans les cellules épithéliales infectées.....	59
Figure 14. Production d'IL-8 par les cellules épithéliales infectées par <i>P. aeruginosa</i>	60
Figure 15. Consommation du nitrite par la bactérie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
Figure 16. Courbe de croissance de <i>P. aeruginosa</i> en présence et en absence de nitrate.....	63

Figure 17. Effet bactéricide du NO et cytoprotection de la pyocyanine.....64

Figure 18. Utilisation de l'IL-8 comme facteur de croissance par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* cultivée dans un milieu bactériostatique.....66

Liste des tableaux

Tableau 1. Efflux chlorique par les lignées de cellules épithéliales.....	41
Tableau 2. Taux de nitrite et d'IL-8 dans les expectorations de sujets bronchitiques et de patients FK.....	51
Tableau 3. Sécrétion d'IL-8 et de nitrite par les lignées de cellules épithéliales.....	57

Liste des abréviations

AG:	Aminoguanidine
BSA:	Bovine Serum Albumine
CCM:	Chromatographie sur Couche Mince
CFTR:	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CFU:	Colony Forming Unit
c-NOS:	NO Synthase Constitutive
CSF:	Colony Stimulating Factor
EDRF:	Endothelium Derived Relaxing Factor
EGF:	Epidermal Growth Factor
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
FBS:	Fetal Bovine Serum
FK:	Fibrose Kystique
FMLP:	Formyl-méthylleucine-phenylalanine
GM-CSF:	Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor
GRE:	Glucocorticoid Responsive Element
HBSS:	Hanks' Balanced Salt Solution
IFN:	Interféron
IL:	Interleukine
i-NOS:	NO Synthase inductible
L-CAN:	L-canavanine
L-NAME:	N ^o -nitro-L-arginine méthyl ester
L-NIO:	N ^o -iminoéthyl-L-ornithine
L-NMMA:	N ^o -monométhyl-L-arginine
L-NNA:	N ^o -nitro-L-arginine
LPS:	Lipopolysaccharide
NO:	Monoxyde d'azote
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PKA:	Protéine Kinase A
PKC:	Protéine Kinase C
PMN:	Leucocyte polymorphonucléaire
SDS:	Sodium Dodécyl Sulfate
Spermine	
NONOate:	1,3-Propanediamine, N-[4-[1-(3-aminopropyl)-2-hydroxy-2-nitrosohydrazino]butyl]
TGF:	Transforming growth Factor
TNF:	Tumor Necrosis Factor

Résumé

La mucoviscidose est une maladie héréditaire à caractère récessif touchant environ un enfant caucasien sur deux mille. Le phénotype principal de cette tare est caractérisé par une accumulation de mucus anormalement sec et épais dans les voies respiratoires. Cet état de fait favorise donc la colonisation des sujets atteints par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* entraînant une infiltration massive des neutrophiles dans les poumons. Il en découle une réponse immunitaire excessive qui est à l'origine d'une inflammation aiguë caractérisée par une production importante de cytokines et de radicaux libres.

Les objectifs de la recherche ont donc été, dans un premier temps, de quantifier la production des marqueurs d'inflammation soit l'interleukine-8 (IL-8), le monoxyde d'azote (NO) et ses dérivés stables par les cellules épithéliales soumises à des stimuli cytokiniques. Une méthode de dosage ELISA a été mise au point de manière à permettre la mesure de l'IL-8 humaine en utilisant des anticorps polyclonaux. Le monoxyde d'azote, quant à lui, a été mesuré indirectement par la méthode colorimétrique de Greiss consistant en la mesure des nitrites dérivés de l'oxydation du monoxyde d'azote. Des études concentration-réponse et cinétiques ont permis de comparer la réponse inflammatoire du phénotype normal à celle obtenue par une lignée CFTR négative. De plus, l'implication de l'IL-8 et du monoxyde d'azote produits par les neutrophiles ayant infiltré les poumons FK dans le processus de destruction protéolytique conduisant à la bronchiectasie a été étudiée en mesurant ces médiateurs dans la phase soluble des expectorations de patients FK et de fumeurs bronchitiques. Les neutrophiles isolés de ces expectorations de même que du sang périphérique de sujets FK et normaux, lorsque mis en culture, ont permis l'évaluation de la production spontanée d'IL-8 et de NO de même que l'étude de la modulation positive et négative de ces marqueurs d'inflammation. Si l'inflammation a pu être induite par des cytokines dites pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 β (IL-1 β) et le tumor necrosis factor α (TNF α), elle a aussi pu être inhibée par l'interféron γ (IFN γ) alors que l'interleukine-4 (IL-4) et les anti-inflammatoires synthétiques ont été sans effet. L'inhibition de la production de NO par les neutrophiles et les cellules épithéliales a été étudiée en prétraitant les cellules avec des antagonistes de L-arginine tels que le N^G-monométhyl-L-arginine (L-NMMA), la forme méthyle ester de l'arginine (L-NAME) et la canavanine (L-CAN). Seul le L-NMMA a pu inhiber partiellement la production de NO par les neutrophiles humains induite par la présence de la bactérie *P. aeruginosa*.

Dans un deuxième temps, l'isolement, la purification et la constitution d'un stock d'une souche clinique de *Pseudomonas aeruginosa* a permis de procéder à des études relatives à l'aspect bactériologique de la maladie. Les interactions entre le pathogène opportuniste et les cellules de l'hôte ont été étudiées en mesurant la production d'IL-8 et de NO induite par la co-incubation de ces deux entités biologiques. De plus, en cultivant la bactérie dans un milieu bactériostatique il a été possible de déterminer l'aptitude de celle-ci à utiliser les produits métaboliques des cellules de l'hôte pour sa propre croissance. Les travaux ont démontré que *Pseudomonas aeruginosa* constitue un

agent inflammatoire important puisqu'elle induit la production d'IL-8 et de NO chez les neutrophiles de même que chez les cellules épithéliales des voies aériennes supérieures. Cette production de marqueurs d'inflammation peut, par ailleurs, être associée au degré de sévérité de la maladie. Les expériences de bactériologie ont permis de démontrer que *P. aeruginosa* tire avantage de la réaction qu'elle provoque puisqu'elle semble utiliser à la fois le nitrate dérivé du NO et l'IL-8. Ainsi donc, ce travail a permis de mieux comprendre les interactions entre les marqueurs d'inflammation, le pathogène impliqué et les cellules de l'hôte et ont permis de mieux saisir les causes de la persistance de l'infection à *Pseudomonas aeruginosa*. En outre, notre travail a permis de documenter des mécanismes inflammatoires cruciaux qui devraient devenir des cibles thérapeutiques dans de nouvelles approches au traitement de la mucoviscidose.

I. Introduction

1.1 Description générale de la mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie héréditaire touchant un enfant caucasien sur deux mille. Il s'agit d'une tare récessive dont le gène a été localisé sur la bande q31 du bras long du chromosome 7 par TSUI, COLLINS et RIORDAN en 1985 (KEREN *et al* 1989, RIORDAN *et al* 1989, ROMMENS *et al* 1989 et FEREC *et al* 1994).

Ce gène code pour la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). Celle-ci est exprimée principalement dans les cellules épithéliales de la muqueuse du tube digestif et des voies respiratoires, notamment dans la région supérieure des bronches (TOMASHEFSKI *et al* 1990). En ce qui concerne les cellules du système immunitaire, l'expression du CFTR est controversée chez les cellules T et les fibroblastes (WELSH *et al* 1990, McDONALD *et al* 1992) alors que chez les neutrophiles et les macrophages, on ne retrouve que peu ou pas d'expression de la protéine (FEREC *et al* 1994). Le CFTR est une protéine transmembranaire agissant à titre de canal chlorique dont l'activité est régulée d'une part par l'ATP cytosolique et d'autre part par une activité phosphokinase. En effet, le CFTR agirait selon un modèle de transport actif. Dans un premier temps, il y aurait une activation de la protéine kinase A (PKA) suite à une augmentation d'adénosine 3',5'-monophosphate (AMPc) intracellulaire (ROMMENS *et al* 1991 et COLLINS 1992). Cette kinase phosphoryle quatre résidus sérine (660, 737, 795 et 813) du domaine R (regulator) (CHENG *et al* 1991). Cette étape accomplie,

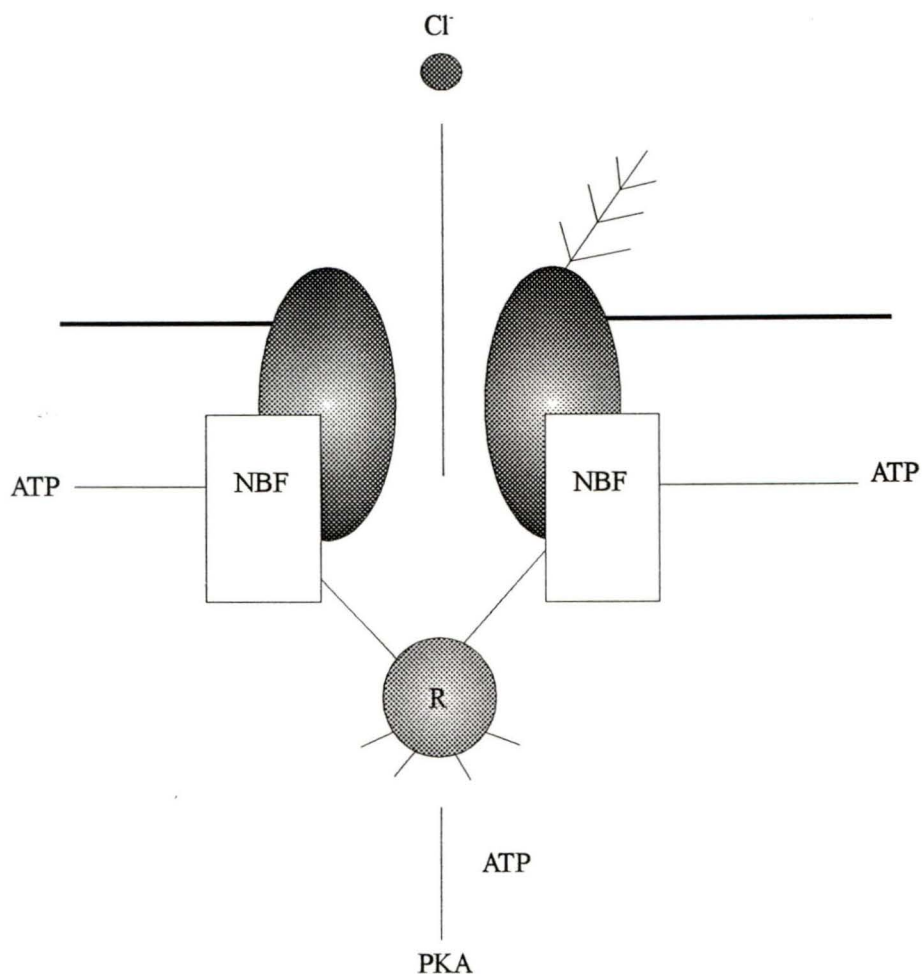


Figure 1. Représentation schématique d'un canal chlorique CFTR. On note la présence de sous-unités transmembranaires liés aux sous-unités NBF portant les sites de liaison à l'ATP (côté cytoplasmique). Ces sous-unités sont rattachées au domaine régulateur (R) portant quatre résidus sérine (représentés par les quatre traits). Du côté extracellulaire, on remarque la présence d'une chaîne glycosylée permettant la maturation et la translocation de la protéine CFTR vers l'apex cellulaire.

Il se produit alors une modification de la conformation de la protéine résultant en une ouverture du canal qui ne pourrait se produire si le domaine R n'était pas phosphorylé. L'ATP peut se lier directement aux deux sites de liaison NBF (nucleotide binding fold). Ainsi, après l'ouverture des canaux, les ions chlorures traversent alors la membrane en suivant un gradient électrochimique (GOOSENS 1991). La structure de la protéine CFTR est illustrée à la Figure 1. La régulation négative est assurée par l'activité de la protéine kinase C (PKC) qui est dépendante du taux de calcium intracellulaire (FRANCIOLINI *et al* 1990). Ainsi, lorsque le niveau de Ca^{2+} intracellulaire augmente, la PKC est activée et entraîne la fermeture du canal (LI *et al* 1989, BARGON *et al* 1990, WELSH *et al* 1990 et PARADISO 1992).

Jusqu'à ce jour, on a dénombré plus de 400 mutations que l'on a regroupées en quatre classes (Figure 2). La majorité des mutations consiste soit en une mutation ponctuelle ou en une très courte insertion ou délétion. Notons d'abord la classe 1. Celle-ci regroupe les mutations conduisant à l'absence partielle ou complète de la protéine CFTR. Il peut s'agir ici d'une mutation ponctuelle qui entraîne un déphasage du cadre de lecture ou de la mutation W1282X. Dans ce cas, la guanine en position 3978 est remplacée par une adénine, ce qui modifie le codon TGG codant normalement le tryptophane en TGA reconnu alors comme étant le codon stop. Cette mutation conduit donc à l'expression d'une protéine incomplète (FEREC *et al* 1994).

La deuxième classe comprend les mutations altérant la maturation cellulaire de la protéine. Il s'agit notamment de délétions provoquant une anomalie de la glycosylation de la protéine (FEREC *et al* 1994). Ceci a pour effet d'altérer la

intracellulaire de la protéine vers l'apex cellulaire. Le CFTR étant positionné de manière aberrante demeure donc tout à fait inefficace.

En troisième lieu, viennent les mutations faux-sens changeant la séquence des acides aminés au site de liaison de l'ATP sur les sous-unités NBF I et II (FEREC *et al* 1994). La liaison de l'ATP cytosolique ne pouvant plus se faire, l'ouverture des canaux chloriques devient impossible. À titre d'exemple, mentionnons ici les deux mutations les plus répandues, soit le remplacement d'une glycine par un aspartate de même que la délétion de la phénylalanine en position 508. Cette dernière est sans contredit la mutation la plus fréquente. Il semblerait que ce génotype soit associé à une sévérité de la maladie remarquablement aiguë.

Finalement, la classe 4, qui constitue un ensemble de mutations peu répandues et encore mal définies, comprend les mutations qui affectent la conductance ionique. En 1993, SHEPPARD démontrait qu'un mutant faux-sens modifiant la partie transmembranaire du CFTR conduisait à l'expression d'une protéine CFTR correctement positionnée et régulée par l'AMPc cellulaire. Par contre, la protéine issue de ces mutants montrait une conductance des ions chlorures remarquablement diminuée.

Il semblerait, toutefois, qu'aucune mutation n'affecte l'activité de la protéine kinase A. À ce propos, COHN et collaborateurs ont publiés en 1993 le résultat de travaux visant à étudier l'efficacité de la phosphorylation par des voies métaboliques dépendantes de l'AMPc et du Ca^{2+} . Ce groupe a comparé l'efficacité de la phosphorylation de deux lignées de cellules épithéliales transformées, l'une provenant

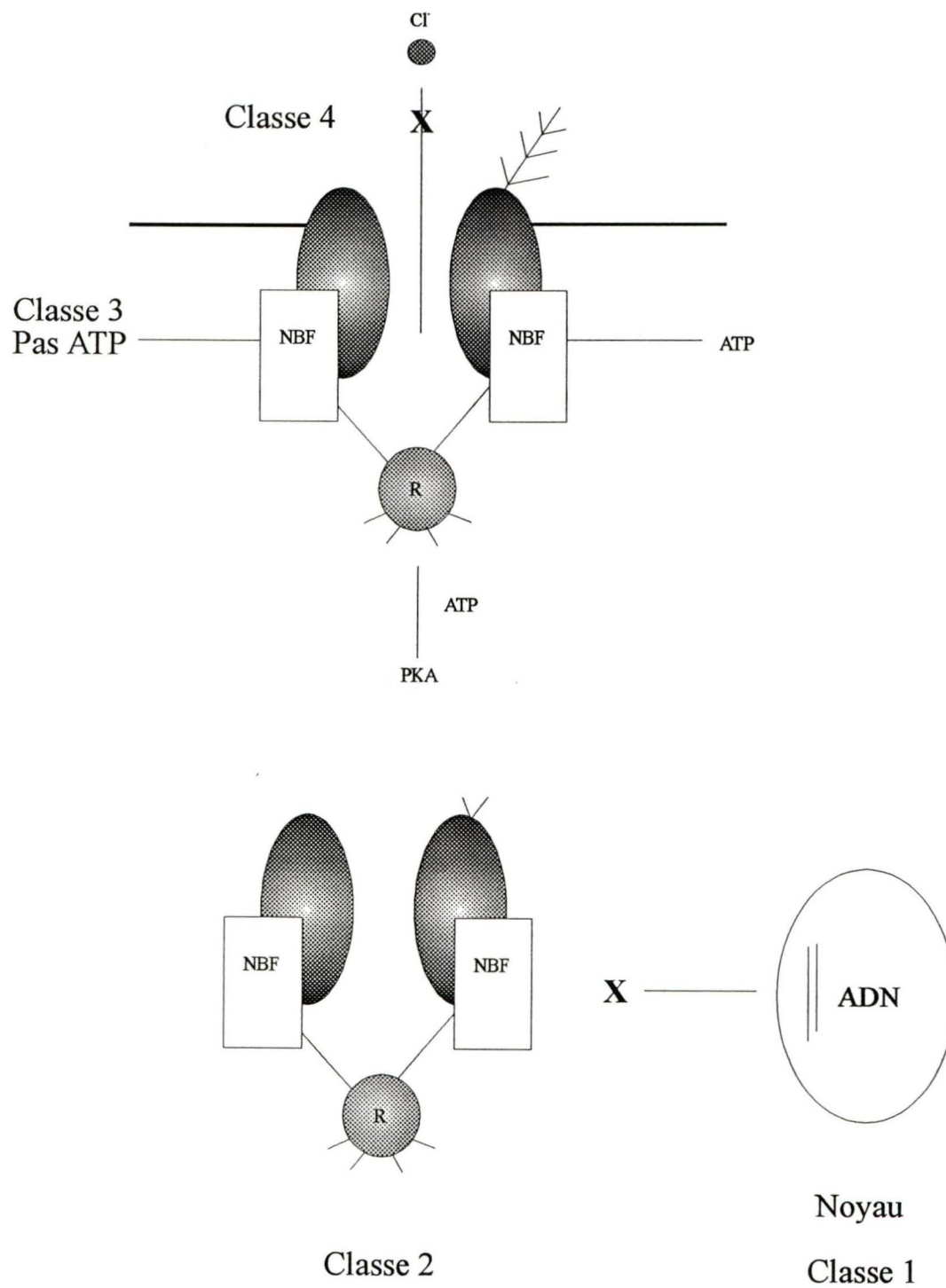


Fig. 2 Schématisation des quatre classes de mutations du CFTR.

d'un sujet atteint de fibrose kystique (FK), l'autre provenant d'un sujet normal. En activant *in vitro* la PKA à l'aide de l'isoprotérénol ou de la bradykinine, les auteurs ont observé que l'existence d'un génotype CFTR⁻ n'altérerait pas la phosphorylation. Par conséquent, la tare n'affecte que la protéine CFTR et l'efficacité de la phosphorylation par les protéines kinases n'est pas mise en cause dans les cas de mucoviscidose.

L'inhibition de la sécrétion chlorique amène des conséquences pour le moins sérieuses. L'accumulation des ions chlorures à l'intérieur des cellules provoque une exclusion exagérée des ions sodiques et favorise la rétention des groupements sulfates à la surface de l'épithélium (WELSH *et al* 1990). Ce débalancement ionique entraîne une entrée d'eau massive dans les cellules épithéliales causant une déshydratation anormale du mucus pulmonaire (JIANG *et al* 1993). D'un point de vue clinique, la mucoviscidose ou fibrose kystique, est définie dans un premier temps comme étant une dysfonction pancréatique entraînant une déficience dans la sécrétion d'enzymes digestives (WEST *et al* 1989). Cet état devient rapidement la cause de problèmes associés à la malnutrition tels que des troubles de la croissance chez l'enfant et la cachexie chez les patients les plus atteints. Chez certains malades, on a même rapporté des cas de diabète et de cirrhose du foie (CROFTON *et al* 1975). Toutes ces manifestations peuvent maintenant être corrigées par une thérapie médicamenteuse administrée *per os*. Cependant, à ce jour, les manifestations pulmonaires demeurent la première cause de décès chez les patients atteints de mucoviscidose. Le diagnostic de mucoviscidose est confirmé par la mesure d'une concentration en sodium élevée dans la sueur (WEST *et al* 1989). La déshydratation du mucus favorise son accumulation dans les bronches causant une

obstruction progressive des voies aériennes. En outre ceci facilite la colonisation par *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Actuellement, une minorité de patients ont accès à la transplantation bipulmonaire. Cette intervention permet aux malades d'améliorer leur qualité de vie et de prolonger leur espérance de vie d'environ sept ans. Cependant, la durée de la greffe est limitée par un affaissement des tissus pulmonaires ou par un relâchement des sutures. Pour la majorité des patients, le traitement consiste en des séances répétées de drainage postural et en l'administration d'antibiotiques intraveineux en milieu hospitalier.

1.2 Implication de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie appartenant au grand groupe des Enterobacteriaceae. Il s'agit d'une bactérie aérobie dénitrifiante (GOTTSCHALK 1986). En effet, les bactéries du genre *Pseudomonas* possèdent une enzyme, la nitrate réductase, qui leur permet de réduire le nitrate du milieu en nitrite puis en azote gazeux. La majorité des bactéries de ce genre sont des microorganismes du sol jouant un rôle important dans le cycle de l'azote. Cependant, *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste caractérisé par sa capacité à synthétiser deux pigments: l'un est fluorescent, la pyoverdine et l'autre est bleu, la pyocyanine. Ceux-ci étant des composés possédant une charge négative auraient pour fonction de protéger la cellule bactérienne contre les effets cytotoxiques des radicaux libres du milieu (PELCZAR *et al* 1988).

Plusieurs facteurs sont responsables de l'infection par *Pseudomonas aeruginosa* des voies respiratoires des patients atteints de fibrose kystique. La présence chronique

de mucus dans les voies aériennes supérieures favorise la rétention de la bactérie dans les bronches. Cependant, il semblerait qu'il existe un mécanisme plus détaillé impliquant la bactérie *Staphylococcus aureus*. En effet, chez la très grande majorité des patients colonisés par *Pseudomonas aeruginosa*, on a noté une infection préalable à *Staphylococcus aureus* (WARNER *et al* 1992). Lors de l'infection primaire à *Staphylococcus aureus*, la bactérie adhère aux cellules des voies trachéo-bronchiques et libère des protéases qui dégradent la fibronectine. Une telle agression provoque un premier influx neutrophilique au site de l'infection. Ces cellules immunitaires libèrent à leur tour de nombreuses protéases dont l'élastase, la cathepsine G et la collagénase (WARNER *et al* 1992, POWER *et al* 1994). Ce processus inflammatoire apporte sa contribution non seulement dans la première étape d'une défense immunitaire mais aussi dans l'augmentation du dommage tissulaire (JONES *et al* 1990). Ceci permettrait alors la colonisation des voies respiratoires par *Pseudomonas aeruginosa* qui, en adhérant, libère à son tour ses propres protéases, entraîne la perte des cils de l'épithélium favorisant ainsi l'accumulation du mucus dans les voies respiratoires ce qui crée un nouvel influx neutrophilique et un relargage enzymatique supplémentaire. La production d'antiprotéases dont l' α_1 -antitrypsine et l'anti-élastase devient rapidement inapte à assurer la protection de l'hôte (BIRRER *et al* 1994). Ce mécanisme cyclique et pernicieux finit éventuellement par causer la desquamation des bronches (WARNER *et al* 1992). Celle-ci sera suivie inéluctablement par une bronchiectasie qui se définit comme étant une destruction protéolytique irréversible des bronches entraînant un relâchement du tonus bronchique.

Suite à la colonisation par *P. aeruginosa*, on observe une augmentation marquée de la concentration d' α_1 -antitrypsine dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) des patients FK (ARTENSTEIN, 1976). La production de cette protéine suffirait à réduire les dommages cellulaires infligés par la production des protéases par les granulocytes, cependant, l'infection bactérienne et l'activation neutrophilique sont telles que même une concentration élevée d' α_1 -antitrypsine ne parvient pas à rétablir l'homéostasie (BIRRER *et al* 1994).

De plus, la bactérie *P. aeruginosa* a développé des mécanismes lui permettant de déjouer les défenses immunitaires de l'hôte. Dans un premier temps, la bactérie s'entoure d'une matrice mucoïde qui dissimule ses épitopes et empêche l'action des immunoglobulines, en plus de la rendre résistante aux antibiotiques (JENSEN *et al* 1992). De plus, il a été démontré que l'alginate contenu dans la matrice mucoïde de *P. aeruginosa* diminue la production de LTB_4 induite par le zymosan de même que l'activation de la PKC par le phorbol-myristate-acétate (PMA). De tels résultats suggèrent une réduction de la reconnaissance de *Pseudomonas* mucoïde par le PMN de même qu'une réduction de la transduction de signal par la bactérie (KÖNING *et al* 1992). Dans un deuxième temps, elle sécrète des protéases qui clivent les anticorps ce qui diminue considérablement l'efficacité du système immunitaire du patient (HORVAT *et al* 1989). MAHENTHIRALINGAM et SPEERT rapportait en 1994 que *Pseudomonas aeruginosa* isolé de patients colonisés de façon chronique n'exprimait plus ni la flagelline ni la pilline contrairement aux souches isolées d'une colonisation récente. Les auteurs proposent que l'acquisition d'un phénotype non motile avantagerait la survie de la

bactérie en augmentant sa résistance à la phagocytose et en permettant une épargne d'énergie.

1.3 Régulation de la réponse immunitaire chez les patients FK.

Tel que mentionné plus haut, la colonisation des voies aériennes des patients FK par des bactéries entraîne une activation exagérée des cellules immunitaires. Ces cellules immunitaires de même qu'une grande variété de cellules présentes au site de l'infection produisent de fortes concentrations de cytokines. Les cytokines sont des facteurs solubles de nature peptidique qui sont sécrétées par plusieurs types cellulaires en réponse à un stimulus microbien, chimique ou physiologique. Elles ont pour fonction d'activer un type cellulaire particulier de manière à induire soit la prolifération et la différenciation de ces cellules, soit d'activer la sécrétion d'une autre cytokine, soit à engendrer une réponse conduisant à l'élimination d'un pathogène ou d'une cellule tumorale. Les cytokines agissent en synergie les unes avec les autres et l'on retrouve généralement un recoupement, voire même une certaine répétition de leurs fonctions. À ceci s'ajoute une grande variabilité de réponses dépendant du stimulus reçu et du type cellulaire en cause, ce qui complique davantage l'étude des mécanismes d'action des cytokines.

Chez les patients FK, on note la présence de cytokines dites pro-inflammatoires telles que le colony stimulating factor (CSF), l'interféron (IFN), le tumor necrosis factor (TNF), les interleukines -1. -2. -6 et -8. Chacune d'entre elles jouent un rôle particulier dans la condition inflammatoire caractérisant la fibrose kystique. Les CSF sont impliqués

principalement dans la multiplication, la maturation et la différenciation des cellules immunitaires telles le macrophage et les granulocytes (CAVAILLON 1993) . Les IFNs sont généralement impliqués dans la défense antivirale (WHEELLOCK 1965). Cependant, chez le patient FK, ils participent à l'effet cytotoxique des cellules T, ils activent les neutrophiles (LIU *et al* 1995) et favorisent la sécrétion d'immunoglobulines. Le TNF, quant à lui, est produit par le macrophage en réponse au lipopolysaccharides (LPS) contenus dans la paroi des bactéries gram négatives (DENIS *et al* 1993, PFEFFER *et al* 1993). Il entraîne la production d'interleukine-1 (IL-1). Cette cytokine est parfois appelée cachectine en raison de sa capacité à causer la fièvre et une anorexie conduisant à un amaigrissement dramatique, la cachexie (CAVAILLON 1993).

Les interleukines -1 et -2 ont un rôle important dans la prolifération des cellules T. Cependant, la présence de ces cytokines peut être déjouée par certains microorganismes. A cet effet, MAZINGUE *et al* publiaient en 1989 les résultats de travaux démontrant que l'IL-2 augmente la croissance du parasite *Leishmania*. En prétraitant des souris avec de l'IL-2 avant de procéder à l'inoculation du parasite, le groupe de MAZINGUE a pu observer une exacerbation des lésions associée à une plus importante prolifération. Les auteurs concluent donc que l'IL-2 pourrait être utilisé comme facteur de croissance par *Leishmania*. Dans le même ordre d'idées, PORAT *et al* rapportaient en 1991 que l'IL-1 β augmentait la croissance d'une souche de *Escherichia coli* virulente. Ces auteurs ont suggéré que l'IL-1 β humain reconnaît des récepteurs à la surface de la bactérie mimant les récepteurs humains. Ce mécanisme contribuerait à retirer l'IL-1 des fluides biologiques et empêcher l'activation des lymphocytes T. La

même année, DENIS publiait que l'IL-2 et le GM-CSF augmentaient la croissance de *E. coli* virulent. Cette augmentation était significative avec une concentration d'IL-2 aussi faible que 1 U/ml. Il a été suggéré que l'ADN animal codant pour les récepteurs de cytokines serait recruté par la bactérie puis exprimé à sa surface. La bactérie serait alors en mesure d'intercepter la cytokine et favoriserait son invasion en diminuant la prolifération des cellules T et en diminuant la production d'immunoglobulines par les cellules B. De plus, chez les patients FK, l'IL-1, l'IL-2, l'IFN γ et le TNF α peuvent subir une inactivation protéolytique par la protéase alcaline et l'élastase produites par *Pseudomonas* (KHARAZMI 1991).

L'interleukine-6 est une cytokine pyrogène produite principalement par les macrophages. Selon CAVAILLON 1993, il pourrait s'agir d'un mécanisme de défense contre les pathogènes. Leur température de croissance étant de 37°C, une augmentation de la température corporelle contribuerait donc à diminuer la croissance de l'agent infectieux. Or, comme c'est le cas pour l'IL-1 et l'IL-2, certains pathogènes tirent avantage de la présence de cette cytokine. C'est le cas notamment de *Mycobacterium avium* (DENIS, 1992). L'interleukine-8 est une autre cytokine pro-inflammatoire importante. Elle est produite par les macrophages, les cellules épithéliales et les fibroblastes suite à une stimulation par le LPS, le TNF et l'IL-1. Son expression conduit à un effet chimiotactique sur les neutrophiles. Aussi, tel que rapporté par ASSADULAHY *et al* en 1992, une augmentation de la concentration d'IL-8 dans les expectorations de patients FK peut être corrélée à une aggravation de la maladie.

Donc, la modulation de la condition inflammatoire par *P. aeruginosa* se produit de la façon suivante. Le LPS présent dans la paroi de la bactérie active les macrophages qui sécrètent de l'IL-1, du TNF qui sont plus ou moins inactivées par les protéases et les toxines de *Pseudomonas*, de l'IL-6 qui active les cellules B à produire des IgM, IgG et IgA. Les macrophages produisent également de l'IL-8 qui s'additionne à celle produite par les cellules épithéliales en réponse au TNF et à l'IL-1 pour créer un appel neutrophilique important au site de l'inflammation.

1.4 Historique et propriétés physico-chimiques de l'interleukine-8.

L'interleukine-8 a d'abord été caractérisée comme étant un neutrophil-activating-peptide (NAP-1). Elle montrait les mêmes effets que les chemokines connues telles que le complément C5a, le leucotriène B₄ (LTB₄), le platelet activating factor (PAF) et la chemokine d'origine bactérienne, le formyl-méthylleucine-phénylalanine (FMLP). Sa structure moléculaire a été déterminée par SCHMID et WEISSMAN en 1987 avant même que sa fonction biologique soit clairement comprise. Il s'agit en fait d'un petit peptide de 72 acides aminés, d'un poids moléculaire de 8 kDa dont la structure secondaire offre une hélice α et deux feuillets β reliés par deux ponts disulfures qui sont essentiels à sa bioactivité (TANAKA *et al* 1988, MATSUSHIMA *et al* 1989). Bien que l'IL-8 soit résistante à la chaleur (elle peut être chauffée à 70°C pendant une heure et conserver sa bioactivité) de même qu'aux variations de pH (2.4 à 9.0) (PEVERI, *et al* 1988, SHRÖDER *et al* 1989), elle est sensible aux protéases (SCHRÖDER *et al* 1987). En 1993, PADRINES *et al* publiaient un article à l'effet que le neutrophile est en mesure

non seulement d'exprimer et de sécréter cette chemokine, il procéderait également à une transformation de celle-ci. En effet, le neutrophile produirait une IL-8 de 77 acides aminés qui, sous l'action de la cathepsine G et de l'élastase également produites par le neutrophile, serait clivée en différents endroits de manière à réduire sa taille à 72 acides aminés. La cytokine mature ainsi produite serait alors plus résistante aux protéases que la cytokine précoce de 77 acides aminés.

Sa véritable fonction biologique a été déterminée alors que l'on étudiait l'activation *in vitro* des neutrophiles par l'IL-1 (SAUDER *et al* 1984). On croyait alors que l'effet chimiotactique des neutrophiles que l'on observait était attribuable à l'interleukine-1. Or, avec la progression des techniques de biologie moléculaire pour la production de l'IL-1 pure par recombinaison, on n'arrivait plus à reproduire les effets fonctionnels obtenus avec des préparations d'IL-1 non purifiées (GEORGILIS *et al* 1984). Ceci suggérait donc la présence d'un facteur contaminant qui était le véritable responsable du chimiotactisme des neutrophiles. De plus, lors d'études *in vivo*, l'effet chimiotactique pouvait être observé plus rapidement si l'on administrait de l'IL-8 en injection intra-veineuse comparé à l'IL-1. Cette observation supposait un effet indirect de l'IL-1. Si l'IL-8 était en mesure d'induire directement l'influx neutrophilique, l'IL-1, quant à elle, devait induire l'expression de l'IL-8 qui était responsable de l'appel neutrophilique (VAN DAMME *et al* 1988).

Plusieurs laboratoires ont alors procédé à l'isolement de la molécule de façon indépendante ce qui a mené à l'apparition de plusieurs nomenclatures différentes. La littérature nous présente donc cette même cytokine sous le nom de monocyte derived

neutrophil chemotactic factor (MDNCF) (YOSHIMURA *et al* 1987), monocyte derived activating peptide (MONAP) (SCHRÖDER *et al* 1987), neutrophil activating factor (NAF) (WALZ *et al* 1987) et granulocyte chemotactic peptide (GCP) (VAN DAMME *et al* 1988).

1.5 Effets biologiques de l'IL-8

Certaines cytokines sont produites par des cellules spécifiques. Notons à titre d'exemple l'IL-2 et l'IFN γ qui ne sont produites que par les cellules T (VAN DAMME 1992). À l'inverse, l'IL-8 est produite par une très grande variété de cellules et son action touche également plusieurs types cellulaires. Son récepteur est d'ailleurs fortement exprimé à la surface des neutrophiles (20 000 récepteurs/cellule) (SAMANTA *et al* 1989), des macrophages (1040 récepteurs/cellule) et des cellules T (300 récepteurs/cellule) (GROB *et al* 1990). Le récepteur de l'IL-8 est spécifique à son ligand. Aucune activité croisée ne peut être induite par les autres chemokines. De plus, l'IL-8 est produite de façon spécifique non pas au niveau de la cellule productrice mais bien au niveau du stimulus reçu. Par exemple, lors d'une infection bactérienne, l'IL-8 est produite par les monocytes de façon beaucoup plus efficace que par les fibroblastes. Par contre, lors d'une infection virale, les fibroblastes répondent mieux. En outre, si l'on stimule des fibroblastes et des cellules endothéliales à l'aide de l'interleukine-1, les deux types cellulaires répondent de manière semblable (VAN DAMME *et al* 1988).

L'IL-8 agit principalement sur les cellules polymorphonucléées (PMNs). Suite à sa fixation au récepteur, il se produit une internalisation du complexe ligand-récepteur.

Par la suite, le récepteur réapparaît rapidement à la surface ce qui suppose un recyclage du récepteur plutôt qu'une synthèse *de novo* (SAMANTA *et al* 1989). L'IL-8 induit alors une dégranulation du neutrophile mesurable par le contenu des granules: la β -glucuronidase, l'élastase, la myeloperoxydase, la gélatinase et la vitamin B₁₂-binding protein (PEVERI *et al* 1988, WILLAMS *et al* 1989, MASURE *et al* 1991). En outre, la cytokine augmente l'adhérence des neutrophiles à l'endothélium de même que la diapédèse. De plus, l'IL-8 a un effet chimiotactique important sur le neutrophile.

Le mécanisme du chimiotactisme de l'IL-8 pourrait donc suivre le cheminement suivant. Au site de l'inflammation, la présence d'une bactérie invasive offre un stimulus provoquant la production d'IL-8 et d'IL-1 par les cellules épithéliales. L'IL-1 active d'autres types cellulaires se trouvant dans une situation histologique intermédiaire aux cellules épithéliales et aux neutrophiles. Il peut s'agir entre autres de fibroblastes, de cellules endothéliales, de monocytes, de macrophages, etc. Ces cellules produisent alors de l'IL-8 sous l'effet de l'IL-1 créant ainsi un gradient de concentration d'IL-8. La molécule se fixe alors à son récepteur exprimé à la surface des neutrophiles qui sont conduits dans le sens du gradient jusqu'au site de l'inflammation. Lorsqu'ils atteignent ce site, la concentration d'IL-8 étant maximale induit une inhibition de l'expression du récepteur d'IL-8 par un mécanisme de feedback négatif. Le neutrophile activé cesse donc de migrer et se fixe au foyer inflammatoire. De plus, selon McCAIN 1993, le GM-CSF est en mesure d'induire la production d'IL-8 par le PMN même. Ce phénomène contribue à augmenter la concentration d'IL-8 au site d'inflammation,

permettant ainsi un recrutement supplémentaire des PMNs ce qui, d'un point de vue physiologique, se traduit par une augmentation de l'acuité de l'inflammation.

1.6 Modulation de la production d'IL-8

Plusieurs stimuli sont en mesure d'induire la production d'IL-8. Cependant, comme il a été mentionné plus haut, chaque type cellulaire répond à un type de stimuli particulier. Les bactéries telles que *Salmonella sp.* et *Listeria monocytogenes* induisent une importante production d'IL-8 par les cellules épithéliales (ECKMANN 1993). Une augmentation du taux d'ARN messager peut être détectée après aussi peu que 90 minutes suite à l'infection. Cependant, ces mêmes cellules ne répondent pas aux bactéries non pathogènes pas plus qu'au LPS. Par contre, STRIETER *et al* rapportaient en 1990 que le LPS s'avérait être un excellent inducteur pour les macrophages. Cet auteur a suggéré que le macrophage est très facilement activable, ce qui laisserait supposer un rôle crucial dans l'infiltration des PMNs dans les poumons. Par contre, des travaux menés par DENTENER *et al* en 1993 démontrent que l'activation cellulaire par le LPS est médiée par la présence du récepteur CD14. Quant aux stimuli cytokiniques tels que le $TNF\alpha$, l'IL- 1β , les phorbol-esters (PHA) et la concanavaline A (ConA), ils induisent la sécrétion d'IL-8 par une large variété de cellules.

Si certaines cytokines peuvent induire la production d'IL-8, d'autres peuvent l'inhiber. C'est le cas des cytokines dites anti-inflammatoires telles que le transforming growth factor bêta ($TGF\beta$) (OHNO *et al* 1992), l'interleukine-4 (WERTHEIN *et al* 1993) et l'interleukine-10 (de WAALS *et al* 1991, NIRO *et al* 1994) de même que les

interférons alpha et bêta. En outre, il existe plusieurs composés aptes à inhiber la production d'IL-8. Ces composés, de nature stéroïdienne ou non, sont reconnus comme étant des composés anti-inflammatoires. En clinique, les corticostéroïdes sont déjà utilisés en inhalothérapie pour diminuer l'inflammation des voies aériennes chez certains patients asthmatiques (KWON 1994). Ces composés tels que la cortisone et le dexaméthasone, suppriment l'expression de l'ARN messager de l'IL-8 en se fixant sur la région GRE située à l'extrémité 5'. Cette liaison a pour effet de nuire à la transcription et donc de diminuer la synthèse de la chemokine de manière concentration-dépendante (MUKAIDA 1992 a et KWON 1994). De plus, il existe bon nombre d'anti-inflammatoires non stéroïdiens. À titre d'exemple, mentionnons l'acide acétyl salicylique (AAS), l'ibuprofène et l'indométhacine. Ces composés agissent de façon moins directe. L'AAS, par exemple, est un inhibiteur de la cyclooxygénase impliquée dans la synthèse des prostaglandines. La relation entre l'inhibition des prostaglandines et la production de l'IL-8 n'est pas encore clairement comprise.

1.7 Monoxyde d'azote et ses dérivés

En 1980, alors que FURCHGOTT et ZAWADSKI effectuaient des études de superfusions sur l'endothélium, ils ont noté la production endogène d'une molécule bioactive qui favorisait la vasodilatation. La molécule fut donc nommée endothelium derived relaxing factor (EDRF). Ce n'est que sept ans plus tard, en 1987, que PALMER et RADOMSKI déterminèrent la nature chimique de l'EDRF. Il s'agit en fait d'un radical libre, le monoxyde d'azote (NO), formé d'un atome d'azote lié à un seul atome

d'oxygène. Le NO est co-produit avec la L-citrulline lors de la transformation du L-arginine par l'enzyme NO synthase. La L-citrulline est alors impliquée dans le cycle de l'urée alors que le NO, après avoir activé une guanylate cyclase qui aura pour effet d'augmenter le taux de GMPC intracellulaire (RAPOPORT *et al* 1983), sera rapidement oxydé en nitrite puis en nitrate. En raison de sa très courte demie-vie, le NO est difficile à mesurer directement. On utilise donc généralement des méthodes colorimétriques pour mesurer soit les intermédiaires oxydés, soit la citrulline. On peut également quantifier l'augmentation du GMPC intracellulaire par essais radioimmunologiques.

Il existe deux types de NO synthase. D'abord, il y a la NO synthase de forme constitutive (c-NOS) présente exclusivement dans les cellules de l'endothélium et dans le tissu cortical. Elle permet le relargage de NO en petites quantités et sur de courtes périodes en réponse à des stimuli physiologiques. L'activité de la c-NOS est dépendante de la concentration intracellulaire de calcium et joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie vasculaire (MONCADA *et al* 1991). En 1989, SOWER *et al* démontraient l'implication d'une NOS Ca^{2+} -dépendante en ajoutant du calcium à la diète de sujets humains et animaux. Dans les groupes ayant reçu des doses de calcium *per os*, la tension artérielle mesurée était diminuée comparativement à celle du groupe témoin.

La deuxième forme de cette enzyme est dite inductible (i-NOS). Elle est calcium-indépendante et est présente dans différents types cellulaires, surtout chez le macrophage de rongeur. La i-NOS permet la synthèse de NO en quantité importante et ce, sur de longues périodes en réponse à des stimuli cytokiniques (TNF, IL-1 et IFN), bactériens ou tumoraux. Son induction dépend de la présence de L-arginine de même que de

cofacteurs tels que le NADPH ou la tétrahydrobioptérine (MONCADA *et al* 1991). Cependant, selon BAYDOUN *et al* 1994, la citrulline pourrait être recyclée en arginine de manière à permettre la synthèse de NO dans un milieu déficient en L-arginine. Cependant, les auteurs ont démontré qu'il ne s'agit pas d'une voie efficace en ce qui concerne le macrophage murin puisque les quantités de NO synthétisées à partir de la citrulline n'atteignent qu'environ 25% de la production maximale obtenue en présence de L-arginine.

Il est possible d'inhiber l'activité de la NOS en employant des analogues du L-arginine. Les inhibiteurs les plus utilisés sont le N^G-monométhyl-L-arginine (L-NMMA), le N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), N^G-iminoéthyl-L-ornithine (L-NIO) qui est un inhibiteur irréversible, le N^G-nitro-L-arginine (L-NNA) (MONCADA *et al* 1991), l'aminoguanidine (AG) (MISKA *et al* 1993) et finalement la L-canavanine (L-CAN). Cette dernière, cependant, soulève une controverse puisqu'elle ne semble pas inhiber la NOS bien qu'une diminution significative du relargage de NO ait été observée. Certains corticostéroïdes sont également en mesure d'inhiber l'expression de la i-NOS. McCALL du groupe de MONCADA, a rapporté en 1991 que la i-NOS des PMNs de rat ne peut être induite par la présence de TNF. Par contre, lorsque de l'IFN est ajouté au milieu, on stimule la synthèse de NO qui peut être inhibée par le dexaméthasone. Il a également été rapporté que les cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF β inhibent efficacement la i-NOS (ALLEVA *et al* 1994). Précisons en outre, que l'expression de l'i-NOS chez les macrophages et neutrophiles humains est encore controversée, bien que cette expression ne fasse aucun doute chez les rongeurs.

1.8 Rôles physiologiques du NO

Plusieurs rôles sont associés à la synthèse de NO notamment au niveau cardiovasculaire, immunitaire et respiratoire. Comme il a été mentionné précédemment, le NO joue un rôle important dans le maintien de la relaxation vasculaire (MONCADA *et al* 1991). Il joue également un rôle préventif en ce qui a trait aux processus thrombogènes et athérogènes puisqu'il inhibe l'agrégation plaquettaire de même que leur adhésion à l'endothélium et aux fibrilles de collagène. En effet, l'adhérence et l'agrégation plaquettaire sont deux phénomènes régulés par les taux de GMPc; le NO augmente la concentration de GMPc intracellulaire inhibant ainsi l'adhérence et l'agrégation des plaquettes. Une telle affirmation a été démontrée par GARDINER *et al* (1990a et b), en inhibant la NOS à l'aide du L-NMMA, ils ont pu mesurer une augmentation de la tension artérielle de même qu'une augmentation de l'agrégation plaquettaire.

On associe en outre l'effet du NO aux vasodilatateurs. Ces composés de synthèse sont utilisés depuis longtemps en cardiologie malgré que le mécanisme d'action ait été méconnu jusqu'à maintenant. En 1977, KATSUKI et SHULTZ furent les premiers à démontrer que les nitrates organiques induisent une augmentation dose-dépendante des taux de GMPc dans le muscle lisse. Un an plus tard, MURAD *et al* définissaient davantage le mécanisme des vasodilatateurs. Le groupe suggérait que ces composés activaient la guanylate cyclase et augmentaient ainsi le taux de GMPc en induisant une séquence de phosphorylations protéiques associée à la relaxation du muscle lisse. Ainsi, le nitrite relargué par l'assimilation des nitrovasodilatateurs réagirait avec des groupements thiols pour former des S-nitrosothiols. Ce sont donc ces composés qui

activeraient la guanylate cyclase (IGNARO *et al*, 1981). Or, le mécanisme d'action des nitrovasodilatateurs demeure sujets à de multiples débats puisqu'il semblerait que les radicaux libres soient eux-mêmes en mesure d'induire la guanylate cyclase (KATSUKI *et al*, 1977). Les nitrovasodilatateurs pourraient donc également générer du NO lors d'une réaction non enzymatique impliquant une cystéine apte à stimuler la guanylate cyclase soluble.

La fonction du NO dans le système immunitaire est de plus en plus reconnue. Le macrophage constitue le plus important producteur de NO. Il répond fortement au TNF, à l'IFN et au LPS. Fait intéressant à constater, si l'on combine le LPS à l'une ou l'autre de ces cytokines, il se produit une synergie potentialisant l'effet inducteur d'un de ces facteurs. Les neutrophiles, quant à eux, ne répondent qu'au LTB₄, FMLP et IFN. Une production de NO a également été rapportée chez les cellules endothéliales, les fibroblastes, les hépatocytes et les cellules de Kupffer en réponse à une préparation cytokinique (généralement une combinaison de LPS et d'une ou plusieurs cytokines proinflammatoires telles le TNF ou l'IL-1) désignée sous le terme de cytomix, de même qu'en réponse au LPS (MONCADA *et al* 1991).

Le rôle qu'occupe le NO dans la défense immunitaire est essentiellement cytotoxique. La principale caractéristique de ce radical libre est de pouvoir se lier au fer et expulser celui-ci de la cellule cible. Cette propriété empêche donc la respiration mitochondriale de la cellule cible en interférant avec les complexes I et II de la chaîne de transport des électrons. En retirant le fer, le NO prive plusieurs enzymes vitales de leur cofacteur. C'est le cas de l'aconitase qui est une enzyme clé du cycle de Krebs de

même que pour la ribonucléotide transférase qui joue un rôle crucial dans la réplication de l'ADN. Évidemment, il n'y a pas de spécificité quant au type cellulaire affecté par de telles actions. Aussi, l'organisme s'assure-t-il d'une protection systémique par le groupement hémique des érythrocytes qui, en complexant le radical, permet une action localisée (MONCADA *et al* 1991).

Il n'en demeure pas moins que le NO est un couteau à deux tranchants et une production excessive peut avoir des conséquences désastreuses. Au niveau des voies respiratoires, entre autres, si le NO n'est produit qu'à faible concentration, i.e. s'il ne provient que de la synthèse catalysée par la c-NOS, son effet est bénéfique. En favorisant la relaxation vasculaire, il protège les tissus pulmonaires en évitant la nécrose de même que l'hypertension pulmonaire (ALVING *et al* 1993). Par contre, si la i-NOS est induite et que l'on atteint des taux élevés de NO on observe alors des processus inflammatoires qui s'avéreront néfastes pour le sujet à plus long terme. Il a été démontré que le NO peut, à son tour, induire la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF (VAN DERVORT *et al* 1994) ce qui accroît son effet cytotoxique et entraîne éventuellement la desquamation de l'épithélium pulmonaire.

1.9 Hypothèses de travail

À la lumière de ces données, notre intérêt s'est porté principalement sur l'implication du monoxyde d'azote et de l'interleukine-8 dans la condition inflammatoire qui caractérise la mucoviscidose. Le travail a été divisé en trois volets importants: l'aspect *in vitro*, *ex vivo* et bactériologique. Sachant que les patients atteints de

mucoviscidose sont soumis à différents stimuli cytokiniques et bactériens, la première partie des travaux a donc consisté à déterminer *in vitro* l'aptitude des cellules épithéliales à produire de l'IL-8 et du NO. Des études de stimulations ont été effectuées sur deux lignées de cellules épithéliales ayant des phénotypes différents. L'une provient du cornet nasal d'un patient FK et possède donc un phénotype CFTR⁻ (56.13), alors qu'une autre est dérivée d'un sujet sain et possède un phénotype normal (13.21). La stimulation de ces cultures cellulaires selon des modes de concentration-réponse et cinétiques par des cytokines pro-inflammatoires a permis de déterminer si la présence d'un génotype CFTR⁻ pouvait faciliter l'induction de l'IL-8 et du NO comparativement à ce qui peut être induit chez une lignée de cellules épithéliales normales. De plus, en utilisant des agents anti-inflammatoires, nous avons tenté de déterminer si la présence d'un phénotype FK peut engendrer une résistance des cellules épithéliales face à de tels composés. Par la stimulation à l'aide de différentes cytokines de même que l'infection des cellules épithéliales par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, a permis de mettre en lumière les stimuli impliqués de même que la contribution des cellules épithéliales dans le processus d'inflammation des voies trachéo-bronchiques.

Dans un deuxième temps, la contribution des neutrophiles ayant infiltré les poumons des patients FK a été étudiée. La production chronique d'IL-8 et de NO a été quantifiée en mesurant ces marqueurs d'inflammation dans les expectorations de patients stables ainsi que de patients subissant une exacerbation de la maladie. Ces résultats ont été comparés à ceux mesurés dans les expectorations de sujets fumeurs atteints de bronchites chroniques. En isolant les neutrophiles des expectorations FK, il a été

possible de déterminer l'activité spontanée de ces cellules, alors que la culture de neutrophiles sanguins FK et normaux ont permis d'étudier l'induction de la production de NO et d'IL-8 chez les PMNs.

Finalement, sachant que la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste, qu'il a été démontré que des cytokines puissent servir de facteur de croissance pour certains microorganismes et connaissant les propriétés dénitrifiantes du genre *Pseudomonas*, des études de croissance de la bactérie ont été menées dans le but de déterminer si ce pathogène tire avantage de la condition inflammatoire qu'il induit. D'abord, la bactérie a été isolée d'un échantillon d'expectoration de patient FK colonisé par *Pseudomonas*. *P. aeruginosa* a été cultivé en présence et en absence de nitrate. La numération de la population bactérienne et la mesure du nitrite restant dans le milieu de culture a permis d'évaluer la consommation de nitrate par la bactérie de même que son assimilation dans ses voies métaboliques. Par la suite, une étude sommaire de l'effet bactéricide du NO a été effectuée en employant un générateur de NO, la spermine NONOate, dans un bouillon de culture. Cette étude a été complétée en vérifiant l'effet protecteur de la pyocyanine obtenue par photooxydation de la phénazine méthosulfate. Finalement, cette souche clinique a été cultivée dans un milieu bactériostatique en présence et en absence d'IL-8 et la croissance bactérienne a été quantifiée sur une période de 12 heures.

II. Matériels et méthodes

2.1 Cellules épithéliales

Les lignées de cellules épithéliales utilisées dérivent de brossages nasaux de sujets normaux (13.21) et FK (56.13) et ont été immortalisées par le groupe de Dr. M. Buchwald du Hospital for Sick Children, Toronto. Le rétrovirus SV40 a été utilisé afin de transférer l'ADNc de l'antigène grand T de même que le gène codant la 3' phosphotransférase qui confère une résistance des cellules épithéliales au G418. En ajoutant 0.5 mg/ml de G418 au milieu de culture, cette propriété permet une sélection des cellules efficacement transfectées (JEFFERSON *et al* 1990). Il en résulte alors des lignées cellulaires exemptes de virus, tel qu'ont pu le démontrer les mesures négatives de l'activité reverse transcriptase. Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de Petri pour culture de tissu dans un milieu α -MEM et D-MEM (1:1) (Gibco), enrichi de 5 % de Nu Serum (Collaborative Research, Cambridge, MA), 1 % de pénicilline-streptomycine, 0.2 mM de glutamine (tous deux de Gibco), 10 ng/ml d'epidermal growth factor (EGF, Collaborative Research), 5 μ g/ml d'insuline, 5 μ g/ml de transferrine, 0.4 μ g/ml d'hydrocortisone, 0.2 ng/ml de Na-sélénite et 25 ng/ml de prostaglandine E₂ (tous de chez Sigma, St-Louis, MO). Les cellules ont été incubées à 37°C dans un atmosphère de 5% CO₂, puis dispersées régulièrement à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (Gibco).

Les lignées cellulaires ont été préalablement caractérisées selon l'observation du phénotype FK en mesurant la sécrétion de chlore par les cellules épithéliales

transformées. Les cellules ont été cultivées dans un tampon sans chlorure contenant 119 nM de Na-gluconate, 1.2 mM de K_2HPO_4 , 0.6 mM de KH_2PO_4 à 37°C/5% CO_2 à raison de 10^6 cellules/puits dans des plaques de 24 puits (Linbro, Flow Laboratories, McLean, VI). Subséquemment, 1 μ Ci de $Na[^{36}Cl]$ (3.43 MBq/ml, Amersham) a été appliqué dans chaque puits avec ou sans forskoline (10^{-6} M). Les cellules ont alors été incubées et 100 μ l de surnageant ont été prélevés à des temps déterminés. Le transport chlorure a été évalué en quantifiant l'émission gamma.

2.2 Stimulation des cellules épithéliales

Les cellules épithéliales ont été cultivées dans des plaques de 24 puits (Linbro) à raison de 3×10^5 cellules/puits et incubées à 37°C/5% CO_2 pendant 24 heures de manière à permettre l'adhérence des cellules. Par la suite, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été lavées trois fois avec du Hanks' balanced salt solution (HBSS, Gibco). Un ml de MEM contenant 10% de fetal bovine serum (FBS) et 1% de pénicilline-streptomycine (tous de Gibco) a été ajouté à chaque puits. Les cellules ont été stimulées avec différentes cytokines: $IL-1\beta$, $TNF\alpha$, LPS, ou avec une combinaison de $IL-1\beta + TNF\alpha$. Les doses utilisées sont précisées dans la section des résultats. Chaque cytokine a été ajoutée au milieu à des concentrations variables pendant une durée d'incubation de 24 heures. Dans certaines expériences, les surnageants ont été prélevés à différents temps d'incubation puis congelés à - 80°C jusqu'au dosage de l'IL-8 et du NO.

2.3 Infection des cellules épithéliales

Lors de certaines expériences, les cellules ont été lavées avec du HBSS et un ml de MEM/FBS 10% sans antibiotique a été ajouté à chaque puits. Les cellules ont été exposées à 10^7 CFU/ml de *Pseudomonas aeruginosa* mucoïde ou 10^7 CFU/ml d'une souche clinique de *Escherichia coli* pour une période de 3 heures. Par la suite, le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été lavées délicatement avec du HBSS. Du milieu MEM/FBS 10% frais a été ajouté et les cellules ont été incubées à $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$. À des intervalles de temps déterminés, les surnageants ont été récoltés pour les mesures d'IL-8 et de NO. Les cellules ont à nouveau été rincées puis lysées avec $500 \mu\text{l}$ de SDS 0.01% pendant 5 minutes. Le détergent a été neutralisé en ajoutant un volume égal d'une solution stérile de BSA (Sigma). Les lysats cellulaires ont ensuite été dilués dans du PBS pour le titrage bactérien.

2.4 Population de patients FK

Dix-sept sujets FK (moyenne d'âge est de 18 ans allant de 8 à 29 ans) ont été étudiés. Tous avaient un test de sueur positif (Na^+ , $\text{Cl}^- > 60 \text{ nmol/L}$) et la plupart éprouvaient des manifestations pulmonaires significatives avec colonisation chronique par *Pseudomonas aeruginosa*, cultivé plus de trois fois l'an à partir des expectorations. Deux types de patients ont été étudiés; des patients à l'état de santé stable et des patients subissant une exacerbation de la maladie. Ces derniers étaient des patients hospitalisés pour une détérioration significative des fonctions respiratoires. Puisque les sujets normaux ne produisent pas d'expectoration, nous avons demandé la collaboration de 6

fumeurs montrant des évidences de bronchite chronique accompagnée de toux et de production d'expectoration dues à l'usage excessif du tabac. Les sujets étaient tous de sexe masculin et la moyenne d'âge était de 36 ans. Les échantillons de mucus recueillis de ces sujets ont donc servis de témoins non FK.

2.5 Récolte des expectorations

Lors du drainage postural des patients FK, les expectorations ont été recueillies dans des contenants de plastique stériles puis pesés. Un ml de PBS a été ajouté pour chaque g d'expectoration. Ces mélanges ont ensuite été vortexés et liquéfiés avec du dithiothréitol 0.5 M à 37° C pendant 1 heure. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 2 000 rpm pendant 20 minutes et les surnageants ont été récoltés puis congelés à -80°C jusqu'aux dosages de nitrite et d'IL-8.

Pour certaines expériences, les neutrophiles contenus dans les expectorations ont été isolés par centrifugation sur un gradient de densité autoformé (Lympholite-Poly, Cedarlane). Les neutrophiles ainsi obtenus ont été lavés avec du milieu de culture Serumless (Gibco) et comptés sur un hématimètre en utilisant du Bleu de Trypan (Gibco). Cette méthode permet d'obtenir des neutrophiles purs à >99%. Les neutrophiles ont ensuite été cultivés dans des plaques de 24 puits à raison de 10^6 cellules/puits dans un milieu Serumless contenant 1% de pénicilline-streptomycine et 0.5% de fungizone (tous de Gibco). Certains puits ont été laissés sans traitement alors que d'autres ont reçu un des traitements suivants: L-arginase 100 U/ml, L-NAME 500 μ M, L-Canavanine 500 μ M (tous trois de Sigma) ou L-NMMA 500 μ M (ICN

Biochemical, Toronto, Canada). Les neutrophiles ont ensuite été incubés pendant 24 heures à 37°C. Les surnageants ont été récoltés par filtration sur des filtres de 0.45 µm puis congelés.

2.6 Neutrophiles sanguins

Des échantillons d'environ 30 cc de sang périphérique de sujets sains et FK ont été obtenus par ponction veineuse dans des tubes héparinés (Vacutainer 10 cc, Beckton Dickinson, Rutherford, NJ). Les neutrophiles sanguins ont été isolés en centrifugeant le sang sur un gradient de densité autoformé (Lympholite-Poly). La bande cellulaire correspondante a été récoltée, lavée dans du milieu Serumless et les cellules ont été incubées dans des plaques de 24 puits à raison de 10⁶ cellules/puits. Les cellules ont été stimulées par 10⁷ CFU/ml de *Pseudomonas aeruginosa* mucoïde isolée d'une expectoration de patient FK. Certains puits ont reçu un des analogues du L-arginine suivant: L-NAME, L-NMMA ou L-CAN dans des concentrations de 500 µM.

2.7 Mesure de l'interleukine-8

La quantification des concentrations d'IL-8 contenues dans les échantillons a été effectuée en utilisant un système ELISA "maison". Des plaques de 96 puits à fonds plats (Costar, no 3590, Cambridge, MA) ont d'abord été recouvertes avec 100 µl/puits d'une dilution 1:10 000 d'un anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre l'IL-8 humaine (R & D system, Minneapolis, MN). Après une incubation de 5 heures à 37°C, les plaques ont été lavées 3 fois avec une solution de PBS (constitué de phosphate de sodium mono-

et dibasique, pH 7.2) contenant 0.05% de Tween 20. Les sites non adsorbés ont été bloqués en ajoutant 250 μ l/puits d'une solution de PBS contenant 2% BSA et en incubant les plaques à 37°C pendant 8 à 16 heures. Les plaques ont à nouveau été lavées 3 fois avec le PBS/Tween 20. Les plaques ainsi préparées peuvent être conservées à 4°C pendant 1 mois. Des dilutions sériées d'échantillons et de standard d'IL-8 (hIL-8 recombinant de chez R & D system, ou un standard interne d'IL-8) dans du PBS ont été disposés dans les puits à raison de 100 μ l/puits. Les plaques ont été incubées pendant 2 heures à 37°C avant d'être lavées 3 fois avec du PBS/Tween 20. Une dilution d'anti-hIL-8 de lapin (1:5 000, R & D system) dans du PBS/Tween 20 a été disposée dans les puits à raison de 100 μ l/puits et les plaques ont été incubées pendant 1h30 à 37°C. Quatre lavages avec PBS/Tween 20 ont précédé l'ajout de 100 μ l/puits d'une dilution 1:5000 d'anti-IgG de lapin provenant de la chèvre (Pierce, Rockford, IL). Cet anticorps couplé à la biotine permet l'amplification de la réponse. Les plaques ont été incubées à nouveau pendant 1h30 à 37°C puis lavées 5 fois avec du PBS/Tween 20. Cent μ l d'une dilution 1:5000 de streptavidine:horseradish peroxydase (Pierce) dans du PBS/Tween 20 ont été ajoutés à chaque puits et incubés à 37°C pendant 1 heure. Six lavages avec du PBS/Tween 20 ont précédés l'ajout de 100 μ l/puits de la solution substrat. Cette dernière est composée de 1 mg/ml d'o-phénylènediamine dans un tampon citrate 0.1 M/0.012% H₂O₂, pH 4.5. Les plaques ont ensuite été incubées à la température de la pièce, dans le noir, pendant 20 à 30 minutes afin de permettre le développement de la couleur. La densité optique a été lue à 450 nm sur un lecteur de plaques Bio-Rad, modèle 3550 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). La sensibilité de

cette méthode était approximativement de 15 pg/ml. Lors d'expériences contrôles, il a été démontré que cette technique ne présente pas de réactivité croisée avec les cytokines humaines telles que IL-1 α , IL-1 β , IL-6, CSF-1 ou TNF α et ce, même dans des concentrations excédant 10 μ g/ml. L'essai était linéaire de 0.015 ng/ml à 1.25 ng/ml. La variation intra-essais était de 0.5% à 1% alors que la variation inter-essais était inférieure à 1.5%.

2.8 Standard interne d'IL-8

Du sang humain périphérique a été prélevé dans un sac hépariné (400 cc) puis distribué dans des tubes à centrifugation contenant 20 ml d'Histopaque (Sigma). Les tubes ont été centrifugés pendant 30 minutes à 1.8×10^3 rpm. Les monocytes ont été prélevés et lavés par centrifugations successives de 7 minutes à 1.8×10^3 rpm avec du milieu Serumless. Les cellules ont ensuite été cultivées dans un flacon de culture contenant 40 ml de milieu Serumless supplémenté de 1% de pénicilline-streptomycine et de 0.5% de fungizone, 5 ng/ml concanavaline A (Sigma) pour une densité cellulaire d'environ 10^6 cellules/ml, puis incubées à 37°C/5% CO₂ pendant 24 heures. Les milieux de culture ont ensuite été prélevés, centrifugés à 1.8×10^3 rpm pendant 7 minutes pour éliminer la contamination cellulaire, aliquotés puis congelés à - 80°C. La mesure de l'IL-8 produit par les monocytes a été réalisée par ELISA en comparant les résultats avec une courbe standard d'IL-8 recombinant (R&D System).

2.9 Mesure du nitrite

La production de NO a été quantifiée en mesurant les intermédiaires réactifs dérivés de l'oxydation du radical libre, soit les ions nitrite (NO_2^-) et nitrate (NO_3^-) par la méthode colorimétrique de Greiss. Cependant, puisque le réactif de Greiss ne réagit pas avec le nitrate et qu'en présence d'oxygène, le nitrite dérivé de l'oxydation du NO subit une seconde oxydation qui conduit à la formation de nitrate, il est essentiel de réduire ce dernier selon un procédé enzymatique.

Cent μl de milieux conditionnés ont été disposés en duplicata dans des microtubes de 1.5 ml. A chaque surnageant, 0.1 U/ml de nitrate réductase d'*Aspergillus* a été ajouté avec 100 μM de NADPH (tous deux de Sigma). Les surnageants ont été incubés environ 16 heures à la température de la pièce, dans le noir. Ensuite, 200 μl du réactif de Greiss (1% sulfanilamide dans l'acide acétique 30% et 0.1% de dihydrochlorure de N-(1-naphtyl)éthylènediamine (tous de Sigma) dans l'acide acétique 60% dans un ratio de 1:1) ont été ajoutés. L'absorbance a été mesurée à 595 nm dans des plaques de 96 puits. La concentration de nitrite a été déterminée en comparant les valeurs obtenues avec une courbe standard établie avec une dilution sériée d'une solution de nitrate de sodium aussi traitée avec la nitrate réductase. La concentration minimale pouvant être détectée avec cette méthode est d'environ 1 μM .

2.10 Constitution d'un stock de *Pseudomonas aeruginosa*

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* a été isolée à partir d'un échantillon d'expectoration frais provenant d'un patient FK. L'expectoration a d'abord été diluée avec du PBS afin de faciliter le prélèvement de l'inoculum dans la phase aqueuse à l'aide d'un manche de Koch. L'inoculum a ensuite été étalé par épuisement sur un agar sélectif à la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (PA agar base, Difco, Fischer Scientific). Après une incubation de 24 heures à 37°C, une colonie isolée de *Pseudomonas aeruginosa* a été sélectionnée selon son aspect général et sa capacité à produire la pyocyanine, puis a été étalée à nouveau par épuisement et incubée à 37°C pendant 24 heures. Un troisième étalement a été effectué afin d'éviter une contamination avec *Staphylococcus aureus*.

Une fois purifiée, la bactérie a été cultivée dans 50 ml de bouillon MacConkey (BDH, Daamstadt, Allemagne de l'est) pendant 48 heures à 37°C. La population bactérienne a alors été dénombrée par titrage bactérien et exprimée en CFU/ml. Du glycérol 30% v/v a été ajouté au bouillon afin de permettre la congélation de la suspension bactérienne à - 80°C. Lors de la remise en culture, les cellules bactériennes ont été centrifugées dans une microcentrifugeuse Eppendorf et lavées avec 1 ml de bouillon MacConkey frais puis incubées dans 50 à 100 ml de MacConkey pendant 24 heures à 37°C. Lors de chaque repiquage, la densité de la population bactérienne a été évaluée par spectrophotométrie. Brièvement, une courbe standard de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* a été établie en prélevant un échantillon d'une culture bactérienne fraîche à des temps déterminés. Pour chaque échantillon, un titrage bactérien

a été effectué afin de déterminer le nombre de CFU/ml. Cette valeur a été associée à la densité optique obtenue à 620 nm pour ce même échantillon. La courbe ainsi obtenue a permis de déterminer le nombre de CFU/ml pour les cultures suivantes par une simple lecture de densité optique (Figure 3).

2.11 Synthèse et purification de la pyocyanine

Des méthodes de synthèse chimiques ont été développées de manière à étudier les effets de ce pigment tout en éliminant les nombreuses variables qu'impose l'utilisation de la bactérie fraîche. Une méthode simple pour la synthèse de la pyocyanine consiste en une photooxydation d'un composé jaune: la phenazine méthosulfate (KNIGHT *et al* 1979).

La phénazine méthosulfate (Sigma) a été dissoute dans un tampon Tris-HCl 0.01 M à raison de 2 mg/ml puis exposée à une lumière intense pendant 4 à 5 jours. Lors de l'exposition à la lumière, la solution de phenazine tourne graduellement du jaune au vert, puis au bleu-vert et finalement au noir. L'évolution de la réaction chimique a été suivie par chromatographie sur couche mince (CCM). À cette fin, 10 ml d'une solution organique constituée d'un mélange de chloroforme et de méthanol 1:1 ont été disposés dans un cylindre gradué de verre de 100 ml. Ce dernier a été recouvert d'un parafilm de manière à permettre la saturation de la chambre à chromatographie (pendant approximativement 20 minutes). Environ 75 - 100 μ l du produit d'oxydation de la phénazine ont été disposés au bas d'une bande 5 X 30 cm d'une feuille d'aluminium recouverte de silice (Fischer Scientifique). La bande a ensuite été placée dans la

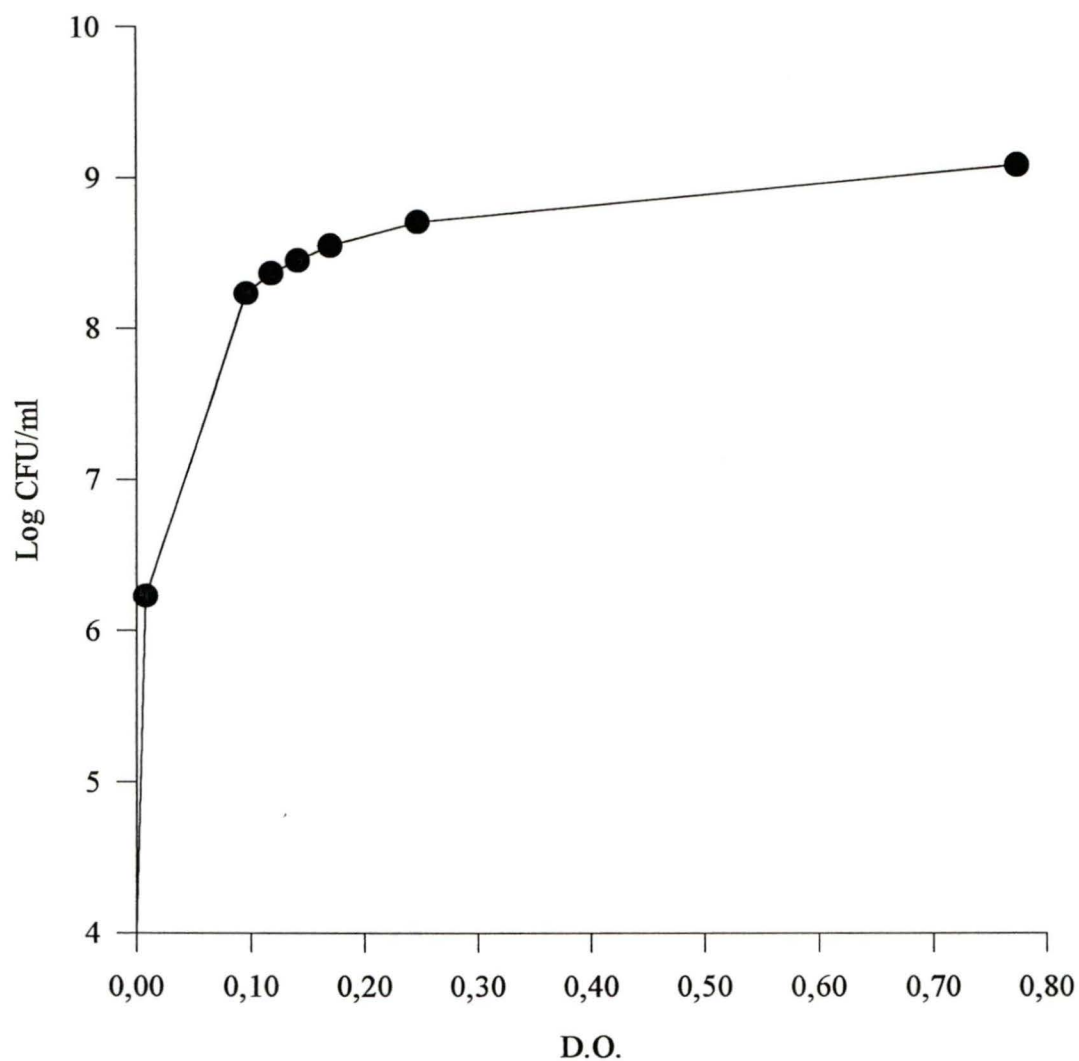


Figure 3. Courbe étalon de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*. Une souche clinique de *P. aeruginosa* a été cultivée dans un bouillon MacConkey et la population bactérienne a été titrée en duplicata sur un agar sélectif à *Pseudomonas*. La densité optique a été lue à $\lambda=620$ nm

chambre à chromatographie pour une période d'élution de 1h30 à 2 heures. La phénazine (jaune) a un r_f de 0.05 alors que la pyocyanine (bleue) a un r_f de 0.60. L'apparition d'une bande, généralement verte, intermédiaire à ces composés indique une oxydation incomplète. La sensibilité de la méthode a été augmentée en utilisant un révélateur sensible aux rayons ultra-violets incorporé à la silice.

Suite à la complétion de l'oxydation, la pyocyanine a été purifiée selon une méthode de chromatographie sur colonne (SORENSEN *et al* 1983, MILLER *et al* 1987). Le choix de la méthode a été basée sur les différences de polarité de la phénazine et de la pyocyanine. Cette dernière étant moins polaire que la phénazine, sa rétention sur le gel a été moindre et donc, la pyocyanine a pu être recueillie bien avant la phénazine.

Une colonne de verre de 2.0 cm de diamètre a été remplie d'un gel de silice sur une hauteur minimale de 82 cm. Le gel a été préparé avec de la silice de 60 Å dans une solution d'équilibration constituée de 1% méthanol dans du chloroforme. La colonne a été équilibrée avec 3 fois le volume total de la colonne à l'aide de la solution d'équilibration. La préparation de pyocyanine a préalablement été lyophilisée et resolubilisée dans un volume minimal de méthanol. L'échantillon a ensuite été déposé en haut du gel et élué avec une solution contenant 15% de méthanol dans du chloroforme. La bande de pyocyanine a pu être suivie visuellement en raison de sa coloration bleue. Les fractions recueillies ont été séchées sous un jet d'air puis pesées. La pureté de la pyocyanine a été vérifiée par CCM. Le pigment a été conservé à -80°C.

2.12 Croissance de *Pseudomonas aeruginosa*

Dans certaines expériences, l'utilisation du nitrate par la bactérie *P. aeruginosa* a été étudiée en cultivant 10^4 CFU/ml de bactéries dans un milieu Serumless ou MacConkey. Certains milieux ont été laissés tels quels alors que d'autres ont été supplémentés avec $500 \mu\text{M}$ de nitrate de sodium (NaNO_3). Dans certaines expériences, un générateur de NO, la spermine NONOate, a été ajouté à raison de $500 \mu\text{M}$ avec ou sans pyocyanine ($5 \mu\text{g/ml}$) afin de vérifier l'effet bactéricide du NO de même que l'effet protecteur de la pyocyanine. Les bactéries ont ainsi été incubées à 37°C pendant 48 heures. À des temps déterminés, des échantillons de la suspension bactérienne ont été prélevés et dilués dans du PBS pour un titrage bactérien ainsi que pour un dosage de nitrite.

L'interaction de la bactérie avec l'IL-8 a été étudiée en cultivant *P. aeruginosa* dans du sérum humain. Le sang d'un volontaire sain a été prélevé par ponction veineuse dans des tubes non héparinés. Après coagulation, le sang a été centrifugé à 2000 rpm pendant 30 min. Le sérum a été prélevé, distribué dans des tubes de 15 ml à raison de 10 ml/tubes puis inactivé à 56°C pendant 25 minutes. Un tube a étéensemencé avec 10^5 CFU/ml de *P. aeruginosa* sans aucun autre traitement. Certains séras ont été supplémentés d'IL-8 recombinant (R & D system) en concentrations variables (0.5 ng/ml et 10 ng/ml) avec ou sans héparine. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures. Des échantillons de séras ont été dilués dans du PBS pour fin de titrage.

2.13 Statistiques

La portée de la différence entre les groupes de données a été analysée en utilisant le test t de Student. Les calculs ont été effectués à partir du chiffrier électronique SigmaPlot 1.0 de Jandel Scientific pour Windows.

III. Résultats

3.1 Caractérisation des cellules épithéliales selon leur phénotype FK et non FK

L'altération du canal CFTR dans les cellules FK se manifeste par une déficience de la sécrétion chlorique en réponse aux agonistes de l'AMPC. À cet effet, la sécrétion chlorique des deux lignées de cellules épithéliales étudiées en réponse à la forskoline (10^{-7} M) a été examinée (Tableau 1). Les résultats montrent que la lignée de cellules normale (13.21) sécrète d'importantes quantités de Cl^- lorsqu'elle se trouve en présence de forskoline. Quant à la lignée FK (56.13), elle ne libère que des quantités de Cl^- négligeables en réponse à la forskoline. En outre, ces cellules épithéliales ont été caractérisées pour leur phénotype, dans une récente publication (BEDARD *et al* 1993).

3.2 Production d'IL-8 et de nitrite par les cellules épithéliales en culture

Les lignées ont été cultivées dans un milieu α -MEM sans sérum puis exposées à des concentrations variables d'IL- 1β et de TNF α . Les lignées de cellules épithéliales normales et FK produisent de larges quantités d'IL-8 lorsqu'elles sont exposées à ces agents inflammatoires. Les Figures 4 et 5 montrent que les lignées 56.13 (Figure 4) et 13.21 (Figure 5) répondent à l'IL- 1β et au TNF α de manière concentration-dépendante. La combinaison de ces deux stimuli pro-inflammatoires ne semble pas augmenter le potentiel de relargage de l'IL-8 par les cellules épithéliales en absence de sérum. L'induction maximale a été atteinte avec 5 ng/ml de cytokine. Cette concentration a

Tableau 1. Efflux chlorique par les lignées de cellules épithéliales

Lignée cellulaire	0 min ^a	3 min	5 min
13.21 (normale)	0	38*	43*
56.13 (FK)	0	4	5

^a L'efflux chlorique est exprimé en % supérieur au témoin comparé à l'efflux basal. Les S.E.M. étaient inférieurs à 15% de la moyenne. Les résultats sont les moyennes de 6 échantillons et l'expérience a été répétée deux fois avec des résultats similaires.

* Indique une différence significative par rapport à la lignée FK ($p < 0.01$).

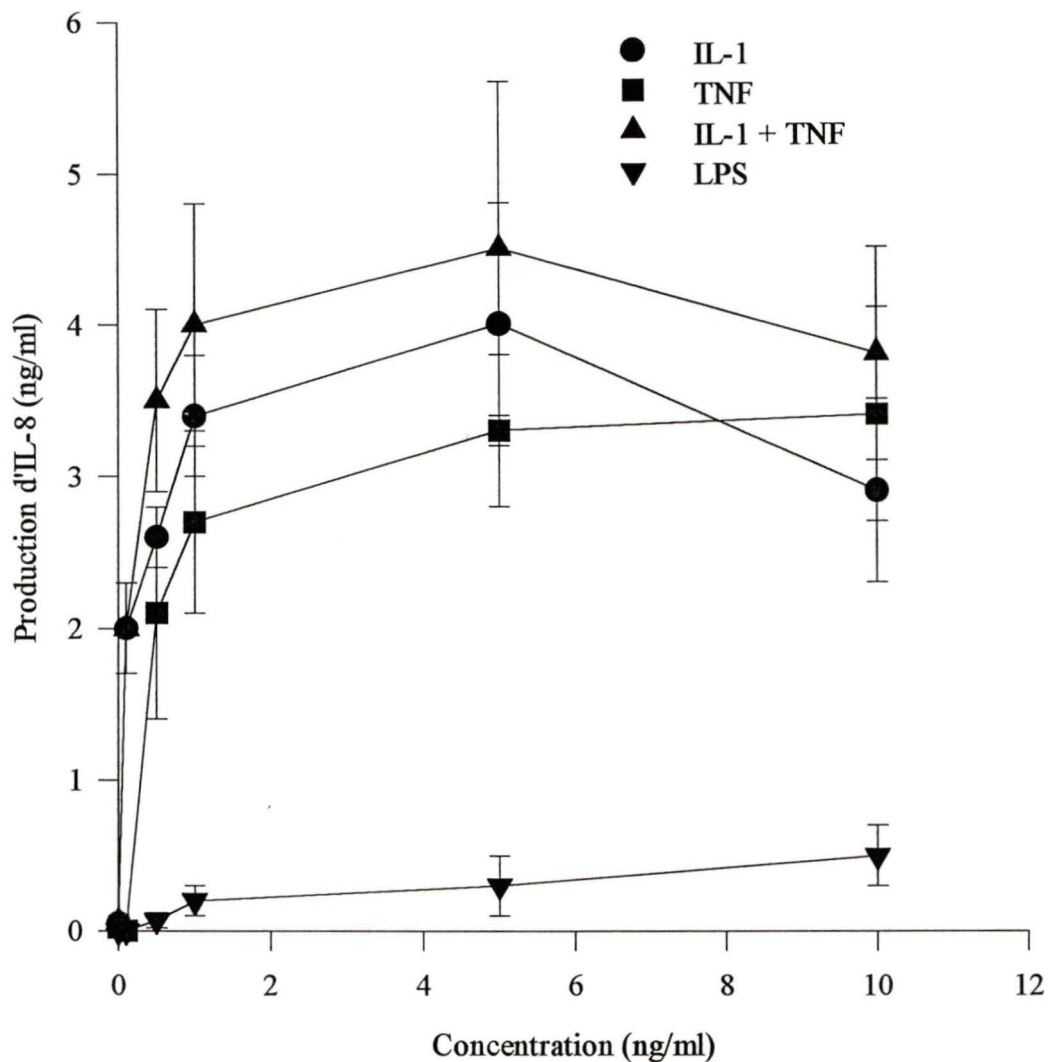


Figure 4. Courbes concentration-réponse de la production d'IL-8 par les cellules épithéliales 56.13 en réponse à des stimuli pro-inflammatoires. L'IL-8 a été mesurée après 24 heures de stimulation avec des concentrations variables de cytokines dans un milieu α -MEM sans sérum. Les résultats représentent les moyennes et E.S.M. de quatre expériences mesurées en duplicata.

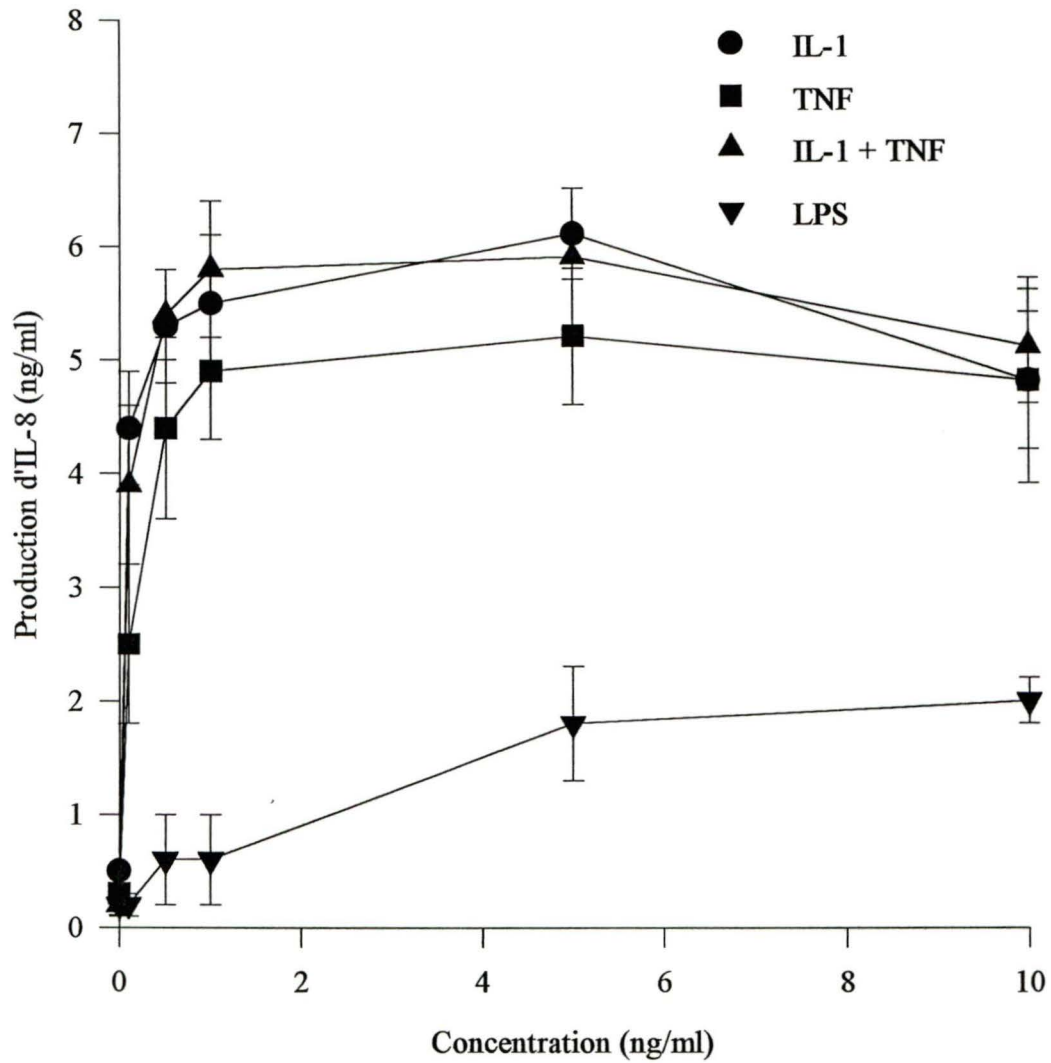


Figure 5. Courbes concentration-réponse de la production d'IL-8 par les cellules épithéliales de la lignée 13.21.

donc été retenue pour les expériences subséquentes. Par contre, le LPS d'*Escherichia coli* n'a induit qu'une très faible production d'IL-8.

Lorsque les cellules épithéliales ont été cultivées en présence de 5 ng/ml d'IL-1 β , 5 ng/ml de TNF α ou 5 ng/ml d'IL-1 β + 5 ng/ml de TNF α dans un milieu α -MEM/FBS 10% afin de procéder à une étude cinétique, on a remarqué que la sécrétion d'IL-8 augmente en fonction du temps de stimulation (Figures 6 et 7). Les cellules cultivées *in vitro* ne relarguent pas l'IL-8 spontanément. La réponse des cellules épithéliales aux cytokines pro-inflammatoires n'est pas significativement différente qu'il s'agisse de la lignée 56.13 ou 13.21. En présence de sérum, il semble y avoir une additivité de l'effet du TNF α et de l'IL-1 β .

Un dosage du nitrite par la réaction de Greiss sur ces mêmes surnageants de stimulation a démontré que les cellules épithéliales humaines ne sécrètent pas spontanément de NO dans le milieu ni même en réponse aux cytokines (résultats non montrés).

Bien que des résultats publiés en 1993 par notre groupe de recherche aient démontré l'efficacité du dexaméthasone à inhiber la production d'IL-8 par les cellules épithéliales primaires, aucune inhibition significative n'a pu être obtenue chez les cellules épithéliales transformées. En effet, les glucocorticoïdes tels que le dexaméthasone et la cortisone se sont avérés inefficaces dans des concentrations de 10 et 50 μ M. Les agents anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que l'ibuprofène et l'indométhacine se sont également avérés inefficaces à inhiber la production d'IL-8 par les lignées cellulaires. Quant à l'IL-4 et à l'IFN γ , elles se sont avérés sans effet sur la lignée de cellules

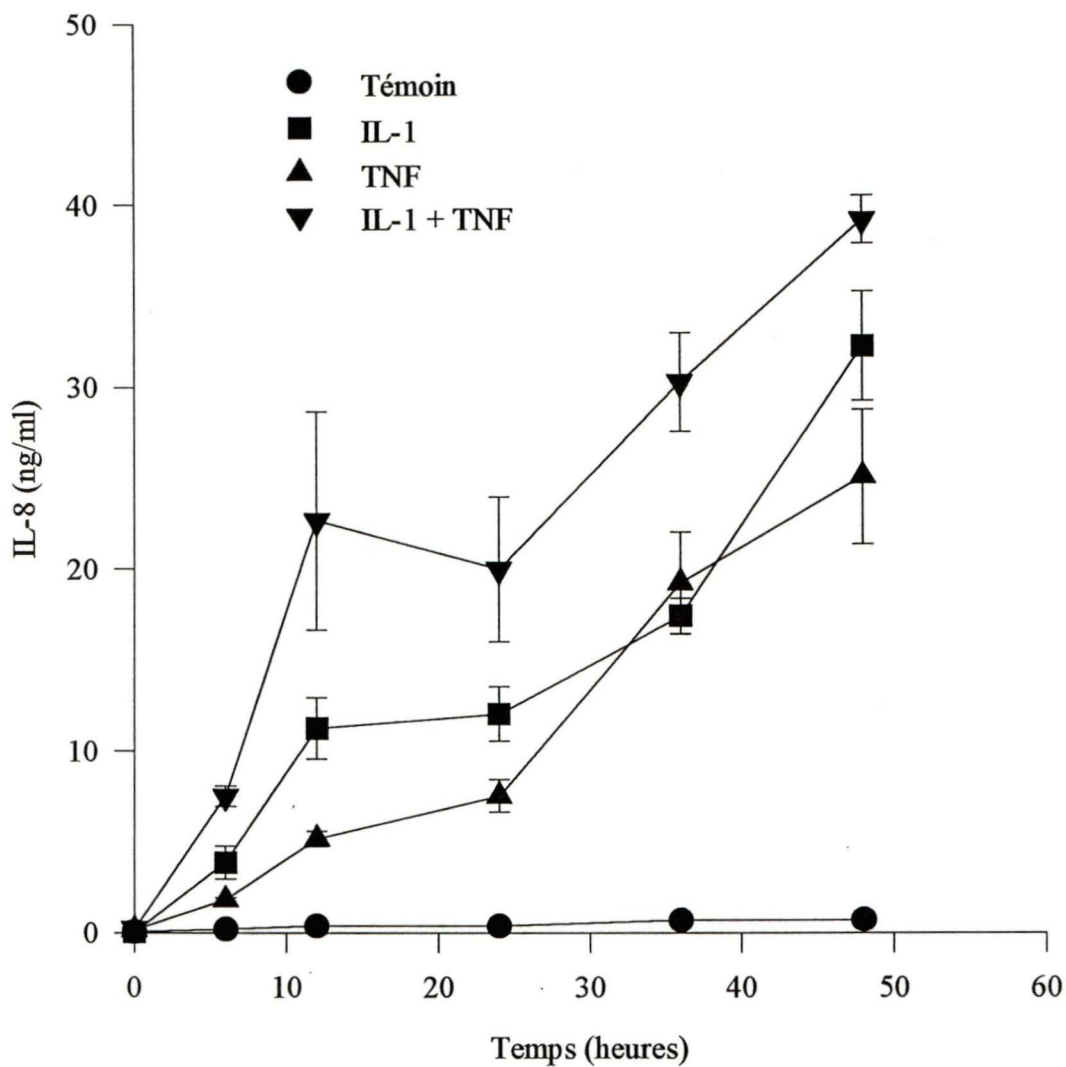


Figure 6. Production d'IL-8 par les cellules de la lignée 56.13 exposées à des cytokines pro-inflammatoires. Au temps 0 h, les cellules ont été exposées à 5 ng/ml de cytokines et les surnageants ont été récoltés à des temps déterminés. Les résultats représentent les moyennes et E.S.M. de quatre expériences mesurées en duplicata.

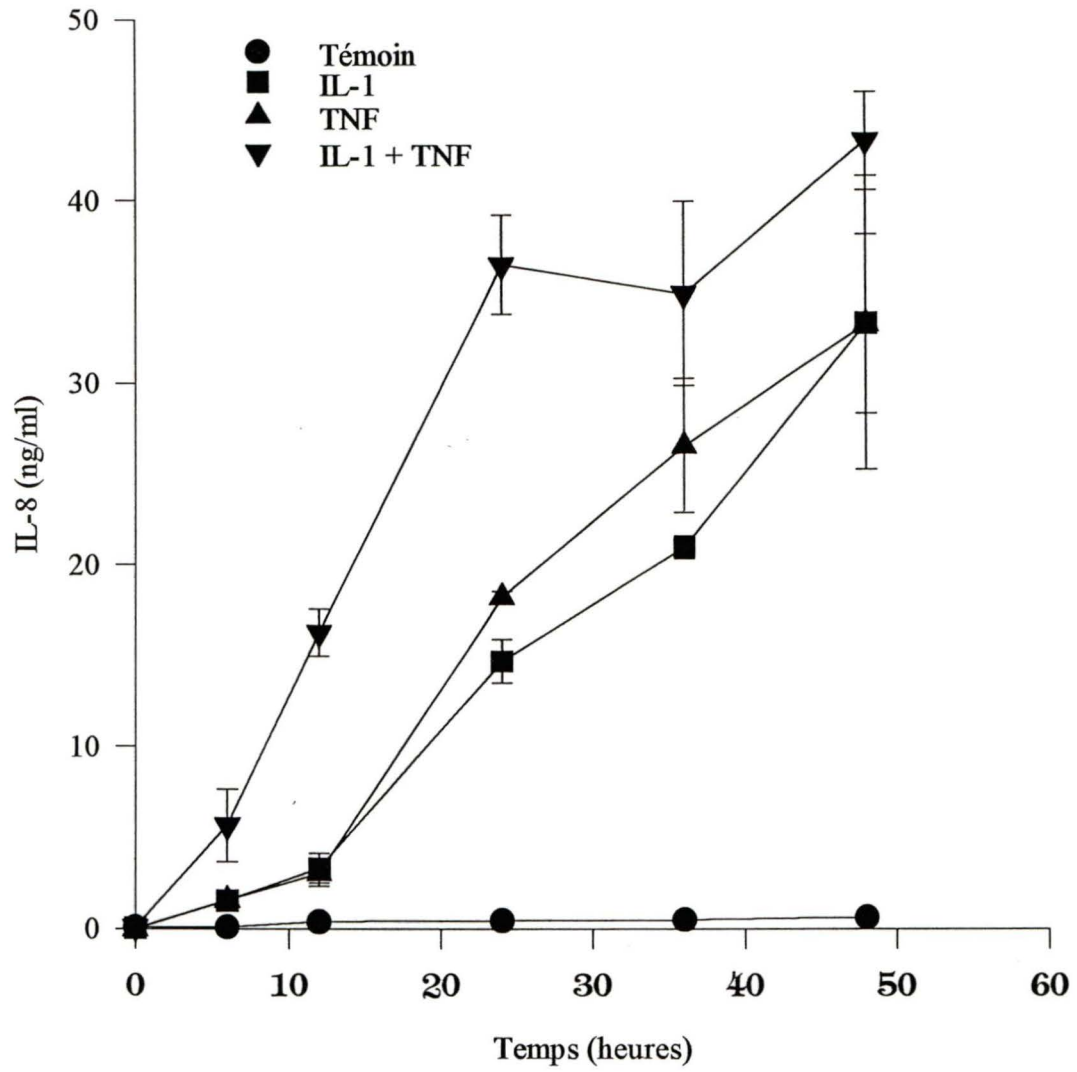


Figure 7. Production d'IL-8 par les cellules de la lignée 13.21 exposées à des cytokines pro-inflammatoires.

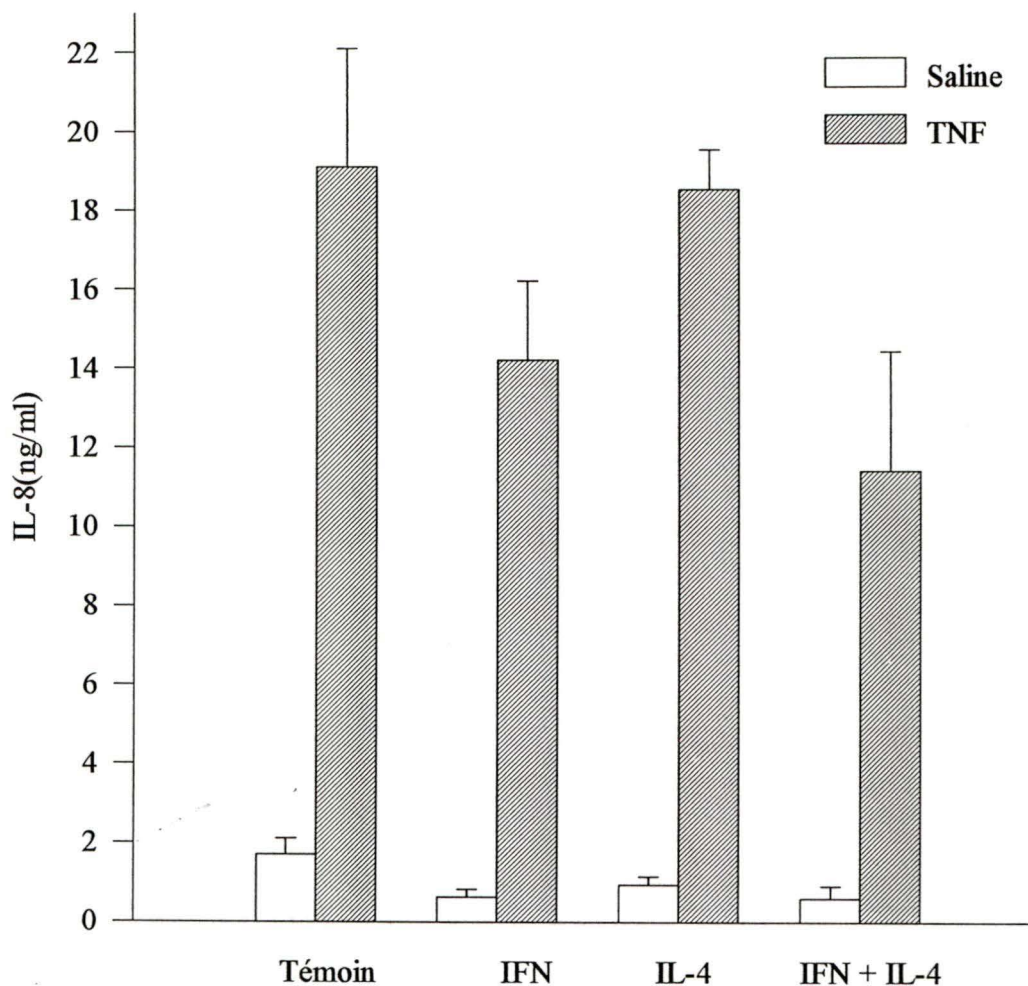


Figure 8. Effet des anti-inflammatoires de l'IFN γ sur les cellules épithéliales 13.21.

Les cellules ont été prétraitées avec 1000 U/ml d'IL-4 et/ou 1000 U/ml d'IFN γ puis traitées avec 5 ng/ml de TNF α ou un volume équivalent de saline. IFN γ n'inhibe pas la production d'IL-8 de façon significative. Les résultats représentent les moyennes et E.S.M. de trois expériences mesurées en duplicata.

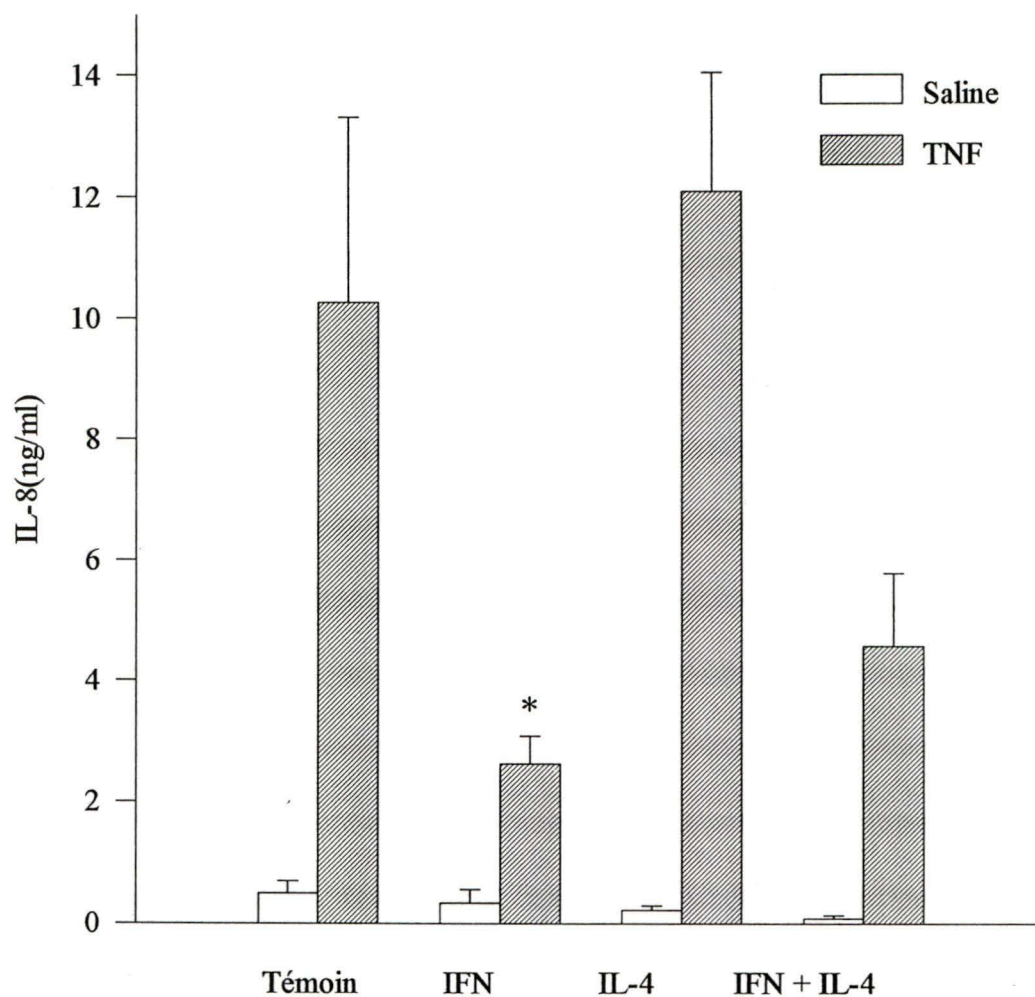


Figure 9. Effet anti-inflammatoire de l'IFN γ sur les cellules épithéliales 56.13. Un prétraitement à l'IL-4 (1000 U/ml) et/ou à l'IFN γ (1000 U/ml) a précédé un conditionnement des cellules par le TNF α 5 ng/ml ou la saline. IFN γ inhibe la production d'IL-8 de la façon significative (*; $p < 0.01$). Les résultats représentent les moyennes et E.S.M. de trois expériences mesurées en duplicata.

normales 13.21 (Figure 8). Par contre, l'effet de l'IFN γ sur la lignée FK, 56.13, est surprenant. Les résultats de la Figure 9 montrent qu'un prétraitement avec 1000 U/ml d'IFN γ 30 minutes avant la stimulation au TNF α (5 ng/ml) diminue significativement la production d'IL-8 par les cellules FK.

3.3 Mesure des taux d'IL-8 et de nitrite dans la phase soluble des expectorations de sujets FK.

Le tableau 2 montre les taux de nitrite et d'IL-8 mesurés dans la phase soluble des sujets FK et des sujets bronchitiques. Des taux élevés de nitrite (100 à 250 μ M) ont été détectés dans la phase soluble des expectorations de sujets FK alors que des taux beaucoup plus faibles ont été trouvés dans les expectorations des sujets montrant une bronchite chronique. Quant à l'IL-8, des taux relativement élevés ont été mesurés dans les échantillons d'expectoration FK, c'est-à-dire entre 1.3 et 8.5 ng/ml alors que les échantillons de bronchitiques avaient une quantité d'IL-8 plus faible. Les deux marqueurs d'inflammation que constituent le nitrite dérivé du NO et l'IL-8 semblent être largement dérivés de l'arbre trachéo-bronchique puisque les échantillons de salive recueillis de ces sujets ne contiennent que de très faibles taux d'IL-8 et de nitrite.

Cependant, il est intéressant de constater que la production des marqueurs d'inflammation par les sujets FK varie selon l'état de santé du patient. En effet, toujours selon les résultats compilés dans le tableau 2, les échantillons d'expectorations recueillis de sujets FK subissant une exacerbation de la maladie présentent des taux d'IL-8 et de

nitrite significativement supérieurs à ceux mesurés dans les échantillons d'expectoration obtenus de patients stables.

3.4 Production d'IL-8 et de nitrite par les neutrophiles isolés des expectorations.

Les expériences subséquentes ont eu pour objectif de déterminer la source potentielle de la production de nitrite dans les voies respiratoires des patients FK. La Figure 10 montre la production de nitrite et d'IL-8 par les neutrophiles ayant infiltré les poumons de patients FK. Les neutrophiles provenant des échantillons d'expectorations des malades en exacerbation présentent une production spontanée d'IL-8 et de nitrite nettement supérieure à celle des sujets stables. La sécrétion de nitrite par les neutrophiles activés n'a été inhibée que partiellement par l'addition de 500 μ M de L-NMMA. D'autres antagonistes tels que le L-NAME et la L-CAN se sont avérés inefficaces quant à l'inhibition de la production de nitrite par les neutrophiles humains.

3.5 Production de nitrite par les neutrophiles sanguins de patients FK.

Puisque les neutrophiles ayant infiltrés les poumons des patients FK sont déjà activés par une large gamme de stimuli, l'isolement de neutrophiles sanguins a permis d'obtenir des neutrophiles jeunes encore inactivés. De telles cellules ont servi à étudier l'induction de la production de NO et ses dérivés par les neutrophiles humains. Les neutrophiles sanguins ont été cultivés dans des plaques de 24 puits et exposés à 10^7 CFU/ml de *P. aeruginosa*. En procédant à un titrage bactérien de la phase soluble des expectorations, nous avons déterminé que la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* colonise

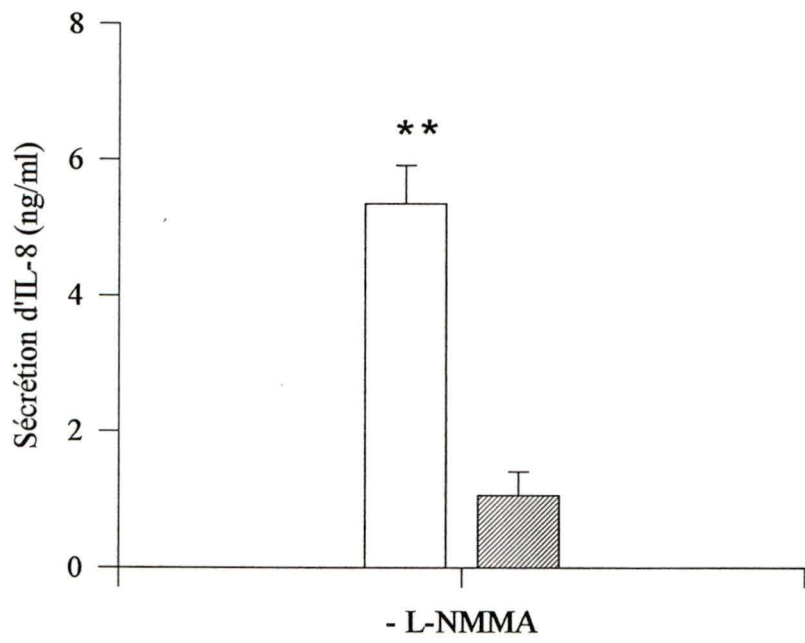
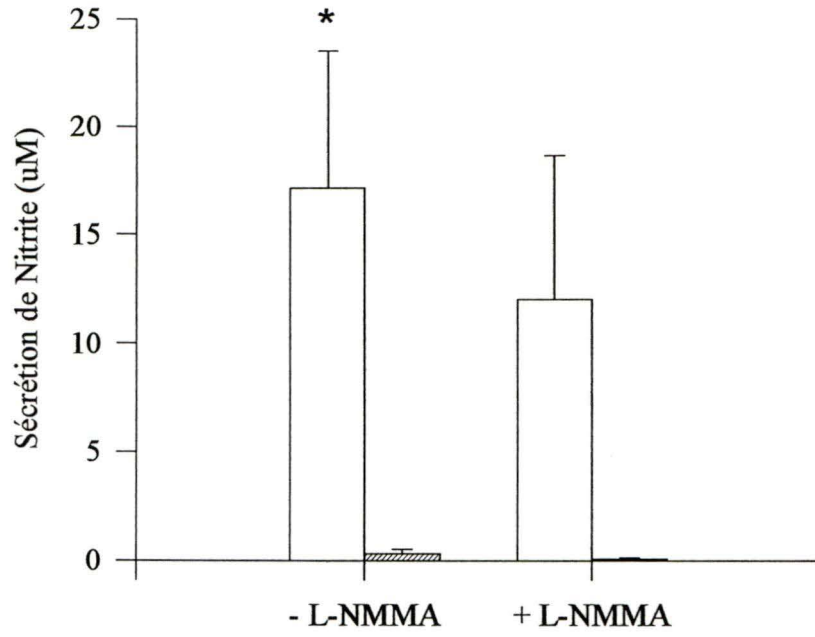
Tableau 2. Taux de nitrite et d'IL-8 dans les expectorations de sujets bronchitiques et de patients FK

Sujets	N	Nitrite (μM)	IL-8 (ng/ml)
FK en exacerbation	10	204.1 \pm 22.1 ^{†*}	4.18 \pm 0.66*
FK stables	5	117.6 \pm 17.0 [†]	0.21 \pm 0.08
Bronchitiques	6	26.9 \pm 4.1	1.17 \pm 0.78
Salive	4	14.6 \pm 2.3	0.15 \pm 0.11

[†] Les taux de nitrite mesurés dans les expectorations provenant de sujets FK étaient statistiquement différent de ceux mesurés dans les échantillons provenant des sujets bronchitiques ($p < 0.01$).

* Designe une différence significative ($p < 0.05$) en comparaison aux résultats obtenus avec les échantillons provenant des patients FK stables.

Figure 10. Production de nitrite par les neutrophiles d'expectoration de patients FK. Les barres représentent les moyennes \pm E.S.M. d'échantillon provenant de patients vivant une exacerbation de la maladie (n=10) et des échantillons provenant de patients stables (n=4). Chaque échantillon a été mesuré en duplicata. Les résultats obtenus de patients en exacerbation sont significativement différents des patients stables (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).



□ FK en exacerbation ▨ FK stables

les voies aériennes des malades à raison de 10^3 à 10^4 CFU par ml d'expectoration. Afin d'examiner leur contribution dans la production de nitrite, 10^7 CFU de *Pseudomonas aeruginosa* ont été incubés pendant 24 h à 48 h dans un milieu Neumann Tytell ou dans un bouillon MacConkey. Suite à cette culture, le nitrite a été mesuré dans le surnageant. Dans cinq expériences différentes sur cinq différentes souches cliniques isolées de patients FK, les taux de nitrite produits par *P. aeruginosa* ont été indétectables par la méthode de Greiss. Tel qu'illustré à la Figure 11, les neutrophiles sanguins des sujets FK ne produisent spontanément que de très faibles quantités de nitrite, suggérant ainsi une activation cellulaire compartimentalisée. Or, lorsque les neutrophiles ont été stimulés avec une souche clinique de *Pseudomonas aeruginosa*, ils ont produit une quantité substantielle de NO. Cette production n'a été que partiellement inhibée par le L-NMMA (approximativement 25 %)

3.6 Stimulation des neutrophiles sanguins par *P. aeruginosa*.

Par la suite, l'induction des neutrophiles FK a été comparée à celle des neutrophiles normaux. Des PMNs de sujets sains et FK ont été isolés et exposés à *P. aeruginosa* en présence et en absence de $500 \mu\text{M}$ de L-NMMA. La Figure 12 montre les résultats obtenus lors de ces expériences. Tels que les expériences antérieures l'avaient démontré, les neutrophiles de patients FK ne produisent que peu de nitrite en absence de stimulation alors que les neutrophiles provenant de sujets sains ne produisent aucune quantité détectable de nitrite. Cependant, l'incubation des PMNs avec une souche clinique de *P. aeruginosa* induit une production importante de nitrite/nitrate par les

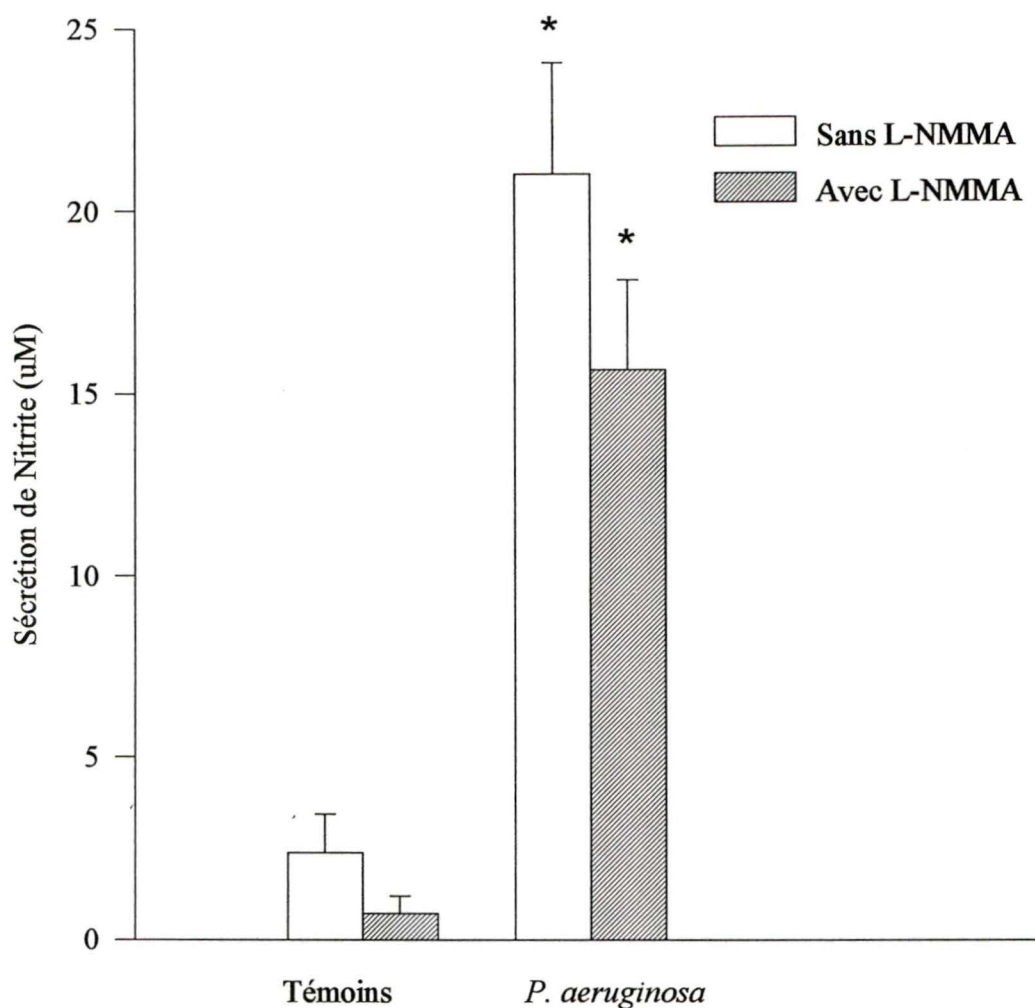


Figure 11. Production de nitrite par les neutrophiles sanguins de patients FK. La sécrétion de nitrite suite à la stimulation des neutrophiles par *Pseudomonas aeruginosa* a été mesurée en absence et en présence de L-NMMA (500 μ M). Les expériences ont été effectuées en duplicata sur des échantillons sanguins provenant de neuf patients différents. Ces patients subissaient alors une exacerbation de la maladie. Les résultats sont significativement différents des témoins non infectés (*: $p < 0.01$).

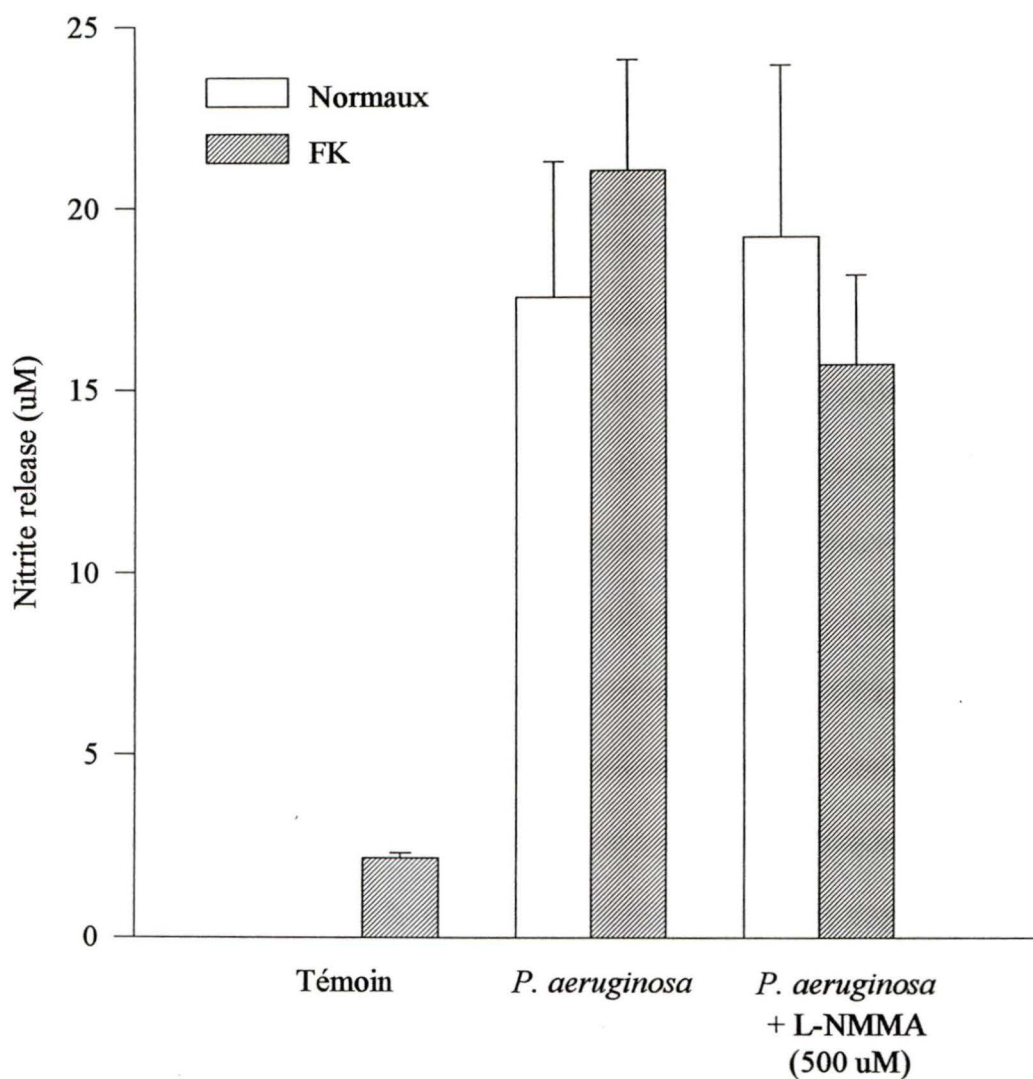


Figure 12. Production de nitrite par les neutrophiles de sujets FK et normaux exposés à *Pseudomonas aeruginosa*. Le diagramme représente la sécrétion de nitrite après la stimulation de neutrophiles FK isolés lors d'une exacerbation (n=9) et normaux (n=3) par *Pseudomonas*.

neutrophiles sanguins, qu'ils proviennent de sujets sains ou FK. Les expériences ne démontrent pas de différences quant à la réponse des neutrophiles FK face au stimulus bactérien comparativement à celle induite chez les neutrophiles de sujets normaux. L'inhibiteur de NOS s'est cependant avéré inefficace.

3.7 Implication des cellules épithéliales dans la production d'IL-8 et de nitrite chez les patients FK.

L'étape suivante a consisté à étudier l'implication des cellules épithéliales des voies aériennes supérieures dans la production d'IL-8 et de nitrite observée dans les expectorations des patients FK. Cette étude a été effectuée en soumettant deux lignées de cellules épithéliales (56.13 et 13.21) à des stimuli cytokiniques et bactériens généralement présents dans les voies respiratoires des malades (Tableau 3). Comme il a été démontré lors des études concentration-réponse et cinétique (section 3.2), le traitement des cellules épithéliales avec des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF α n'induit pas la sécrétion de nitrite par ce type cellulaire. Cependant, une infection de trois heures avec *Pseudomonas aeruginosa* conduit à une production significative de nitrite par les cellules épithéliales, bien que cette production ne soit que relativement faible. Une infection avec une bactérie telle que *Escherichia coli* induit une production encore plus faible de nitrite. L'exposition à la bactérie du genre *Pseudomonas* provoque la production de fortes quantités d'IL-8 par les cellules épithéliales. Contrairement à ce qui a été observé relativement à la production de nitrite, l'IL-1 β et le TNF α provoquent une production importante d'IL-8 par les cellules

Tableau 3. Sécrétion d'IL-8 et de nitrite par les lignées de cellules épithéliales

Condition	FK (56.13)		Normale (13.21)	
	NO (μ M)	IL-8 (ng/ml)	NO (μ M)	IL-8 (ng/ml)
—	0.00	0.45 \pm 0.17	0.00	0.38 \pm 0.12
TNF α 10 ng + IL-1 β 5 ng	0.00	36.5 \pm 2.7 [†]	0.00	20.0 \pm 3.9*
<i>P. aeruginosa</i> 10 ⁷ CFU	9.87 \pm 0.47 [†]	13.6 \pm 0.9 [†]	18.3 \pm 3.5*	17.1 \pm 1.5 [†]
<i>E. coli</i> 10 ⁷ CFU	3.9 \pm 2.0	4.3 \pm 0.06 [†]	4.21 \pm 0.51 [†]	5.4 \pm 0.2 [†]

Les valeurs représentent les moyennes \pm S.E.M. de trois expériences de stimulation cellulaire avec des stimuli cytokiniques et bactériens. L'IL-8 et le nitrite ont été mesurés dans le surnageant suite à une stimulation de 24 heures. La production de ces marqueurs inflammatoires était significativement différente du témoin ([†]: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$).

épithéliales. L'exposition à l'entérobactérie *E. coli* induit également une production d'IL-8 significative, quoique plus faible.

La Figure 13 montre la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* dans les cellules épithéliales infectées. Suite à une exposition de 3 heures, les cellules ont été lavées et incubées afin de déterminer la croissance bactérienne intracellulaire. La lyse cellulaire et le titrage bactérien ont permis de démontrer que la bactérie se multiplie rapidement dans les cellules infectées. La numération des cellules épithéliales au Bleu de Trypan a démontré que la densité cellulaire ne variait pas de façon significative au cours des 24 h suivant l'infection. Cependant, après ce laps de temps, une détérioration très rapide de la monocouche due à la lyse cellulaire pouvait être observée par simple examen microscopique.

Comme il a été mentionné précédemment, l'infection des cellules épithéliales par *Pseudomonas aeruginosa* a conduit à une importante production d'IL-8. La Figure 14 montre la production d'IL-8 par les cellules épithéliales infectées. Cette sécrétion s'est produite principalement au cours des 8 premières heures suivant l'infection. Encore une fois, il ne semble pas avoir de différence significative quant à la réponse des cellules provenant de sujets FK (56.13) comparativement aux cellules provenant de sujets normaux (13.21).

3.8 Utilisation du nitrite par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*.

Sachant que la majorité des bactéries du genre *Pseudomonas* sont dénitrifiantes, nous avons tenté de déterminer l'aptitude de *P. aeruginosa* à consommer le nitrite produit

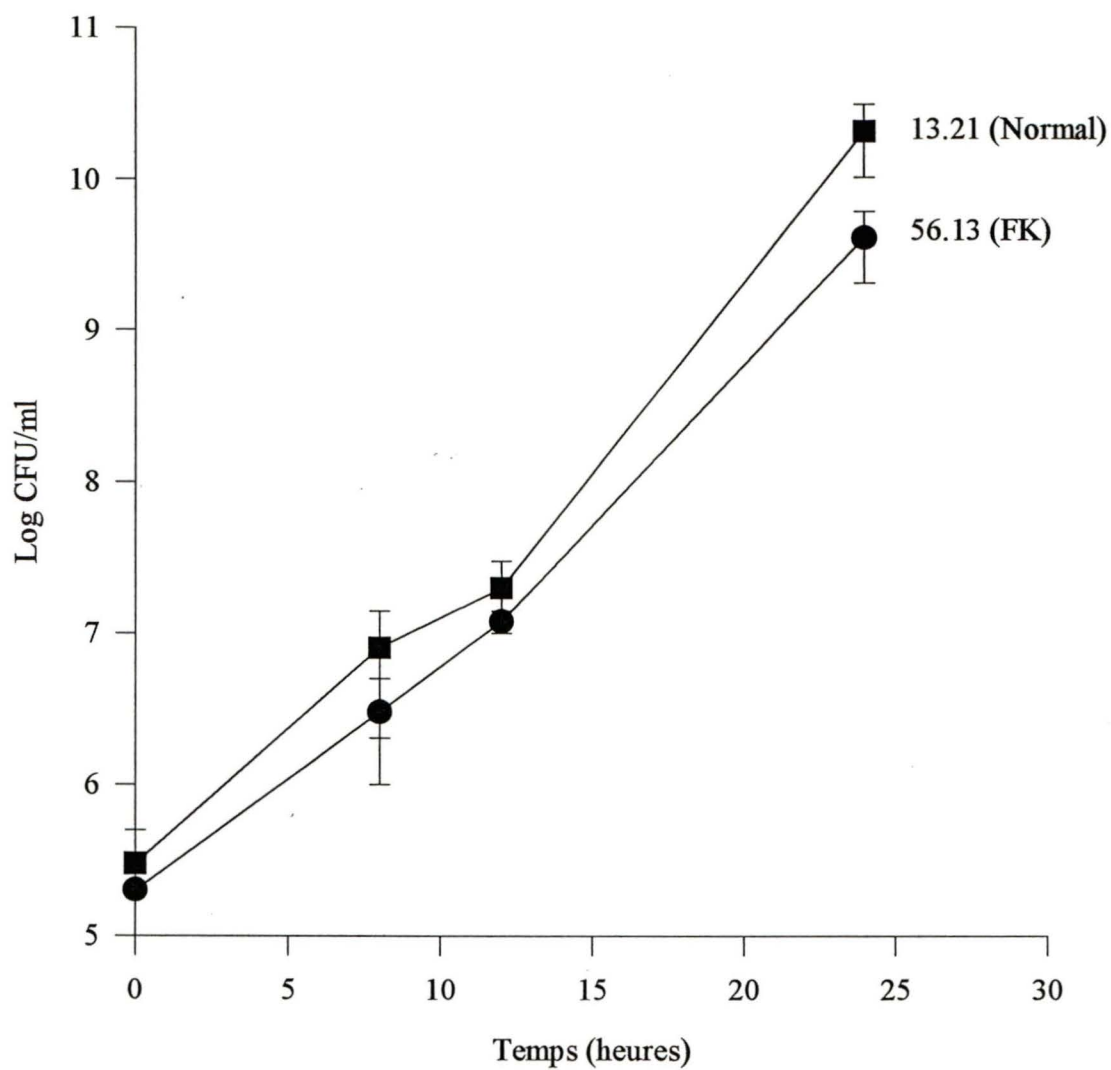


Figure 13. Courbes de croissance de *Pseudomonas* dans les cellules épithéliales infectées. Les résultats sont les moyennes \pm E.S.M. de quatre déterminations. L'expérience a été répétée trois fois avec des résultats similaires.

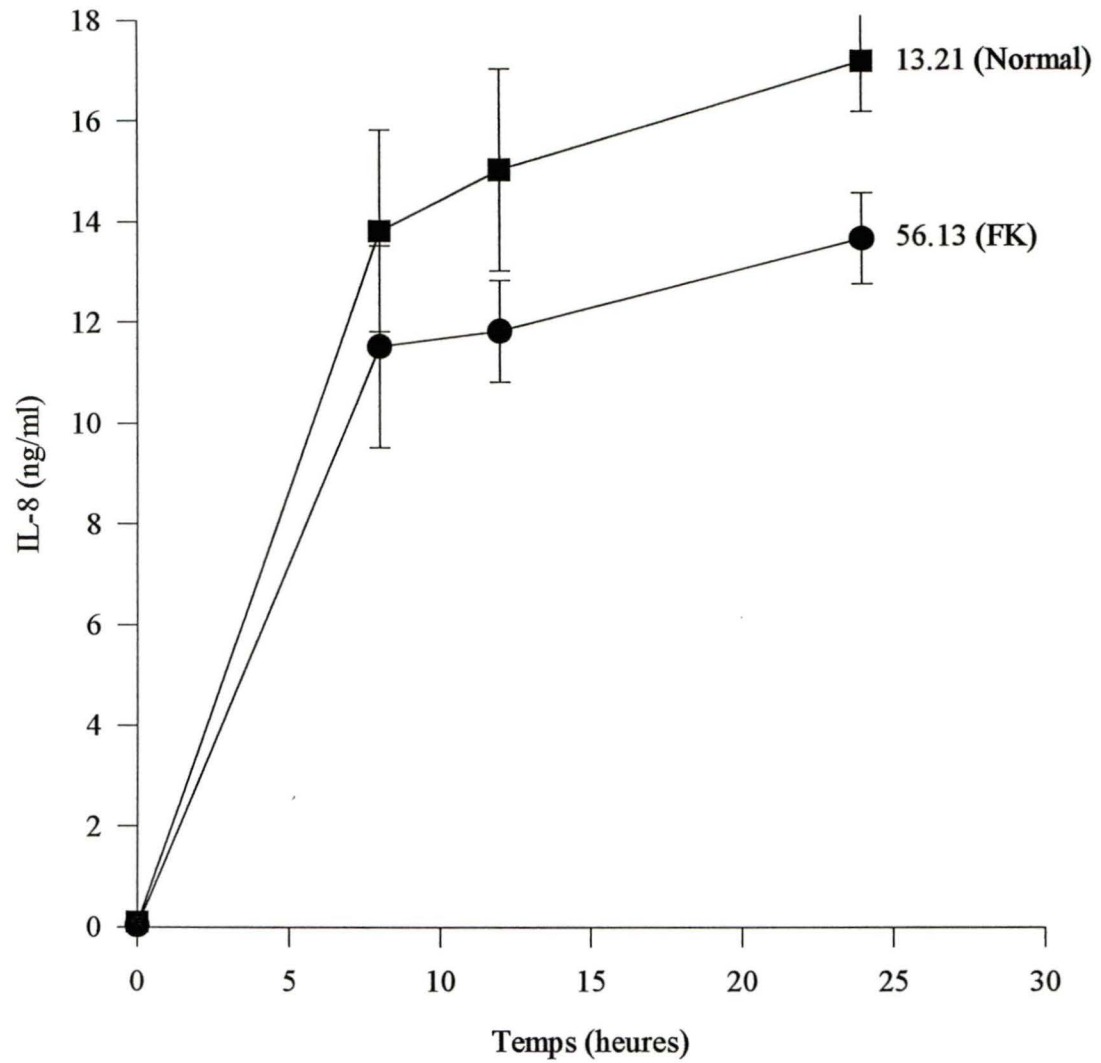


Figure 14. Production d'IL-8 par les cellules épithéliales infectées par *P. aeruginosa*.

Les résultats représentent les moyennes \pm E.S.M. de quatre déterminations répétées trois fois avec des résultats similaires.

par les cellules épithéliales et les neutrophiles. Une souche clinique de *Pseudomonas aeruginosa* a été cultivée dans un milieu Neumann-Tytell supplémenté ou non de nitrate de sodium ou d'un générateur de NO, la spermine NONOate. Les résultats sont illustrés à la Figure 15. Après 12 h de culture, le nitrate a d'abord été converti en nitrite par la nitrate réductase de *Pseudomonas aeruginosa* puis a été entièrement consommé par celle-ci lorsque l'on atteint la douzième heure de culture. La spermine NONOate a été dégradée en NO au contact de l'air puis rapidement oxydée en nitrite puis en nitrate. Son assimilation a également débutée vers la douzième heure d'incubation et s'est effectuée rapidement entre la douzième et la vingt-quatrième heure. Sa consommation était complète à la trente-sixième heure.

Cependant, le titrage bactérien correspondant montre que la bactérie n'utilise pas le nitrite pour favoriser sa croissance (Figure 16). En effet, bien que 750 μM de nitrate de sodium aient été ajouté au bouillon de culture, la population bactérienne s'est accrue de 4 log en 48 h, équivalent à l'augmentation de la population bactérienne dans le bouillon de culture sans additif.

Si d'une part, la bactérie peut métaboliser le nitrite, il n'en demeure pas moins que le NO est un radical apte à altérer la survie bactérienne. C'est ce que démontre la Figure 17. Lorsque cultivée dans un bouillon MacConkey, la population de *P. aeruginosa* augmente de 4 log en 48 h. Cependant, lorsqu'un générateur de NO est ajouté au bouillon de culture, on observe une diminution significative au cours des 8 premières heures. Une fois la spermine NONOate convertie en nitrite puis en nitrate, la multiplication bactérienne continue. L'addition du pigment de pyocyanine synthétique

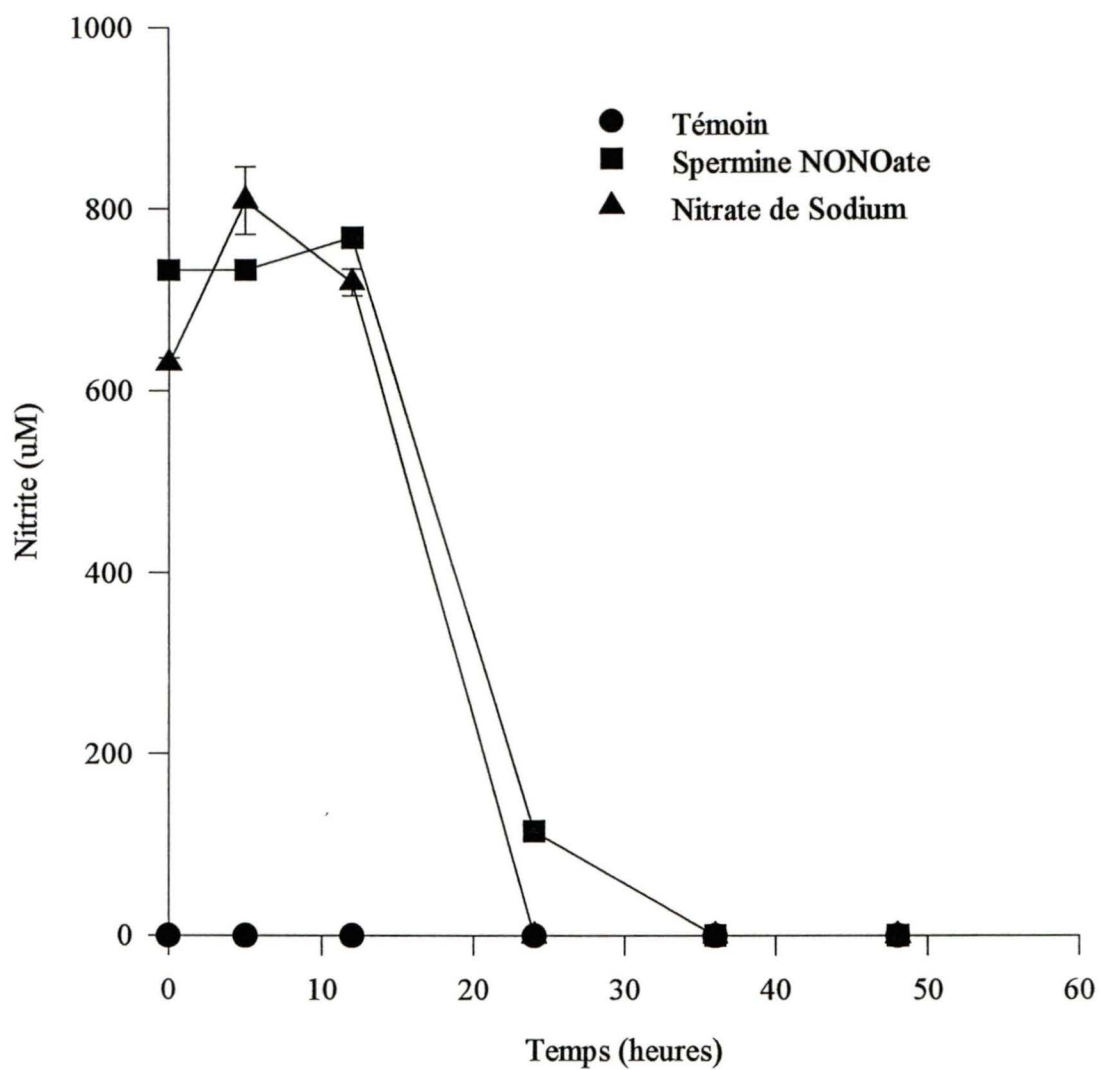


Figure 15. Consommation de nitrite par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats représentent les moyennes \pm E.S.M. de trois expériences.

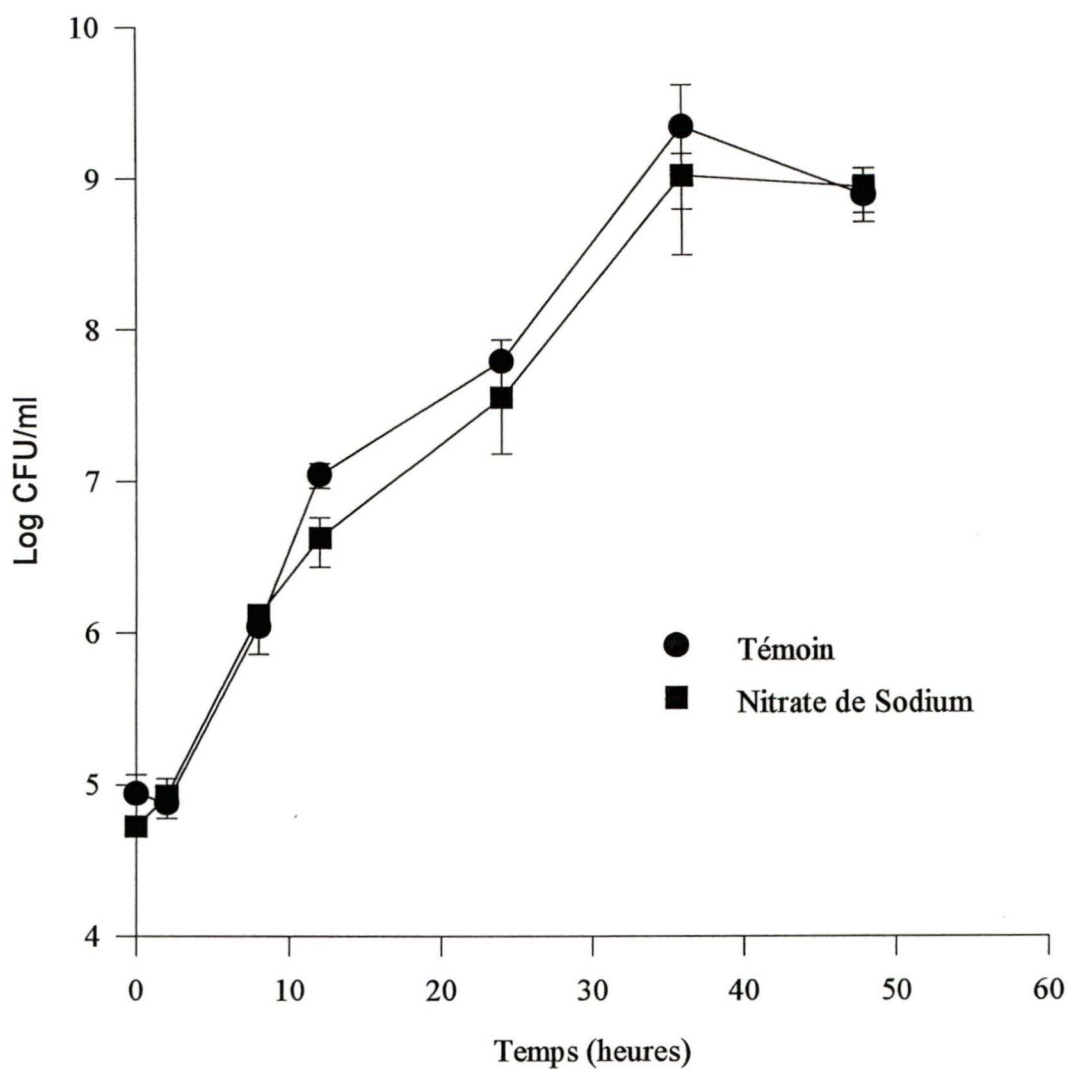


Figure 16. Courbe de croissance de *P. aeruginosa* en présence et en absence de nitrate. Les résultats représentent les moyennes \pm E.S.M. de trois expériences.

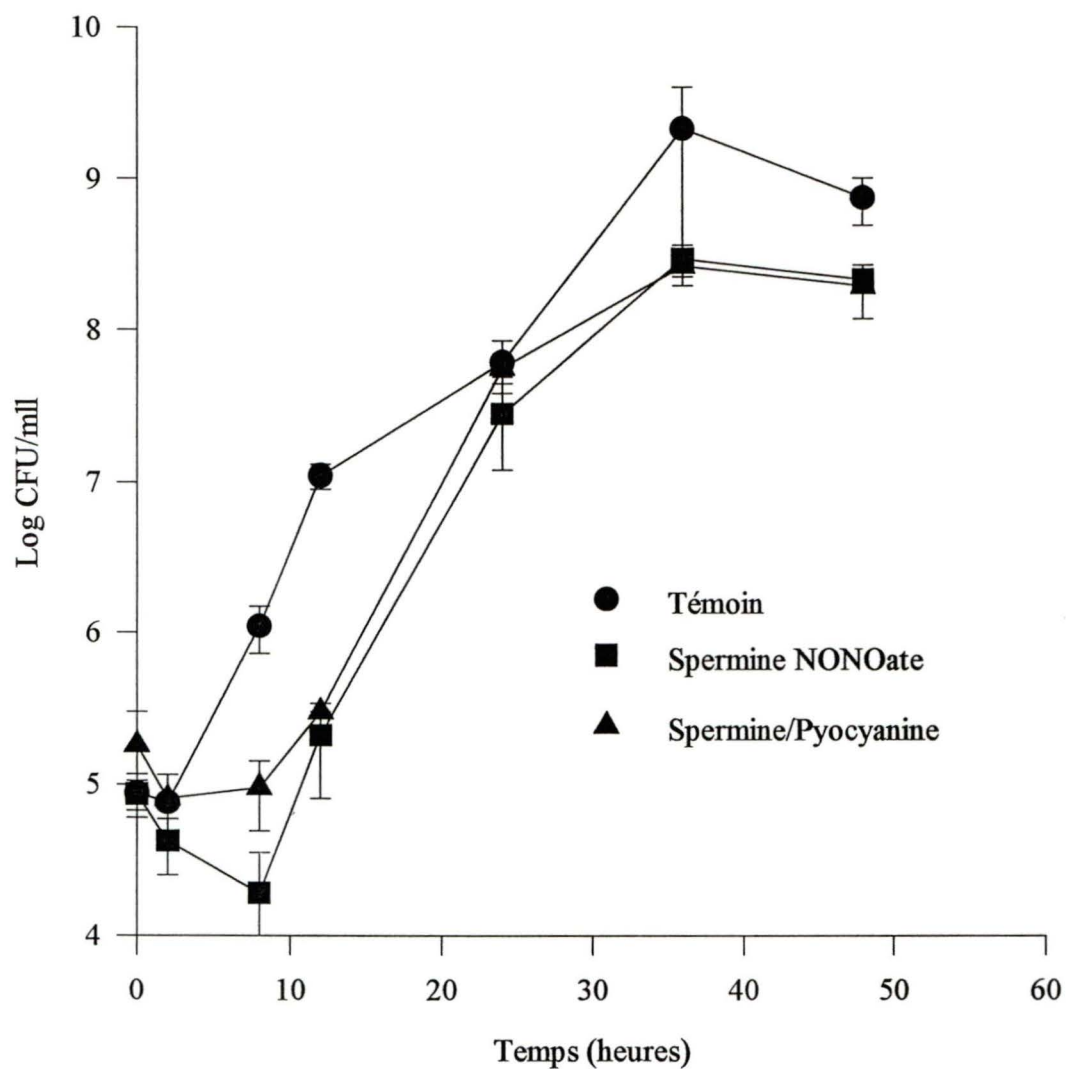


Figure 17. Effet bactéricide du NO et cytoprotection de la pyocyanine. *P. aeruginosa* a été cultivée dans un milieu optimal en présence ou en absence de spermine NONOate (750 μ M). Certains tubes ont reçu 5 μ g de pyocyanine synthétique. L'expérience a été répétée trois fois avec des résultats similaires.

à raison de 5 $\mu\text{g/ml}$ n'a pas permis d'empêcher totalement l'effet bactéricide de la spermine NONOate, bien qu'elle ait maintenue la population bactérienne dans un état stationnaire au cours des 8 premières heures de culture, ce qui suggère que la pyocyanine a bloqué l'effet toxique du NO

3.9 Utilisation de l'IL-8 comme facteur de croissance par *P. aeruginosa* cultivée dans un milieu bactériostatique.

La culture de *P. aeruginosa* dans le sérum humain permet de maintenir la population bactérienne approximativement constante (Figure 18). Cependant, l'ajout de la chemokine IL-8 à des concentrations aussi faibles que 0.5 ng/ml favorise la croissance de cette bactérie dans un milieu généralement bactériostatique sinon hostile. L'effet observé n'est pas concentration-dépendant, aussi, l'ajout de l'IL-8 au sérum dans des concentrations de 10⁷ ng/ml n'a pas permis d'obtenir des taux de croissance significativement supérieurs à ceux obtenus avec des concentrations d'IL-8 de 0.5 ng/ml. De plus, il semblerait qu'il n'y ait ni effet additif ni synergie entre l'IL-8 et les autres cytokines pro-inflammatoires. L'ajout d'un "cytomix" obtenu par la stimulation de macrophages humains par la concanavaline A n'a pas favorisé la croissance bactérienne de manière significative comparativement à ce qui été observé en présence d'IL-8 seul.

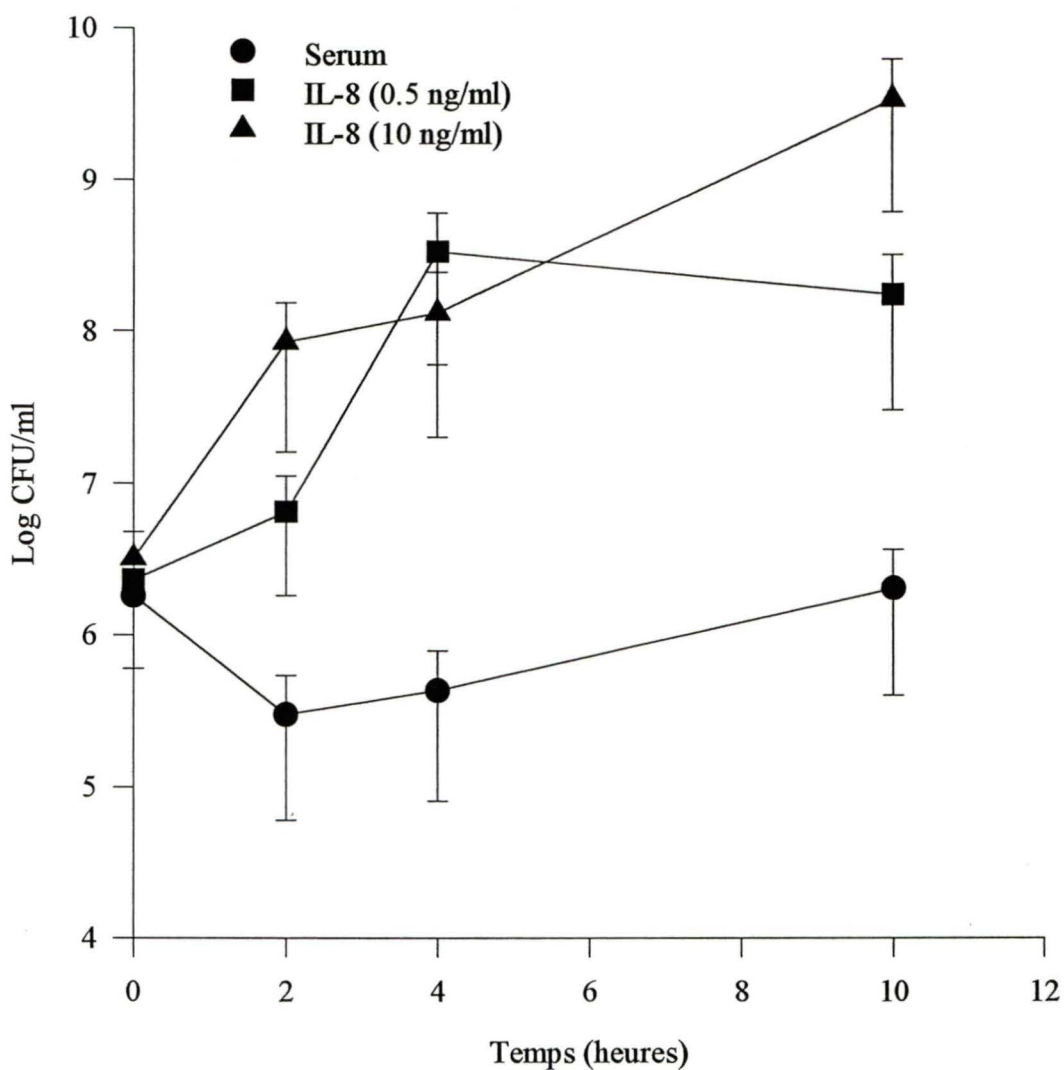


Figure 18. Utilisation de l'IL-8 comme facteur de croissance par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* cultivée dans un milieu bactériostatique. Les résultats représentent les moyennes et E.S.M. de quatre déterminations répétées trois fois avec des résultats similaires.

IV Discussion

Les travaux avaient donc pour objectif de déterminer l'implication du NO et de l'IL-8 dans la condition inflammatoire caractérisant la mucoviscidose. Or, plusieurs questions se sont posées. D'abord, nous avons dû déterminer si la présence du génotype CFTR⁻ pouvait être impliquée dans la production de ces marqueurs par les cellules FK. Ensuite, chez le patient atteint de mucoviscidose, dans quelles mesures sont produits le NO et l'IL-8, par quels types cellulaires et sous l'effet de quels stimuli? Enfin, nous avons tenté d'évaluer le rôle qu'occupe le pathogène *Pseudomonas aeruginosa* dans l'induction et le maintien de la condition inflammatoire.

Il a déjà été démontré antérieurement que les macrophages et les fibroblastes des voies aériennes produisent d'importantes quantités de cytokines pro-inflammatoires telles IL-1, IL-6, IL-8 et CSF. (DENTENER *et al* 1993, XING *et al* 1993). De plus, dans une récente publication, notre groupe de recherche a démontré que les cellules épithéliales des voies aériennes supérieures en culture primaire produisaient des quantités très appréciables d'IL-6, CSF et IL-8 (BEDARD *et al* 1993). Ces résultats rejoignent ceux obtenus par les groupes de MARINI 1991 relativement aux cellules épithéliales bronchiques et BARKER 1991 relativement aux kératinocytes. Nos travaux démontrent que l'IL-1 β et le TNF α induisent fortement la production d'IL-8 par les cellules épithéliales avec une concentration de 1 ng/ml. Or, le maximum de stimulation est atteint à 5 ng/ml. L'apparition d'un plateau suggère une saturation des récepteurs d'IL-1 β et de TNF α à la surface cellulaire. Ces deux cytokines induisent la production d'IL-8 de manière équipotente. Cependant, l'interaction entre le TNF α et l'IL-1 β n'est pas

encore complètement élucidée. Il n'est pas clairement démontré si le $\text{TNF}\alpha$ stimule la production d'IL-8 directement et simultanément à l'IL-1 β ou s'il s'agit d'une réaction en cascade où le $\text{TNF}\alpha$ induirait la production d'IL-1 qui conduirait à l'expression de l'IL-8. Sachant que l'IL-1 β et le $\text{TNF}\alpha$ agissent sur des récepteurs différents, que l'on suppose l'un ou l'autre des mécanismes d'interaction, l'on pourrait s'attendre à une induction additive. Une telle induction a effectivement été trouvée lors des études cinétiques. L'absence d'effet additif lors des études concentration-réponse pourrait s'expliquer par le fait que ces expériences ont été menées en absence de sérum contrairement aux études cinétiques. On remarque aussi que la production d'IL-8 mesurée en absence de sérum est beaucoup plus faible que ce qui a pu être mesuré en présence de sérum. Trois hypothèses sont possibles. D'abord, il est connu que l'IL-8 est sensible aux protéases (SCHRÖDER *et al* 1987), donc sans la protection du sérum, la cytokine serait sujette à des modifications protéolytiques qui diminueraient sensiblement la reconnaissance de l'IL-8 par les anticorps polyclonaux utilisés lors de la mesure par ELISA. De plus, ces lignées de cellules épithéliales montrent une adhérence et une viabilité plus faible en absence de sérum. La deuxième hypothèse est qu'un facteur particulier présent dans le sérum pourrait potentialiser l'effet des cytokines sur les cellules épithéliales en culture. Finalement, puisque l'IL-8 est un heparin-binding polypeptide (MUKAIDA *et al* 1992b), la présence des protéines sériques homologues à l'héparine (e.g. héparansulfate) pourraient lier l'IL-8 produit par les cellules épithéliales en réponse à l'IL-1 β et au $\text{TNF}\alpha$ et empêcher ainsi la rétroinhibition. Cette hypothèse expliquerait également la cinétique linéaire obtenue en présence de sérum.

À l'opposé, la production d'IL-8 par les cellules épithéliales induite par le LPS d'*Escherichia coli* est négligeable et ce, même à des concentrations atteignant 10 µg/ml. De plus, il n'y a pas de différence significative quant à l'induction de la production d'IL-8 chez la lignée normale comparativement à la lignée FK. Des résultats similaires ont été montrés par BEDARD *et al* 1993. Il est fort probable que ceci soit relié au fait que les cellules épithéliales n'expriment pas le récepteur CD14 (DENTENER *et al* 1993). Le CD14 est une protéine de 53 kDa ancrée à la membrane par un groupement glycosylphosphatidylinositol. Elle est reconnue pour être fortement exprimée par les monocytes et les macrophages (KNAPP 1989) et faiblement exprimée par les PMNs (WRIGHT *et al* 1991). En présence de sérum, le LPS est connu pour interagir avec le CD14 lors de l'activation cellulaire (COUTURIER *et al* 1991), notamment lors de l'induction du TNF α , de l'IL-6 et de l'IL-8 par les granulocytes mononucléés (DEBETS *et al* 1989, FLETCHER STARNES *et al* 1990, HUBER *et al* 1991).

Une vue d'ensemble des résultats d'induction nous permet de constater que la présence du génotype CFTR⁻ des cellules 56.13 ne semble pas favoriser la production d'IL-8 comparativement à la lignée de cellules normale, 13.21. De plus, la présence du phénotype FK ne semble pas rendre ces cellules plus ou moins sensibles à l'effet des cytokines puisque la concentration nécessaire à l'obtention de l'effet maximal est identique pour les deux lignées.

Les glucocorticoïdes sont des composés généralement connus pour diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF α (WAAGE *et al* 1990, AMARO *et al* 1992, RAY *et al* 1994). Plusieurs travaux ont également

démontré le potentiel inhibiteur du dexaméthasone sur l'induction du monoxyde d'azote et de l'IL-8 (RADOMSKI *et al* 1990, MUKAIDA *et al* 1992, LEVINE *et al* 1993). BEDARD *et al* 1993 ont effectivement démontré que le dexaméthasone inhibait la production d'IL-8 chez les cellules épithéliales de brossage nasal en culture primaire lorsque ces cellules étaient traitées à l'élastase. Or, dans la même publication, les résultats démontrent l'inefficacité du dexaméthasone à inhiber la production d'IL-8 chez les lignées de cellules épithéliales. Au cours des présents travaux, des résultats similaires ont montré que les composés stéroïdiens tels le dexaméthasone et la cortisone ont été sans effet sur les cellules épithéliales stimulées avec le $TNF\alpha$ ou l'IL-1 β . De plus, des inhibiteurs de la cyclooxygénase dont l'ibuprofène et l'indométhacine se sont également avérés inefficaces quant à l'inhibition de la sécrétion d'IL-8 par les cellules transformées.

L'IL-4 est une cytokine produite par les cellules T qui exerce plusieurs actions différentes (PURI *et al* 1993, HILLMAN *et al* 1995). Si d'une part, cette cytokine est apte à activer le lymphocyte B en favorisant sa prolifération et la production d'immunoglobulines, d'autre part, on lui reconnaît un effet anti-inflammatoire sur le macrophage, i.e. puisque la cytokine bloque la production spontanée et induite d'IL-1, IL-6, IL-8 et $TNF\alpha$ (ESSNER *et al* 1981, HART *et al* 1989, STANDIFORD *et al* 1990). Selon PARK *et al* 1987 et LOWENTHAL *et al* 1989, les cellules épithéliales expriment le récepteur de l'IL-4 à leur surface. Or, nos résultats ont démontré que l'IL-4 n'inhibe pas la production d'IL-8 induite par le $TNF\alpha$ sur les deux lignées de cellules épithéliales. Ces résultats rejoignent les observations publiées par GALY *et al* en 1991. Les auteurs

ont trouvés que l'IL-4 inhibe la production de GM-CSF alors qu'il est sans effet sur la production d'IL-6, de G-CSF et d'IL-8 induite par l'IL-1.

Quant à l'IFN γ , il est reconnu pour activer le macrophage (VAREZIA *et al* 1993). Les cellules épithéliales 13.21 exposées à 1000 U/ml d'IFN γ n'ont pas modulé leur production d'IL-8 lorsque stimulées au TNF α . Cependant, les cellules épithéliales FK (56.13) ont montré une diminution de la production d'IL-8 lorsqu'elle ont été prétraitées à l'IFN γ avant d'être exposées au TNF α . Or, les travaux de BAZZONI 1991 ont montré que l'IFN γ régule négativement l'expression constitutive de l'ARNm de l'IL-8 dans les PMNs au repos. La préincubation des PMNs avec l'IFN γ inhibe significativement leur capacité à exprimer l'IL-8 et à sécréter la cytokine suite à une stimulation avec TNF, LPS, FMLP ou des stimuli phagocytaires suggérant que la synthèse d'IL-8 par les PMNs est contrôlée. De plus, GALY *et al* 1991 ont également démontré que l'IFN γ inhibe partiellement la production d'IL-8 par les cellules épithéliales de thymus humain. Selon nos résultats, l'IFN γ ne semble avoir agi à titre d'anti-inflammatoire que sur la lignée FK. Cependant, ce résultat ne permet pas de faire un lien avec la déficience de la protéine CFTR. Afin de renforcer une telle hypothèse, des expériences similaires sur deux autres lignées de phénotypes identiques et de génotypes différents (56.12 = FK et NP.34 = normale) auraient été requises. Les résultats auraient alors dû être reproductibles sur ces deux lignées. Néanmoins, il est possible que l'IFN γ puisse jouer un rôle comme antagoniste de l'IL-8 chez les cellules épithéliales. Si l'IFN γ est impliqué dans la régulation de l'expression de l'IL-8, il appert que les cellules FK aient développé une certaine réceptivité vis-à-vis l'IFN γ . Ces

cellules se trouvant naturellement exposées à plusieurs stimuli inflammatoires, elles pourraient utiliser l'IFN γ à titre de régulateur de l'expression de l'IL-8 alors que les cellules normales ne semblent pas avoir développé un tel mécanisme de contrôle. Par ailleurs, CASSATELLA *et al* 1993, ont démontré que la production d'IL-8 par les PMNs humains induite par 5 ng/ml de TNF pouvait être inhibée efficacement avec 10 U/ml d'IFN γ . Cette inhibition ne s'est pas avérée concentration-dépendante dans un intervalle de 10 à 1000 U/ml. Les auteurs suggèrent que l'IFN γ serait impliqué dans la régulation de l'expression du gène de l'IL-8 chez le PMN humain.

La contribution majeure de nos travaux a consisté en l'examen de la génération possible de NO et d'IL-8 dans les voies trachéo-bronchiques des patients FK. Des taux élevés de nitrite et de nitrate ont été mesurés dans la phase soluble des expectorations de tous les sujets FK. Nous avons également mesuré des taux élevés d'IL-8 dans les expectorations de sujets subissant une exacerbation de la maladie. L'isolement des neutrophiles à partir des expectorations ont produits spontanément de fortes quantités de nitrite/nitrate qui ont pu être inhibées partiellement par le L-NMMA suggérant une implication de la voie de la NO synthase catalysant l'oxydation du L-arginine. Cependant, cette production spontanée de nitrite n'a pas été observée chez les neutrophiles sanguins de patients FK suggérant que la sécrétion de NO se produit chez le neutrophile activé dans l'environnement localisé du poumon FK. En effet, de hauts taux de cytokines (TNF) et de médiateurs (LTB $_4$) aptes à activer les neutrophiles sont également présents dans les expectorations de sujets FK (GREALLY *et al* 1993, KHARITONOV *et al* 1994). Notre groupe de travail de même que le groupe de

KHARITONOV 1994 ont démontré la présence de la chemokine IL-8 dans ces expectorations. McCALL publiait en 1992 le résultat de travaux au cours desquels l'IL-8 bloquait l'induction de la NO synthase chez le rat. Or, selon les résultats obtenus dans notre laboratoire, la production de NO et d'IL-8 ne semblent pas avoir des effets antagonistes.

Par ailleurs, il est connu que la synthèse de monoxyde d'azote chez le macrophage est régulée positivement par l'IFN γ mais régulée négativement par d'autres cytokines telles que le TGF β et l'IL-4 (OSWALD *et al* 1992). Néanmoins, il n'est pas clairement défini si les cytokines inflammatoires modulent la synthèse de monoxyde d'azote chez le neutrophile humain. En outre, il existe une controverse à l'effet que le neutrophile humain soit en mesure de produire le NO. Il est clair, cependant, que la production de NO par le neutrophile est régulée différemment du macrophage murin puisque l'analogue du L-arginine, le L-NMMA, ne bloque pas entièrement la production de NO.

Plusieurs cytokines et produits inflammatoires sont présents dans les expectorations FK et ceux-ci peuvent moduler la NO synthase. Les études d'inductibilité de la synthèse de NO par le neutrophile sanguin démontrent qu'une exposition du neutrophile à une souche clinique de *Pseudomonas aeruginosa* entraîne une sécrétion de NO par le granulocyte en quantité substantielle.

Les taux d'IL-8 et de nitrite étaient tous deux élevés dans la phase soluble des expectorations de sujets FK avec une exacerbation de la maladie contrairement aux faibles niveaux qui ont été mesurés chez les patients stables. Ceci suggère une

association entre l'importance quantitative de la production de ces molécules et une détérioration de l'état du patient. Aussi, les neutrophiles isolés des expectorations de patients en exacerbation produisent spontanément des taux de NO et IL-8 plus élevés que les cellules correspondantes provenant des sujets stables. Cette observation mérite une recherche plus approfondie. Une étude de la corrélation de la fonction respiratoire et de la production d'IL-8 pourrait être faite de façon rigoureuse. Ainsi, les patients pourraient subir un drainage postural et un test de volume expiré maximal par seconde (VEMS) ce qui permettrait un juste appariement de ces valeurs. Quant à la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, elle ne contribue à la production de nitrite qu'en agissant à titre de stimulus phagocytaire pour les neutrophiles et les cellules épithéliales. La bactérie elle-même ne produit pas de nitrite. Chez les cellules épithéliales, la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* a un potentiel inducteur plus élevé que la bactérie *Escherichia coli*. En effet, les cellules répondent différemment aux composantes des parois. Il est déjà bien connu que les cellules épithéliales répondent très peu au LPS de *E. coli* (BEDARD *et al* 1993, et cette étude) alors que les cellules épithéliales primaires et transformées subissent une induction de la production d'IL-8 par les rhamnolipides présents dans la paroi de *Pseudomonas aeruginosa* (BEDARD *et al* 1993). Bien que la présence des bactéries soit le seul stimulus apte à induire la production de nitrite par les cellules épithéliales, il n'en demeure pas moins que cette production soit faible. La contribution du macrophage étant déjà reconnue (EISENSTAT *et al* 1993), nous pensons que le neutrophile et la cellule épithéliale des voies respiratoires supérieures pourraient aussi être impliquées dans la

production des marqueurs d'inflammation mesurés dans les expectorations de patients FK.

Des données récentes (MALAWISTA *et al* 1992) ont démontré que le NO produit par le neutrophile humain jouait un rôle important dans l'effet bactéricide contre la bactérie *Staphylococcus*. *Staphylococcus aureus* colonise fréquemment les voies respiratoires des patients FK et, dans cette optique, le NO pourrait constituer pour l'hôte un important mécanisme de défense dans la mucoviscidose. À cet effet, il serait d'un intérêt certain de vérifier l'impact du NO produit par le neutrophile humain sur son activité bactéricide vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*.

De plus, SUTTORP *et al* 1993, ont démontré que certaines toxines bactériennes induisaient la production de NO par le macrophage murin. À cet effet, une étude de la production de NO par le neutrophile humain et des cellules épithéliales en réponse aux produits bactériens pourrait s'avérer être d'un apport intéressant.

Nos résultats n'ont pas démontré de différence significative quant à la sécrétion de NO, qu'il s'agisse de la lignée de phénotype FK ou normale en réponse à *Pseudomonas aeruginosa*. Il apparaît donc que la sécrétion de NO dans les cas de mucoviscidose pourrait être le résultat d'une exposition constante à la bactérie pathogène infectant l'épais mucus plutôt que de résulter directement de la dysfonction du CFTR liée au phénotype FK.

L'inhibition de la NO synthase par le L-NMMA demeure un point à éclaircir. KLEBANOFF *et al* 1994 démontraient un effet inhibiteur spécifique et complet de la NOS par le L-NMMA. De plus, des tests effectués à l'aide de l'arginase n'ont pas

davantage démontré d'inhibition de la NOS. Selon des travaux menés sur le métabolisme de l'arginine dans le macrophage de souris et de rat les auteurs ont suggéré une voie de recyclage de la L-citrulline (BAYDOUN *et al* 1994). Or, lorsque les cellules empruntaient la voie de la citrulline, la production de NO n'atteignait que 25% de l'induction atteinte par la voie de l'oxydation de l'arginine. Puisque l'induction de la NOS semble être beaucoup plus faible chez le neutrophile que chez le macrophage, en extrapolant ces données chez le neutrophile humain, on pourrait soupçonner que ce type cellulaire emprunte la voie du recyclage de la citrulline de manière satisfaisante. Ainsi, malgré la dégradation du substrat original par l'arginase, le neutrophile demeurerait apte à produire du nitrite. Aussi, une utilisation préférentielle de la citrulline par rapport aux analogues du L-arginine pourrait expliquer l'inhibition partielle obtenue par le L-NMMA. Bien entendu, ces hypothèses restent à démontrer, en commençant par la démonstration de l'existence d'une voie de recyclage de la citrulline chez le neutrophile humain.

Les cellules épithéliales possédant le phénotype FK ne sont pas plus susceptibles à l'infection que les cellules de phénotype normal, tel que le démontre les courbes d'infection (Figure 13). Cette infection conduit à une réponse inflammatoire équivalente d'une lignée à l'autre.

On sait que la majorité des bactéries du genre *Pseudomonas* sont dénitrifiantes. Sachant que la bactérie *P. aeruginosa* peut induire la production de nitrite chez la cellule épithéliale et le neutrophile, nous avons tenté de déterminer si ce pathogène est en mesure d'utiliser le nitrite produit par l'hôte pour sa propre croissance. Les résultats de consommation de nitrite et le titrage bactérien démontrent que la croissance de

Pseudomonas aeruginosa n'est pas augmentée en présence de nitrate malgré le fait que ce composé inorganique soit consommé par la bactérie. Ceci peut s'expliquer par le fait que *Pseudomonas* utilise le nitrite et le nitrate selon la voie de la réduction dissimilatrice du nitrate. En condition aérobie, la bactérie dégrade le glucose par la voie d'Embden-Mayerhof-Parnas qui conduit ensuite au cycle de Krebs puis à la chaîne respiratoire qui utilise l'oxygène comme accepteur final de protons et d'électrons. Cependant, lorsque la tension partielle d'oxygène du milieu diminue, l'azote moléculaire devient alors un inducteur de la respiration anaérobie. C'est donc le nitrate qui remplace l'oxygène à titre d'accepteur de protons et d'électrons (GOTTSCHALK 1986). Or, la machinerie enzymatique nécessaire à la dénitrification n'est induite qu'en présence de faibles tensions d'oxygène. Aussi, les résultats obtenus démontrent effectivement que la consommation de nitrate ne débute que vers la douzième heure de culture plutôt que de débiter immédiatement après l'ensemencement des bouillons. Puisque nous avons utilisé un système de culture sans agitation, il se crée un gradient de tension d'oxygène. En absence de nitrate, la respiration de *Pseudomonas aeruginosa* est obligatoirement aérobie et les bactéries se trouvant dans une zone de faible tension d'O₂ se mobilisent vers la surface du bouillon, où la tension d'oxygène est suffisante. Lorsque du nitrate est présent dans le milieu de culture, les bactéries se trouvant dans une zone aérobie utilisent l'O₂ comme accepteur de protons et d'électrons, alors que les bactéries se trouvant dans les zones microaérobies entrent en respiration anaérobie en utilisant la voie de la réduction dissimilatrice du nitrate.

Le NO est impliqué dans la défense immunitaire contre les pathogènes (MONCADA *et al* 1991). Lorsque la bactérie *P. aeruginosa* est cultivée en présence d'un générateur de NO, on note une diminution significative de la population bactérienne associée à l'action du radical libre. Or, la spermine NONOate est un composé très instable qui s'oxyde en nitrite puis en nitrate au contact de l'air. Après huit heures de culture avec la spermine NONOate, le composé est entièrement transformé et le pathogène est alors en mesure de l'utiliser dans la voie dissimilatrice du nitrate, tel que discuté plus haut. Cependant, dans des conditions physiopathologiques, le NO est induit sur de plus longues périodes. Ainsi, afin d'induire une réaction semblable *in vitro*, il aurait été d'intérêt d'ajouter une seconde dose de spermine NONOate après huit heures de culture.

Quant à certaines souches de *Pseudomonas aeruginosa*, elles synthétisent un pigment très réactif: la pyocyanine. WILSON *et al* 1988 ont rapporté que la pyocyanine présente dans le mucus des voies respiratoires des patients FK induit une dysfonction des cils des cellules épithéliales nasales chez l'humain. En fait, en présence d'agents réducteurs et d'oxygène, la pyocyanine peut entrer dans un cycle redox conduisant à la formation de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène. Bien que ces radicaux libres soient responsables de l'effet microbicide de la pyocyanine (dans le but de réduire la compétitivité), son implication dans les injures tissulaires associées à *Pseudomonas aeruginosa* est moins clair (HASSAN *et al* 1980). Ce pigment est aussi reconnu pour protéger la bactérie même contre l'effet cytotoxique des radicaux libres du milieu. Or, l'ajout d'une pyocyanine synthétique n'a permis de protéger la culture bactérienne que

partiellement contre l'effet de la spermineNONOate. Des études de structure de la molécule synthétique par infra-rouge et résonance magnétique nucléaire auraient permis de confirmer la structure des groupements prostétiques de la pyocyanine. De plus, la comparaison de l'effet bactéricide du NO sur une souche de *P. aeruginosa* produisant naturellement le pigment avec celui observé sur une souche non productrice aurait permis de vérifier l'efficacité du pigment synthétique.

Plusieurs microorganismes dont *P. aeruginosa* sécrètent des sidérophores. La liaison de ces composés permettent à la bactérie de compétitionner avec l'hôte pour l'utilisation du fer (COX *et al* 1985). Des données récentes (COFFMAN *et al* 1990) montrent que la pyocheline, un sidérophore de *Pseudomonas aeruginosa*, peut catalyser la formation du radical hydroxyl à partir d'un flux continu de $\bullet\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ généré par des neutrophiles activés. Ceci suggère que la ferripyocheline peut contribuer au dommage tissulaire médié par *Pseudomonas*. BRITIGAN *et al* 1992 suggèrent que les produits de sécrétion, la pyocyanine et la pyocheline, pourraient agir en synergie à travers une génération de radicaux hydroxyls de manière à contribuer au dommage tissulaire.

Dans les pneumopathologies dégénératives impliquant *Pseudomonas aeruginosa*, l'intérêt est porté non seulement sur l'injure tissulaire mais également sur la persistance de l'infection. Bien entendu, l'utilisation du nitrate par la bactérie de même que l'effet protecteur de la pyocyanine, la sécrétion d'une matrice mucoïde composée de mucine et d'alginate et la sécrétion de protéases sont autant d'avantages permettant la résistance du microorganisme.

Les cytokines jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre les pathogènes. À cet effet, PIERANGELI *et al* publiaient en 1993 le résultat d'expériences montrant que l'IFN γ et le TNF α synergisent de manière à augmenter le potentiel bactéricide des macrophages murins envers *Pseudomonas aeruginosa*. Des expériences similaires menées dans notre laboratoire (DENIS *et al* 1994, résultats préliminaires) ont également démontré que le traitement de PMNs humains avec de l'IL-8 favorisant la phagocytose et l'effet bactéricide intracellulaire envers *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant, plusieurs auteurs ont déjà démontré que les microorganismes sont en mesure de s'adapter à un environnement hostile en utilisant les cytokines à titre de facteur de croissance ou simplement dans le but de retirer le message du milieu et ainsi annuler son effet. En effet, il semblerait que même des cytokines reconnues comme ayant un effet pro-inflammatoire important de même qu'un potentiel bactéricide peut éventuellement provoquer une croissance importante d'une population bactérienne ou parasitaire donnée. À titre d'exemple, mentionnons les travaux de KONGSHAVN *et al* 1989 qui témoignent d'une augmentation dramatique du taux de croissance du parasite *Trypanosoma muscili* lorsque incubé en présence de TNF α alors que cette même cytokine favorise l'effet bactéricide du macrophage. Or, à la lumière de nos résultats, il semblerait que *Pseudomonas aeruginosa* soit également en mesure d'utiliser l'IL-8 qu'elle induit pour maintenir et favoriser sa croissance dans un milieu bactériostatique.

L'IL-8 semble donc induire deux effets. D'une part, elle semble réprimer la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* en favorisant la phagocytose et l'effet bactéricide du neutrophile et, d'autre part, cette même cytokine favorise la croissance de la bactérie

dans un milieu minimal. En 1993, TAYLOR *et al* rapportaient une forte prépondérance de mutants auxotrophes dans les expectorations d'adultes avec fibrose kystique. La population d'auxotrophes était plus importante chez les patients en phase aiguë que chez les patients stables. Ces mutants étaient dépendant de la présence de divers acides aminés dont la méthionine, la leucine et la proline (TAYLOR *et al* 1993). Cependant, il est peu probable que l'IL-8 puisse jouer un rôle nutritif. Étant donné que les concentrations d'IL-8 mesurés dans les expectorations sont de l'ordre du ng, les quantités d'acides aminés fournies par cette cytokine sont donc insuffisantes pour expliquer une différence de biosynthèse significative en présence d'IL-8. De plus, ceci ne pourrait expliquer le fait que l'augmentation de la croissance ne soit induite que par l'IL-8 et ne soit pas accentuée lorsque l'on combine cette cytokine à une autre. Bien que nous n'ayons pas définis les mécanismes impliqués dans ce phénomène, l'on pourrait penser que l'IL-8 puisse agir comme un signal induisant la réplication de l'ADN menant à la multiplication bactérienne. Une telle adaptation du pathogène pourrait contribuer à briser l'équilibre entre la prolifération et l'élimination de la bactérie par les PMNs et promouvoir ainsi la réplication de la bactérie de même que l'exacerbation de la maladie.

V Conclusions

Les travaux ont permis de mettre en lumière l'implication du génotype CFTR négatif de même que l'implication des cellules épithéliales et des neutrophiles dans la condition inflammatoire qui caractérise la mucoviscidose. Les résultats ont aussi permis de déterminer l'implication de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* et de soulever des points d'intérêt concernant la relation bactérie/hôte et les processus susceptibles de favoriser la résistance du pathogène contre les défenses de l'hôte.

En effet, les résultats ont démontré que le phénotype FK n'est pas directement relié à la production d'IL-8 qui témoigne du degré d'inflammation. Cependant, bien que les lignées de cellules épithéliales transformées avec SV40 ne répondent pas aux anti-inflammatoires synthétiques, des études plus approfondies permettraient de vérifier une relation possible entre la réponse anti-inflammatoire à l'IFN γ et la présence du phénotype FK.

Les cytokines pro-inflammatoires présentes dans les voies aériennes des patients FK (IL-1 β et TNF α) stimulent la production d'IL-8 par les neutrophiles et les cellules épithéliales alors que la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* entraîne non seulement la production d'IL-8 par ces types cellulaires mais induit la production de monoxyde d'azote en quantité appréciable. La production d'IL-8 et de nitrite semble être un marqueur du degré de sévérité de la maladie. Cependant, bien que les radicaux libres et les cytokines pro-inflammatoires constituent normalement des mécanismes de défense contre un envahisseur, il semblerait que *P. aeruginosa* ait été en mesure de s'adapter à un

environnement hostile en développant des mécanismes lui permettant d'utiliser le nitrate dérivé du NO et l'IL-8 produite par les cellules épithéliales et les neutrophiles.

En regard de ces résultats, l'on pourrait envisager la possibilité que l'inhibition de la production de NO et d'IL-8 serait susceptible de devenir une cible thérapeutique non seulement dans le but de ralentir la progression des dommages pulmonaires mais également dans l'optique de réduire la persistance de l'infection par *Pseudomonas aeruginosa* qui constitue le principal agent causal de l'inflammation chez les patients FK.

VI Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de recherche, Dr Michel Denis, pour la confiance qu'il m'a témoigné en m'accueillant au sein de son équipe. Je lui suis tout particulièrement reconnaissante de m'avoir conduite jusqu'à l'obtention de mon diplôme malgré le fait qu'il ait changé de situation. Aussi, sous sa direction ai-je pu développer des aptitudes, tant sur le plan scientifique que personnel, qui me seront utiles tout au long de ma carrière.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à Dr Jean-François Beaulieu pour son soutien, ses encouragements, ses conseils et ses précieuses discussions. La contribution de Dr Beaulieu a été, sans contredit, d'un appui essentiel à la complétion de ma maîtrise.

Je remercie mes parents, Mme Hélène Rocheleau et M. Louis Francoeur, pour l'appui moral et financier qu'ils ont toujours su me procurer avec délicatesse et sincérité de même que pour m'avoir aidé à affronter et surmonter les embûches.

Merci à Leng Hong Pheng pour ses discussions et son aide relative à l'utilisation des logiciels informatiques, de même que pour son encouragement lors de la recherche d'un directeur de thèse.

Merci à Dr René Bastarache pour m'avoir appris à trouver la motivation nécessaire à la poursuite de mes objectifs et à développer le sens de l'entreprise.

Merci à Marie Bédard, M.Sc, Ginette Bilodeau, B.Sc et Nicole Carrier pour leur soutien technique.

Merci aux Drs Gilles Dupuis et Pierre Bécharde pour leurs encouragements et leurs conseils.

VII Références

- Alleva, D.G., Burger, C.J. et Elgert, K.D., (1994), Tumor induced regulation of suppressor macrophage nitric oxide and TNF α production. Role of tumor-derived IL-10, TGF β , and prostaglandin E $_2$., J Immunol. 153:1674-1686
- Alving, L., Fornhem, C. et Lundberg, J.M., (1993), Pulmonary effects of endogenous and exogenous nitric oxide in the pig: relation to cigarette smoke inhalation., Br J Pharmacol 110:739-746
- Amaro, Y., Lee, S. et Allison, A., (1992), Inhibition of glucocorticoids of the formation of interleukin-1 α , interleukin-1 β , and interleukin-6: mediation by decreased mRNA stability., Mol Pharmacol 43:176-182
- Artenstein, M.S., (1976), Immunologic and infectious reaction in the lung., Kirkpatrick, C.H. et Reynolds, H.Y. éditeurs, Marcel Decker inc., N.Y. É.-U., pp 17-19
- Assadulahi, T.P., Church, M.K., Dai, Y. *et al*, (1992), Interleukin-8 concentrations are elevated in children with cystic fibrosis, Am Rev Respir Dis 145(4 pt2):A118
- Bargon, J., Trapnell, B.C., Cher, C.S., *et al*, (1992), Down regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene expression by agents that modulate intracellular divalent cations., Mol Cell Biol 12:1872-1878
- Barker, J.N.W.N., Jones, M.L., Mitra, R.S., *et al*, (1991), Modulation of keratinocyte-derived interleukin-8 which is chemotactic for neutrophils and T lymphocytes., Am J Pathol 139:869-876

- Baydoun, A.R., Bagle, R.G., Pearson, J.D., *et al*, (1994), Discrimination between citrulline and arginine transport in activated macrophages: inefficient synthesis of NO from recycling of citrulline to arginine., *Br J Pharmacol* 112:487-492
- Bazzoni, F., Cassatella, M.A., Rossi, F., *et al*, (1991), Phagocytosing neutrophils produce and release high amounts of the neutrophil activating peptide-1/interleukin-8., *J Exp Med* 173:771-774
- Bédard, M., McClure, C.D., Schiller, N.L., Francoeur, C. *et al*, (1993), Release of interleukin-8, interleukin-6, and colony stimulating factors by upper airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis., *Am J Respir Cell Mol Biol* 9:455-462
- Birrer, P., McElvaney, N.G., Rådeberg, A. *et al*, (1994), Protease-antiprotease imbalance in the lungs of children with cystic fibrosis., *Am J Respir Crit Care Med* 150:207-213
- Britigan, B.E., Roeder, T.L., Rasmussen, G.T., *et al*, (1992), Interaction of the *Pseudomonas aeruginosa* secretory products pyocyanin and pyochelin generates hydroxyl radical and causes synergistic damage to endothelial cells., *J Clin Invest* 90:2187-2196
- Cassatella, M.A., Guasparri, I, Ceska, M, *et al*, (1993), Interferon-gamma inhibits interleukin-8 production by polymorphonuclear leucocytes., *Immunol* 78:177-184
- Cavaillon, J.M., (1993), Les agents infectieux face aux cytokines., *La presse médicale* 22:847-849
- Cheng, S.H., Rich, D., Marshall, J., *et al*, (1991), Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel., *Cell* 66:1027-1036

- Coffman, T.J., Cox, C.D., Edeker, B., *et al*, (1990), Possible role of bacterial siderophores in inflammation: iron bound to the *Pseudomonas* ferripyochelin can function as a hydroxyl radical catalyst., *J Clin Invest* 86:1030-1037
- Cohn, J.A., Kole, J and Yankaskas, J.R., (1993), Protein phosphorylation responses in normal and cystic fibrosis airway epithelial cell lines., *Am J Respir Cell Mol Biol* 9:401-404
- Collins, F.S., (1992), Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications., *Science* 256:774-779
- Couturier, C., Haeffner-Cavaillon, N., Caroff, M. *et al*, (1991), Binding sites for endotoxin (lipopolysaccharides) on human monocytes., *J Immunol* 147:1899-1904
- Cox, C.D. et Adams, P., (1985), Siderophore activity of pyoverdine of *Pseudomonas aeruginosa*., *Infect Immun* 48:130-138
- Crofton, J et Douglas, A., (1975), Respiratory diseases., 2^e édition Blackwell Scientific Publications, Oxford, Angleterre, pp 638-642
- Debets, J.M.H., Kampmeijer, R., Van der Linden, M.P.M.H., *et al*, (1989), Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients., *Crit Care Med* 17:489-494
- Denis, M., (1992), Interleukin-6 is used as a growth factor by virulent *Mycobacterium avium*: presence of specific receptors., *Cell Immunol* 141:182-188
- Denis, M., Bédard, M., Francoeur, C., *et al* (1993), Local and systemic release of cytokines in CF., *Ped Pulm* S9:287

- Denis, M., Campbell, D et Gregg, E.O., (1991), Interleukin-2 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor stimulate growth of a virulent strain of *Escherichia coli*., *Infect Immun* 59:1853-1856
- Dentener, M.A., Bazil, V., Von Asmuth, E.J.U., *et al*, (1993), Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α , IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages., *J Immunol* 150:2885-2891
- de Waals, M.R., Ahams, J., Bennett, B., *et al*, (1991), Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes., *J Exp Med* 174:1209
- Eckmann, L., Kagnoff, M.F. et Feirer, J., (1993), Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry., *Infect Immun* 61:4569-4574
- Eisenstat, J.Y.R., Jorens, P.G., Hébert, C.A., *et al*, (1993), Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway disease., *Am J Physiol* 264:L413-L418
- Essner, R., Rhoades, K., McBride, W.H., *et al*, (1989), IL-4 down-regulates IL-1 and TNF gene expression in human monocytes., *J Immunol* 142:3857-3861
- Férec, C., Mercier, B. et Audrézat, M.P., (1994), Les mutations de la mucoviscidose: du génotype au phénotype., *M/S* 10:631-639
- Fletcher Starnes, H., Pearce, M.K., Tewari, A., (1990), Anti-IL-6 antibody protects against lethal *Escherichia coli* infection and lethal tumor necrosis factor- α challenge in mice., *J Immunol* 145:4185 -4191

- Franciolini, F. et Petris, A., (1990), Chloride channels of biological membranes., *Biochem Biophys Acta* 1031:247-259
- Furchgott, R.F. et Zawadzki, J.V., (1980), The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine., *Nature* 288:373-376
- Galy, A.H.M. et Spits, H., (1991), IL-1, IL-4 and IFN γ differentially regulate cytokine production and cell surface molecule expression in cultured human thymic epithelial cells., *J Immunol* 147:3823-3830
- Gardiner, S.M., Compton, A.M., Bennett, T., *et al*, (1990 a), Persistent haemodynamic changes following prolonged infusions of N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) in conscious rats., dans *Nitric Oxide from L-arginine: a bioregulatory system.*, édité par Moncada, S. et Higgs, E.A., Elsevier, Amsterdam, pp 489-491
- Gardiner, S.M., Compton, A.M., Bennett, T. *et al*, (1990 b), Regional haemodynamic changes during oral ingestion of N^G-nitro-L-arginine methyl ester in conscious Brattleboro rats., *Br J Pharmacol* 101:10-12
- Georgilis, K., Schaefer, C., Dinarello, C.A., *et al*, (1987), Human recombinant interleukin-1 beta has no effect on intracellular calcium or on functional responses of human neutrophils. *J Immunol* 138:3403-3407
- Goosens, M., (1991), Biologie de la mucoviscidose: progrès récents et perspectives., *M/S* 7:1048-1051
- Gottschalk, G., (1986), *Bacterial metabolism*, 2^e édition, Springer-Verlag, N.Y. É.U., pp 122-125

- Greally, P., Hussein, M.J., Cook, A.J., *et al* (1993), Sputum tumor necrosis factor- α and leukotriene concentration in cystic fibrosis., *Arch Dis Child* 68:389-392
- Grob, P.M., David, E., Warren, T.C., *et al* (1990), Characterization of a receptor for human monocyte-derived neutrophils chemotactic factor/interleukin-8., *J Biol Chem* 265:8311-8316
- Hart, P.H., Vitti, G.F., Burgess, D.S., *et al* (1989), Potential anti-inflammatory effects of interleukin-4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin-1, and prostaglandin E₂., *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3803-3807
- Hassan, H.M. et Fridovich, I., (1980), Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine., *J Bacteriol* 141:156-163
- Hillman, G. et Haas, G.P., (1995), Role of cytokines in lymphocyte functions. dans *Human cytokines: their role in disease and therapy.*, Aggarwal, B.B. et Puri, R.K. éditeurs, Blackwell Science, É.U. p 44
- Horvat, R.T., Clabough, M., Jobe, C.D. et Parmely, M., (1989), Inactivation of human gamma interferon by *Pseudomonas aeruginosa* proteases: elastase augments the effects of alkaline protease despite the presence of α_2 -macroglobuline., *Infect Immun* 57:1668-1674
- Huber, A.R., Kunkel, S.L., Todd, R.F., *et al*, (1991), Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous IL-8., *Science* 254:99-102

- Ignarro, L.J., Lipton, H., Edwards, J.C., *et al* (1981), Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprussides and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates., *J Pharmacol Exp Ther* 218:739-749
- Jefferson, D.M., Valentich, J.D., Marini, F.C., *et al* (1990), Expression of normal and cystic fibrosis phenotypes by continuous airway epithelial cell lines., *Am J Physiol* 259:L496-L505
- Jensen, E.T., Kharazmi, A., Høiby, N., *et al* (1992), Some bacterial parameters influencing the neutrophil oxidation by response to *Pseudomonas aeruginosa* biofilms., *APMIS* 100:729-733
- Jiang, C., Finkbeiner, W.E., Widdicombe, J.H., *et al* (1993), Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis., *Science* 262:424-427
- Jones, M.M., Seilheimer, D.K., Pier, G.H., *et al*, (1993), Increased elastase secretion by peripheral blood monocytes in cystic fibrosis patients., *Clin Exp Immunol* 80:344-349
- Katsuki, S., Arnold, W., Mittal, C., *et al*, (1977), Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerine and nitric oxide in various tissues preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine., *J Cyclic Nucleotide Res* 3:23-25
- Kerem, B., Rommens, J.M., Buchanan, J.A., *et al*, (1989), Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis., *Science* 245:1073-1080
- Kharazmi, A. (1991), Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*., *Immunol Let* 30:201-206

- Kharitonov, S.A., Yates, D., Robbins, R.A., *et al*, (1994), Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients., *Lancet* 343:133-135
- Klebanoff, S.J. et Nathan, C.F., (1993), Nitrite production by stimulated human polymorphonuclear leukocytes supplemented with azide and catalase., *Biochem Biophys Res Comm* 197:192-196
- Knapp, W., (1989), Myeloid section report, Dans: *Leucocyte typing IV.*, W. Knapp, B. Dörken, W.R. Gillks, E.P. Reiber, R.E. Schmidt, H. Stein et A.E.G. Kr. Von der Borne, éditeurs, Oxford University Press, Oxford, England, New York et Tokyo, p 747.
- Knight, M. Hartman, P.E., Hartman, Z., *et al*, (1979), A new method of preparation of pyocyanine and demonstration of an unusual bacterial sensitivity., *Anal Biochem* 95:19-23
- Kongshavn, P.A.I. et Ghadirian, E., (1989), Enhancing and suppressing effects of tumor necrosis factor/cachectin on *Trypanosoma musculi* growth., *Parasite Immunol* 10:581-588
- Köning, R., Freidl, P., Pederson, S.S., *et al*, (1992), Alginate - Its role in neutrophil responses and signal transduction towards mucoid *Pseudomonas aeruginosa* bacteria., *Int Arch Aallergy Immunol* 99:98-106
- Kwon, O.J., Au, B.T., Collins, P.D., *et al*, (1994), Inhibition of interleukin-8 expression by dexamethasone in human cultured airway epithelial cells., *Immunol* 81:389-394

- Levine, S., Larivée, P., Logun, C., *et al*, (1993), Corticosteroids differentially regulate secretion of IL-6, IL-8, and G-CSF by a human bronchial epithelial cell line., *Am J Physiol* 265:L360-L368
- Li, M., McCann, J.D., Anderson, M.P., *et al*, (1989), Regulation of chloride channels by protein kinase C in normal and cystic fibrosis airway epithelia., *Science* 244:1353-1356
- Liu, J.H. et Djeu, J.Y., (1995), Role of cytokines in neutrophil functions., du livre *Human cytokines: their role in disease and therapy.*, Aggarwal, B.B. et Puri, R.K. éditeurs, Blackwell Science É.-U., pp 76-77
- Lowenthal, J.W., Castle, B.E., Christiansen, J. *et al*, (1988), Expression of high affinity receptors for murine interleukin-4 (BSF-1) on hemopoietic and non hemopoietic cells., *J Immunol* 140:456-464
- Mahenthalingam, E., Campbell, M.E. et Speert, D.P., (1994), Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis., *Infect Immun* 62:596-605
- Malavista, S.E., Montgomery, R.R. et VanBlaricom, G., (1992), Evidence for reactive nitrogen intermediates in killing of staphylococci by human neutrophil cytoplasm., *J Clin Invest* 90:631-636
- Marini, M., Soleperto, M., Mezzetti, M., *et al*, (1991), Interleukin-1 binds to specific receptors on human bronchial epithelial cells and upregulated granulocyte macrophage colony-stimulating factor synthesis and release., *Am J Respir Cell Mol Biol* 4:519-524

- Masure, S., Porat, P., Van Damme, J., *et al*, (1991), Purification and identification of 91-kDa neutrophil gelatinase. release by the activating peptide interleukin-8., *Eur J Biochem* 198:391-398
- Matsushima, K et Oppenheim, J.J., (1989), Interleukin-8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL-1 and TNF., *Cytokine* 1:2-13
- Mazingue, C., Deteuf, F.C., Luis, J., *et al*, (1989), *In vitro* and *in vivo* effects of interleukin-2 on the protozoan parasite *Leishmania*., *Eur J Immunol* 19:487-491
- McCain, R.W., Dessypris, E.N. et Christman, J.W., (1993), Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates human polymorphonuclear leukocytes to produce interleukin-8 *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8:28-34
- McCall, T.B., Palmer, R.M.J. et Moncada, S., (1991), Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur J Immunol* 21:2523-2527
- McCall, T.B., Palmer, R.M.J, et Moncada, S., (1992), Interleukin-8 inhibits the induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils., *Biochem Biophys Res Commun* 186:680-685
- McDonald, T.V., Nghiem, P.T., Gardner, P., *et al*, (1992), Human lymphocytes transcribe the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene and exhibit CF-defective cAMP-regulated chloride current., *J Biol Chem* 267:3242-3248
- Miller, K.M., Dearborn, D.G. et Sorensen, R.U., (1987), *In vitro* effects of synthetic pyocyanine on neutrophil superoxide production., *Infect Immun* 55:559-563

- Miska, T.P., Moore, W.M., Kasten, T.P., *et al*, (1993), Selective inhibition of the inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine., *Eur J Pharmacol* 233:119-125
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. et higgs, E.A., (1991), Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology., *Pharmacol Rev* 43:109-142
- Mukaida, N., Gussella, G.L., Kasahara, T. *et al*, (1992 a), Molecular analysis of the inhibition of interleukin-8 production by dexamethasone in a human fibrosarcoma cell line., *Immunol* 75:674-679
- Mukaida, N., Harada, A., Yasumoto, K., *et al*, (1992 b), Proportions of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin-8 and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF)., *Microbiol Immunol* 36:773-789
- Murad, F. Mittal, C.R., Arnold, W.P., *et al*, (1978), Guanylate cylase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide and hydroxyl radical., Dans *Inhibition by hemoglobin and myoglobin.*, *Adv Cyclic Nucleotide Res* 9:145-158
- Niiro, H., Otsuka, T., Kuga, S., *et al*, (1994), IL-10 inhibits prostaglandin E₂ production by lipopolysaccharide-stimulated monocytes., *Int Immunol* 6:661
- Ohara, I., Lea, R.G., Flanders, K.C., *et al*, (1992), Eosinophils in chronically inflamed human upper airway tissues express transforming growth factor β_1 gene (TGF β_1)., *J Clin Invest* 89:1662-1668
- Oswald, I.P., Gazzinelli, R.T., Sher, A., *et al*, (1992), Il-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor beta to inhibit macrophage cytotoxic activity., *J Immunol* 148:3578-3582

- Padrines, M., Wolf, M., Walz, A., *et al*, (1994), Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3., FEBS Let 352:231-235
- Palmer, R.M.J., Rerige, A.G. et Moncada, S., (1987), L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation., Biochem Biophys Res Commun 153:1251-1256
- Paradiso, A.M., (1992), Identification of Na⁺-H⁺ exchange in human normal and cystic fibrosis ciliated airway epithelium., Am J Physiol 6:L757-764
- Park, L.S., Friend, D. et Sassenfeld, H.M., (1987), Characterization of the human B cell stimulatory factor-1 receptor. J Exp Med 166:476-488
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. et Krieg, M.R., (1988), Microbiology, 5^e édition, McGraw-Hill Book Company, Montréal, Canada, pp 267-268
- Peveri, P. Walz, A., Dewald, B., *et al* (1988), A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes., J Exp Med 167:1547-1559
- Pfeffer, K., Huecksteadt, T.P. et Hoidal, J.R., (1993), Expression and regulation of tumor necrosis factor in macrophages from cystic fibrosis patients., Am J Respir Cell Mol Biol 9:511-519
- Pierangeli, S.S. et Sonnenfeld, G., (1993), Treatment of murine macrophages with murine interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha enhances uptake and intracellular killing of *Pseudomonas aeruginosa*., Clin Exp Immunol 93:165-171
- Porat, R., Clark B.D., Wolff, S.M., *et al*, (1991), Enhancement of growth of virulent strains of *Escherichia coli* by interleukin-1., Science 254:430-432

- Power, C., O'Connor, C.M., MacFarlane, D., *et al*, (1994), Neutrophil collagenase in sputum from patients with cystic fibrosis., *Am J Respir Crit Care Med* 150:818-822
- Puri, R.K. et Siegel, J.P., (1992), Interleukin-4 and gene therapy., *Cancer Invest* 11:473-486
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. et Moncada, S., (1987), Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in patients., *Br J Pharmacol* 92:181:187
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. et Moncada, S., (1990), Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells., *Proc Natl Acad Sci USA* 87:10043-10047
- Rapoport, R.M. et Murad, F., (1983), Agonist induced endothelium dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP., *Circ Res* 52:352-357
- Ray, A. et Préfontaine, K.E., (1994), Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of NF κ B and the glucocorticoids receptor., *Proc Natl Acad Sci USA* 91:752-756
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.S., *et al* (1989), Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA., *Science* 245:1066-1073
- Rommens, J.M., Iannuzi, M.C., Kerem, B.S., *et al* (1989), Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping., *Science* 245:1059-1064

- Rommens, J.M., Dho, S., Bear, C.E., *et al* (1991), cAMP-inducible chloride conductance in mouse fibroblast lines stably expressing the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator., *Proc Natl Acad Sci* 88:7500-75104
- Samanta, A.K., Oppenheim, J.J. et Matsushima, K., (1989), Identification and characterization of specific receptors for monocyte-derived monocyte derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) on human neutrophils., *J Exp Med* 169:1185-1189
- Sauder, D.N., Mounessa, N.L., Katz, S.I., *et al* (1984), Chemotactic chemokines: the role of leucocytic pyrogen neutrophil chemotaxis., *J Immunol* 132:828-832
- Schmid, J. et Weissman, C., (1987), Induction of mRNA for a serine protease and a beta-thromboglobulin-like protein in mitogen stimulated human leucocytes., *J Immunol* 139:250-256
- Schröder, J.M., Mrowietz, U., Morita, E., *et al*, (1987), Purification and partial biochemical characterization of a human monocyte-derived neutrophil-activating peptide that lacks interleukin-1 activity., *J Immunol* 139:3474-3483
- Schröder, J.M., (1989), The monocyte-derived neutrophil activating peptide (NAP-1/interleukin-8) stimulates human neutrophil arachidonate-5-lipoxygenase, but not the release of cellular arachidonate., *J Exp Med* 170:847-863
- Sheppard, D.N., Rich, D.P., Ostedgaard, L.S., *et al* (1993), Mutation in CFTR associated with mild-disease from Cl⁻ channel with altered pore properties., *Nature* 362:160-164

- Schultz, P.J. et Ray, L., (1989), Effects of antihypertensive agents on endothelium-dependent and endothelium-independent relaxation. *Br J Clin Pharmacol* 28(suppl 2):1515-1575
- Sorensen, R.U., Klinger, J.D., Cash, H.A., *et al* (1983), *In vitro* inhibition of lymphocyte proliferation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments., *Infect Immun* 41:321-330
- Sowers, J.R. Zemel, M.B., Standley, P.R. *et al*, (1989), Calcium and hypertension., *J Lab Clin Med* 114:338-348
- Standiford, T.J., Strieter, R.M., Kasahara, K., *et al* (1990), Disparate regulation of interleukin-8 gene expression from blood monocytes endothelial cells, and fibroblast by interleukin-4., *Biochem Biophys Res Commun* 171:531-536
- Strieter, R.M., Chensue, S.W., Basha, M.A., *et al* (1990), Human alveolar macrophage gene expression of interleukin-8 by tumor necrosis factor- α , lipopolysaccharide, and interleukin- 1β ., *Am J Respir Cell Mol Biol* 2:321-326
- Suttorp, N., Fuhrmann, M. Tannert-Otto, S., *et al* (1993), Pore-forming bacterial toxins potently induces release of nitric oxide in porcine endothelial cells., *J Exp Med* 178:337-341
- Tanaka, S., Robinson, E.A., Yoshimura, T., *et al* (1988), Synthesis and biological characterization of monocyte-derived neutrophil chemotactic factor., *FEBS Let* 236:467-470

- Taylor, R.F.H., Hodson, M.E. et Pitt, T.L., (1993), Adult cystic fibrosis: association of acute pulmonary exacerbation and increasing severity of lung disease with auxotrophic mutants of *Pseudomonas aeruginosa.*, Thorax 48:1002-1005
- Tomashefski, J.F., Bruce, M., Goldberg, H.I., *et al*, (1986), Regional distribution of macroscopic lung disease in cystic fibrosis., Am Rev Resir Dis 133:535-540
- Van Damme, J., (1992), Interleukin-8 and related molecules, dans Handbook of cytokines, Thompson, A., éditeur, Academic Press, Toronto, Canada, p 202
- Van Damme, J., Van Beeumen, J., Opdenakker, G, *et al* (1988), A novel NH₂-terminal sequence-characterized human monokine processing neutrophil chemotactic, skin-reactive, and granulomatosis-promoting activity., J Exp Med 167:1364-1376
- Van Dervort, A., Yan, L., Madara, P., *et al* (1994), Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF α production by human neutrophils., J Immunol 152:4102-4109
- Varesio, L., Cox, G.W., Pulkki, K., *et al* (1993), Activation of macrophages and monocytes by interferon-gamma and interleukin-2., dans Monoclear phagocytes in cell biology., Klonstergaard, J. et Lopez-Berestin, G. éditeurs Boca Raton, Floride CRC Press pp 119-146
- Waage, A., Slupphaug, G et Shalaby, R., (1990), Glucocorticoides inhibit the production of IL-6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts., Eur J Immunol 20:2439-2443
- Walz, A., Peveri, P., Aschauer, H., *et al*, (1987), Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil activating factor produced by monocytes., Biochem Biophys Res Commun 159:755-761

- Warner J.O. (1992), Immunology of cystic fibrosis., Br Med Bul 48:893-911
- Welsh, M.J., (1990), Abnormal regulation of ion channels in cystic fibrosis epithelia., FASEB J 4:2718-2725
- Werthein, W.A., Kunkel, S.L., Standiford, T.J. *et al* (1993), Regulation of neutrophil derived IL-8: the role of prostaglandin E₂, dexamethasone, and IL-4., J Immunol 151:2166-2175
- West, J.B. (1989), Physiopathologie respiratoire, édition Pradel, Paris, France, p 153
- Wheelock, E.F., (1965), Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohaemagglutinin., Science 149:310-311
- Willems, J., Joniau, M., Cique, S., *et al* (1989), Human granulocyte chemotactic peptide (IL-8) as a specific neutrophil degranulator: comparaison with other monokines., Immunol 67:540-542
- Wilson, R., Sykes, D.A., Watson, D., *et al* (1988), Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium., Infect Immun 56:2515-2517
- Wright, S.D., Ramos, R.A., Hermanowski-Vosatka, A., *et al* (1991), Activation of the adhesive capacity of CR3 on neutrophils by endotoxin dependence on lipopolysaccharide binding protein and CD14. J Exp Med 173:1281-1286
- Xing, I., Jordana, M., Braciak, T. *et al*, (1993), Lipopolysaccharide induces expression of granulocyte/macrophage colony stimulating factor, interleukin-8, and interleukin-6 in human nasal, but not lung, fibroblasts: evidence of heterogeneity within the respiratory tract. Am J Respir Cell Mol Biol 9:255-263

- Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., *et al* (1987), Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines., *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9233-9237