

Université de Montréal

**La réponse inflammatoire à l'exercice chez les patients atteints de fibrose
kystique et sa modulation par la réadaptation.**

par

Mikhael Laskine

Département de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences biomédicales

option générale

Août 2014

© Mikhael Laskine, 2014

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**La réponse inflammatoire à l'exercice chez les patients atteints de fibrose
kystique et sa modulation par la réadaptation.**

Présenté par :

Mikhael Laskine

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Yves Berthiaume

Président-rapporteur

Dre Céline Bergeron

Directrice de recherche

Dr Claude Poirier

Codirecteur de recherche

Dr Alphonse Jeanneret

Membre du jury

Résumé

L'inflammation joue un rôle central dans la fibrose kystique (FK) et dans sa progression. Actuellement peu de connaissances sont disponibles sur l'impact de l'exercice sur la cascade inflammatoire. Dès lors, nous avons effectué une étude exploratrice, prospective, non contrôlée, non randomisée chez 10 sujets atteints d'une FK cliniquement stable, afin de déterminer la réponse inflammatoire à l'exercice aigu, tant au niveau local que systémique, et la modulation de celle-ci suite à un programme de réadaptation individualisé et non supervisé d'une durée de 4 semaines. Nos résultats montrent que l'état inflammatoire basal est augmenté chez les sujets FK sédentaires. D'autre part, l'exercice aigu augmente le stress inflammatoire au niveau systémique et bronchique. La réadaptation a permis de diminuer l'état inflammatoire de base au niveau bronchique et a également diminué le stress inflammatoire induit par l'exercice aigu. Dans le sérum, nous avons constaté une augmentation des métalloprotéases neutrophiliques 8 et 9, ainsi que d'IL-8 après la réadaptation et une diminution de MCP-1 et de CRP. Le questionnaire CQFR montre que ces changements étaient parallèles à l'amélioration de la forme physique. En conclusion, nous pensons que l'exercice est sécuritaire chez les patients FK et qu'il est nécessaire, car il permet de diminuer l'inflammation au niveau bronchique et probablement sérique.

Mots-clés : Fibrose kystique, réadaptation, inflammation, expectorant, IL-6, IL-8, MMP-8, MMP-9, TIMP1

Abstract

It is well recognized that inflammation plays a major role in cystic fibrosis (CF) lung disease and its progression. Little is known about the impact of exercise on the inflammatory cascade. Therefore we conducted a prospective non-controlled non-randomized pilot study in ten patients with clinically stable CF to better understand airway and systemic inflammatory response to exercise and its modulation after a 4 week rehabilitation programme. We found that the basal inflammation is high in CF and that it is up-modulated by an acute exercise. After the rehabilitation programme, airway inflammation was down-regulated, as was the stress-induced airway inflammatory response to exercise. As for systemic inflammation, our results showed that metalloproteinase 8 and 9 increased over time and IL-8, while MCP-1 and CRP decreased over time. The CQFR questionnaire showed that these changes were consistent with a better physical condition. In conclusion, we think that exercise is safe and vital in CF. It helps to down-regulate the basal airway inflammation and probably the systemic one.

Keywords : Cystic fibrosis, inflammation, physical exercise, sputum, IL-6, IL-8, MMP-8, MMP-9, TIMP1

Table des matières

Résumé.....	iii
Summary.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Dédicace.....	xiv
Préambule.....	1
Chapitre 1 : Fibrose Kystique et inflammation.....	2
1. La Fibrose Kystique.....	2
1.1 Mutations associées à la FK.....	5
2. FK et atteinte pulmonaire.....	7
3. Cellules épithéliales pulmonaires.....	8
4. FK et inflammation.....	10
4.1. FK, inflammation et exercice physique.....	11
4.2. Médiateurs inflammatoires.....	12
5. Neutrophiles.....	16
5.1 Neutrophiles et stress oxydatif.....	19
5.2 Neutrophiles et protéases.....	20
5.2.1 Élastase neutrophilique.....	21
5.2.2 MMP.....	22
5.2.2.1 MMP-2.....	23

5.2.2.2 MMP-7.....	24
5.2.2.3 MMP-8.....	24
5.2.2.4 MMP-9.....	25
5.2.2.5 MMP-12.....	25
5.2.3 Inhibiteurs de MMP.....	26
6. Mastocytes.....	27
7. Macrophages et monocytes.....	28
8. Lymphocytes.....	29
9. Cellules dendritiques.....	30
10. Résumé.....	31
Chapitre 2 : Rationnel et Hypothèse.....	32
1. Rationnel.....	32
2. Hypothèse et objectifs.....	32
Chapitre 3 : Matériels et Méthodes.....	34
1. Design de l'étude et population.....	34
2. Protocole de l'exercice physique.....	35
3. Réadaptation.....	36
4. Analyse des expectorations et du sang.....	38
5. Analyse du questionnaire CQF-R.....	40
6. Analyse statistique.....	41
Chapitre 4 : Résultats.....	42
1. Caractéristiques démographiques et cliniques de la population de l'étude.....	42

2. Fonctions pulmonaires.....	43
3. Exercice aigu : mesures des marqueurs inflammatoires.....	46
3.1. Mesures dans le sang.....	46
3.2. Mesures dans l'expectorat.....	48
4. Effet de la réadaptation : comparaison des marqueurs inflammatoires entre préE1 et préE2.....	55
4.1. Mesures dans le sang.....	55
4.2. Mesures dans l'expectorat.....	57
5. Effet de la réadaptation : la modulation des marqueurs inflammatoires par le deuxième exercice.....	62
5.1. Mesures dans le sang.....	62
5.2. Mesures dans l'expectorat.....	65
6. Comparaison entre les dosages des cytokines.....	72
7. Comparaison entre les dosages d'IL-6, IL-8 et neutrophiles dans l'expectorat et les fonctions pulmonaires préE1.....	74
8. Questionnaire CQF-R.....	77
Chapitre 5 : Discussion.....	78
Chapitre 6 : Conclusion.....	95
Bibliographie.....	xv

Liste des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Caractéristiques des patients.....	43
<u>Tableau 2</u> : Paramètres des fonctions pulmonaires avant E1.....	44
<u>Tableau 3</u> : Paramètres des fonctions pulmonaires avant E2.....	44
<u>Tableau 4</u> : Paramètres d'endurance E1.....	45
<u>Tableau 5</u> : Paramètres d'endurance E2.....	45
<u>Tableau 6</u> : Modulation par exercice aigu E1 des leucocytes et du CRP dans le sang.....	47
<u>Tableau 7</u> : Le compte cellulaire dans le sputum préE1.....	49
<u>Tableau 8</u> : Modulation du compte cellulaire dans le sputum par E1.....	50
<u>Tableau 9</u> : Modulation par réadaptation des leucocytes et du CRP dans le sang.....	55
<u>Tableau 10</u> : Modulation par réadaptation du compte cellulaire dans le sputum.....	57
<u>Tableau 11</u> : Modulation par un exercice aigu des leucocytes et du CRP dans le sang après 4 semaines de réadaptation.....	63
<u>Tableau 12</u> : Les médianes des mesures de cytokines dans le sang.....	64
<u>Tableau 13</u> : Modulation par E2 du compte cellulaire dans le sputum.....	65
<u>Tableau 14</u> : Modulation des cytokines dans les expectorations par l'exercice.....	67
<u>Tableau 15</u> : Comparaison de modifications des concentrations de cytokines dans le sputum et le sérum.....	72

<u>Tableau 16</u> : Comparaison des valeurs p associées selon la modification des concentrations de cytokines dans le sputum et le sérum selon la corrélation de Spearman.....	72
<u>Tableau 17</u> : Résultats du questionnaire CQF-R.....	77

Liste des figures

Figure 1 : Augmentation de la survie médiane prédite des patients atteints de fibrose kystique.....	3
Figure 2 : 5 Classes de mutation du gène CFTR.....	5
Figure 3 : Inflammation pulmonaire chez FK.....	31
Figure 4 : Exemple du résultat du dosage par la méthode semi-quantitative.....	40
Figure 5 : La comparaison de compte de neutrophiles dans le sang pré- et post-E1.....	47
Figure 6 : Concentration moyenne des cytokines mesurées dans le sputum pré-E1.....	51
Figure 7 : Quantité d'IL-6 dans l'expectorat pré-post E1 par sujet.....	52
Figure 8 : Concentration de GM-CSF dans l'expectorat pré-post E1 par sujet.....	52
Figure 9 : Concentration de MMP-9 dans le sputum pré-post E1 par sujet.....	53
Figure 10 : Réduction de l'inflammation postréadaptation.....	58
Figure 11 : Modulation d'IL-1B pré E1-pré E2.....	58
Figure 12 : Modulation d'IL-6 préE1- préE2.....	59
Figure 13 : Modulation d'IL-8 pré E1- pré E2.....	59
Figure 14 : La modulation par la réadaptation de MMP-8, -9 et TIMP-1....	61
Figure 15 : Concentration de MCP-1 pré E1 – pré E2.....	62

<u>Figure 16</u> : Concentration d'IL-6 dans l'expectorat des patients pré-post E1 et pré-post E2.....	68
<u>Figure 17</u> : Concentration d'IL-8 dans l'expectorat des patients pré-post E1 et pré-post E2.....	69
<u>Figure 18</u> : Concentration de MMP-9 dans l'expectorat des patients pré-post E1 et pré-post E2.....	70
<u>Figure 19</u> : Concentration de TIMP-1 dans l'expectorat des patients pré-post E1 et pré-post E2.....	71
<u>Figure 20</u> : Corrélation entre la concentration d'IL-6 et VEMS préE1.....	74
<u>Figure 21</u> : Corrélation entre la concentration d'IL-6 et le rapport de Tiffeneau pré-E1.....	75
<u>Figure 22</u> : Corrélation entre la concentration d'IL-8 et le rapport de Tiffeneau pré-E1.....	75
<u>Figure 23</u> : Corrélation entre le pourcentage de neutrophiles dans l'expectorat et le rapport de Tiffeneau pré-E1.....	76

Liste des sigles et abréviations

AINS	Anti-inflammatoires non-stéroïdiens
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine 5'-Triphosphate
Baso	Basophiles
CFQ-R	<i>Cystic Fibrosis Questionnaire - Revised</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CRP	Protéine C-réactive
E1	Exercice aigu au Jour 1 de l'étude
E2	Exercice aigu à la fin de l'étude
Eosino	Eosinophiles
FK	Fibrose kystique
GB	Globules blancs
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
IL	Interleukine
IMC	Index de la masse corporelle
L	Litre
LPS	Lipopolysaccharide
LTB-4	Leucotriènes B-4
Lymph	Lymphocytes
MC_T	<i>Mucosal Mast Cells</i>
MC_{Tc}	<i>Connective Tissue Mast Cells</i>
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>

MMP	Métalloprotéinase matricielle
Mono	Monocytes
MPOC	Maladie pulmonaire obstructive chronique
NA	Valeur absente
Neutro	Neutrophiles
NF-kB	Facteur nucléaire-kappa B
Plt	Plaquettes
Th	Lymphocyte T <i>helper</i>
TIM	Test incrémental maximal
TIMP-1	Inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase matricielle 1
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
VEMS	Volume expiratoire maximal à une seconde
Ui	Unité arbitraire (de densité optique)

« C'est le rôle essentiel du professeur d'éveiller la joie de travailler et de connaître. »

Albert Einstein

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche Dr Céline Bergeron (M.D., F.R.C.P.C, M.Sc.) et mon codirecteur de recherche Dr Claude Poirier (M.D., F.R.C.P.C.) pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet très intéressant.

J'aimerais remercier les anciens et nouveaux membres du laboratoire de recherche de Dr Bergeron : Areej Al Rabea (M.Sc.), Stanislaw Ptaszynski (M.Sc.), Valerie Tardif (M.Sc.) et Karim Lahjouji.

J'aimerais tout particulièrement remercier Guylaine Lebeuf (R.T.) et Annie Landry (R.T., T.M.) qui toutes les deux m'ont beaucoup aidé et encouragé.

Je voudrais également remercier mes collègues : Dre Madeleine Durand (M.D., M.Sc., F.R.C.P.C.), Dr Christophe Kolan (M.D.), Dr Maxime Lamarre-Cliche (M.D., F.R.C.P.C.), Dr Paul Van Nguyen (M.D., F.R.C.P.C.) et Dr Robert Wistaff (M.D., F.R.C.P.C.) qui m'ont soutenu moralement et qui m'ont permis de suivre les cours à l'Université en me déchargeant du temps clinique.

Je voudrais remercier Xavier Marchand (M.D.) pour la qualité de ces dessins.

Je voudrais remercier de tout mon cœur ma famille qui m'a soutenu sans faille durant tout ce travail.

Préambule:

L'objectif du présent mémoire est d'étudier l'effet de l'exercice aigu et chronique sur les paramètres inflammatoires systémiques et pulmonaires chez les patients atteints de fibrose kystique (FK).

L'entraînement physique est une activité physique régulière qui permet d'améliorer la performance physique, la force physique et/ou la fonction cardio-pulmonaire.¹ Cette activité physique fait partie du mode sain de la vie de tous les jours et est hautement suggérée à tous les patients porteurs d'une maladie chronique, y compris des patients FK. L'effet bénéfique de l'entraînement physique chez les patients avec FK consiste en amélioration de la forme physique globale² et de la fonction cardio-pulmonaire.³⁻⁵ Il permet d'augmenter la force physique et la coordination, améliore la qualité de vie et augmente la clairance du mucus.⁶⁻⁸ L'exercice semble diminuer également le déclin de la fonction pulmonaire.⁹

Nous croyons que l'exercice physique régulier a une influence positive sur l'évolution de la FK en permettant la diminution de l'inflammation chronique systémique et des organes cibles, particulièrement du poumon.

Chapitre 1 : Fibrose Kystique et inflammation :

1. La Fibrose Kystique:

La Fibrose Kystique (FK) est une maladie génétique autosomique récessive avec une incidence approximative de 1:3500 naissances en Amérique du Nord et en Europe de l'Ouest.¹⁰ Selon les données de 2008, au Canada, 1 personne sur 25 est porteuse de cette mutation. Au Québec la prévalence est encore plus élevée, atteignant 1:20, avec une particularité géographique au Saguenay-Lac-Saint-Jean où 1:15 personne porte une mutation génétique.

La FK est une maladie chronique évolutive des enfants et des jeunes adultes qui touche surtout les systèmes respiratoire, digestif et immunitaire.¹¹ Ces atteintes ont des conséquences importantes sur le développement physique et psychologique des patients, leur capacité à l'effort, ainsi que leur qualité de vie. L'atteinte pulmonaire est au premier plan des symptômes et est la principale cause de la mortalité qui demeure encore élevée. L'inflammation et les surinfections jouent un rôle central dans l'évolution de la maladie pulmonaire de la FK menant à la longue à une défaillance respiratoire et, malgré l'amélioration constante des soins, à la mort vers l'âge médian de 48.6 ans actuellement en absence de transplantation pulmonaire (Figure 1). Malheureusement, ce traitement est toutefois limité vu les difficultés techniques et le manque de donneurs.

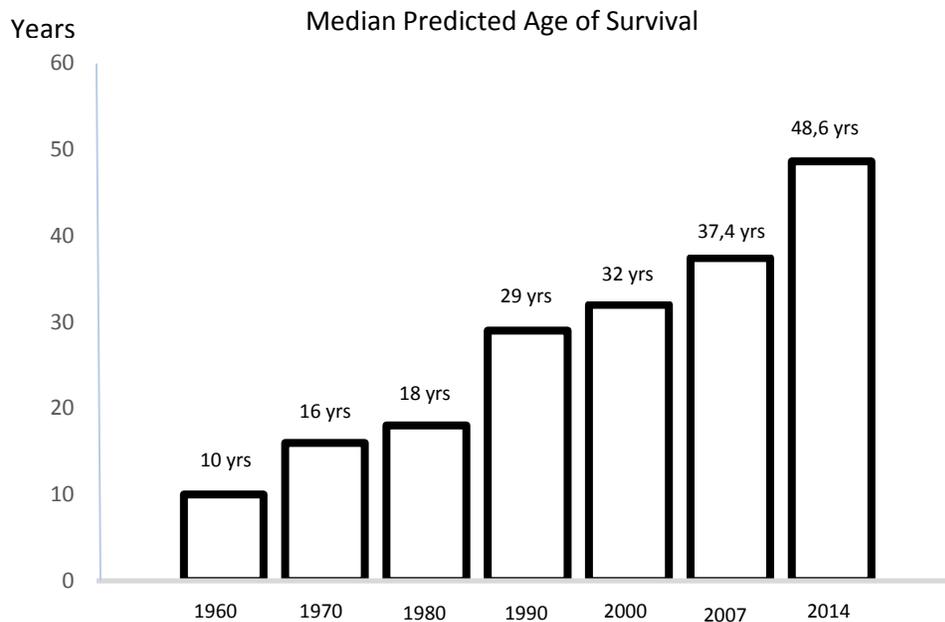


Figure 1 : Augmentation de la survie médiane prédite des patients atteints de fibrose kystique. Tiré et modifié du site web: *Cystic Fibrosis Foundation Web site* [<http://www.cff.org/AboutCF>]. *About Cystic Fibrosis. Bethesda (MD): Cystic Fibrosis Foundation.*

La FK est causée par les mutations du gène de CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (membre de la famille des protéines ABC (*adenine nucleotide-binding cassette*) qui code normalement pour une protéine transmembranaire qui agit en tant que canal chlore. Ces mutations causent un défaut de régulation du transport ionique du chlore. En combinaison à l'atteinte d'autres canaux, ces mutations mènent à un défaut de transport d'ions (Na⁺, K⁺, etc) et de l'eau à travers la membrane de la cellule épithéliale. Cela crée une absorption absolue du liquide périciliaire et une déshydratation de la surface épithéliale. Cette déshydratation mène probablement à une diminution de la fonction muco-ciliaire et par conséquent à une diminution de la clearance bactérienne.

Le gène CFTR contient 27 exons s'étendant sur 250 kb du chromosome 7, en 7q31, et code pour un ARNm de 6,5 kb. Habituellement la protéine normale de CFTR est transcrite de l'ARNm, puis est transportée dans le réticulum endoplasmique (pour d'autres transformations), puis est envoyée dans la membrane cellulaire où elle joue un rôle essentiel dans le transport des ions cités ci-dessus.

1.1 Mutations associées à la FK :

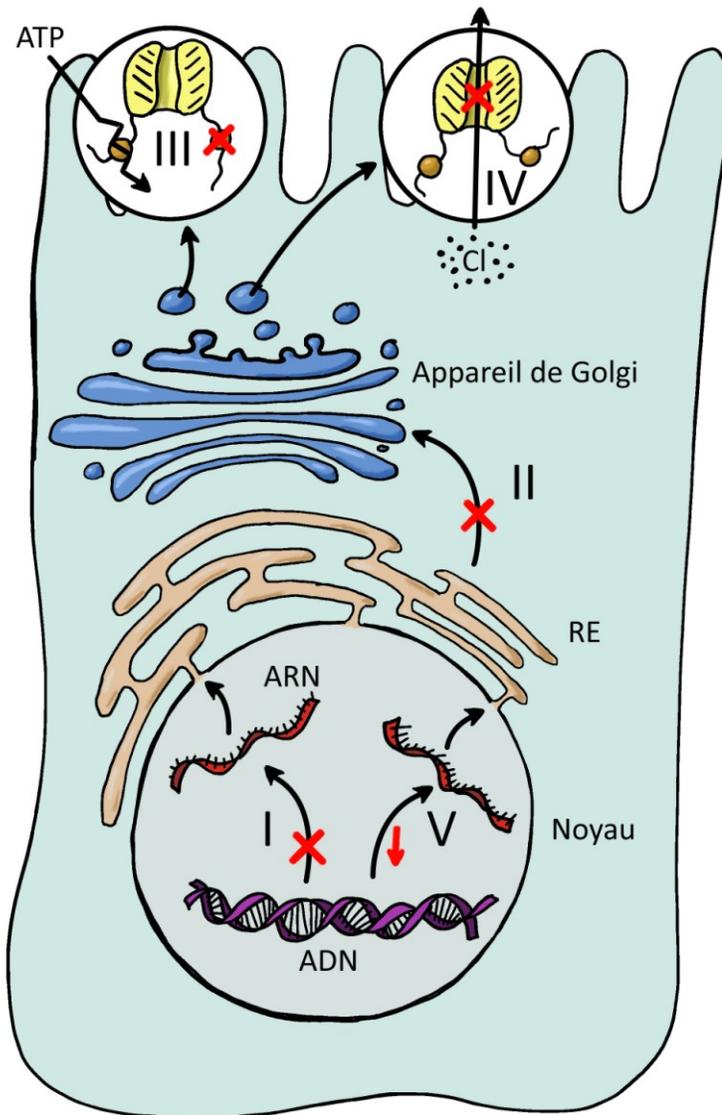


Figure 2 : 5 Classes de mutation du gène CFTR. Représentation schématique de cinq catégories des mutations du gène CFTR menant aux différents phénotypes de la maladie. (Dessin de Xavier Marchand)

A ce jour, nous connaissons plus de 1000 mutations du gène CFTR qui mènent aux différents phénotypes de la maladie. On divise ces mutations en cinq catégories selon leurs effets sur la fonctionnalité de la protéine CFTR.¹²

Classe I: mutations altérant la production de la protéine (mutations non-sens et codon stop prématuré) qui mènent à une absence totale ou partielle de la protéine; soit l'ARNm muté est instable et ne produit pas de protéine, soit la protéine anormale produite sera instable et rapidement détruite.

Classe II: mutations touchant le processus de maturation intracellulaire de la protéine, menant aux problèmes de pliage (« *folding* »); ainsi, la protéine est soit absente, soit présente en quantité réduite dans la membrane apicale; les mutations de cette classe représentent la majorité des allèles CF, dont la fréquente mutation $\Delta F508$);

Classe III: mutations perturbant la régulation du canal Cl^- ; ces mutations sont le plus souvent situées dans les domaines de liaison à l'ATP;

Classe IV: mutations altérant la conduction du canal Cl^- (atteinte du pore ionique par mutations dans les domaines transmembranaires); les mutations faux-sens situées dans ces régions produisent une protéine correctement positionnée qui présente une activité canal Cl^- -AMPc dépendante, mais les caractéristiques de ces canaux sont différentes avec une diminution du flux d'ions et une sélectivité modifiée;

Classe V: mutations altérant la stabilité de la protéine mature et diminuant donc la quantité de la protéine mature fonctionnelle.

Il existe une anomalie supplémentaire, l'épissage anormal de l'exon 9 (séquence différente de l'exon 8) qui ne fait pas partie des classes de mutations et qui peut mener à un ARNm de qualité anormale.

2. FK et atteinte pulmonaire :

Les diverses mutations, altérant l'expression du CFTR, diminuent au niveau pulmonaire l'hydratation du mucus, la clearance du mucus et réduisent la fonction muco-ciliaire. Ces changements accroissent la susceptibilité aux infections bactériennes récurrentes et à la colonisation bactérienne qui jouent un rôle central dans la détérioration de la fonction pulmonaire.¹³ A cause de cette atteinte bactérienne où prédomine le *Pseudomonas aeruginosa*, le *Staphylococcus aureus*, l'*Haemophilus influenzae* et le *Burkholderia cenocepacia*, l'augmentation de l'expression des cytokines et chemokines inflammatoires est observée dans le poumon des patients atteints de FK. Cette insulte bactérienne induit des cycles répétés de dommages épithéliaux et de réparations cellulaires qui, accompagnée d'une activation importante du système immunitaire, participent au développement de bronchiectasies par destruction de la structure bronchique. Ce phénomène physiopathologique est à la base de l'atteinte pulmonaire chronique chez les patients atteints de FK. Les mutations de CFTR en tant que telles peuvent également jouer un rôle dans l'inflammation persistante chez ces patients et participer au processus de destruction. En effet, le CFTR maintient l'expression homéostatique de plus de 843 gènes chez les humains¹⁴ et ces gènes sont impliqués dans l'activation du complément, de l'apoptose, de la chimiotaxie, de phagocytose, de sélection des lymphocytes T, et de l'activation des lymphocytes B. De par ces mécanismes, certaines mutations du CFTR peuvent augmenter l'insulte en tant que telle. Bien que complexe, les cellules épithéliales bronchiques et le processus inflammatoire

neutrophilique sont au centre du processus physiopathologique du développement de l'atteinte pulmonaire dans la FK.

3. Cellules épithéliales pulmonaires :

L'épithélium bronchique est la première ligne de défense du système respiratoire contre les infections et participe donc activement à la réponse inflammatoire. De plus, en raison du gène CFTR muté, l'épithélium pulmonaire des FK a des qualités pro-inflammatoires intrinsèques, avec un déséquilibre en faveur de la voie pro-inflammatoire.

En réponse à la stimulation par le *P. aeruginosa* ou d'autres bactéries, l'épithélium pulmonaire augmente, de façon supranormale, la production du NF- κ B qui, à son tour, stimule la production de l'IL-8, une chimiokine, qui est la principale molécule chémo-attractrice des neutrophiles dans la FK.^{15,16} Cet effet pro-inflammatoire supranormal du LPS sur les cellules épithéliales pulmonaires est probablement expliqué par l'effet d'amplification provenant de l'inflammation neutrophilique coexistante.¹⁷ IL-8 module la production d'IL-1, de TNF- α et d'autres médiateurs en recrutant les cellules immunes, comme les macrophages et neutrophiles. A leur tour, les macrophages augmentent la réponse inflammatoire en augmentant la production d'IL-8 par les cellules épithéliales. In vitro, le TNF- α augmente la réparation de l'épithélium bronchique, tout en ralentissant la croissance cellulaire,¹⁸ donc il pourrait avoir une action double : pro-inflammatoire et anti-inflammatoire.

D'autre part, l'épithélium bronchique FK présente plusieurs anomalies intrinsèques. L'une d'elles, est la production diminuée de glutathion¹⁹ et celle augmentée de COX2 et de prostaglandine E2.²⁰ Cela mène à une diminution de neutralisation des radicaux libres et, donc, à l'augmentation de l'inflammation locale. De plus, l'accumulation du $\Delta 508$ -CFTR mène à une dysfonction du réticulum endoplasmique et à l'augmentation des super-oxydes. Ce phénomène active à son tour les enzymes de transglutaminases tissulaires (« *enzyme tissue transglutaminase* », TG2), produisant des agrégats protéiniques. Ces agrégats séquestrent les protéines anti-inflammatoires de type PPAR-gamma (« *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* ») et de la protéine inhibitrice- κ B (I- κ B α) (la protéine inhibitrice de NF- κ B), ce qui mène à une augmentation de l'inflammation. Ces agrégats de TG2 sont normalement détruits par les autophagosomes, mais ce processus est déficient dans les cellules $\Delta 508$ -CFTR, ce qui augmente encore l'inflammation.^{21,22}

L'accumulation du CFTR anormal dans le réticulum endoplasmique provoque une anomalie de son fonctionnement (« *endoplasmic reticulum stress response* ») menant à l'activation de NF- κ B, puis à l'augmentation de la production d'IL-8 et ce, indépendamment de l'infection. Il faut mentionner que certains auteurs mettent en doute ces résultats en soulignant le fait que les patients pouvaient présenter des infections virales passées inaperçues. Parallèlement, l'expression de la I- κ B est diminuée, par une diminution relative d'IL-10 et de NO,²³ dû à une lésion spécifique au niveau de STAT-1.²⁴ En plus, selon certains auteurs les

cellules épithéliales des patients atteints de FK ont une capacité régénératrice diminuée et rencontrent des difficultés à reformer un épithélium normal suite à un traumatisme.²⁵

Toutes ces multiples anomalies des cellules épithéliales mènent à l'état inflammatoire et participent activement à l'inflammation du poumon FK en interaction avec les neutrophiles.

4. FK et inflammation :

Les insultes bactériennes et intrinsèques (reliés aux mutations) mènent à un état inflammatoire jouant un rôle central dans l'évolution de la maladie. Les différents éléments du système immunitaires sont incriminés. Cependant, le neutrophile pulmonaire activé,²⁶ en tant qu'élément principal de l'immunité innée et de défense antibactérienne de première ligne, joue un rôle physiopathologique prépondérant. Certains auteurs pensent que l'inflammation pulmonaire existe avant même la première infection et pourrait être due à la mutation CFTR en tant que telle.²⁷ En effet, cette inflammation neutrophilique est un facteur de risque indépendant de la progression de la maladie *per se*, elle est associée aux fonctions respiratoires diminuées^{28,29} et à la diminution de la masse maigre^{30,31} (donc à l'augmentation du catabolisme) chez des patients adultes FK.

4.1 FK, inflammation et exercice physique :

Plusieurs études ont essayé de démontrer l'effet bénéfique de l'exercice physique régulier chez des patients atteints de maladies chroniques : MPOC, diabète de type 2, insuffisance cardiaque ou maladie cardiaque athérosclérotique. Cet entraînement physique régulier diminue l'inflammation basale de l'organisme ou de l'organe cible en deçà de la valeur pré-test et en plus, protège contre la progression de certaines maladies chroniques.³² A noter que la masse graisseuse d'un individu a une forte association positive avec les marqueurs circulants inflammatoires³³ et que chez les FK, la masse adipeuse est diminuée, faisant penser que l'inflammation basale chez ces patients est due à la maladie *per se*.

Il existe également une relation inverse entre le pourcentage de VEMS prédit et les marqueurs d'inflammation mesurés dans les expectorations, comme l'élastase libre, l'IL-8 et le compte neutrophilique.³⁴ Le VEMS diminue progressivement chez les FK et ce déclin augmente avec chaque exacerbation.³⁵ Les études chez les enfants FK ont démontrées que le VEMS bas et le faible IMC sont associés à une consommation d'oxygène maximale basse (VO2 pic) et que cette VO2 pic basse peut prédire une mortalité précoce, tout comme la vitesse de diminution du VEMS ou de VO2 pic.

D'autre part, une étude effectuée chez le rat a démontré que l'entraînement physique régulier inhibe la réponse inflammatoire pulmonaire neutrophilique suite à l'injection de LPS.³⁶

4.2 Médiateurs inflammatoires :

Les médiateurs inflammatoires dans le poumon FK sont nombreux et proviennent de différentes sources. L'IL-8, le TNF-alpha, les MMP-8 et -9 et l'IL-1 sont les médiateurs principaux retrouvés dans la FK.

D'abord quelques mots sur TNF-alpha. In vitro, le TNF-alpha active et augmente (via la NADPH oxydase) la production de radicaux libres par les neutrophiles³⁷ et leurs dégranulation, augmente l'interaction entre les molécules d'adhésion et maintient les cellules au site de l'inflammation.³⁸⁻⁴⁰ L'augmentation du TNF alpha bioactif augmente la production de l'IL-8 par les neutrophiles eux-mêmes, la migration de neutrophiles, leurs activations et un mouvement plus anarchique de neutrophiles. Ces effets ont été associés à un pronostic plus sombre chez des malades avec des infections pulmonaires chroniques, telle que la FK.^{41,42}

L'IL-1 stimule surtout les lymphocytes T et B et est produit par le macrophage. Tout comme le TNF-alpha, l'IL-1 a une fonction autocrine sur le macrophage lui-même en stimulant la sécrétion d'IL-1, IL-6, IL-8, tout en augmentant l'activité antimicrobienne ou inflammatoire pure du macrophage. L'IL-1 (via l'augmentation

d'IL-17) recrute également les neutrophiles dans les voies bronchiques, tout en les activant également.⁴³

L'IL-17 augmente la production des cytokines inflammatoires comme IL-6, IL-8, TNF-alpha, CXCL9 et CXCL10 et est produit surtout par les cellules T_H17, mais les cellules T8, cellules NK et les neutrophiles eux-mêmes le produisent également.^{44,45} Le rôle d'IL-17 a été surtout décrit dans l'asthme allergique. L'épithélium pulmonaire et les cellules musculaires lisses pulmonaires produisent l'IL-8 qui est la principale molécule chémo-attractrice des neutrophiles dans le poumon de FK. Elle module la production d'IL-1, de TNF- α et autres médiateurs en recrutant les cellules immunes, comme les macrophages et neutrophiles. A leur tour les macrophages augmentent la réponse inflammatoire en augmentant la production d'IL-8 par les cellules épithéliales.⁴⁶ La fonction anti-inflammatoire d'antibiotiques type macrolides passe par l'inhibition de la stimulation par IL-17 de la production d'IL-8.⁴⁷

GM-CSF est une cytokine de 23 kDa produite par différents types cellulaires, entre autres par l'épithélium pulmonaire. Le GM-CSF induit le recrutement et la survie des neutrophiles (et probablement d'autres cellules), ainsi que la différenciation terminale des macrophages alvéolaires.⁴⁸ Le GM-CSF joue un rôle important dans le système immunitaire via la régulation de la maturation et de l'activation des cellules myéloïdes, ainsi que la reconnaissance, la phagocytose et le nettoyage des pathogènes microbiens. Les macrophages alvéolaires des

souris déficientes en GM-CSF possèdent de multiples défauts tels que : défaut d'adhésion, d'expression de récepteurs de surface, de phagocytose, de production de ROS, etc.⁴⁹ Chez la souris déficiente en GM-CSF, la production de TNF-alpha et du MIP1 est diminuée, tout comme le recrutement des neutrophiles alvéolaires.⁵⁰ D'autre part, le GM-CSF participe à l'homéostasie du surfactant pulmonaire via la régulation de son catabolisme par les macrophages alvéolaires, d'où son rôle dans la protéinose alvéolaire pulmonaire.⁵¹

Le MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) (ou CCL2) est produit par les cellules épithéliales pulmonaire de type II, les cellules endothéliales et les macrophages. Le MCP-1 participe activement au recrutement des cellules inflammatoires et peut être dosé dans le sérum des volontaires sains.⁵² Sa concentration sérique augmente de façon significative dans les cas de fibrose pulmonaire,⁵³ mais également dans l'insuffisance cardiaque et avec l'âge.⁵⁴

L'IL-6 est sécrétée par de nombreuses cellules de l'organisme : les cellules musculaires striées périphériques, les cellules musculaires respiratoires (suite à leur stimulation par l'effort physique),⁵⁵ les cellules inflammatoires de type mastocytes et par l'épithélium pulmonaire FK. Au repos, la sécrétion d'IL-6 par le muscle est minimale et elle augmente, durant l'exercice, proportionnellement à la durée et à l'intensité de l'effort, à la masse musculaire utilisée durant l'exercice donné et à la forme physique (et inversement).⁵⁶⁻⁵⁸ Le niveau d'IL-6, de TNF-alpha et de leurs récepteurs solubles (TNF-alpha SR I et II) augmentent dans le

sérum après un exercice de 5 minutes à 3.1 METS par rapport aux valeurs d'avant l'exercice chez les adultes FK.⁵⁹ Cette augmentation d'IL-6 et de TNF-alpha se retrouve également chez les enfants FK.⁶⁰ Il semble que la durée de l'exercice et pas seulement son intensité joue un rôle dans l'augmentation des paramètres inflammatoires.⁶¹ Chez le rat, l'exercice physique régulier ne modifie pas le niveau basal d'IL-6 dans le sérum, ni l'expression d'ARNm d'IL-6 dans le muscle. En ce qui concerne le TNF-alpha, on observe une diminution du taux sérique après 12 semaines d'entraînement chez les jeunes rats, mais pas chez les rats plus âgés.⁶²

Même chez les grands sportifs, l'exercice à puissance constante augmente de façon significative le niveau sérique de l'IL-6. Le pic de l'IL-6 peut être encore augmenté ou au contraire diminué par un deuxième exercice similaire, selon la durée de repos entre ces deux séances d'exercice⁶³.

Le rôle d'IL-6 dans l'organisme semble complexe, selon les situations cliniques, il peut être pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. Par exemple, la sécrétion intrapulmonaire participe probablement activement à l'inflammation, comme le montrent les expériences de perfusion d'IL-6 chez le rat⁶⁴ ou dans le cas d'un sepsis où l'augmentation d'IL-6 et d'autres cytokines est précédée par l'augmentation de TNF-alpha. Par contre, IL-6 systémique facilite le métabolisme de glucose durant l'exercice physique⁶⁵ et diminue l'expression de TNF-alpha et de IL-1bêta,⁶⁶ tout en augmentant la production des cytokines anti-inflammatoires, telles que IL-1RA et IL-10.^{67,68} L'action d'IL-6 nécessite une

liaison à son récepteur soluble, sIL-6R, qui joue le rôle du cofacteur.⁶⁹ Donc, cette production d'IL-6 par le muscle squelettique dans les conditions d'exercice physique semble avoir un effet protecteur et anti-inflammatoire sur l'organisme, au contraire des conditions pathologiques de type arthrite rhumatoïde⁷⁰.

Nous allons maintenant passer en revue les différents types cellulaires responsables de cette inflammation systémique et pulmonaire chez les patients FK.

5. Neutrophiles :

Les neutrophiles font partie des leucocytes (granulocytes), tout comme les éosinophiles et les basophiles. Les macrophages et les leucocytes ont une cellule progénitrice commune dans la moelle osseuse. Afin de devenir un leucocyte, la cellule progénitrice subit de multiples transformations avec une expression sélective de certains facteurs de transcription, de protéines granulocytaires et des récepteurs des chemokines et des cytokines⁷¹. La demi-vie des neutrophiles circulant varie entre 6 et 8 heures, par contre ils peuvent survivre nettement plus longtemps dans les tissus. Le passage des neutrophiles dans les tissus pulmonaires, suite à l'interaction des neutrophiles et des cellules endothéliales, est fait en suivant un gradient chimiotactique, surtout constitué par le LTB-4 et IL-8 produit par les cellules épithéliales. D'autres molécules participent également à ce mécanisme, telles que C5a, CXCL1, CXCL5 et le complexe élastase-alpha-1-antitrypsine. Suite à la réception de ce signal, le

neutrophile active une série de signaux intracellulaires, réarrange son cytosquelette et modifie les récepteurs membranaires. Ces étapes permettent au neutrophile activé de traverser les vaisseaux au niveau des capillaires pulmonaires (par la voie para-cellulaire et trans-cellulaire) et de se retrouver à l'intérieur des voies respiratoires.

Ce neutrophile activé sécrète une grande variété de cytokines et de chemokines pro-inflammatoires qui vont, d'une part, avoir une action défensive contre les pathogènes et, d'autre part, permettre d'interagir avec d'autres cellules de voisinage. Le neutrophile interagit avec les cellules de son environnement immédiat (cellules épithéliales pulmonaires, cellules endothéliales, macrophages, etc.), provoque l'influx d'autres cellules inflammatoires et sécrète les médiateurs inflammatoires, ainsi que les molécules protéolytiques, dont l'objectif est la destruction des bactéries colonisatrices⁷² mais causant des dommages collatéraux aux tissus pulmonaires des FK.

Dernièrement, il a été prouvé que les neutrophiles circulants plasmatiques activés (durant l'épisode aigu d'exacerbation pulmonaire FK) produisent des quantités supranormales de radicaux libres et d'IL-8, tout en ayant une réponse pro-apoptotique augmentée.⁷³ Ce phénomène augmente leur effet nocif au niveau du parenchyme pulmonaire. Par contre, le degré de l'inflammation systémique, exprimé par la concentration sérique de CRP, d'IL-6, -8 et de TNF-alpha, n'est pas un facteur de risque pour une exacerbation future chez des

patients adultes FK.⁷⁴ Ceci semble montrer que l'inflammation chez les FK n'est pas systémique, mais plutôt prédominante au niveau pulmonaire.

Les neutrophiles jouent un rôle actif dans la défense immunitaire contre les bactéries, en les détruisant par la voie extracellulaire et intracellulaire. Par contre ils perpétuent la réponse inflammatoire, en détruisant (par le relâchement des MMP) la membrane basale et les cellules épithéliales (menant au remodelage tissulaire). Le relâchement d'ADN par les neutrophiles nécrotiques augmente encore un peu plus la viscosité du mucus.⁷⁵ Cet ADN extracellulaire augmente également le stress oxydatif.

Les neutrophiles CFTR^{-/-} ont possiblement une capacité inflammatoire supérieure aux neutrophiles normaux selon un modèle animal, où ils ont provoqué des lésions pulmonaires nettement plus importantes.⁷⁶ D'autre part, les neutrophiles FK démontrent une augmentation de l'expression des récepteurs TLR-4 et une diminution des TLR-2.⁷⁷ Cela mène possiblement à une diminution de la capacité du système immunitaire à éliminer de façon efficace les pathogènes du système respiratoire.

Plusieurs études démontrent que l'apoptose neutrophilique est défailante dans le poumon FK, mais nous ne savons pas encore avec précision si c'est un défaut constitutionnel dû à la mutation CFTR (avec diminution de la coronine-1, du TNF-R1, du Fas et du FasL) ou s'il s'agit d'un défaut commun à plusieurs maladies

inflammatoires (de mécanisme encore indéterminé) ou encore d'un défaut causé par l'infection bactérienne, surtout par *P.aeruginosa*, ou enfin, d'un mélange de ces différents mécanismes.⁷⁸

Tout le paradoxe du poumon FK consiste dans le fait qu'une flore bactérienne pathogène survit et se multiplie malgré une présence nettement supranormale des neutrophiles. Cela indiquerait soit un problème primaire au niveau de leur fonctionnement, soit secondaire au microenvironnement pulmonaire ou complètement indépendant des neutrophiles, soit une combinaison de tous ces problèmes.³⁷

5.1. Neutrophiles et stress oxydatif

Il est également reconnu depuis longtemps que la production des radicaux libres (O_2^- , H_2O_2 , OH) par les neutrophiles, ainsi que par les cellules alvéolaires de type II et par les cellules ciliées bronchiques participe à la défense active contre les infections bactériennes. Mais la concentration anormale de ces radicaux libres dans le poumon FK participe à l'inflammation excessive et à la production du mucus, tout comme l'atteinte directe de la fonction du canal CFTR.⁷⁹ Par contre, le rôle exact de l'atteinte de la qualité du surfactant pulmonaire par ce stress oxydatif n'est pas clair. Il pourrait participer à la progression de la maladie pulmonaire chez les FK et à la diminution de la fonction pulmonaire. En même temps, la concentration des molécules anti-oxydantes (comme le glutathion) est diminuée dans le poumon FK⁸⁰ ce qui entraîne plusieurs effets néfastes

(augmentation de l'inflammation, augmentation de la toxicité de pyocyanine et même diminution des défenses contre le *Burkholderia cenocepacia*).⁷⁹ Une étude récemment publiée montre que ce sont les neutrophiles pulmonaires qui transportent et relâchent l'enzyme gamma-glutamyl-transférase, augmentant sa concentration dans les sécrétions des voies respiratoires des patients FK, et diminuant par la même occasion le glutathion et ces dérivés, dont ils sont le substrat.⁸¹

Chez les patients MPOC, une étude a montré que le stress oxydatif est plus grand chez les patients dont un rapport masse maigre/masse grasse est diminué (masse grasse augmentée et masse maigre diminuée), ce qui pourrait également être le cas chez certains patients FK.⁸²

En résumé, le stress oxydatif dans le poumon FK est augmenté et participe activement à la destruction pulmonaire.

5.2. Neutrophiles et protéases

L'activation des neutrophiles mène à leur dégranulation et au relâchement des protéases neutrophiliques. Il existe deux types des protéases : serine protéases et metalloprotéases de la matrice (MMP). Trois de ces serine protéases sont bien connues : l'élastase neutrophilique, la cathepsine G et la protéinase 3 qui sont stockées dans des granules azurophiliques des neutrophiles et sont relâchées habituellement dans les phagosomes. Dans le poumon FK, ces

sérines protéases sont également stockées par les neutrophiles (activés par IL-8 via CXCR-2) dans les structures extracellulaires « *neutrophil extracellular traps* » (NETs); et peuvent être mobilisées rapidement depuis ces réservoirs⁸³ afin d'immobiliser et de tuer les bactéries et les organismes fongiques. Leur concentration est augmentée dans les sécrétions pulmonaires des FK.⁸⁴ Dans des conditions pathologiques (FK, asthme, MPOC), ces protéases sont responsables du dommage aux cellules épithéliales et de l'atteinte de la fonction muco-ciliaire à cause de la diminution de la fréquence des battements des cils.

5.2.1 Élastase neutrophilique

L'élastase neutrophilique est une molécule de 29 kD avec une charge positive qui clive des dipeptides neutres non-aromatiques dans l'espace extracellulaire. Elle augmente l'expression d'IL-8 par les cellules épithéliales et de ce fait, l'inflammation neutrophilique, via TLR2 (via un fragment actif de CXCR1)⁸⁵ et TLR4.⁸⁶ L'IL-8 à son tour augmente le relâchement de l'élastase neutrophilique par les neutrophiles et donc perpétue le cercle de l'inflammation tout comme le TNF-alpha.⁸⁷ D'autre part, l'élastase neutrophilique augmente de façon cliniquement significative la MMP-9 dans les bronches des patients FK, en activant le pré-MMP-9, tout en bloquant son inhibiteur, le TIMP-1 (« *tissue inhibitor of metalloprotease-1* »).⁸⁸ Elle participe également par son action à la destruction du parenchyme pulmonaire et à la fibrose sous-épithéliale. En même temps, la quantité excessive de l'élastase neutrophilique bronchique interfère avec la destruction des pathogènes, en diminuant, la reconnaissance du

P.aeruginosa par le système immunitaire.^{89,90} De plus, l'élastase neutrophilique dégrade des protéines antibactériennes dans le mucus, clive les récepteurs de surface de cellules T et bloque la maturation des cellules dendritiques, etc. Par ces actions elle perturbe la bonne marche du système immunitaire inné et adaptatif.⁹¹

La diminution de l'élastine dans le tissu pulmonaire chez des patients FK est positivement corrélée avec l'augmentation de l'élastase neutrophilique dans les expectorations, ainsi qu'avec des niveaux élevés de desmosine et d'isodesmosine urinaires (produits de dégradation de l'élastine).⁹² Ceci est dû à l'augmentation de l'activité protéolytique dans le poumon.

De façon intéressante, la concentration de l'élastase neutrophilique (tout comme des radicaux libres) dans les expectorations des patients FK n'est pas significativement diminuée après un traitement antibiotique par la voie intraveineuse d'une exacerbation bronchique et sa concentration avant et après demeure supérieure par rapport au poumon normal.⁹³ Ce fait pourrait suggérer une dysfonction constitutive des neutrophiles FK et pourrait être relié directement à la mutation CFTR et aux effets néfastes au long cours.

5.2.2. MMP

Il existe de multiples formes de metalloprotéases de la matrice (MMP-1 à -25). Ces enzymes font partie d'une sous-famille de metallo-endopeptidases, connues

sous le nom de metzincines, toutes contenant du zinc au niveau de leur site catalytique.⁹⁴ Ces MMP participent aux mécanismes normaux d'homéostasie en dégradant les composantes du tissu conjonctif, en relâchant certaines cytokines, hormones de croissance et de chimiokines et en modulant la mobilité et la migration cellulaire.⁹⁵ Leurs concentrations s'élèvent durant l'inflammation, l'infection et le processus de remodelage-réparation tissulaire.^{96,97}

La transcription des MMP est induite par l'IL-1 et le TNF-alpha. Les MMP sont produites en tant que zymogène (forme inactive), puis elles sont activées de trois façons différentes : par la voie de protéinases, par l'activation oxydative ou par l'activation de la matrice.⁹⁸ Nous allons discuter plus spécifiquement de quelques-unes de ces MMP plus loin.

Il existe deux groupes d'inhibiteurs de MMP : le groupe peu spécifique, tel qu'alpha2-macroglobuline, et le groupe spécifique, inhibiteurs tissulaires de metalloprotéases : TIMP (« *tissue inhibitors of metalloproteases* »).⁹⁶

5.2.2.1. MMP-2

La MMP-2 (ou gélatinase A) est une protéase avec une activité gelatinolytique, exprimée dans les cellules épithéliales et macrophages. Elle participe à l'angiogenèse, au remodelage tissulaire et à l'augmentation de la réponse inflammatoire.^{99,100} Selon une étude, l'élastase neutrophilique augmente l'expression de MMP-2 par les macrophages *in vitro* et dans un modèle animal de l'inflammation, via le facteur nucléaire-kappaB (NF-kB).¹⁰¹ *In vivo*, la

concentration de MMP-2 semble diminuer dans le sérum des patients FK durant un épisode d'exacerbation.¹⁰² Son rôle dans la pathogenèse de la FK n'est pas encore bien compris.

5.2.2.2. MMP-7

La MMP-7 (ou matrilysine) est capable de cliver de nombreuses composantes de la matrice extracellulaire. En plus, elle participe à la réépithélialisation des voies respiratoires, à l'inflammation et à la croissance cellulaire. Son rôle a été largement étudié dans la fibrose pulmonaire idiopathique. Son expression est augmentée par l'épithélium pulmonaire (pneumocyte de type II et cellules épithéliales des voies respiratoires supérieures). La MMP-7 est relâchée au niveau apical par ces cellules chez les patients FK et quelquefois aussi au niveau basal. La MMP-7 participe probablement tant aux dommages qu'à la réparation des poumons FK. En effet son inhibition dans le modèle animal et *ex vivo* ne permet pas la réépithélialisation des voies respiratoires.¹⁰³

5.2.2.3. MMP-8

La MMP-8 (ou la collagénase neutrophilique), comme son nom l'indique, est fortement exprimée dans les neutrophiles et permet, entre autres, de cliver le collagène de type I, II et III. Son expression est augmentée dans plusieurs maladies pulmonaires, comme le MPOC et la fibrose pulmonaire idiopathique. L'expression et l'activité de la MMP-8 sont également augmentées dans le liquide du lavage broncho-alvéolaire des patients avec FK et sont corrélées avec

le nombre de neutrophiles présents.¹⁰⁴ Par contre, cette élévation durant un épisode d'exacerbation pulmonaire de FK est faiblement associée avec la fonction pulmonaire (VEMS prédit).¹⁰² Les travaux évaluant l'impact exact de la MMP-8 sur la maladie FK sont encore en cours, mais on présume que la MMP-8 participe activement à l'atteinte pulmonaire chronique des patients FK.

5.2.2.4. MMP-9

La MMP-9 (ou gélatinase B) est exprimée surtout par les neutrophiles, mais aussi par les cellules épithéliales et macrophages. Elle semble avoir des effets pro-inflammatoires et est augmentée dans les expectorations et le sérum des patients FK. Dans une étude chez des patients pédiatriques sa concentration était corrélée à la fonction pulmonaire (VEMS prédit), mais pas dans la seconde étude.^{102,105} L'augmentation de la MMP-9 chez les FK participe également au phénomène de fibrose pulmonaire.¹⁰⁶

5.2.2.5. MMP-12

La MMP-12 (ou élastase macrophagique) est une protéase produite par les macrophages afin de dégrader l'élastine via son domaine catalytique, d'où son rôle dans la pathogenèse de l'emphysème.¹⁰⁷ L'élastine est remplacée dans le poumon FK par le collagène de type I ce qui mène également à la fibrose pulmonaire. De plus, cette élastase a également un domaine terminal *carboxy* qui lui permet d'avoir une activité antimicrobienne directe.¹⁰⁸ *In vitro*, les macrophages d'origine non-pulmonaire relâchent cette protéase en réponse à la

stimulation par TNF-alpha et IL-1bêta.¹⁰⁹ Dans le modèle animal du poumon FK, en réponse à la déshydratation du mucus et sa stase, l'activation des macrophages est observée ce qui mène au relâchement de la MMP-12 et aux lésions pulmonaires de type emphysémateux.¹¹⁰

5.2.3. Inhibiteurs de MMP:

Il existe deux groupes d'inhibiteurs de MMPs. Le premier peu spécifique, tel qu'alpha2-macroglobuline, et les deuxièmes, spécifiques, comprennent des inhibiteurs tissulaires de metalloprotéases: TIMP (« *tissue inhibitors of metalloproteases* »).⁹⁶ La dysfonction de ces inhibiteurs ou leur diminution dans le poumon FK joue un rôle dans la genèse des atteintes pulmonaires chez FK. Dans une des études, l'augmentation du ratio MMP-9/TIMP-1 dans les expectorations de FK était d'une part corrélée à l'augmentation de l'activité de l'élastase neutrophilique pulmonaire et, d'autre part, à l'augmentation de l'état inflammatoire durant les exacerbations.¹¹¹ D'autres auteurs démontrent que durant l'exacerbation pulmonaire aiguë chez les FK, le TIMP-1 augmente de façon significative, tout comme les MMP-8 et -9, mais le rapport reste en défaveur des inhibiteurs.¹⁰²

En résumé, les MMPs et les élastases participent activement à l'inflammation et à la destruction du parenchyme pulmonaire chez les FK, menant à la modification de l'architecture du parenchyme pulmonaire et aux bronchiectasies. On pense que le déséquilibre entre la quantité de ces protéases et leurs

inhibiteurs naturels chez les FK aggrave encore ce phénomène. Des études ont montré l'augmentation des MMP-1, -8, -9 dans le sérum des patients durant un épisode d'exacerbation aiguë pulmonaire dû à l'infection par *P.aeruginosa*,¹⁰² tout comme l'augmentation du GM-CSF,¹¹² sont corrélées avec le degré de l'inflammation pulmonaire et également avec les fonctions pulmonaires (VEMS). L'inflammation induite par l'infection aiguë, mesurée par ces paramètres, est très proche de l'inflammation induite par l'exercice aigu selon les auteurs.

D'autres études ont dosé dans les expectorations le niveau de cathepsines B et S,¹¹³ d'élastase relâchées par les neutrophiles bronchiques,¹¹⁴ IL-8¹¹⁵ et de myeloperoxydase.¹¹⁶

6. Mastocytes :

Il existe deux types de mastocytes, classés selon les enzymes contenus dans leurs granules: le type « tissu conjonctif », contenant la tryptase et la chymase (*connective tissue mast cells* (MC_{TC})), et de type « intra-muqueuse », contenant seulement la tryptase (*mucosal mast cells* (MC_T)).¹¹⁷

Dans les bronchioles du poumon FK, la quantité totale de mastocytes est diminuée à cause de la réduction de la sous-population MC_T. Par contre, dans les zones inflammatoires le nombre de cellules MC_{TC} est augmenté et ces cellules secrètent une quantité augmentée d'IL-6 et de TGF-beta. Ces molécules pro-inflammatoires augmentent la production des neutrophiles par la moelle

osseuse et, en même temps, diminuent l'activité régulatrice des lymphocytes T, tout en participant probablement à la déposition du collagène et, donc, à la fibrose pulmonaire.¹¹⁸ La même étude montre que le nombre total de MC_{TC} et la quantité de TGF-beta produits corréleront négativement avec les fonctions pulmonaires.¹¹⁸

7. Macrophages et monocytes:

Certains auteurs ont cherché à savoir si les macrophages des patients FK sont déficients dans leurs fonctions, étant donné la colonisation bactérienne au niveau pulmonaire et l'augmentation du pourcentage des bactéries vivantes à l'intérieur des macrophages issus des monocytes circulants des patients FK comparés aux patients sains, et ce malgré la phagocytose efficace.¹¹⁹ Cet effet est peut-être dû à l'accumulation du calcium intracellulaire jusqu'à un niveau suffisant pour modifier l'expression génique du macrophage,¹²⁰ due à la mutation CFTR.

D'autre part, la sécrétion basale d'IL-8 par les monocytes est augmentée chez les patients FK. Par contre ces monocytes produisent 100 fois moins d'IL-8 suite à la stimulation par LPS par rapport aux sujets sains.¹²¹

Les macrophages secrètent une cytokine pro-inflammatoire majeure, *macrophage migration inhibitory factor* (MIF),¹²² qui induit entre autres la sécrétion de TNF-alpha et augmente l'expression de TLR-4.¹²³ Il a été également démontré dans un modèle animal d'infection à *P.aeruginosa* que la diminution

d'expression du MIF diminue le recrutement neutrophilique et le niveau de TNF-alpha.¹²⁴ D'autre part, le MIF présente un certain polymorphisme chez les humains au niveau de son site promoteur, définissant les producteurs plus ou moins importants du MIF. Chez certains patients FK une diminution relative constitutive de la production du MIF (dû à ce polymorphisme) ralentit le déclin de VEMS, tout en diminuant l'expression et la production relative du TNF-alpha, ce qui mène à un certain effet protecteur du parenchyme pulmonaire.¹²⁵

8. Lymphocytes :

En ce qui concerne les lymphocytes de la sous-muqueuse bronchique, nous pouvons observer chez les patients FK une réponse prédominante Th2, ce qui pourrait expliquer d'une part la fréquence élevée d'ABPA due à une exposition à l'*A.fumigatus* et, d'autre part, une diminution de la capacité d'élimination des *P. aeruginosa* et possiblement une susceptibilité aux autres agents bactériens.¹²⁰ Ceci est de nouveau probablement dû à l'influx du calcium intracellulaire en lien à la mutation CFTR et à la modification de l'expression génique.¹²⁶

Le sous-type Th17, par leur sécrétion d'IL-17A stimule l'induction d'autres médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF-alpha, l'IL-6, les MMPs, le GM-CSF, etc.¹²⁷ Le développement de Th17 est régulé par l'IL-23.¹²⁸ Le rôle principal de ces lymphocytes dans le poumon est la lutte contre les bactéries extracellulaires et les champignons. D'ailleurs, lors des épisodes d'exacerbation de FK, le niveau d'IL-17 et d'IL-23 augmente dans les expectorations des

patients, puis diminue suite au traitement efficace par les antibiotiques.¹²⁹ Il faut noter que le niveau basal d'IL-17 et -23 est nettement supérieur chez les patients FK, même en dehors de l'épisode de décompensation aigue, par rapport aux sujets sains.¹³⁰ De ce fait, les Th17 jouent probablement un rôle dans la destruction chronique du poumon FK.¹²⁸

9. Cellules dendritiques:

La cellule dendritique est une cellule présentatrice d'antigène qui est distribuée tout le long de l'arbre trachéo-bronchique et du parenchyme pulmonaire. Les cellules dendritiques chez le FK présentent un défaut de structure membranaire et un défaut de métabolisme lipidique, pouvant être impliqués dans la réponse inflammatoire anormale chez ces patients.¹³¹ D'autre part, l'élastase neutrophilique, dont la concentration intrapulmonaire est augmentée chez les FK, inhibe la maturation des cellules dendritiques pulmonaires et diminue la capacité des cellules dendritiques matures à présenter l'antigène aux lymphocytes T.¹³² Cela mène à une réponse anti-infectieuse moins efficace dans le poumon FK.

10. Résumé :

Afin de résumer ces interactions complexes, nous avons schématisé tout ceci en une figure (figure 3) afin de présenter les cytokines et les cellules que nous pensons être impliquées dans l'inflammation pulmonaire FK et leurs interdépendances. Au centre de cette inflammation se trouvent les neutrophiles activés bronchiques et les cellules épithéliales.

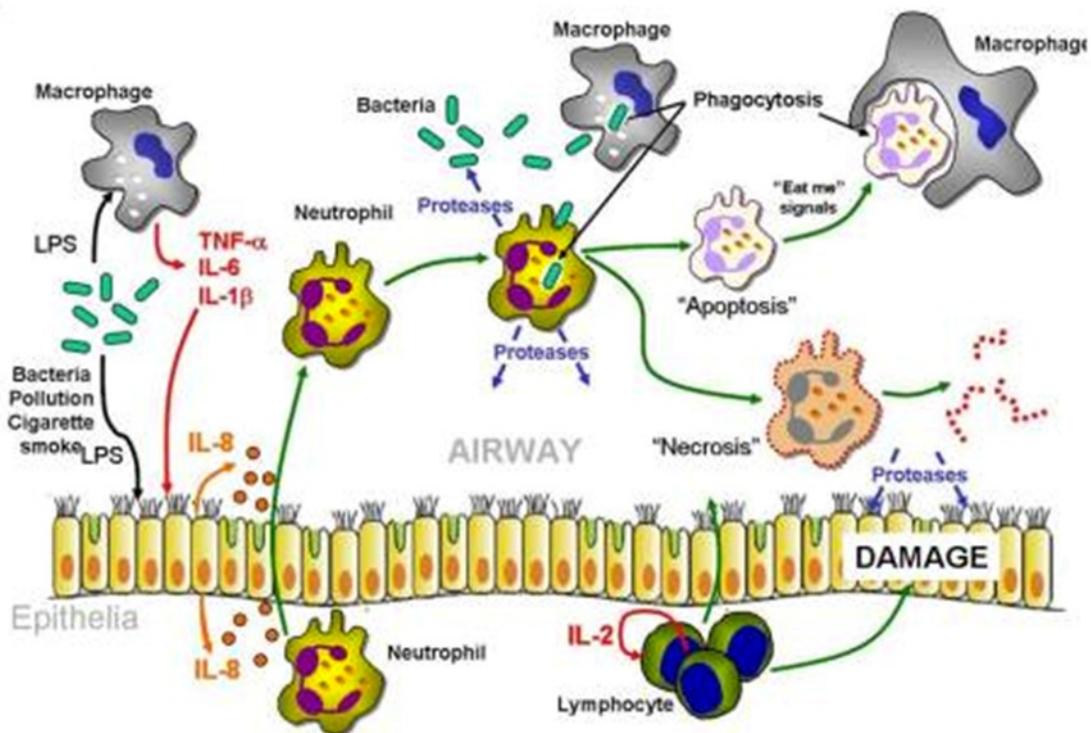


Figure 3: Inflammation pulmonaire chez FK. Interaction entre différents types de cellules présentes dans les voies bronchiques. (Dessin de Xavier Marchand)

Chapitre 2 :

1. Rationnel :

L'exercice physique chez le patient FK a des bénéfices cliniques dont le ralentissement du déclin de la fonction pulmonaire.¹³³ Cet effet positif pourrait être en lien avec des changements de la concentration des cytokines inflammatoires dans les expectorations ou dans le sérum après l'exercice physique. Plusieurs auteurs ont validé cette technique et ont démontré sa reproductibilité.^{134,135}

2. Hypothèse et objectifs :

Notre hypothèse est que l'initiation d'un programme d'exercice régulier améliore l'état inflammatoire basal pulmonaire et systémique chez les FK peu actifs physiquement.

L'objectif global de notre étude est la compréhension de la réponse inflammatoire systémique et des voies bronchiques à l'exercice physique chez les patients FK.

Les objectifs spécifiques de notre étude sont :

- le dosage des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans le sérum et le sputum de nos patients avant et après un exercice aigu;

- le dosage des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans le sérum et le sputum de nos patients après 4 semaines de réadaptation;
- nous allons évaluer les fonctions pulmonaires de nos patients, ainsi que leur tolérance à l'effort et leurs qualité de vie avant et après la réadaptation et allons les comparer avec les marqueurs inflammatoires.

Chapitre 3 : Méthodes

1. Design de l'étude et population

Étude pilote prospective non contrôlée non randomisée de faisabilité chez les patients FK. L'étude a été menée chez les sujets atteints de FK suivi à la clinique ambulatoire spécialisée du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), à l'Hôpital Hôtel-Dieu. Tous les sujets ont signé le consentement éclairé, approuvé par le Comité d'éthique de notre institution (CRCHUM). 13 sujets ont été inclus, dont 10 ont complété l'étude. Les critères d'inclusion étaient le diagnostic de FK posé antérieurement; être âgés de plus de 18 ans; avoir une atteinte obstructive légère à modérée (selon les lignes directrices de *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) : VEMS \geq 50% des valeurs prédites, le rapport de Tiffeneau $>70\%$; nous n'avons pas utilisé le LIN du ratio VEMS/CVF, tel que suggéré par ATS/ERS 2005, vu l'âge moyen de nos sujets); avoir déjà passé durant l'année en cours un test incrémental maximal sur l'ergocycle sans complications; être capable de produire une quantité d'expectoration suffisante à la demande.

Les critères d'exclusion étaient une maladie obstructive sévère (VEMS $< 50\%$); une exacerbation des symptômes pulmonaires; hospitalisation; utilisation des antibiotiques pour une exacerbation aiguë durant le mois précédent; utilisation chronique de la corticothérapie par voie orale ou des AINS ou des anti-leucotriènes (Montelukast ou Zafirlukast). Les sujets étaient aussi exclus s'ils

avaient une contre-indication à l'exercice de toute nature ou une limitation sévère les empêchant de faire de l'exercice; faisait déjà de l'exercice de deux heures ou plus par semaine; ou s'ils avaient déjà participé à un programme de réadaptation durant l'année.

Si pendant le cours de l'étude, un sujet présentait une exacerbation aiguë, il était temporairement exclu de l'étude jusqu'un mois après le traitement antibiotique, puis recommencerait l'entraînement de zéro.

Avant et après la réadaptation, les tests de fonction pulmonaire de type spirométrie (VEMS et Tiffeneau) ont été effectués et les sujets ont répondu au Questionnaire Révisé de la Fibrose Kystique (« *Cystic Fibrosis Questionnaire – Revised* » CFQ-R).¹³⁶

2. Protocole de l'exercice physique :

Comme cela a déjà été mentionné plus haut, tous les sujets ont passé durant l'année un test incrémental maximal (TIM) sur l'ergocycle dans le cadre du suivi annuel à la clinique ambulatoire de FK.

Au jour 1 de l'étude, les sujets ont effectué un exercice aigu de type endurance (E1) sur ergocycle à freins électromagnétiques jusqu'à épuisement, à 80% de leur puissance maximale atteinte durant le TIM. Cet exercice a été effectué dans notre laboratoire de physiologie respiratoire à l'Hôpital Hôtel-Dieu du CHUM

après deux minutes d'échauffement sur ergocycle sans charge, sous supervision médicale directe. Le patient était encouragé à effectuer un effort maximal jusqu'à la limite des symptômes respiratoires ou musculaires ou jusqu'à ce qu'il ne pouvait plus maintenir la vitesse de 60 tours de pédale par minute. Durant l'exercice les paramètres métaboliques, tels que $\dot{V}CO_2$ et $\dot{V}O_2$, et les paramètres de la ventilation ont été enregistrés, respiration par respiration à travers une pièce buccale. La saturation transcutanée en oxygène a été monitorée en continu à l'aide d'une pince digitale standard. Le rythme cardiaque et le tracé ECG a été monitoré en continu. L'épuisement musculaire et la dyspnée ont été monitorés par l'échelle de Borg modifiée durant l'exercice et à la fin de cet exercice.[137,138](#)

Après quatre semaines de réadaptation à domicile les sujets ont effectué un deuxième exercice aigu (E2) selon le même protocole et condition que le premier.

3. Réadaptation :

Afin de déterminer les modalités d'entraînement pour chacun des sujets, il y a eu une évaluation de la condition physique et une consultation en activité physique faite par une kinésithérapeute spécialisée. Suite à cette rencontre, les modalités d'entraînement personnalisées ont été déterminées sur la base des résultats des tests d'effort maximal et à charge constante, des résultats de l'évaluation de la

condition physique, des antécédents médicaux, ainsi que du matériel d'entraînement à la disposition du sujet à domicile.

Un programme d'entraînement basé sur le renforcement musculaire et cardiovasculaire a été établi pour chaque sujet.

Le renforcement musculaire s'est fait de façon générale et globale, ayant comme but à atteindre le renforcement de la capacité fonctionnelle. Les exercices de renforcement musculaire ont été effectués sous forme de circuit musculaire. Le circuit musculaire était composé de 6 exercices. Les charges soulevées ont été adaptées selon la perception de l'effort du sujet, mesurée à l'aide de l'échelle de Borg. Le poids du corps a aussi été utilisé comme résistance lorsque le sujet ne possédait pas de matériel d'entraînement à domicile.

En ce qui concerne la portion entraînement cardiovasculaire, les sujets se sont entraînés à une intensité se situant entre 60 et 80% de leur capacité maximale. Sur la base de l'épreuve d'effort initiale nous avons pu déterminer la capacité maximale des sujets, incluant leur VO₂max, ce qui a facilité la prescription de modalités d'entraînement optimales et personnalisées. L'échelle de Borg a été de nouveau utilisée pour gérer l'intensité de l'effort. Un cardiofréquencemètre a pu être utilisé chez certains sujets. Des appareils de type vélo stationnaire, des tapis roulants et des elliptiques ont été utilisés pour accomplir cette portion de

l'entraînement. Dans le cas où les sujets ne disposaient pas de ce type d'appareil, la marche rapide a été préconisée.

4. Analyse des expectorations et du sang :

Chaque patient a eu des prélèvements de sang et d'expectoration avant et 60 minutes après les E1 et E2.

Nous avons prélevé 3 tubes de 10 ml de sang à chaque étape. Nous avons effectué une formule sanguine complète avec une différenciation leucocytaire (FSC) et un dosage de la protéine C-réactive (CRP) avant et après E1 et E2 selon le protocole standard des laboratoires de l'hématologie et de biochimie du CHUM. Le troisième tube a été gardé sur la glace, puis centrifugé à 1200 tours/min à 4°C. Le plasma a été séparé des cellules, puis conservé à -80°C jusqu'à la fin de l'étude. Par la suite, les cytokines ont été dosées dans le plasma par le *Custom Human Cytokine Antibody Array* (Cedarlane®, On, Canada). Nous avons dosé par la méthode semi-quantitative les cytokines suivantes : IL-1B, IL-6, IL-8, IL-17, MMP-8, MMP-9, TIMP-1, MCP-1, TNFalpha et GM-CSF.

En ce qui concerne les expectorations, elles ont été obtenues spontanément et gardées sur la glace, puis traitées à l'intérieur de deux heures selon les recommandations.¹³⁵ Les échantillons d'expectorations ont été séparés de la salive et mélangés avec 4 volumes de dithiothreitol (DTT) (sputalysine 10%; Calbiochem Corp, San Diego, CA, USA), puis dilué avec de l'eau distillée à

0.1%, afin de dissocier les liens disulfures dans le mucus. Cette solution a été agitée pendant 15 secondes grâce à un mixeur à vortex, puis aspirée à la main à l'aide d'une pipette Pasteur. La suspension a été agitée pendant 15 minutes par Benchrocker, puis 4 volumes de D-PBS ont été ajoutés pour arrêter l'action de DTT et le liquide a de nouveau été agité pendant 5 minutes. Puis la suspension a été filtrée et centrifugée à 750 tours/minute pendant 10 minutes, puis le surnageant a été stocké jusqu'à la fin de l'étude à -80°C.

Le culot de cellules ainsi formé a été de nouveau suspendu par D-PBS, puis le décompte cellulaire a été effectué, ainsi que le décompte de la viabilité cellulaire et le différentiel leucocytaire.

Les cytokines ont été dosées dans le surnageant à la fin de l'étude par le *Custom Human Cytokine Antibody Array* (Cedarlane®, On, Canada) en accord avec le protocole du manufacturier. Nous avons dosé par la méthode semi-quantitative les cytokines suivantes : IL-1B, IL-6, IL-8, IL-17, MMP-8, MMP-9, MCP-1, TNFa, GM-CSF et TIMP1.

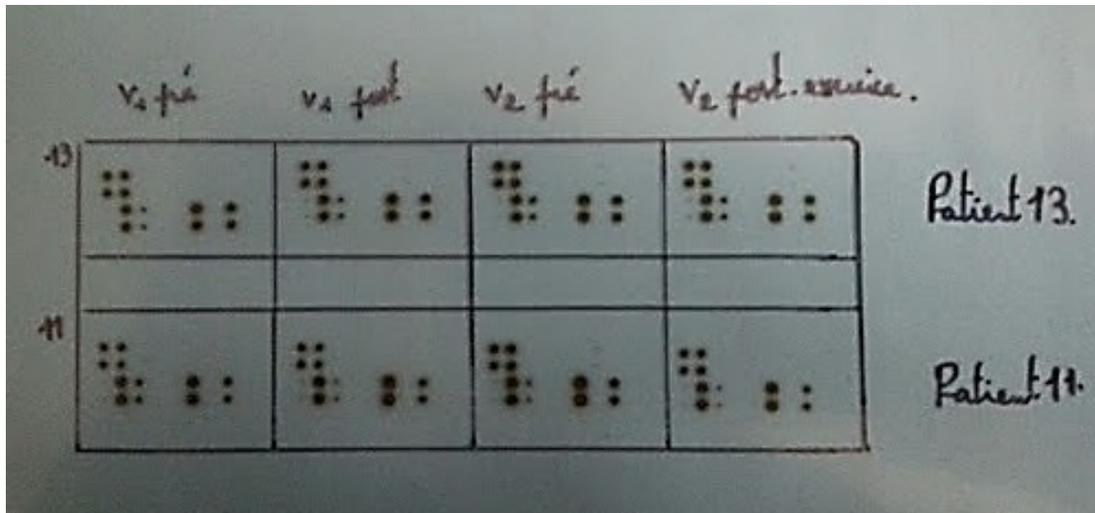


Figure 4. Exemple du résultat du dosage par la méthode semi-quantitative, *Custom Human Cytokine Antibody Array* (Cedarlane®, On, Canada).

5. Analyse du questionnaire CQF-R :

Dans beaucoup d'études, les questionnaires spécifiques pour les patients atteints de fibrose kystique portant sur leur qualité de vie ont été utilisés en tant qu'issues secondaires afin d'évaluer soit la réponse au traitement soit la progression de la maladie. Dans notre étude nous avons choisi le questionnaire CQF-R. [136,139](#)

Ce questionnaire, largement validé, de la qualité de vie et de l'état de santé est spécifique à la fibrose kystique et s'adresse aux enfants, adolescents et adultes. Il contient plusieurs domaines : le fonctionnement physique, la vitalité, la perception de sa santé par le patient, les symptômes respiratoires, les difficultés liés au traitement, la capacité de fonctionner dans la vie de tous les jours et les affects. Ce test peut être utilisé pour suivre l'évolution clinique dans le temps, la réponse au traitement ou en tant que l'issue secondaire dans la recherche

clinique. Le pointage le plus haut correspond à la meilleure performance au test. Nous avons utilisé la version auto-administrée, traduite et validée en français par les auteurs.

L'auto-administration du test était faite juste avant l'exercice E1 et juste avant l'exercice E2 dans nos locaux. Par la suite nous avons comparé les deux pointages.

6. Analyses statistiques :

Pour les patients 4 et 5, la FSC post E1 n'existe pas (erreur de labo). Pour E2, les patients 1, 8, 12 ont été exclus de l'étude et pour le patient 3 il n'y a pas de FSC (erreur de labo).

Le patient 5 a été exclu des analyses des cytokines, car l'expectorant a été contaminé par un écoulement nasal postérieur avec absence de cellules bronchiques.

Nous avons utilisé les tests de moyenne avec écart-type et médiane pour comparer nos valeurs. Nous avons également utilisé le test de « Wilcoxon matched-pairs signed-ranks » afin de tenir compte du petit nombre de paires disponibles (test non paramétrique) et de la nature appariée (pré-post) des données.

Chapitre 4 : Résultats

1. Caractéristique démographiques et cliniques de la population de l'étude :

Nous avons inclus 13 patients dans l'étude : 7 femmes et 6 hommes. Parmi eux 10 ont terminé l'étude : 6 femmes et 4 hommes. Les raisons d'abandon étaient : la grossesse découverte à la semaine deux de la réadaptation (le premier test de grossesse étant négatif), un séjour prolongé intra-hospitalier avec refus de débiter la réadaptation selon le protocole de l'étude et un abandon pour manque de motivation du patient durant la réadaptation. L'âge moyen des femmes était de 28 ans (22-38) et des hommes de 26 ans (20-31). L'IMC moyen des femmes était de 21.4 (18.2-26.6) et des hommes de 23.8 (19.4-29.2). Les mutations sont représentées dans le Tableau 1, tout comme le nombre de décompensation durant l'année avant l'inclusion.

11 patients étaient traités en prophylaxie par Azithromycine (Zithromax®) *per os* trois fois par semaine depuis plus de 1 an. 2 patients étaient traités en prophylaxie par Colimycine inhalé, 5 par Tobramycine inhalé et 1 par Aztreonam inhalé, tous les jours depuis plus de 1 an.

	Age (ans)	Sexe	BMI	Mutation	Nb d'exacerbation avec ttt AB 12 mois avant l'inclusion
1	25	H	29,2	ΔF508 - G542X	2
2	28	F	22	ΔF508 - G21+1GT	1
3	26	H	24,2	ΔF508 - ΔF508	0
4	31	H	20,7	ΔF508 - G21+1GT	4
5	28	F	22,2	ΔF508 - G21+1GT	0
6	29	F	19,7	ΔF508 - G21+1GT	5
7	22	F	18,2	ΔF508 - ΔF508	5
8	20	H	22,2	ΔF508 - G85E	5
9	27	H	26,9	ΔF508 - ΔF508	0
10	38	F	20,9	ΔF508 - G21+1GT	2
11	30	H	19,4	ΔF508 - ΔF508	1
12	31	F	20,3	ΔF508 - R553X	3
13	25	F	26,6	ΔF508 - C.3752G	2

Tableau 1. Caractéristiques des patients. Présentation des âges, sexe, BMI et les mutations des patients. Également représenté le nombre d'exacerbations nécessitant un traitement antibiotique durant l'année précédant l'inclusion dans l'étude.

2. Fonctions pulmonaires et exercice :

Nous avons effectué les tests de fonctions pulmonaires immédiatement avant E1 (tableau 2). Le VEMS moyen était de 2.5 litres (en moyen 71.4% de VEMS prédit), la capacité vitale fonctionnelle était en moyenne de 3.64 litres et le rapport de Tiffeneau (VEMS/CVF) était en moyenne de 70.4. La capacité inspiratoire (CI) était en moyenne de 2.72 litres. A noter que les mesures de CI n'ont pas été réalisées per-exercice et donc nous n'avons pas de données sur l'hyperinflation dynamique post-entraînement.

Après la réadaptation, nous avons de nouveau effectué les tests de fonctions pulmonaires immédiatement avant E2. Globalement, nous n'avons pas mis en

évidence de modifications cliniquement significatives ni pour le VEMS, ni pour le CVF, le Tiffeneau ou la capacité inspiratoire (voir tableau 3).

	PréE1				
	VEMS (L)	VEMS (%)	CVF (L)	VEMS/CVF	Capacité inspiratoire
1	2,30	57	3,21	72	2,95
2	2,60	86	3,49	74	2,55
3	2,31	55	4,30	54	2,85
4	2,54	67	3,75	68	3,10
5	2,61	85	3,26	80	2,20
6	2,32	77	2,98	78	1,85
7	2,77	86	3,45	80	2,80
8	3,38	73	5,06	67	2,55
9	2,95	74	4,82	61	3,91
10	1,67	55	2,46	68	2,05
11	3,21	75	5,09	63	4,10
12	2,24	70	2,90	77	2,11
13	1,89	68	2,58	73	2,35
moyenne	2,50	71,4	3,64	70,4	2,72

Tableau 2 : Paramètres des fonctions pulmonaire avant E1.

	PréE2				
	VEMS (L)	VEMS (%)	CVF (L)	VEMS/CVF	Capacité inspiratoire
1	N	N	N	N	N
2	2,20	73	2,84	78	2,45
3	2,51	60	4,10	61	2,75
4	2,60	68	3,83	68	3,05
5	2,30	75	2,97	78	1,90
6	2,19	73	2,79	79	1,98
7	2,79	87	3,49	80	2,88
8	N	N	N	N	N
9	3,19	80	4,98	64	3,85
10	1,68	55	2,50	67	2,10
11	3,48	81	5,51	63	4,19
12	N	N	N	N	N
13	1,97	71	2,63	75	2,45
moyenne	2,49	66,9	3,56	71,3	2,76

Tableau 3 : Paramètres des fonctions pulmonaire avant E2. La différence cliniquement significative pour la CI est de 0.2 L. N : données non disponibles (patients exclus de l'étude).

E1				Isotemps 3 min		
	Watt	Temps limite	Raison d'arrêt	VE (L/min)	HR (bpm/min)	RR (br/min)
1	106	07:00	2 et 9	47	156	25
2	144	04:43	N	49	152	26
3	108	06:34	7 et 8	22	152	28
4	96	05:03	5 et 7	42	160	28
5	84	04:28	5 et 6	37	175	22
6	60	13:01	4 et 4	35	132	25
7	132	22:02	8 et 2	60	133	21
8	96	05:36	4 et 6	51	N	39
9	128	06:50	7 et 9	58	N	26
10	96	04:33	3 et 4	38	N	29

Tableau 4 : Paramètres d'endurance de l'E1. N : données non disponibles. Les raisons d'arrêts sont mesurées selon l'échelle de Borg.

E2				Isotemps 3 min		
	Watt	Temps limite	Raison d'arrêt	VE (L/min)	HR (bpm/min)	RR (br/min)
1	107	03:05	N	49	157	28
2	144	06:30	6 et 7	46	144	24
3	108	06:48	7 et 10	45	148	27
4	96	05:17	5 et 7	48	153	33
5	84	05:46	4 et 7	35	163	27
6	60	04:16	4 et 4	36	N	26
7	156	05:21	9 et 9	85	152	28
8	96	08:03	5 et 7	45	N	34
9	128	05:38	4 et 8	53	N	21
10	96	06:05	7 et 5	39	155	31

Tableau 5 : Paramètres d'endurance de l'E2. N : données non disponibles. Les raisons d'arrêts sont mesurées selon l'échelle de Borg.

Dans les tableaux 4 et 5, nous présentons les paramètres physiologiques que nous avons mesurés durant les deux exercices, E1 et E2. La différence de puissance de l'exercice chez patient 7 est due à l'erreur de calcul (E1 fait à 65% de la puissance maximale). Comme nous pouvons constater, nous ne voyons pas de pattern reproductible chez tous les sujets : le temps d'endurance est variable, l'endurance à l'effort n'a été modifiée selon échelle de Borg, ni les paramètres physiologiques à l'isotemps de 3 minutes.

3. Exercice aigu : mesure des marqueurs inflammatoires :

3.1. Mesure dans le sang

Le sang de 13 sujets a été analysé pour la modulation des marqueurs de l'inflammation suite à l'exercice aigu.

La moyenne de leucocytes pré E1 était de $8.2 \times 10^6 (\pm 2.3) / L$, des neutrophiles $5.8 \times 10^6 (\pm 2.2) / L$ (70% du compte total des cellules dans le sang), lymphocytes $1.7 \times 10^6 (\pm 0.46) / L$ (20.7%), monocytes $0.47 \times 10^6 (\pm 0.09) / L$ (5.7%), basophiles $0.02 \times 10^6 (\pm 0.04) / L$ (0.2%), éosinophiles $0.1 \times 10^6 (\pm 0.1) / L$ (1.2%). La moyenne de CRP était à 3.8 mg/L (± 4.6) (voir tableau 6). Ces analyses sont dans les limites de la normale.

La moyenne de leucocytes post E1 était de $9.5 \times 10^6 (\pm 2.7) / L$, des neutrophiles $7.3 \times 10^6 (\pm 2.7) / L$ (76.8% du compte total des cellules dans le sang), lymphocytes $16 \times 10^6 (\pm 0.45) / L$ (16.8%), monocytes $0.5 \times 10^6 (\pm 0.13) / L$ (5.3%), basophiles $0.02 \times 10^6 (\pm 0.04) / L$ (0.2%), éosinophiles $0.1 \times 10^6 (\pm 0.1) / L$ (1%). La CRP n'a pas été mesurée (tableau 6).

	GB	Neutro	Lympho	Mono	Eosino	Baso	CRP
moy pré E1±ET	8,2±2,3	5,8±2,25	1,7±0,46	0,5±0,09	0,1±0,1	0,02±0,04	3,86±4,6
moy post E1±ET	9,6±2,7	7,3±2,7	1,6±0,45	0,5±0,13	0,1±0,1	0,02±0,04	NA
%variation pré-post E1	+17%	+26%	-10%	0	0	0	NA

Tableau 6. Modulation du décompte leucocytaire et du CRP dans le sang après l'exercice aigu. Valeurs moyennes des leucocytes et CRP pré et post E1 chez les 13 sujets avec écart-type et le pourcentage de la variation. Globules Blancs (GB), Neutrophiles (Neutro), Lymphocytes (Lympho), Monocytes (Mono), Eosinophiles (Eosino), Basophiles (Baso) mesurés en nombre de cellules $\times 10^6$ par litre, CRP en milligramme par litre.

Suite à l'exercice aigu E1, en moyenne, le décompte leucocytaire a augmenté de façon significative de 17%, et celui de neutrophiles de 26% (figure 5). Il n'y a pas eu de différence dans le décompte des autres cellules (Tableau 6).

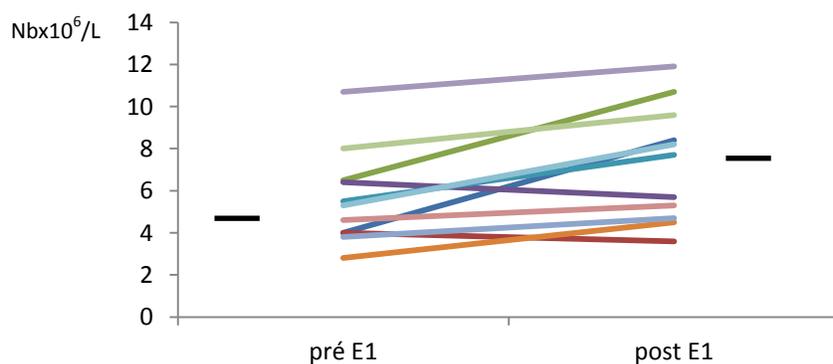


Figure 5 : La comparaison du compte absolu de neutrophiles (mesurés en nombre de cellules $\times 10^6$ par litre) dans le sang pré-post E1. Les barres noires horizontales représentent les moyennes et les droites de couleurs les résultats par patient (idem dans les autres figures).

La médiane des concentrations d'IL-6, TNF-alpha, du GM-CSF, d'IL-1B, d'IL-8 ne montre pas de modulation après exercice aigu E1 (tableau 11).

Nous avons également dosé la concentration d'IL-17 et de MCP-1 (tableau 11). La concentration de ces deux cytokines n'était pas modulée significativement par l'exercice aigu chez nos sujets.

La concentration de MMP-8 de MMP-9 ne montre pas de modulation non plus et la concentration de TIMP-1 demeure stable (tableau 11).

En résumé, il n'y a pas de modulation de cytokines dosées dans le sérum par l'exercice aigu.

3.2. Mesure dans l'expectorat :

Les expectorations de 13 sujets ont été analysées pour la modulation des marqueurs de l'inflammation suite à l'exercice aigu.

La viabilité cellulaire moyenne pré E1 était de 75.04% ($\pm 10.06\%$) avec deux prélèvements de moins bonne qualité avec une viabilité de 41 et 58% respectivement. Le compte cellulaire total dans l'expectorat a montré une grande variation chez les sujets avec une moyenne de 2.87×10^6 ($\pm 1,5$) cellules/mL et une médiane de 1.8×10^6 cellules/mL. Le nombre de neutrophiles était en moyenne de 2.40×10^6 (± 1.01) cellules/mL (72.4%) et de macrophages de

0.37×10^6 (± 0.41) cellules/ml (23%). Le nombre total des autres cellules (lymphocytes, éosinophiles, etc.) était très faible (tableau 7).

patients:	E1 pré						
	viabilité %	CCT $\times 10^6$	N $\times 10^6$	E $\times 10^6$	M $\times 10^6$	L $\times 10^6$	Eb $\times 10^6$
1	76,78	3,52	2,67	0,12	0,69	0,04	0,01
2	41,00	1,90	1,60	0,00	0,25	0,05	0,00
3	89,00	3,80	3,07	0,11	0,58	0,05	0,00
4	61,00	1,23	1,00	0,00	0,19	0,03	0,01
5	68,00	0,28	0,21	0,00	0,04	0,01	0,02
6	77,70	1,71	1,38	0,02	0,26	0,03	0,02
7	87,00	10,13	8,74	0,38	0,94	0,05	0,03
8	N	N	N	N	N	N	N
9	58,00	0,07	0,03	0,00	0,04	0,00	0,01
10	73,00	3,37	2,54	0,03	0,77	0,03	0,00
11	88,00	5,79	5,37	0,05	0,38	0,02	0,00
12	90,00	1,19	1,00	0,00	0,17	0,02	0,00
13	91,00	1,40	1,24	0,03	0,11	0,01	0,00
moyenne \pm ET	75,04 \pm 10,06	2,87 \pm 1,50	2,40 \pm 1,01	0,06 \pm 0,06	0,37 \pm 0,41	0,03 \pm 0,02	0,01 \pm 0,01

Tableau 7. Le compte cellulaire dans le sputum avant le premier exercice. Viabilité cellulaire dans le sputum est exprimée en pourcentage. CCT : comte cellulaire total; N : neutrophiles; E : éosinophiles; M : macrophages; L : lymphocytes; Eb : cellules épithéliales bronchiques. Exprimées en nombre de cellules fois dix puissance six. Les moyennes sont exprimées avec l'écart-type (ET).

La viabilité cellulaire moyenne post E1 était de 82.7% (± 5.7) avec tous les prélèvements de bonnes qualités. La moyenne du compte cellulaire total dans le sputum était de 5.55×10^6 (± 2.49) cellules/mL et une médiane de 3.7×10^6 cellules/mL. Le nombre de neutrophiles était en moyenne de 4.68×10^6 (± 1.77) cellules/mL (73.9%) et de macrophages de 0.66×10^6 (± 0.48) cellules/mL (20.6%). Le nombre total d'autres cellules (lymphocytes, éosinophiles, etc.) était très faible tout comme en pré E1 (tableau 8).

patients:	E1 post						
	viabilité %	CCT x10 ⁶	N x10 ⁶	E x10 ⁶	M x10 ⁶	L x10 ⁶	Eb x10 ⁶
1	81,50	4,07	3,01	0,00	1,03	0,04	0,00
2	76,00	1,02	0,80	0,00	0,21	0,01	0,01
3	91,20	6,84	5,42	0,05	1,30	0,05	0,02
4	92,00	5,00	4,22	0,00	0,70	0,04	0,03
5	76,00	2,18	1,78	0,00	0,20	0,20	0,01
6	67,00	1,37	1,00	0,03	0,28	0,03	0,03
7	93,00	21,22	18,10	0,81	2,08	0,17	0,11
8	N	N	N	N	N	N	N
9	84,00	3,30	2,42	0,03	0,34	0,04	0,48
10	81,00	0,83	0,56	0,01	0,25	0,01	0,01
11	92,00	14,82	13,60	0,12	1,08	0,00	0,04
12	86,00	5,35	4,76	0,00	0,48	0,04	0,07
13	73,50	0,55	0,51	0,00	0,03	0,00	0,01
moyenne±ET	82,7±5,7	5,55±2,49	4,68±1,77	0,09±0,13	0,66±0,48	0,05±0,04	0,07±0,07

Tableau 8. Le compte cellulaire dans le sputum après le premier exercice. Viabilité cellulaire dans le sputum est exprimée en pourcentage. CCT : comte cellulaire total; N : neutrophiles; E : éosinophiles; M : macrophages; L : lymphocytes; Eb : cellules épithéliales bronchiques. Exprimées en nombre de cellules fois dix puissance six par litre. Les moyennes sont exprimées avec l'écart-type (ET).

Après E1, le nombre absolu de cellules dans le sputum a augmenté en moyenne de 1.93 fois, de neutrophiles de 1.94 fois et de macrophages de 1.76 fois. Ces résultats montrent une augmentation importante des neutrophiles et des macrophages dans le sputum des patients FK après l'exercice aigu de près du double. Néanmoins, le pourcentage de neutrophiles et de macrophages dans les expectorations avant et après l'exercice aigu n'a pas été modifié.

La figure 6 montre les concentrations moyennes des cytokines dans le sputum de nos sujets avant le premier exercice.

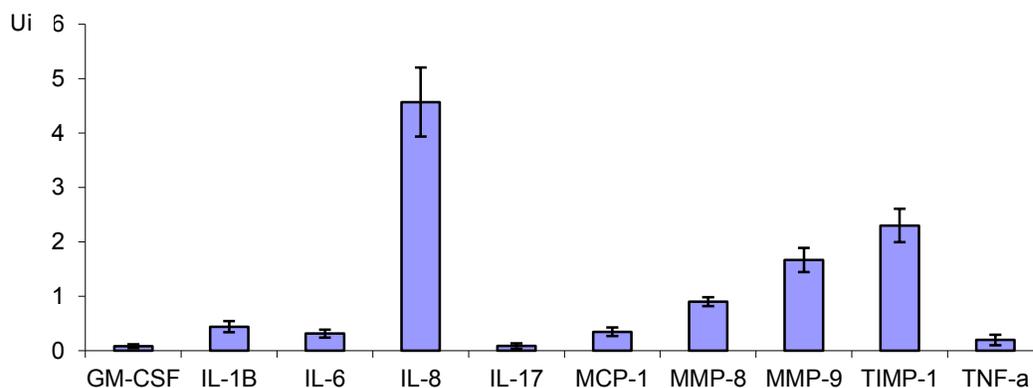


Figure 6 : Concentration moyenne des cytokines (exprimée en Unité arbitraire de densité optique) mesurées dans le sputum pré E1. Les barres verticales représentent l'écart-type.

En moyenne la concentration d'IL-6 pré-E1 est de 0.36 ± 0.15 Ui et de 0.27 ± 0.57 Ui post E1 (tableau 12). Ceci montre une modulation à la baisse d'IL-6 de 1.3 fois (22.6%) après exercice aigu E1 ($p=0.05$). L'analyse des valeurs par sujets démontre une tendance à la diminution de la concentration d'IL-6 dans les expectorations après chaque exercice aigu, sauf chez un sujet (figure 7).

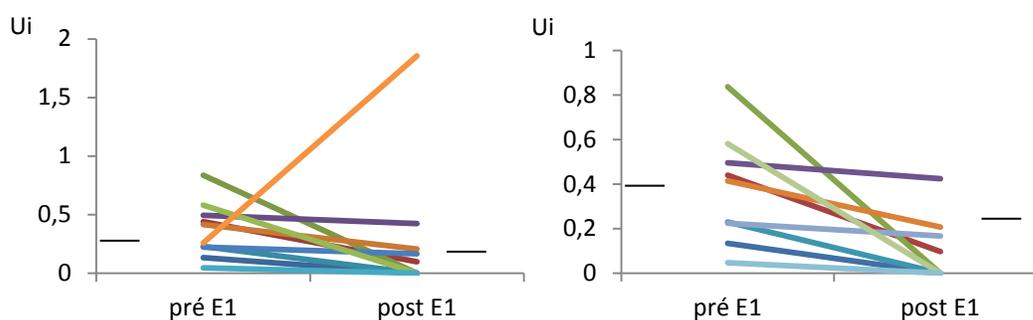


Figure 7 : Quantité d'IL-6 dans le sputum pré-post E1 par sujet (mesurée en Ui). Le panneau de droite représente les mêmes données après avoir enlevé un patient avec la plus forte augmentation d'IL-6 après l'exercice. Deux traits noirs représentent les moyennes d'IL-6 dans le sputum.

En moyenne, la concentration du GM-CSF montre une tendance à la baisse après l'exercice aigu E1 de $0.09 \pm 0.13 U_i$ à $0.01 \pm 0.03 U_i$, soit de 9 fois de réduction (tableau 13). Nous remarquons cette tendance chez certains sujets (figure 8).

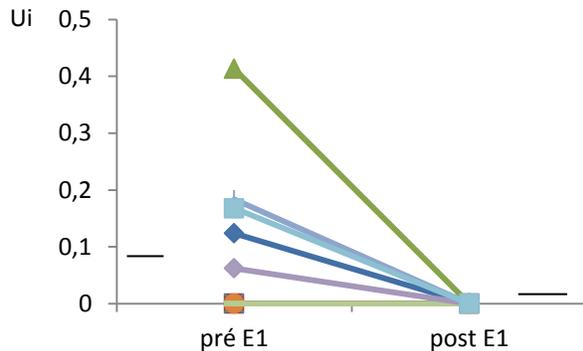


Figure 8 : Concentration de GM-CSF (U_i) dans l'expectorant pré-post E1 par sujet. Les barres horizontales représentent les moyennes.

En moyenne la concentration d'IL-1B reste stable dans les expectorations de nos sujets pré-post E1 ($0.47 \pm 0.36 U_i$ versus $0.5 \pm 0.5 U_i$) (tableau 13).

La concentration d'IL-8 était la plus élevée parmi les cytokines que nous avons dosées, avec une moyenne pré-E1 à $4.77 \pm 2.2 U_i$ et post-E1 à $4.18 \pm 2.35 U_i$. Aucune modulation significative de cette cytokine par exercice aigu n'a été observée (tableau 13).

Nous avons également dosé la concentration d'IL-17 (moyenne de $0.08 \pm 0.18 U_i$ pré-E1 et de $0.15 \pm 0.3 U_i$ post-E1) et de MCP-1 ($0.35 \pm 0.29 U_i$ et de $0.38 \pm 0.3 U_i$ respectivement). Tout comme l'IL-8, la concentration de ces trois cytokines n'était pas modulée significativement par l'exercice aigu chez nos sujets (tableau 13).

La concentration de MMP-9 en moyenne pré-E1 était de $1.74 \pm 0.76 \text{Ui}$ et de $1.73 \pm 0.81 \text{Ui}$ post-E1 (tableau 12). La concentration de MMP-9 ne montre pas de modulation non plus (figure 9).

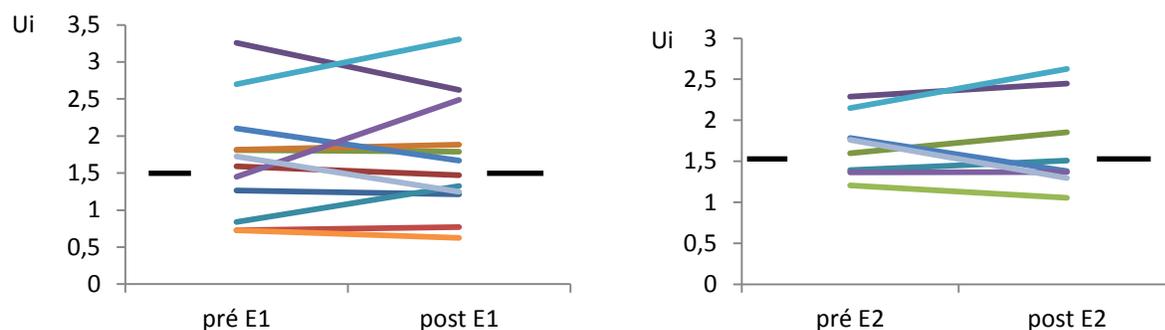


Figure 9 : Concentration de MMP-9 (en Ui) dans le sputum pré-post E1 par sujet. Les barres horizontales représentent les moyennes.

La concentration de TIMP-1 demeure stable : $2.4 \pm 1.1 \text{Ui}$ pré-E1 et $2.4 \pm 1 \text{Ui}$ post-E1 (tableau 13).

Le rapport de concentrations de MMP-9/TIMP-1 (0.76 ± 0.16 versus 0.74 ± 0.18) qui exprime l'inflammation intrapulmonaire à prédominance neutrophilique (le rapport est utilisé pour voir le débalancement de l'activité protéolytique sur l'inhibition de cette activité) est stable et n'est pas modulé de façon significative par l'exercice aigu.

La moyenne de concentration de MMP-8 ne montre pas non plus de modulation dans notre étude ($0.9 \pm 0.3 \text{Ui}$ pré-E1, $0.84 \pm 0.35 \text{Ui}$ post-E1) et nous ne voyons pas de tendances particulières en analysant chaque sujet individuellement (tableau 13).

La concentration de TNF-alpha n'est pas modulée par l'exercice aigu ($0.2 \pm 0.35 \text{Ui}$ versus $0.22 \pm 0.44 \text{Ui}$) (tableau 13).

4. Effet de la réadaptation : comparaison des marqueurs inflammatoires entre pré E1 et pré E2:

4.1. Mesures dans le sang :

La moyenne des leucocytes pré E2 était de $8 \times 10^6 (\pm 1.9) / L$, des neutrophiles $5,9 \times 10^6 (\pm 2) / L$, lymphocytes $1,5 \times 10^6 (\pm 0,6) / L$, monocytes $0,48 \times 10^6 (\pm 0,09) / L$, basophiles $0,03 \times 10^6 (\pm 0,04) / L$, éosinophiles $0,1 \times 10^6 (\pm 0,1) / L$. La moyenne de CRP était à $2,5 (\pm 3.5) \text{ mg/L}$ (tableau 9).

Après 4 semaines de réadaptation (pré E1- pré E2), le niveau de base du décompte leucocytaire est resté stable (diminution de 1% (0.98 fois)), tout comme celui de neutrophiles (augmentation de 2% (1.02 fois)). Le niveau de la CRP est nettement diminué de 35% (0.65 fois) (tableau 9).

	GB	Neutro	Lympho	Mono	Eosino	Baso	CRP
moy pré E1±ET	8,2±2,3	5,8±2,25	1,7±0,46	0,5±0,09	0,1±0,1	0,02±0,04	3,86±4,6
moy pré E2±ET	8,08±1,96	5,9±2	1,49±0,65	0,48±0,09	0,14±0,1	0,03±0,05	2,5±3,5
% variation pré E1-pré E2	-2	+2	+13	-4	+40	+50	-35

Tableau 9 : Modulation par réadaptation des leucocytes et du CRP dans le sang. Valeurs moyennes des leucocytes et CRP pré-E1 et pré-E2 chez les sujets avec écart-type et le pourcentage de différence dans le sang. Globules blanches, Lymphocytes, Monocytes, Neutrophiles, Eosinophiles, Basophiles mesurés en nombre de cellules $\times 10^6$ par litre, CPR en milligramme par litre.

La médiane de la concentration de GM-CSF reste stable après la réadaptation, tout comme celle d'IL-1B et d'IL-6 (tableau 12). Ceci est également vrai pour le TNF-alpha.

Nous ne notons pas de concentration significative d'IL-17 dans nos échantillons avant ou après la réadaptation (tableau 12).

La concentration d'IL-8 augmente après la réadaptation, passant de 0.12Ui (IQR 0.07;0.23) pré-E1 à 0.21Ui (IQR 0.12;0.31) pré-E2, soit une augmentation de 75%.

La concentration de MMP-9 ne montre pas de modulation après la réadaptation : 1.04Ui (IQR 0.93;1.14) pré-E1 et 1.04Ui (IQR 1;1.39) pré-E2.

La concentration de TIMP-1 a diminué suite à la réadaptation, la médiane passant de 1.33Ui (IQR 1.14;1.63) pré-E1 à 1.13Ui (IQR 1.06;1.67) pré-E2, soit une diminution de 18%.

La médiane de la concentration de MMP-8 a augmenté après la réadaptation passant de 0.25Ui (IQR 0.21;0.42) pré-E1 à 0.34Ui (IQR 0.26;0.43) pré-E2, soit une augmentation de 36%.

La médiane de la concentration de MCP-1 varie de 0.36Ui (IQR 0.26;0.62) pré-E1 à 0.63Ui (IQR 0.4;0.76) pré-E2, ce qui représente une augmentation de 75%.

4.2. Mesure dans l'expectorat :

La viabilité cellulaire moyenne dans l'expectorat pré E2 était de 70,1% ($\pm 23,5$), sauf chez un sujet, dont la viabilité était de 20%. La moyenne du compte cellulaire total dans le sputum était de 1.32×10^6 (± 1.07) cellules/mL et une médiane de 0.6×10^6 cellules/mL. Le nombre de neutrophiles était en moyenne de $1,04 \times 10^6$ ($\pm 0,96$) cellules/mL (61.6%) et de macrophages de 0.2×10^6 (± 0.09) cellules/mL (31.9%). Le nombre total d'autres cellules (lymphocytes, éosinophiles, etc.) était très faible (tableau 10).

	viabilité %	CCT x10 ⁶	N x10 ⁶	E x10 ⁶	M x10 ⁶	L x10 ⁶	Eb x10 ⁶
moyenne pré E1 \pm ET	75,04 \pm 10,06	2,87 \pm 1,50	2,40 \pm 1,01	0,06 \pm 0,06	0,37 \pm 0,41	0,03 \pm 0,02	0,01 \pm 0,01
moyenne pré E2 \pm ET	70,1 \pm 23,5	1,32 \pm 1,07	1,04 \pm 0,96	0,05 \pm 0,06	0,2 \pm 0,09	0,04 \pm 0,02	0,04 \pm 0,05
variation préE1- préE2	N	2,17	2,3	N	1,85	N	N

Tableau 10. Modulation par réadaptation des cellules dans le sputum. Valeurs moyennes des leucocytes et cellules épithéliales bronchique préE1 et préE2 chez les sujets avec écart-type et la variation moyenne dans le sputum. Nombre total de cellules, neutrophiles, éosinophiles, macrophages, lymphocytes et cellules épithéliales bronchiques mesuré en nombre de cellules x10⁶ par litre, la viabilité est mesurée en pourcentage.

Après les 4 semaines de réadaptation (pré E1- pré E2), le nombre absolu de cellules dans l'expectorat a diminué de 2,17 fois, de neutrophiles de 2,3 fois et de macrophages de 1,85 fois (tableau 10). Si on compare le pourcentage de cellules inflammatoires dans l'expectorat pré E1 – pré E2, alors la diminution de neutrophiles est de 15%, par contre une augmentation en pourcentage de macrophages dans l'expectorant de 38% est observée (figure 10).

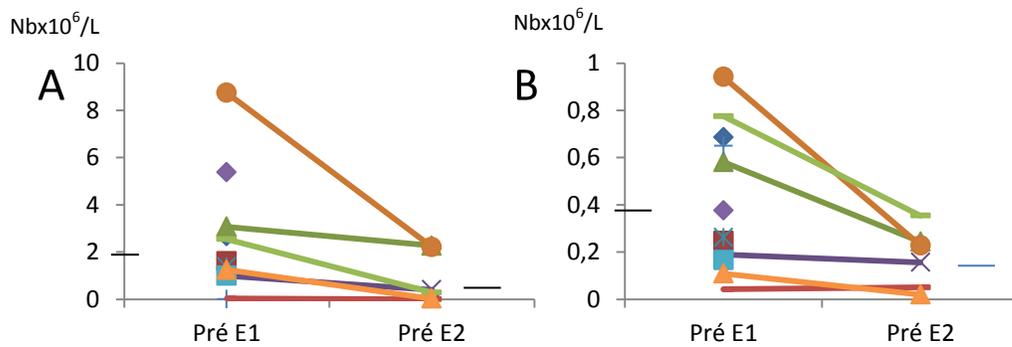


Figure 10 : Réduction de l'inflammation post-réadaptation. **A.** Nombre de neutrophiles dans le sputum pré E1- E2 (nombre de cellules $\times 10^6$ par litre). **B.** Nombre de macrophages dans le sputum pré E1- E2 (nombre de cellules $\times 10^6$ par litre). Les traits noirs représentent les moyennes.

La concentration de GM-CSF baisse de façon importante de 0.086 ± 0.13 Ui à 0 Ui. En effet, le GM-CSF est indétectable dans les expectorations des sujets en pré-E2.

La concentration de l'IL-1B a augmenté en moyenne de 0.45 ± 0.36 Ui à 0.6 ± 0.42 Ui (figure 11).

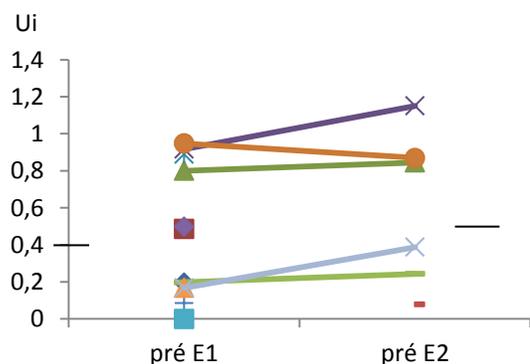


Figure 11 : Modulation d'IL-1B. La concentration d'IL-1B pré E1–pré E2 chez les sujets. Les traits noirs représentent les moyennes.

La concentration d'IL-6 baisse après la réadaptation avec une diminution de la concentration moyenne de $0.36 \pm 0.23 \text{Ui}$ à $0.14 \pm 0.13 \text{Ui}$, soit de -2.6 fois en moyenne avec un écart-type important ($p=0.04$) (figure 12).

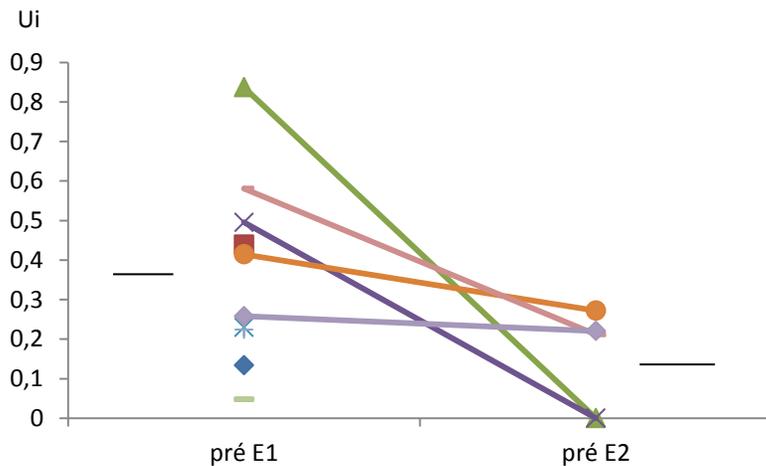


Figure 12 : Modulation préE1- préE2 d'IL-6. La concentration d'IL-6 est à la baisse chez les sujets. Les traits noirs représentent les moyennes.

La concentration d'IL-8 diminue après la réadaptation, passant de $4.77 \pm 2.2 \text{Ui}$ à $3.97 \pm 0.6 \text{Ui}$, soit une diminution de 20% (figure 13).

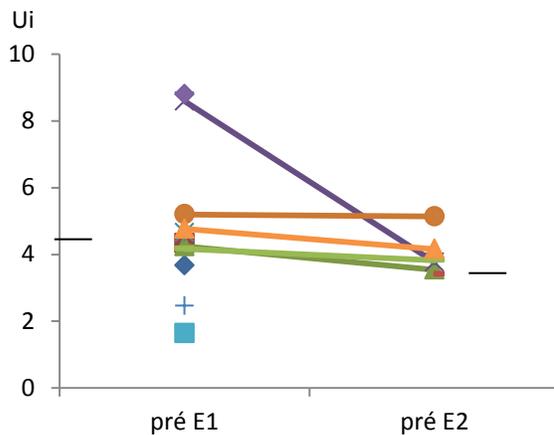


Figure 13 : Modulation d'IL-8 pré E1- pré E2. La concentration d'IL-8 est à la baisse chez les sujets. Les traits noirs représentent les moyennes.

Nous n'avons pas trouvé de modulation de la concentration moyenne de MMP-8 par la réadaptation ($0.9 \pm 0.3 \text{Ui}$ à $0.9 \pm 0.15 \text{Ui}$). En observant les sujets individuellement la concentration de MMP-8 varie de façon non-prédictible (figure 14).

La concentration moyenne de MMP-9 pré E1-E2 diminue, passant de $1.74 \pm 0.76 \text{Ui}$ à $1.67 \pm 0.38 \text{Ui}$. En analysant les données patient par patient une nette tendance à la baisse de la concentration de MMP-9 après la réadaptation est observée, même si la valeur p n'est pas significative (figure 14).

La concentration moyenne du TIMP-1 est modulée à la baisse par la réadaptation de 14% (1.16 fois), de $2.38 \pm 1.08 \text{Ui}$ à $2.04 \pm 0.5 \text{Ui}$. Nous remarquons également cette tendance en analysant les patients individuellement (figure 14).

Le rapport de concentration de MMP-9/TIMP-1 pré E1-E2 passe de 0.76 ± 0.16 à 0.82 ± 0.09 . Ce rapport exprime l'inflammation intrapulmonaire à prédominance neutrophilique (le rapport est utilisé pour voir le débalancement de l'activité protéolytique sur l'inhibition de cette activité). En comparant le rapport entre les sujets, nous remarquons une tendance à la hausse (figure 14).

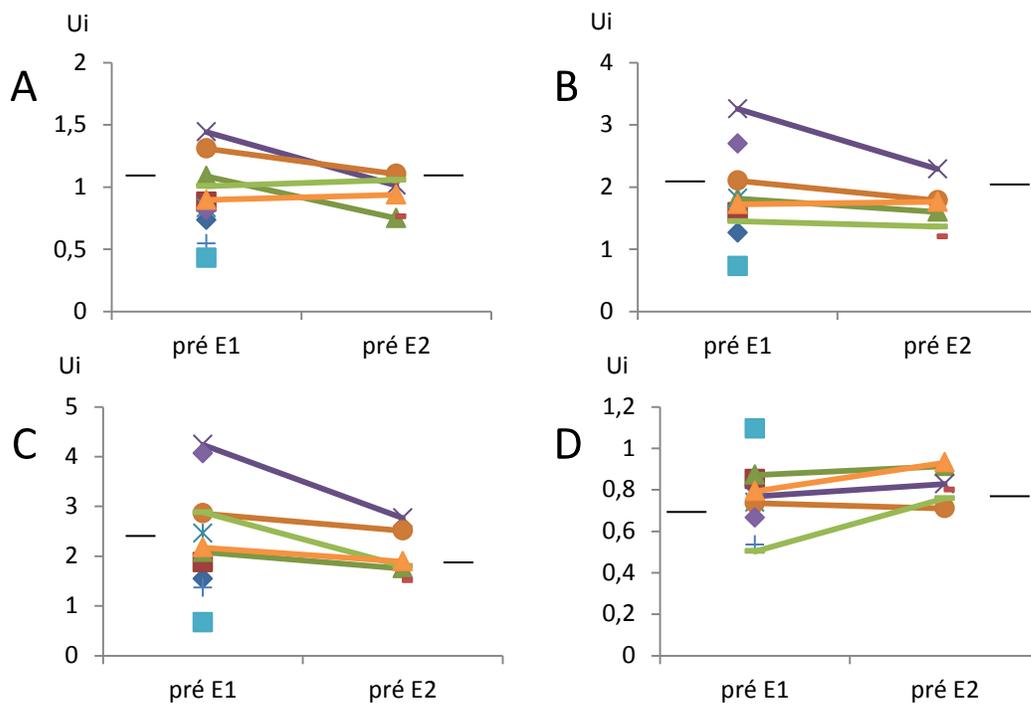


Figure 14 : La modulation par la réadaptation de MMP-8, -9 et TIMP-1.

A. La concentration de MMP-8 pré E1 – pré E2. **B.** La concentration de MMP-9 pré E1-E2. **C.** La concentration de TIMP-1. **D.** Le rapport de MMP-9/TIMP-1. Les traits noirs représentent les moyennes.

La modulation de la concentration d'IL-17 n'est pas significative, tout comme celle de TNF-alpha.

La concentration moyenne de MCP-1 varie de 0.35 ± 0.29 Ui à 0.28 ± 0.15 Ui, ce qui représente une diminution de 20% (figure 15).

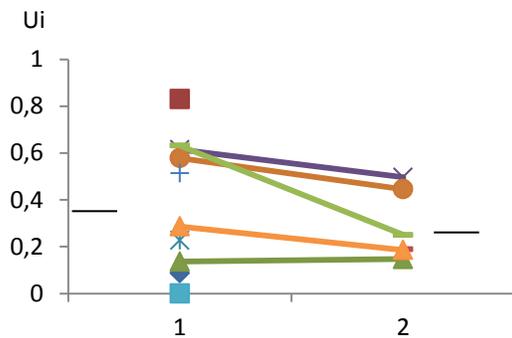


Figure 15 : La concentration de MCP-1 pré E1 – pré E2. Les traits noirs représentent les moyennes.

5. Effet de la réadaptation : la modulation des marqueurs inflammatoires par le deuxième exercice aigu :

5.1. Mesures sanguines :

La moyenne des leucocytes post E2 était de $8,6 \times 10^6 (\pm 1.9) / L$, des neutrophiles : $6,5 \times 10^6 (\pm 2) / L$; lymphocytes : $1,4 \times 10^6 (\pm 0,6) / L$; monocytes : $0,4 \times 10^6 (\pm 0,11) / L$; basophiles : $0,01 \times 10^6 (\pm 0,03) / L$; éosinophiles : $0,1 \times 10^6 (\pm 0,1) / L$. Sur 5 mesures de la CRP 4 ont été à 0 et une à 9 mg/l (tableau 11).

Suite à E2, le décompte leucocytaire a augmenté de 6 % (1.06 fois) et celui de neutrophiles de 10% (1.1 fois). Donc, l'augmentation du compte leucocytaire et neutrophilique sanguin observé pré-post E2 est inférieure par rapport à l'augmentation pré-post E1 (tableau 11).

	GB	Neutro	Lympho	Mono	Eosino	Baso	CRP
moy pré E2±ET	8,08±1,96	5,9±2	1,49±0,65	0,48±0,09	0,14±0,1	0,03±0,05	2,5±3,5
moy post E2±ET	8,6±1,9	6,5±2	1,4±0,6	0,45±0,1	0,1±0,1	0,01±0,03	NA
delta ↑ pré-post E2	1,06 X	1,1 X	0,94 X	0,93 X	0,7 X	0,3 X	NA
delta ↑ pré-post E1	1.17 X	1.26 X	0,9 X	1 X	1 X	1 X	NA

Tableau 11 : Modulation par un exercice aigu des leucocytes et du CRP dans le sang après 4 semaines de réadaptation. Valeurs moyennes des leucocytes et CRP pré et post E2 chez les sujets avec écart-type et les deltas. Globules blancs, Lymphocytes, Monocytes, Neutrophiles, Éosinophiles, Basophiles mesurés en nombre de cellules $\times 10^6$ par litre, CPR en milligramme par litre. NA : valeur absente.

La concentration de GM-CSF est à la limite de significative avant l'E2 et n'est pas modulée par le deuxième exercice. Le même est vrai en ce qui concerne les dosages d'IL-6, IL-1B, IL-17 et de TNF-alpha (tableau 12).

La médiane de la concentration d'IL-8 diminue après le deuxième exercice aigu, passant de 0.21Ui (IQR 0.14;0.31) pré-E2 à 0.16Ui (IQR 0.1;0.29) post-E2, soit une diminution de 24% (-1.31 fois) (tableau 12).

La médiane de la concentration de MMP-8 augmente suite au deuxième exercice aigu, passant de 0.34Ui (IQR 0.26;0.43) pré-E2 à 0.46Ui (IQR 0.34;0.49) post-E2, soit une augmentation de 26% (1.35 fois) (tableau 12).

La médiane de la concentration de MMP-9 montre une augmentation de 1.04Ui (IQR 1;1.39) pré-E2 à 1.25Ui (IQR 1.06;1.37) post-E2, soit une augmentation de 17% (1.2 fois) (tableau 12).

La médiane de la concentration de TIMP-1 augmente suite à l'E2, passant de 1.13Ui (IQR 1.06;1.67) pré-E2 à 1.24Ui (IQR 1.11; 1.53), montrant une augmentation de 9% (1.1 fois). Le rapport MMP-9/TIMP-1 reste stable (tableau 12).

La médiane de la concentration de MCP-1 diminue suite à l'E2, passant de 0.63Ui (IQR 0.4;0.76) pré-E2 à 0.5Ui (IQR 0.34;0.74), soit une diminution de 21% (-1.26 fois) (tableau 12).

	E1-Pré	E1-Post	E2-Pré	E2-Post
IL1-beta	0.02 (0 ;0.02)	0.02 (0.01;0.02)	0.02 (0.01;0.03)	0.01 (0;0.03)
IL-6	0.01 (0;0.02)	0.01 (0;0.01)	0.01 (0;0.02)	0 (0;0.02)
IL-8	0.12 (0.07;0.23)	0.12 (0.06;0.29)	0.21 (0.14;0.31)	0.16 (0.1;0.29)
IL-17	0 (0;0.01)	0 (0;0.01)	0 (0;0.01)	0 (0;0)
MMP-8	0.25 (0.21;0.42)	0.31 (0.24;0.47)	0.34 (0.26;0.43)	0.46 (0.34;0.49)
MMP-9	1.04 (0.93;1.14)	1.09 (1;1.15)	1.04 (1;1.39)	1.25 (1.06;1.37)
MCP-1	0.36 (0.26;0.62)	0.4 (0.25;0.68)	0.63 (0.4;0.76)	0.5 (0.34;0.74)
TNF-alpha	0.03 (0.02;0.03)	0.03 (0.03;0.03)	0.04 (0.03;0.04)	0.03 (0.02;0.04)
GM-CSF	0.02 (0.01;0.04)	0.02 (0.01;0.02)	0.02 (0.02;0.03)	0.03 (0.01;0.04)
TIMP-1	1.33 (1.14;1.63)	1.23 (1.12;1.7)	1.13 (1.06;1.67)	1.24 (1.11;1.53)

Tableau 12 : Les médianes des mesures de cytokines dans le sang (en Unité arbitraire de densité optique (Ui)). Les IQR sont exprimés entre parenthèses.

5.2. Mesure dans l'expectorat :

La viabilité cellulaire moyenne post E2 était de 79,6% ($\pm 14\%$). La moyenne du compte cellulaire total dans le sputum était de 3.48×10^6 (± 2.7) cellules/mL et une médiane de 2.2×10^6 cellules/mL. Le nombre de neutrophiles était en moyenne de 3.06×10^6 (± 2.48) cellules/mL, ce qui représente 70.4% du compte cellulaire total dans l'expectorat. Le nombre de macrophages étaient en moyenne de 0.3×10^6 (± 0.19) cellules/mL (18.1%). Le nombre total d'autres cellules (lymphocytes, éosinophiles, etc.) était très faible (tableau 13).

	viabilité %	CCT x10 ⁶	N x10 ⁶	E x10 ⁶	M x10 ⁶	L x10 ⁶	Eb x10 ⁶
moyenne pré E2 \pm ET	70,1 \pm 23,5	1,32 \pm 1,07	1,04 \pm 0,96	0,05 \pm 0,06	0,2 \pm 0,09	0,04 \pm 0,02	0,04 \pm 0,05
moyenne post E2 \pm ET	79,6 \pm 14	3,48 \pm 2,7	3,06 \pm 2,48	0,04 \pm 0,04	0,3 \pm 0,19	0,03 \pm 0,03	0,04 \pm 0,05
variation préE2-postE2	N	2,64	2,94	N	1,5	N	N

Tableau 13. Modulation par le deuxième exercice aigu des cellules dans le sputum. Valeurs moyennes des leucocytes et cellules épithéliales bronchique préE2 et postE2 chez les sujets avec écart-type et la variation moyenne dans le sputum. Nombre total de cellules, neutrophiles, éosinophiles, macrophages, lymphocytes et cellules épithéliales bronchiques mesurés en nombre de cellules x10⁶ par litre, la viabilité est mesurée en pourcentage.

Après E2, le nombre absolu de cellules dans le sputum a augmenté en moyenne de 2.64 fois, de neutrophiles de 2.94 fois et de macrophages de 1.5 fois. Cela s'accompagne d'une augmentation de pourcentage de neutrophiles dans l'expectorant de 8.8% et d'une diminution du pourcentage de macrophages de 13.8% (tableau 13).

En moyenne, la concentration de GM-CSF ne montre pas de modulation après E2 (tableau 14).

La concentration d'IL-6 n'est pas modulée chez nos sujets de façon significative par E2, tout comme l'IL-17 et le TNF-alpha (tableau 14).

La concentration d'IL-1B est modulée différemment chez tous les sujets et il n'y a pas de tendance significative (tableau 14).

La concentration d'IL-8 était la plus élevée dans les expectorations de nos sujets, avec une moyenne à 4 ± 0.63 Ui préE2 et avec une moyenne à 4.1 ± 1.5 Ui postE2 (tableau 14).

La concentration de MMP-8 passe de 0.94 ± 0.15 Ui à 0.88 ± 0.2 Ui, ce qui est non-significatif (tableau 14).

La concentration de MMP-9 ne montre pas de modulation pré-postE2 en passant de 1.67 ± 0.38 Ui à 1.56 ± 0.5 Ui (tableau 14).

La concentration moyenne du TIMP-1 augmente de 1.1 fois pré-post E2, en passant de 2 ± 0.5 pg/ml à 2.2 ± 0.5 pg/ml, sans que ceci soit significatif (tableau 14).

Le rapport de MMP-9/TIMP-1 est de 0.82 ± 0.09 pré E2 et de 0.7 ± 0.09 post E2, ce qui est non significatif en faisant les tests non-paramétriques (tableau 14).

La concentration de MCP-1 a varié de 0.28 ± 0.15 Ui à 0.27 ± 0.18 Ui pré-postE2 (tableau 14).

	pré E1		post E1		pré E2		post E2	
	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type	moyenne	écart-type
GM-CSF	0,08	0,13	0,01	0,03	0,02	0,06	0,03	0,09
IL-1B	0,44	0,36	0,45	0,46	0,57	0,4	0,52	0,43
IL-6	0,31	0,25	0,24	0,5	0,22	0,35	0,12	0,14
IL-8	4,57	2,2	4,22	2,15	4,35	0,89	4,3	2,07
IL-17	0,08	0,17	0,12	0,3	0,03	0,09	0,09	0,18
MCP-1	0,34	0,27	0,37	0,27	0,28	0,13	0,26	0,18
MMP-8	0,9	0,28	0,88	0,36	0,99	0,16	0,9	0,34
MMP-9	1,66	0,77	1,7	0,75	1,69	0,38	1,6	0,57
TIMP-1	2,3	1,07	2,4	0,94	2,17	0,5	2,26	0,6
TNF-a	0,19	0,33	0,19	0,4	0,24	0,44	0,24	0,36
MMP-9/ TIMP-1	0,7	0,16	0,7	0,17	0,78	0,1	0,7	0,09

Tableau 14 : Modulation des cytokines dans les expectorations par l'exercice (en Unité arbitraire de densité optique (Ui)). Moyenne avec ecartype par cytokines pré et post E1 et E2 dans l'expectorat.

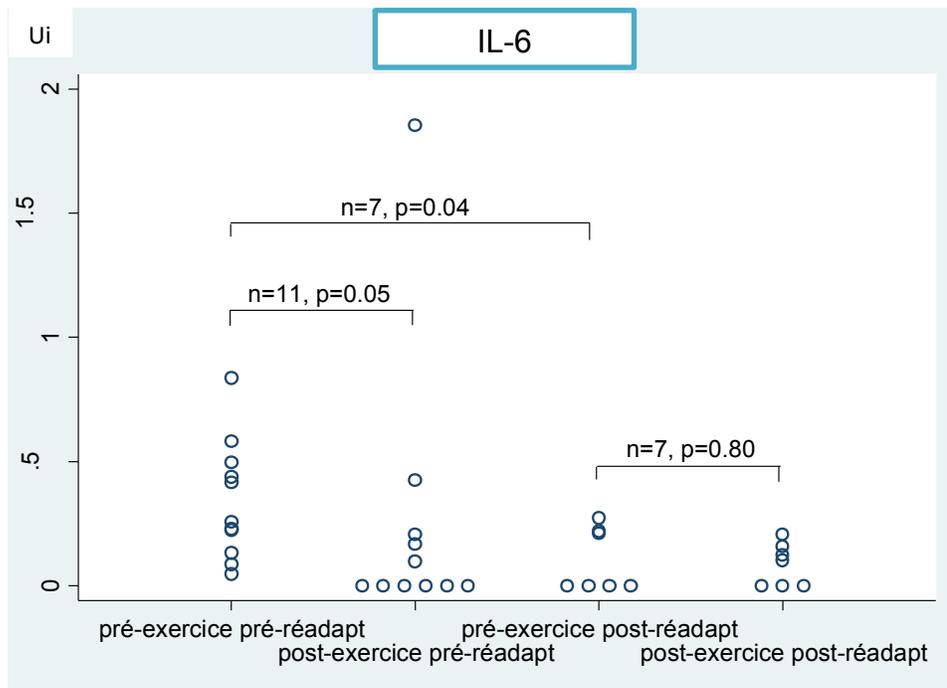


Figure 16 : Concentration d'IL-6 dans l'expectorat des patients pré-post E1 et E2. L'axe des y est en Unité arbitraire de densité optique (Ui). Les points représentent les valeurs obtenues pour tous les patients chez qui les mesures ont été prises. Les n et valeurs p indiquées sur le tableau représentent le nombre de patients pour lesquelles les données pré et post exercices aigus étaient disponibles, avec la valeur p obtenue pour la comparaison des valeurs pré post au moyen du test de Wilcoxon sign rank.

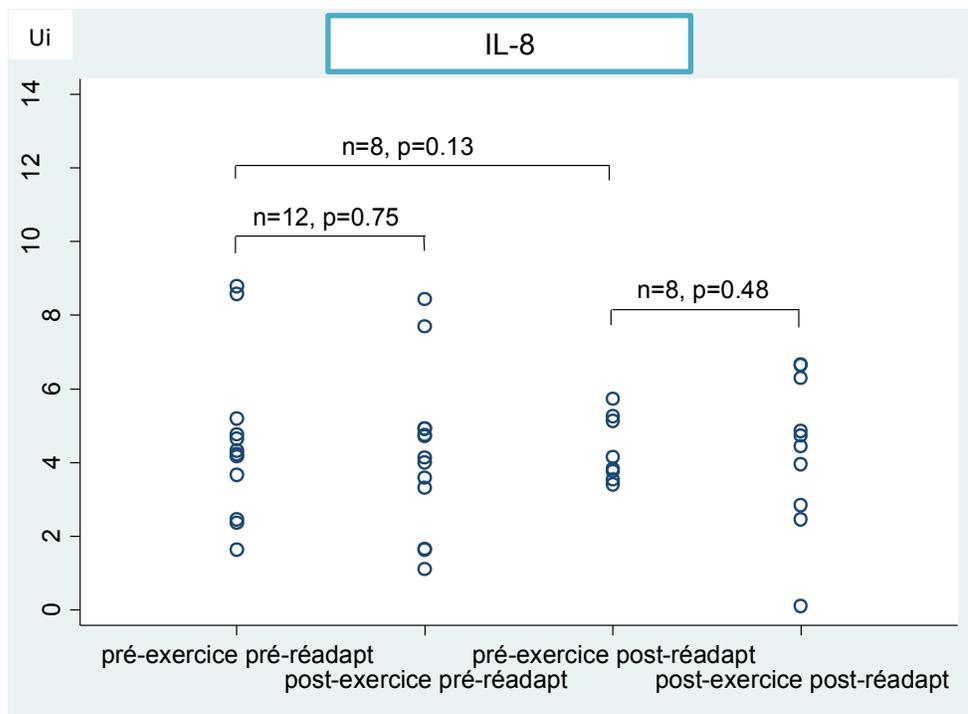


Figure 17 : Concentration d'IL-8 dans l'expectorat des patients pré-post E1 et E2. L'axe des y est en Unité arbitraire (Ui) de densité optique. Les points représentent les valeurs obtenues pour tous les patients chez qui les mesures ont été prises. Les n et valeurs p indiquées sur le tableau représentent le nombre de patients pour lesquelles les données pré et post exercices aigus étaient disponibles, avec la valeur p obtenue pour la comparaison des valeurs pré post au moyen du test de Wilcoxon sign rank.

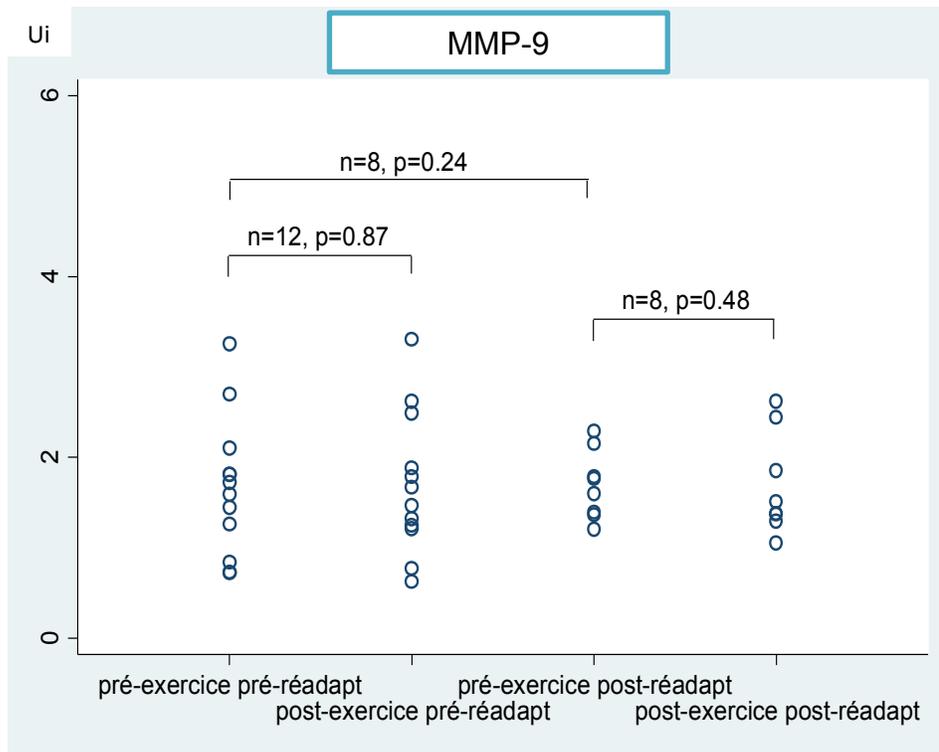


Figure 18 : Concentration de MMP-9 dans l'expectorat des patients pré-post E1 et E2. L'axe des y est en Unité arbitraire (Ui) de densité optique. Les points représentent les valeurs obtenues pour tous les patients chez qui les mesures ont été prises. Les n et valeurs p indiquées sur le tableau représentent le nombre de patients pour lesquelles les données pré et post exercices aiguës étaient disponibles, avec la valeur p obtenue pour la comparaison des valeurs pré post au moyen du test de Wilcoxon sign rank.

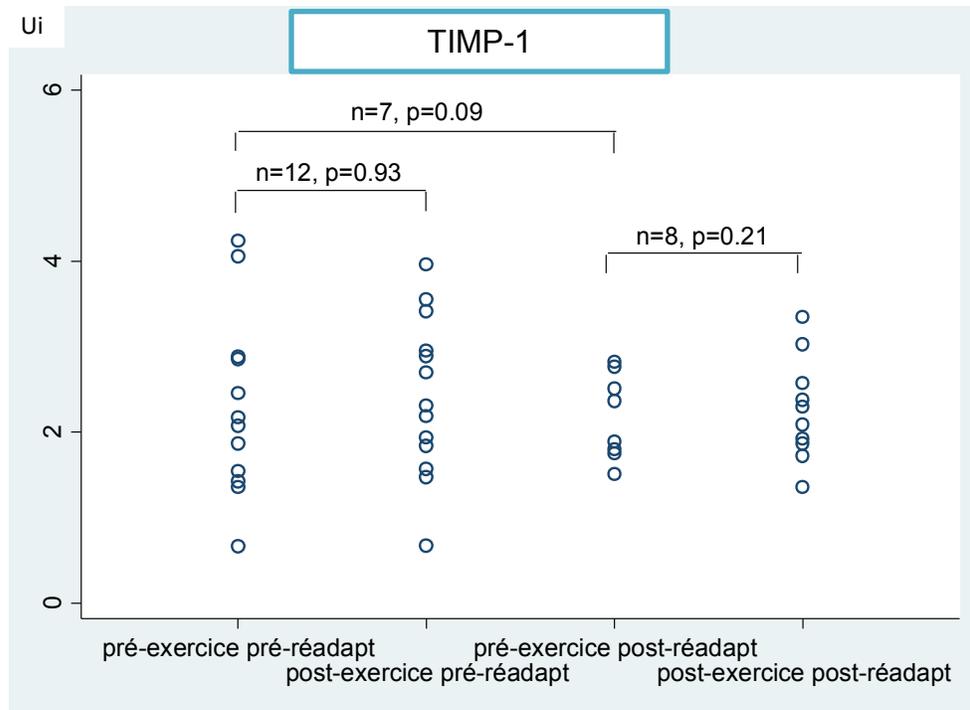


Figure 19 : Concentration de TIMP-1 dans l'expectorant des patients pré-post E1 et E2. L'axe des y est en Unité arbitraire (Ui) de densité optique. Les points représentent les valeurs obtenues pour tous les patients chez qui les mesures ont été prises. Les n et valeurs p indiquées sur le tableau représentent le nombre de patients pour lesquelles les données pré et post exercices aigues étaient disponibles, avec la valeur p obtenue pour la comparaison des valeurs pré post au moyen du test de Wilcoxon sign rank.

6. Comparaison entre les dosages des cytokines :

Nous avons effectués le test de corrélation de Spearman afin de comparer les modifications des concentrations de cytokines dans le expectorât et le sérum (entre le pourcentage de différence entre sérum et expectorât) (tableau 15).

	% Δ E1 pré-post	% Δ E2 pré-post	% Δ E1 pré-E2 pré
GM.CSF	-0.3072	NA	-0.7351
IL-17	-0.0768	+0.0	+0.1118
IL-1B	-0.1747	+0.2125	+0.0870
IL-6	+0.1623	+0.1251	+0.7775
IL-8	-0.4623	-0.6571	+0.7714
MCP-1	-0.1456	-0.0911	-0.5429
MMP-8	+0.1972	-0.5429	+0.2571
MMP-9	+0.5524	+0.4286	+0.4857
TIMP-1	+0.3357	+0.3714	+0.1429
TNF-alpha	-0.1863	+0.4928	+0.6468

Tableau 15 : Comparaison de modifications des concentrations de cytokines dans le sputum et le sérum. Corrélation de Spearman. % Δ E1 pré-post : pourcentage de différence du dosage de cytokines avant-après E1 entre sputum et sérum; % Δ E2 pré-post : pourcentage de différence du dosage de cytokines avant-après E2 entre sputum et sérum; % Δ E1 pré-E2 pré : pourcentage de différence du dosage de cytokines après 4 semaines de réadaptation entre sputum et sérum

	% Δ E1 pré-post	% Δ E2 pré-post	% Δ E1 pré-E2 pré
GM-CSF	0.3315	NA	0.0959
IL-17	0.8126	1.0000	0.8330
IL-1B	0.5870	0.6860	0.8699
IL-6	0.6143	0.8134	0.0687
IL-8	0.1302	0.1750	0.1028
MCP-1	0.6516	0.8638	0.2972
MMP-8	0.5390	0.2972	0.6583
MMP-9	0.0666	0.4194	0.3556
TIMP-1	0.2867	0.4972	0.8028
TNF-alpha	0.5620	0.3206	0.1651

Tableau 16 : Comparaison des valeurs p associés selon la modification des concentrations de cytokines dans le sputum et le sérum selon la corrélation de Spearman.

Plusieurs des associations sont élevées (en particulier GM-CSF, IL-6, IL-8), traduisant le fait que le pourcentage de différence du dosage de cytokines au temps pré-post E1, pré-post E2 et pré E1-pré E2 est corrélé. *Nota bene* : nous assistons en parallèle à la diminution (ou à l'augmentation) du dosage d'une cytokine dans le sputum et dans l'expectorat. Néanmoins, vu le très petit nombre d'échantillons, cette corrélation peut être due au hasard, ce que traduisent les valeurs p (tableau 16).

7. Comparaison entre le dosage d'IL-6, IL-8 et neutrophiles dans l'expectorant et les fonctions pulmonaires pré-E1 :

Nous avons comparé les indices d'obstruction bronchique (le rapport de Tiffeneau) avant le E1 chez les participants de l'étude avec le niveau d'IL-6, d'IL-8 et le pourcentage de neutrophiles dans l'expectorant avant le E1 (figures 21-23). Nous présentons également la corrélation d'IL-6 avec le VEMS, toujours avant l'E1 (figure 20). Nous observons une corrélation directe entre le taux d'obstruction et la concentration de ces deux cytokines pro-inflammatoires. En d'autres mots : plus le patient est obstructif, plus hauts sont les taux d'IL-6 et d'IL-8 dans l'expectorant avant l'E1. Par contre, le pourcentage de neutrophiles dans l'expectorant n'est pas corrélé avec le degré d'obstruction.

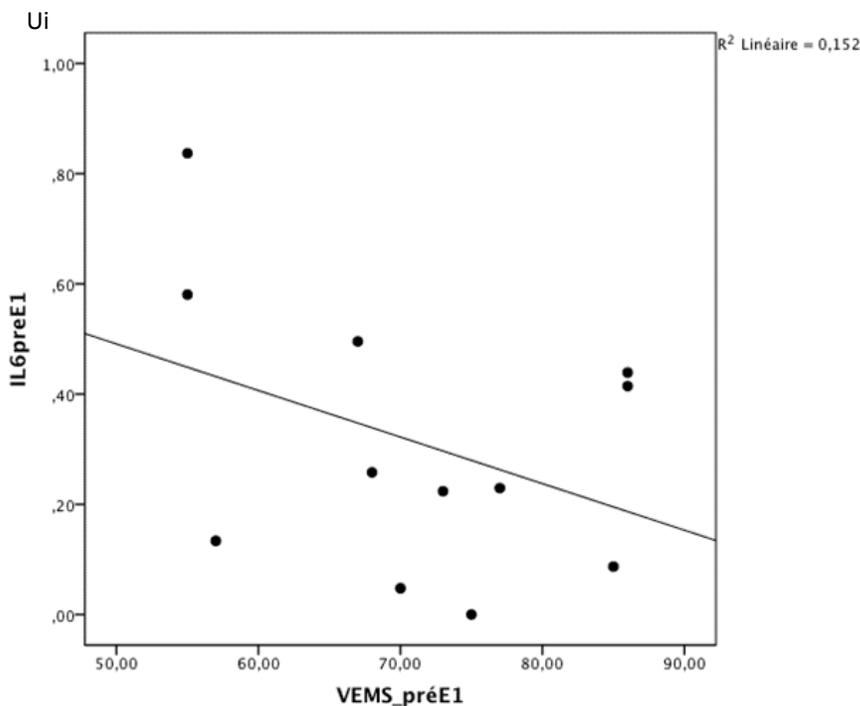


Figure 20 : Corrélation entre la concentration d'IL-6 (Ui) et VEMS préE1.

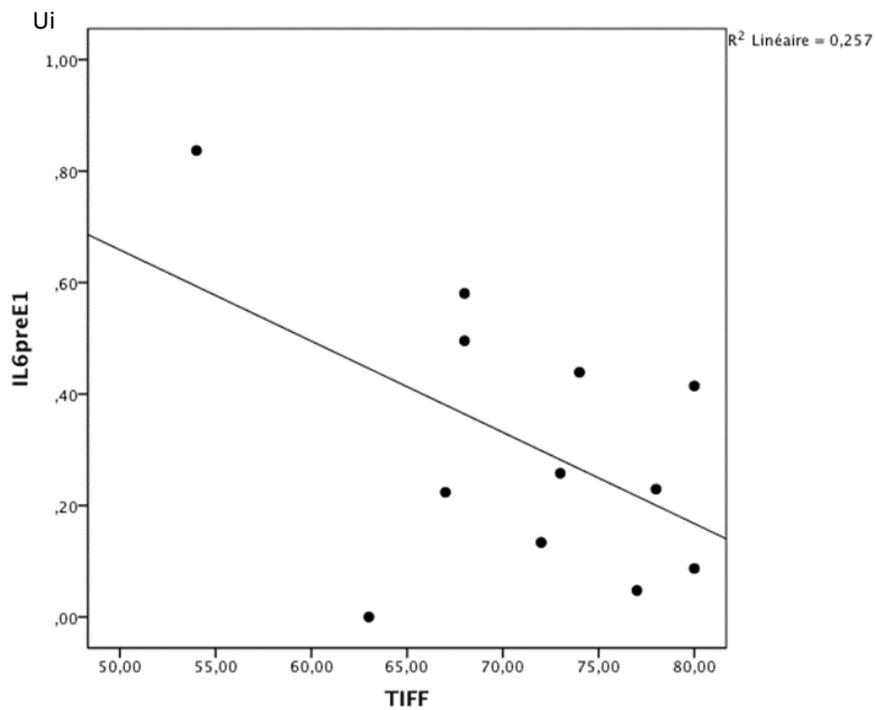


Figure 21 : Corrélation entre la concentration d'IL-6 (Ui) et le rapport de Tiffeneau préE1.

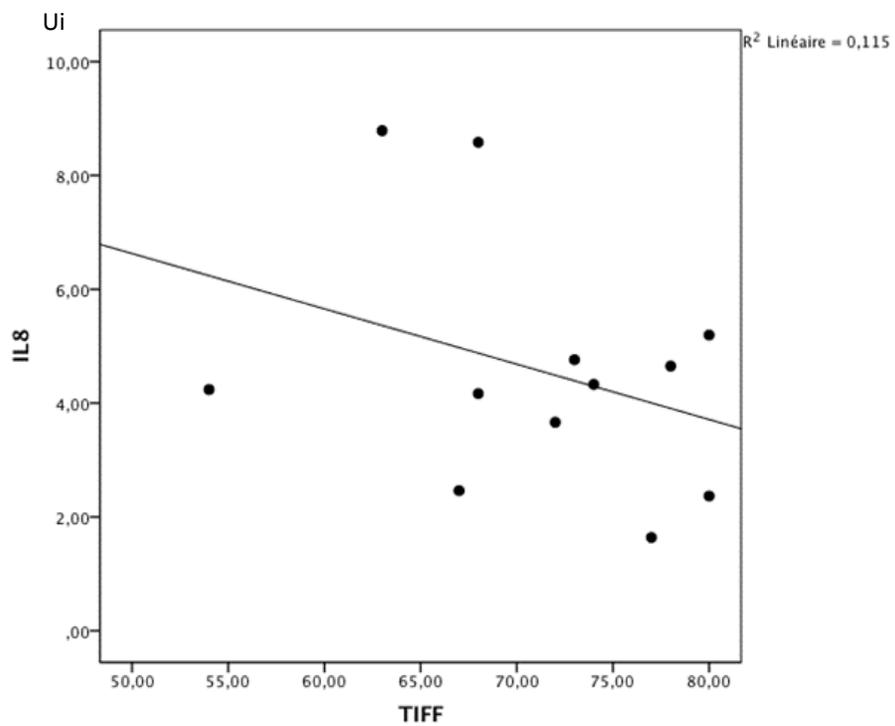


Figure 22 : Corrélation entre la concentration d'IL-8 (Ui) et le rapport de Tiffeneau préE1.

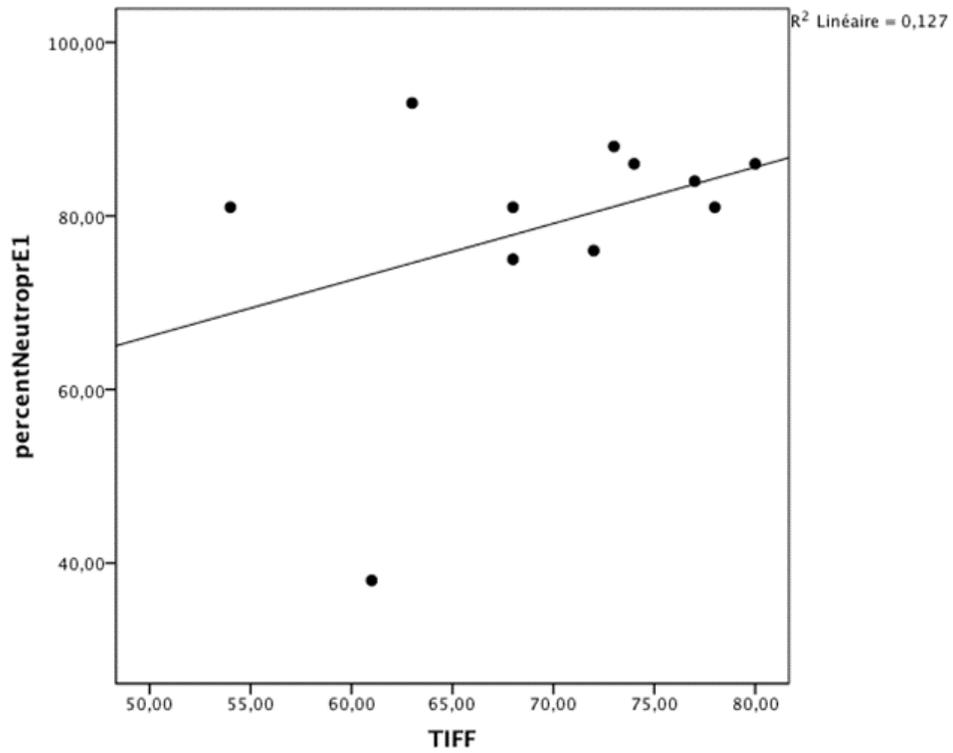


Figure 23 : Corrélation entre le pourcentage de neutrophiles dans l'expectorant et le rapport de Tiffeneau préE1.

8. Questionnaire CQF-R :

Les 12 domaines du questionnaire pour chaque patient avant et après les 4 semaines de réadaptation ont été comparés, ainsi que les scores entre chaque patient. La forme physique a été améliorée chez 8 patients parmi les 10 et les émotions ont été améliorées chez 5. Il n'y a pas eu de modifications dans les autres domaines (tableau 17).

	Patients										nb de patients	
	2	3	4	5	6	7	9	10	11	13	améliorés	détériorés
Forme physique	28	10	0	5	9	29	5	10	0	15	8	0
Vitalité	0	9	0	0	48	48	-19	-9	0	19	4	2
Émotion	0	8	0	23	38	23	0	0	0	8	5	0
Manger	13	0	13	0	-13	13	0	-39	0	0	3	2
Fatigue due au traitement	13	0	0	0	0	13	8	0	-13	13	4	1
Perception de l'état de santé	25	0	0	-13	25	26	0	13	-39	26	5	2
Socialisation	-6	0	-6	-13	45	-6	-20	-6	26	6	3	6
Image corporelle	-26	0	13	0	13	0	25	-25	26	13	5	2
Rôle	-10	0	0	0	29	10	-10	10	0	0	3	2
Poids	-76	0	0	0			0	-76	0	0	1	2
Respiration	-19	-6	0	6	13	0	6	-25	-6	25	3	4
Digestion	0	-13	13	13	0	0	-13	-38	-13	-13	2	5

Tableau 17 : Résultats du questionnaire CQF-R. Les 12 domaines étudiés sont représentés sur l'axe de Y, les 10 patients qui ont terminé l'étude sont représentés par leurs numéro de randomisation. Les scores sont dans les colonnes :

- 0 : pas de modification après 4 semaines de réadaptation;
- Nombre positif : amélioration du domaine après 4 semaines de réadaptation;
- Nombre négatif : détérioration du domaine après 4 semaines de réadaptation.

Chapitre 5 : Discussion

Dans ce mémoire, j'ai exploré les relations entre l'inflammation basale, la modulation de l'inflammation par l'exercice aigu et par la réadaptation dans une population de sujets FK.

L'inflammation basale systémique et surtout bronchique est augmentée chez les sujets FK.¹⁴⁰ Toutefois nous ne savons pas encore avec certitude si elle est modulée par l'exercice aigu (et si oui, de quelle façon) ou par la réadaptation chez les sujets FK sédentaires. Dès lors, nous avons effectué une étude préliminaire afin d'évaluer l'hypothèse suivante : l'inflammation basale systémique et bronchique est augmentée par l'exercice aigu chez les patients FK sédentaires. Nous proposons également que cette élévation est réduite suite à un programme de réadaptation personnalisé et non-supervisé de 4 semaines (tout comme l'inflammation basale).

Afin de mesurer cette inflammation, nous avons quantifié les marqueurs pro-inflammatoires, soit IL-1B, IL-6, IL-8, IL-17, MMP-8, MMP-9, MCP-1, TNF-alpha et GM-CSF, ainsi que les leucocytes et la CRP, au niveau sérique et au niveau local (bronchique dans notre cas), de façon minimalement invasive. Nous avons également dosé un marqueur anti-inflammatoire, le TIMP-1. Les mesures des marqueurs inflammatoires bronchique peuvent être faites soit dans les expectorations (spontanées ou induites) ou par lavage broncho-alvéolaire via bronchoscopie. La méthode de choix est l'analyse des expectorations : une

méthode directe et non-invasive. Plusieurs auteurs ont validé cette technique et ont démontré sa reproductibilité.^{134,135} Nous avons donc utilisé cette technique.

Des études ont montré l'augmentation des MMP-1, MMP-8 et MMP -9 dans le sérum des patients durant un épisode d'exacerbation aigüe pulmonaire dû à l'infection par *P.aeruginosa*,¹⁰² tout comme l'augmentation du GM-CSF.¹¹² D'autres études se sont intéressées à IL-8.¹¹⁵ Les taux de ces marqueurs sont corrélés avec le degré de l'inflammation pulmonaire et également avec les fonctions pulmonaires (VEMS). Selon ces auteurs, l'inflammation induite par l'infection aigüe, mesurée par ces paramètres, est très proche de l'inflammation induite par l'exercice aigüe.

Dans le cadre de notre étude, les marqueurs ont été mesurés au départ (temps pré-E1), après le premier exercice aigüe (post-E1), après la réadaptation (pré-E2) et après le deuxième exercice aigüe (post-E2). Les résultats obtenus à chacun de ces temps seront discutés séquentiellement. Bien qu'obtenus dans un échantillon restreint, des tendances ont été observées et seront également discutées plus-bas et mises en parallèle avec les données actuellement disponibles dans la littérature.

Temps pré-E1

Nous allons débiter la discussion avec les mesures préE1. En moyenne, les mesures biochimiques utilisées habituellement en cliniques ne montrent pas d'inflammation basale systémique chez sujets FK sédentaires en dehors d'un

épisode de décompensation aigüe. Ceci est confirmé par le taux de globules blancs normal observés chez nos sujets pré-E1, tout comme des neutrophiles, lymphocytes, monocytes et éosinophiles. Le dosage de la protéine C-réactive est également normal.

En ce qui concerne les mesures des cytokines circulantes, les concentrations d'IL-6, du GM-CSF, d'IL-1B, d'IL-17 et de TNF-alpha étaient également très faibles. Par contre, les dosages d'IL-8, de MCP-1, de MMP-9, de TIMP-1 et de MMP-8 circulants étaient nettement plus élevés, confirmant un niveau d'inflammation basale élevé chez les patients FK.

Cet état inflammatoire est nettement plus apparent au niveau bronchique, tel qu'il a déjà été mis en évidence dans d'autres études.^{141,142} Nos mesures montrent une augmentation de l'inflammation basale bronchique chez nos sujets. Ceci est mesuré par la quantité de neutrophiles et de macrophages présents dans l'expectoration spontanée au début de l'étude, tout comme par la quantité d'IL-8, MMP-8 et MMP-9 et de TIMP-1 dans les expectorations, tout comme au niveau sanguin. Cette inflammation chronique est néfaste pour les voies aériennes des sujets FK et participe certainement à leur destruction.¹⁰⁶ Par contre, en contradiction avec d'autres études, la concentration de TNF-alpha est basse chez nos sujets.^{141,143} Ce fait pourrait être expliqué par la stabilité de l'état clinique de nos sujets et par l'atteinte obstructive pulmonaire relativement légère.

L'ensemble de ces mesures est en accord avec le paradigme actuel de l'état inflammatoire systémique et pulmonaire est augmenté chez les FK et dont la cellule centrale est le neutrophile activé, en interaction avec les cellules épithéliales et les monocytes/macrophages.¹⁴¹ Néanmoins, nous ne savons pas encore avec certitude si les cytokines inflammatoires circulantes (dosées dans le sérum) viennent au moins en partie du compartiment bronchique ou pulmonaire.

Temps post-E1 :

Suite à l'exercice aigu à 80% de la puissance maximale effectué jusqu'à l'épuisement, nous avons constaté une nette augmentation de neutrophiles circulants dans le sang périphérique chez les sujets FK sédentaires, sans modification notables de la concentration de cytokines sériques, à part une augmentation de concentration de MMP-8 (médiane 0.25 (0.21 ;0.42) à 0.31 (0.24 ;0.47) et du rapport de MMP-9/TIMP-1 (0.92 à 1). Vu le faible nombre de mesures nous ne pouvons pas discuter de la signification statistique de cette augmentation. Cette augmentation de neutrophiles circulants a déjà été observée dans d'autres études en réponse à un exercice physique à puissance constante chez des sujets en bonne santé, asthmatiques ou FK.^{61,144} Le fait que nous n'observons quasiment pas d'augmentation de cytokines inflammatoires parallèle à cette neutrophillie pourrait suggérer une démarginalisation de neutrophiles dans la circulation systémique en réponse à un exercice de relativement courte durée et à 80% de la puissance maximale, sans que cela ne représente une réponse « inflammatoire » en soi.⁶¹ Nous pouvons spéculer que

ces neutrophiles ne sont pas activés et n'augmentent donc pas la production de cytokines pro-inflammatoires.

L'absence d'augmentation d'IL-6 circulant (laquelle est considérée une myokine et est augmentée par un exercice physique aigu prolongé chez le sujet sain, à point de départ des muscles des membres inférieurs)⁷⁰ est plus surprenante, mais est comparable à l'étude chez les enfants FK de Nguyen et al.⁶¹ L'augmentation de l'IL-6 a été reliée à un effet anti-inflammatoire systémique et pourrait être déficiente chez les FK, ce qui concorde avec nos résultats.⁶⁸ Il est également possible que la durée de l'exercice chez nos sujets était insuffisante pour détecter l'augmentation de cette myokine.⁶¹ L'origine d'IL-6 circulant ne provient pas toujours uniquement des muscles des membres inférieurs (pendant l'exercice sur ergocycle) et pourrait même être un signe de souffrance musculaire. En effet, dans une autre étude pilote chez les patients MPOC sévère ayant une faible masse musculaire,⁵⁵ la ventilation non-invasive durant l'exercice physique à puissance constante sur ergocycle a permis d'abolir l'augmentation d'IL-6 sérique. Les auteurs concluaient que ceci est dû à la diminution de la charge de travail sur la musculature respiratoire chez ces patients. Nous pouvons raisonnablement supposer que la charge de travail des muscles respiratoires chez nos sujets était moindre, tout comme la demande en oxygène. Également l'interaction cœur-poumon est moins compromise chez nos sujets avec les valeurs spirométriques nettement supérieures que dans l'étude citée.

D'autre part, nous savons que les taux sériques de différentes cytokines (surtout les metalloprotéases de la matrice, tel que MMP-8 et MMP-9) sont modulés à la hausse par l'infection aiguë et à la baisse par un traitement antibiotique subséquent.¹⁰² Donc, leur faible hausse dans le sérum de nos patients suite à l'E1 est un indice important de l'innocuité de l'exercice aiguë chez les sujets FK.

L'augmentation du nombre absolu des neutrophiles et des macrophages dans les expectorations est encore plus significative après l'exercice aiguë (par rapport aux neutrophiles circulants). Ces deux types cellulaires sont au cœur du paradigme inflammatoire des FK comme cela a été mentionné dans l'introduction (avec les cellules épithéliales). Néanmoins, le pourcentage de ces cellules reste stable dans les expectorations avant et après l'exercice aiguë. Ce fait pourrait signifier que nous n'assistons pas à la modulation de l'inflammation bronchique dans nos conditions de l'exercice, mais plutôt également à un afflux de ces cellules dans les voies bronchiques, tout comme dans le cas des neutrophiles systémiques. Ceci est confirmé par le fait que la concentration des cytokines inflammatoires dans les expectorations de nos sujets après E1 reste également stable, et même on note une diminution significative du GM-CSF et d'IL-6 (figure 16). IL-6 semble avoir un rôle pro-inflammatoire au niveau pulmonaire comme le montrent les expériences de perfusion d'IL-6 chez le rat.⁶⁴ La diminution du dosage d'IL-6 pourrait impliquer la régulation à la baisse de cette cytokine par l'épithélium bronchique suite à l'effort physique dans nos conditions et donc être bénéfique. La diminution du GM-CSF semble avoir également un effet

protecteur, en diminuant l'effet hyper-inflammatoire des neutrophiles et macrophages des voies respiratoires des FK.⁵¹ Nous ne pouvons pas mettre cette diminution sur le compte de l'amélioration de la clearance du sputum, car nous n'assistons pas à la modification des concentrations d'autres cytokines mesurées dans notre étude.

L'ensemble de ces données tendent à démontrer que l'exercice aigu dans nos conditions expérimentales n'augmente pas l'inflammation systémique ou bronchique des sujets FK stables et pourrait même avoir des effets bénéfiques locaux via la réduction de l'IL-6 et du GM-CSF dans l'expectorat.

Temps pré-E2

Suite à 4 semaines du programme de réadaptation non-supervisée le décompte leucocytaire systémique ne montre pas de modification et reste au niveau normal, tout comme le nombre de neutrophiles et de monocytes. Par contre, l'état inflammatoire systémique mesuré par la CRP est diminué suite à la réadaptation, en accord avec d'autres études.¹⁴⁵ Ceci suggère que nos participants ont activement participé au programme de réadaptation. Ceci est congruent avec les résultats du questionnaire CQF-R où nous observons clairement l'augmentation de la forme physique de nos patients.

Par contre nous assistons à la tendance à la hausse de certaines cytokines pro-inflammatoires sériques, tel que MCP-1, IL-8, MMP-8, et le ratio molaire de

MMP-9 à son inhibiteur TIMP-1, ce qui pourrait être néfaste. Surtout que la diminution de MMP-8 (mais pas du ratio molaire MMP-9/TIMP-1) sérique a été corrélée dans le passé à une réponse favorable à l'antibiothérapie pour un épisode de décompensation infectieuse pulmonaire chez les FK.¹⁰² Néanmoins, cette tendance à la hausse (qui demeure faible en valeur absolue et surtout en absence concomitante de l'augmentation de TNF-alpha) pourrait être simplement une variabilité normale des mesures dans le temps.

Au contraire de ce que nous voyons au niveau sérique, le nombre absolu de cellules et le nombre de neutrophiles et macrophages montrent une très nette diminution dans l'expectorat, avec une augmentation en proportion de macrophages dans l'expectorat par rapport aux neutrophiles. Ces modifications s'accompagnent d'une diminution de GM-CSF, d'IL-6, d'IL-8 et de MCP-1. Ces quatre cytokines participent au recrutement de cellules inflammatoires pulmonaires, surtout des neutrophiles, et sont produites par les macrophages, l'épithélium pulmonaire et d'autres cellules. En parallèle, nous voyons une augmentation de la concentration d'IL-1beta. Cette augmentation (en parallèle avec l'augmentation de la proportion des macrophages dans l'expectorat), tout comme la diminution des quatre cytokines citées plus haut, est un signe de la diminution nette de l'inflammation bronchique des FK dans nos conditions. De plus, ceci modifie le paradigme de l'inflammation bronchique des FK avec une diminution du rapport neutrophiles/macrophages et pourrait donc être moins destructeur pour le parenchyme pulmonaire. Le design de notre étude ne nous

permet pas de distinguer entre les effets bénéfiques de la réadaptation sur l'inflammation intra-bronchique et systémique des effets bénéfiques (locaux et systémiques) de l'amélioration de la clearance des sécrétions bronchiques chez les patients FK, suite à la réadaptation. Effectivement, via l'induction par la ventilation de l'ATP et d'AMP cyclique et de l'augmentation de la perfusion pulmonaire, l'exercice physique en aérobie stimule le recrutement pulmonaire¹⁴⁶, l'hydratation du mucus¹⁴⁷ et améliore les mouvements des cils. Ceci diminuerait les bouchons muqueux, les épisodes infectieux et même l'inflammation basale et, donc, la destruction du parenchyme pulmonaire.¹⁴⁷ Néanmoins, plusieurs études chez des sujets sains, des sujets FK ou des sujets avec d'autres maladies chroniques ont démontré une diminution de l'inflammation systémique après une réadaptation, y compris non-supervisée.⁴ De plus, d'autres auteurs ont mis en évidence une amélioration de la fonction pulmonaire et une diminution des paramètres inflammatoires après un traitement antibiotique ce qui ne pourra pas être expliqué seulement par augmentation de la clearance de l'expectorat.¹⁰²

En résumé, nous assistons à une diminution de l'inflammation bronchique et probablement systémique après 4 semaines de réadaptation non-supervisée chez nos sujets.

Temps post-E2

Afin de comparer les effets de réadaptation sur la poussée inflammatoire, nous avons refait l'exercice aigu à la fin de 4 semaines de notre étude. En réponse au

deuxième exercice (E2) jusqu'à l'épuisement, les neutrophiles sériques montrent de nouveau une augmentation notable. Néanmoins quand on la compare avec l'E1, nous remarquons qu'elle est moindre. En ce qui concerne les cytokines mesurés dans le sérum, nous assistons à une diminution d'IL-8 et MCP-1. Ceci nous démontre les effets positifs de la réadaptation sur le profil inflammatoire systémique chez les patients FK avec une diminution de la poussée inflammatoire suite à un exercice aigu, tout comme une diminution de la démarginalisation.

Par ailleurs, nous voyons une légère augmentation de MMP-8 sérique. A noter que le MMP-9 augmente également dans le sérum. Le TIMP-1, l'inhibiteur naturel de MMP-9, augmente de façon quasi proportionnelle. Malgré cela, le ratio MMP-9/TIMP-1 est légèrement augmenté passant de 0.92 à 1. Nous pouvons mettre ceci en parallèle avec une augmentation du nombre de neutrophiles circulants et d'une poussée inflammatoire après un exercice aigu. Le fait de ne pas voir de modulation de la concentration d'autres cytokines (tel que TNF α et IL-6) et même une diminution d'IL-8 et de MCP-1, me pousse à dire que le stress inflammatoire globale après un exercice aigu est diminué par la réadaptation. Et donc que la réadaptation a été bénéfique chez nos sujets FK.

En ce qui concerne le profil inflammatoire dans l'expectorat, nous assistons à l'augmentation en nombres absolus des neutrophiles et des macrophages post-E2. Cette augmentation s'accompagne d'une modification de la répartition

cellulaire en faveur des neutrophiles. Néanmoins, cette augmentation de neutrophiles dans l'expectorat est de 1.6 fois inférieure post E2 par rapport à post E1. En parallèle, nous ne détectons aucune modification dans le profil de cytokines dans l'expectorat, à part une diminution de 1.8 fois d'IL-6. Nous avons déjà vu une diminution un peu moindre d'IL-6 après E1.

Ces données tendent à démontrer que l'exercice aigu effectué dans nos conditions expérimentales après 4 semaines de réadaptation non supervisée n'augmente pas l'inflammation bronchique des sujets FK stables. On pense même que la réadaptation a diminué le stress inflammatoire induit par l'exercice aigu au niveau bronchique. Par contre au niveau sérique, nous voyons toujours l'augmentation de neutrophiles circulants après un exercice aigu avec l'augmentation de concentration de metalloprotéases dosées. De façon intéressante, dans notre étude, on a l'impression que ce stress est confiné au compartiment systémique et ne vient pas du compartiment bronchique chez les patients FK. Cette activation immunitaire pourrait alors être une réponse normale à l'exercice aigu et avoir des effets bénéfiques ou, au contraire, produire une réponse hyper-inflammatoire et néfaste chez les sujets FK.¹⁴⁸ Nous avons besoin d'autres études pour mieux caractériser cette inflammation après un exercice aigu et pour déterminer si c'est la durée de l'exercice ou son intensité qui est à l'origine de ces modifications chez les sujets FK et ainsi mieux préciser l'effet global sur l'évolution de la maladie.

Interprétations de l'ensemble des résultats

Nous savons que les cycles d'infections/d'inflammation à répétition (voir persistantes) induisent des dommages irréversibles aux poumons FK et mènent à la longue à une insuffisance respiratoire irréversible et au décès. Nous savons également que ce sont les neutrophiles pulmonaires en interaction avec les cellules épithéliales, les macrophages et éventuellement d'autres cellules, qui sont au cœur de ce processus. Notre étude montre, en accord avec d'autres études,²³ que l'inflammation basale tant systémique que pulmonaire est augmentée chez les sujets FK. D'autre part, plusieurs études ont montré que le VEMS diminue progressivement chez les FK et ce déclin augmente avec chaque exacerbation,³⁵ ce qui mène ultimement à la défaillance pulmonaire. Nous espérons que si on diminue l'inflammation basale, ceci va se traduire par l'amélioration de la qualité de vie et, éventuellement au long terme, diminuera la vitesse de perte de fonction pulmonaire (ce qui est le but visé). Nous sommes convaincus de ceci, car, comme nous l'avons montré, le degré d'obstruction est bien corrélé avec certains marqueurs inflammatoires dans l'expectorat, tel IL-6 et IL-8. Ceci est en accord avec d'autres auteurs qui ont déjà mis en évidence la même corrélation inverse entre le pourcentage de VEMS prédit et les marqueurs inflammatoires mesurés dans les expectorations, comme l'élastase libre et l'IL-8.^{23,34} En partie ceci a été également montré par Moorcroft et coll.⁴ De façon intéressante, nous ne voyons pas de corrélation des fonctions respiratoires avec la quantité de neutrophiles dans l'expectorat chez nos sujets à l'état de base. Ceci pourrait être expliqué par les facteurs confondants qui n'étaient pas pris en

compte dans ce projet, comme l'activité bactérienne, la médication concomitante (de type azythromycine, par exemple), les mutations différentes chez nos sujets ou même par les manifestations extra-pulmonaire de la FK.

D'autre part, l'ensemble de nos résultats montre que la réadaptation même non-supervisé chez nos sujets a permis de diminuer l'état inflammatoire basale bronchique de nos sujets FK, tout en améliorant leur forme physique subjective (selon le questionnaire CQF-R) (tableau 11). Ceci a possiblement permis une adaptation physiologique à l'exercice chez nos sujets et, donc, une diminution de réponse inflammatoire bronchique à un exercice aigu, même si nous ne voyons pas d'effets clairs sur les paramètres de l'exercice en tant que tel (tableau 4,5). L'autre effet bénéfique est une amélioration probable de la clearance de l'expectorat (et/ou de la capacité de l'expectorer) avec un effet de type « physiothérapie respiratoire » de la réadaptation permettant une meilleure expectoration des sécrétions. Ce mécanisme pourrait également participer à la diminution de l'inflammation basale des voies respiratoires.

Dans notre étude, suite à la réadaptation, nous voyons une augmentation sérique de plusieurs cytokines inflammatoires, tel que IL-8, le MMP-8, le rapport MMP-9/TIMP-1 sérique et de MCP-1 et qui sont même modulées à la hausse par l'E2. L'augmentation de ces cytokines pourrait avoir des effets négatifs sur, par exemple, la masse musculaire de nos patients ou sur leur cachexie.⁵⁹ Néanmoins le fait de la quasi-absence d'IL-6 circulant et de TNF- α , ainsi que de

la diminution du dosage de la CRP montre en même temps une quasi-absence de l'inflammation systémique. Ces résultats pourraient suggérer que certaines de ces cytokines augmentées viennent d'autres organes que les poumons et pourraient être déversées dans la circulation systémique. Une autre hypothèse serait que les cellules inflammatoires productrices de ces cytokines répondent de façon différentielle à la réadaptation. D'autre part on pourrait penser que ceci pourrait être simplement une variation intra-test et inter-test de nos mesures.

Le design de notre étude ne nous donne donc pas la réponse sur la signification clinique de cette augmentation. Nous aurons besoin d'une autre étude afin de répondre à cette question. Nous aurons besoin de doser l'activité biologique de ces cytokines. De plus, nous devrions doser l'élastase neutrophilique, ainsi que ces produits de dégradation urinaire (desmosine et isodesmosine), afin de mieux préciser le degré de l'activité biologique éventuel de cette augmentation. Nous pourrions rajouter même l'étude de certaines alarmines.

Limites de l'étude

Nous avons de nombreuses limitations à notre étude. Tout d'abord, notre étude est exploratoire avec un nombre de sujets limité et des mutations à la base de la maladie différentes (tableau 1). Ceci nous amène à ne pas avoir de groupe contrôle afin de comparer la modulation des cytokines inflammatoires dans le sang ou l'expectorat. Effectivement, nous n'avons pas de comparaison de dosages de cytokines inflammatoires avec un groupe de sujets sains exposé aux

mêmes conditions d'étude, ni avec un groupe de sujets FK chez qui nous aurions pu doser ces paramètres inflammatoires à un mois d'intervalle sans réadaptation.

Par ailleurs les mesures de laboratoire en tant que telles, utilisées dans ce travail, ont des limitations intrinsèques. Nous n'avons pas pris en compte cette variabilité, puisque cela dépasse les objectifs de ce travail et pourrait faire l'objet d'une autre étude avec un plus grand nombre de sujets, des mesures répétées et un groupe contrôle.

Également, nous avons étudié les effets de réadaptation d'une relativement courte durée et donc ne pouvons pas nous prononcer sur les effets bénéfiques de l'entraînement physique au long cours dans cette population. D'autre part, la réadaptation étant non supervisée, nous ne pouvons pas être totalement sûr que nos sujets ont tous eu une adhérence parfaite au programme de réadaptation. Ceci pourrait avoir eu un effet sur l'inhomogénéité des résultats tant au niveau physique (par exemple sur la durée du deuxième exercice aigu) que sur la modulation de l'inflammation chez nos sujets. Néanmoins d'autres équipes avant nous ont déjà étudié la réadaptation non supervisée⁴ qui est par essence nettement plus facile à implémenter dans la vie de tous les jours pour nos patients, et ont conclu qu'elle était bénéfique.

Finalement, étant donné la somme de ces variabilités et à la petite taille de l'échantillon, les résultats observés peuvent être dû au hasard. Des tests statistiques formelles n'ont pas été faits pour toutes les mesures (avec une valeur p). En raison de la multiplicité de mesures et de comparaison possible, il ne m'a pas semblé adéquat d'effectuer ces tests, par peur d'introduire l'erreur de type 1 (à savoir de considérer réelle une différence due au hasard).

Forces de l'étude

Après avoir discuté de ces quelques limitations à notre étude, je voudrais souligner plusieurs points forts de ce travail.

Tout d'abord, nous avons réussi à étudier une population homogène ce qui nous permet de tirer les conclusions importantes sur l'effet de la réadaptation non-supervisée de 4 semaines chez nos sujets. De plus, à ma connaissance, notre étude est la première à étudier la modulation de l'inflammation en parallèle dans l'expectorat et dans le sérum aux quatre temps (suite à l'exercice aigu et à la réadaptation). Plusieurs de nos résultats sont concordants entre eux selon la corrélation de Spearman (tableau 9) qui compare la modulation du dosage de la même cytokine en parallèle dans l'expectorat et dans le sérum. Nos résultats montrent une modulation à la baisse de l'inflammation bronchique en E2 et donc les effets bénéfiques de la réadaptation. Ce fait est confirmé à notre avis par la concordance de l'amélioration de la forme physique au questionnaire CQF-R. Par ailleurs, je pense que ces réponses confirment également le fait que malgré

que la réadaptation n'ait pas été supervisée, les sujets de l'étude ont suivi leur programme d'exercice au mieux de leurs possibilités.

Également, nous avons analysé plusieurs marqueurs inflammatoires (cytokines), d'origine cellulaire différente, afin d'ouvrir la voie aux études subséquentes pour mieux comprendre les interactions cellulaires des voies bronchiques FK.

Je pense que cette étude va servir d'excellent point de départ pour un projet d'envergure subventionné par un organisme gouvernemental avec comité de pairs de type IRSC afin de mieux étudier la modulation de l'inflammation par l'exercice physique chez les FK. Elle va nous permettre de calculer la taille de l'échantillon nécessaire, de mieux préciser les cytokines à doser et de déterminer la durée de la réadaptation.

Chapitre 6 : Conclusion :

Notre étude met en évidence la diminution de l'état inflammatoire au niveau bronchique après 4 semaines de réadaptation non-supervisée, tout comme une diminution du stress inflammatoire suite à l'exercice aigu au niveau bronchique. En ce qui concerne les phénomènes inflammatoires au niveau systémique, nos résultats montrent une possible augmentation de l'inflammation d'origine neutrophillique avec une diminution de l'inflammation cellulaire d'autre origine. La signification clinique de ces changements n'a pas été étudiée actuellement.

Sur la base des conclusions de notre étude, je pense que nous devons continuer de proposer aux patients avec FK les activités sportives diverses, ainsi que la réadaptation.

Nos données sont très encourageantes et vont nous permettre de concevoir une étude à plus large échelle, multicentrique, afin de mieux évaluer les phénomènes décrits dans ce travail.

Bibliographie :

1. Shepard RJ. Aerobic Fitness and Health: Human Kinetics; 1994.
2. Gruber W, Orenstein DM, Braumann KM, Huls G. Health-related fitness and trainability in children with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology* 2008;43:953-64.
3. Hebestreit H, Kieser S, Junge S, et al. Long-term effects of a partially supervised conditioning programme in cystic fibrosis. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2010;35:578-83.
4. Moorcroft AJ, Dodd ME, Morris J, Webb AK. Individualised unsupervised exercise training in adults with cystic fibrosis: a 1 year randomised controlled trial. *Thorax* 2004;59:1074-80.
5. Griese M, Busch P, Caroli D, et al. Rehabilitation Programs for Cystic Fibrosis - View from a CF Center. *The open respiratory medicine journal* 2010;4:1-8.
6. Asher MI, Pardy RL, Coates AL, Thomas E, Macklem PT. The effects of inspiratory muscle training in patients with cystic fibrosis. *The American review of respiratory disease* 1982;126:855-9.
7. Williams CA, Benden C, Stevens D, Radtke T. Exercise training in children and adolescents with cystic fibrosis: theory into practice. *International journal of pediatrics* 2010;2010.
8. Salh W, Bilton D, Dodd M, Webb AK. Effect of exercise and physiotherapy in aiding sputum expectoration in adults with cystic fibrosis. *Thorax* 1989;44:1006-8.
9. Schneiderman-Walker J, Pollock SL, Corey M, et al. A randomized controlled trial of a 3-year home exercise program in cystic fibrosis. *The Journal of pediatrics* 2000;136:304-10.
10. Worldwide WaC. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS; 2002.
11. Randell SH, Boucher RC, University of North Carolina Virtual Lung G. Effective mucus clearance is essential for respiratory health. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2006;35:20-8.
12. Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annual review of genetics* 1995;29:777-807.
13. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2003;168:918-51.
14. Virella-Lowell I, Herlihy JD, Liu B, et al. Effects of CFTR, interleukin-10, and *Pseudomonas aeruginosa* on gene expression profiles in a CF bronchial epithelial cell Line. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2004;10:562-73.
15. Venkatakrisnan A, Stecenko AA, King G, et al. Exaggerated activation of nuclear factor-kappaB and altered IkappaB-beta processing in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000;23:396-403.
16. Sutanto EN, Kicic A, Foo CJ, et al. Innate inflammatory responses of pediatric cystic fibrosis airway epithelial cells: effects of nonviral and viral stimulation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2011;44:761-7.
17. Boots AW, Gerloff K, Bartholome R, et al. Neutrophils augment LPS-mediated pro-inflammatory signaling in human lung epithelial cells. *Biochimica et biophysica acta* 2012;1823:1151-62.
18. Maille E, Trinh NT, Prive A, et al. Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF-alpha after injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011;301:L945-55.

19. Gao L, Kim KJ, Yankaskas JR, Forman HJ. Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *The American journal of physiology* 1999;277:L113-8.
20. Chen J, Jiang XH, Chen H, et al. CFTR negatively regulates cyclooxygenase-2-PGE(2) positive feedback loop in inflammation. *Journal of cellular physiology* 2012;227:2759-66.
21. Luciani A, Vilella VR, Esposito S, et al. Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nature cell biology* 2010;12:863-75.
22. Fu L, Sztul E. ER-associated complexes (ERACs) containing aggregated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) are degraded by autophagy. *European journal of cell biology* 2009;88:215-26.
23. Sagel SD, Chmiel JF, Konstan MW. Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2007;4:406-17.
24. Steagall WK, Elmer HL, Brady KG, Kelley TJ. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-dependent regulation of epithelial inducible nitric oxide synthase expression. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000;22:45-50.
25. Boucher RC. An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Advanced drug delivery reviews* 2002;54:1359-71.
26. Muhlebach MS, Noah TL. Endotoxin activity and inflammatory markers in the airways of young patients with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002;165:911-5.
27. Brennan S. Innate immune activation and cystic fibrosis. *Paediatric respiratory reviews* 2008;9:271-9; quiz 9-80.
28. Pillarisetti N, Williamson E, Linnane B, et al. Infection, inflammation, and lung function decline in infants with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011;184:75-81.
29. Ratjen F, McColley SA. Update in cystic fibrosis 2011. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2012;185:933-6.
30. Ionescu AA, Evans WD, Pettit RJ, Nixon LS, Stone MD, Shale DJ. Hidden depletion of fat-free mass and bone mineral density in adults with cystic fibrosis. *Chest* 2003;124:2220-8.
31. Ionescu AA, Nixon LS, Evans WD, et al. Bone density, body composition, and inflammatory status in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000;162:789-94.
32. Beavers KM, Brinkley TE, Nicklas BJ. Effect of exercise training on chronic inflammation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2010;411:785-93.
33. Nicklas BJ, You T, Pahor M. Behavioural treatments for chronic systemic inflammation: effects of dietary weight loss and exercise training. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne* 2005;172:1199-209.
34. Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Accurso FJ, et al. Association between pulmonary function and sputum biomarkers in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2007;175:822-8.
35. Waters V, Stanojevic S, Atenafu EG, et al. Effect of pulmonary exacerbations on long-term lung function decline in cystic fibrosis. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2012;40:61-6.
36. Ramos DS, Olivo CR, Quirino Santos Lopes FD, et al. Low-intensity swimming training partially inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Medicine and science in sports and exercise* 2010;42:113-9.

37. McKeon DJ, Cadwallader KA, Idris S, et al. Cystic fibrosis neutrophils have normal intrinsic reactive oxygen species generation. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2010;35:1264-72.
38. Lauterbach M, O'Donnell P, Asano K, Mayadas TN. Role of TNF priming and adhesion molecules in neutrophil recruitment to intravascular immune complexes. *Journal of leukocyte biology* 2008;83:1423-30.
39. Ogilvie AC, Hack CE, Wagstaff J, et al. IL-1 beta does not cause neutrophil degranulation but does lead to IL-6, IL-8, and nitrite/nitrate release when used in patients with cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1996;156:389-94.
40. Sapey E, Wood AM, Ahmad A, Stockley RA. Tumor necrosis factor- α rs361525 polymorphism is associated with increased local production and downstream inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010;182:192-9.
41. Niwa Y, Kasama T, Miyachi Y, Kanoh T. Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging: cross-sectional and longitudinal studies. *Life sciences* 1989;44:1655-64.
42. Egger G, Aigner R, Glasner A, Hofer HP, Mitterhammer H, Zelzer S. Blood polymorphonuclear leukocyte migration as a predictive marker for infections in severe trauma: comparison with various inflammation parameters. *Intensive care medicine* 2004;30:331-4.
43. Ivanov S, Palmberg L, Venge P, Larsson K, Linden A. Interleukin-17A mRNA and protein expression within cells from the human bronchoalveolar space after exposure to organic dust. *Respiratory research* 2005;6:44.
44. Joshi AD, Fong DJ, Oak SR, et al. Interleukin-17-mediated immunopathogenesis in experimental hypersensitivity pneumonitis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009;179:705-16.
45. Ramirez-Velazquez C, Castillo EC, Guido-Bayardo L, Ortiz-Navarrete V. IL-17-producing peripheral blood CD177+ neutrophils increase in allergic asthmatic subjects. *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 2013;9:23.
46. Elizur A, Cannon CL, Ferkol TW. Airway inflammation in cystic fibrosis. *Chest* 2008;133:489-95.
47. Vanaudenaerde BM, Wuyts WA, Geudens N, et al. Macrolides inhibit IL17-induced IL8 and 8-isoprostane release from human airway smooth muscle cells. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2007;7:76-82.
48. Yoshida M, Ikegami M, Reed JA, Chroneos ZC, Whitsett JA. GM-CSF regulates protein and lipid catabolism by alveolar macrophages. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2001;280:L379-86.
49. Shibata Y, Berclaz PY, Chroneos ZC, Yoshida M, Whitsett JA, Trapnell BC. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 2001;15:557-67.
50. Berclaz PY, Carey B, Fillipi MD, et al. GM-CSF regulates a PU.1-dependent transcriptional program determining the pulmonary response to LPS. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2007;36:114-21.
51. Carey B, Trapnell BC. The molecular basis of pulmonary alveolar proteinosis. *Clinical immunology* 2010;135:223-35.
52. Inadera H, Egashira K, Takemoto M, Ouchi Y, Matsushima K. Increase in circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 with aging. *Journal of interferon & cytokine research :*

the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research 1999;19:1179-82.

53. Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, et al. Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung diseases. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002;165:378-81.

54. Stumpf C, Lehner C, Raaz D, et al. Platelets contribute to enhanced MCP-1 levels in patients with chronic heart failure. *Heart* 2008;94:65-9.

55. Hannink JD, van Hees HW, Dekhuijzen PN, van Helvoort HA, Heijdra YF. Non-invasive ventilation abolishes the IL-6 response to exercise in muscle-wasted COPD patients: a pilot study. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 2014;24:136-43.

56. Fischer CP. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exercise immunology review* 2006;12:6-33.

57. Leggate M, Nowell MA, Jones SA, Nimmo MA. The response of interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor isoforms following intermittent high intensity and continuous moderate intensity cycling. *Cell stress & chaperones* 2010;15:827-33.

58. Nimmo MA, Leggate M, Viana JL, King JA. The effect of physical activity on mediators of inflammation. *Diabetes, obesity & metabolism* 2013;15 Suppl 3:51-60.

59. Ionescu AA, Mickleborough TD, Bolton CE, et al. The systemic inflammatory response to exercise in adults with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2006;5:105-12.

60. Tirakitsoontorn P, Nussbaum E, Moser C, Hill M, Cooper DM. Fitness, acute exercise, and anabolic and catabolic mediators in cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;164:1432-7.

61. Nguyen T, Obeid J, Ploeger HE, Takken T, Pedder L, Timmons BW. Inflammatory and growth factor response to continuous and intermittent exercise in youth with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2012;11:108-18.

62. Moon MK, Cho BJ, Lee YJ, et al. The effects of chronic exercise on the inflammatory cytokines interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha are different with age. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* 2012;37:631-6.

63. Ronsen O, Lea T, Bahr R, Pedersen BK. Enhanced plasma IL-6 and IL-1ra responses to repeated vs. single bouts of prolonged cycling in elite athletes. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 2002;92:2547-53.

64. Kuhn C, 3rd, Homer RJ, Zhu Z, et al. Airway hyperresponsiveness and airway obstruction in transgenic mice. Morphologic correlates in mice overexpressing interleukin (IL)-11 and IL-6 in the lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000;22:289-95.

65. Helge JW, Stallknecht B, Pedersen BK, Galbo H, Kiens B, Richter EA. The effect of graded exercise on IL-6 release and glucose uptake in human skeletal muscle. *The Journal of physiology* 2003;546:299-305.

66. Keller C, Hellsten Y, Steensberg A, Pedersen BK. Differential regulation of IL-6 and TNF-alpha via calcineurin in human skeletal muscle cells. *Cytokine* 2006;36:141-7.

67. Pedersen BK, Fischer CP. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* 2007;10:265-71.

68. Petersen AM, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of applied physiology* 2005;98:1154-62.

69. Febbraio MA, Hiscock N, Sacchetti M, Fischer CP, Pedersen BK. Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. *Diabetes* 2004;53:1643-8.

70. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiological reviews* 2008;88:1379-406.
71. Cowburn AS, Condliffe AM, Farahi N, Summers C, Chilvers ER. Advances in neutrophil biology: clinical implications. *Chest* 2008;134:606-12.
72. Makam M, Diaz D, Laval J, et al. Activation of critical, host-induced, metabolic and stress pathways marks neutrophil entry into cystic fibrosis lungs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:5779-83.
73. Montemurro P, Mariggio MA, Barbuti G, et al. Increase in interleukin-8 production from circulating neutrophils upon antibiotic therapy in cystic fibrosis patients. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2012.
74. Sequeiros IM, Jarad N. Factors associated with a shorter time until the next pulmonary exacerbation in adult patients with cystic fibrosis. *Chronic respiratory disease* 2012;9:9-16.
75. Shak S, Capon DJ, Hellmiss R, Marsters SA, Baker CL. Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87:9188-92.
76. Su X, Looney MR, Su HE, Lee JW, Song Y, Matthay MA. Role of CFTR expressed by neutrophils in modulating acute lung inflammation and injury in mice. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 2011;60:619-32.
77. Petit-Bertron AF, Tabary O, Corvol H, et al. Circulating and airway neutrophils in cystic fibrosis display different TLR expression and responsiveness to interleukin-10. *Cytokine* 2008;41:54-60.
78. Hayes E, Pohl K, McElvaney NG, Reeves EP. The cystic fibrosis neutrophil: a specialized yet potentially defective cell. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 2011;59:97-112.
79. Galli F, Battistoni A, Gambari R, et al. Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochimica et biophysica acta* 2012;1822:690-713.
80. Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 1993;75:2419-24.
81. Corti A, Franzini M, Cianchetti S, et al. Contribution by polymorphonuclear granulocytes to elevated gamma-glutamyltransferase in cystic fibrosis sputum. *PloS one* 2012;7:e34772.
82. van Helvoort HA HY, de Boer RC, Swinkels A, Thijs HM, Dekhuijzen PN. Six-minute walking-induced systemic inflammation and oxidative stress in muscle-wasted COPD patients. *Chest* 2007;131:439-45.
83. Dubois AV, Gauthier A, Brea D, et al. Influence of DNA on the activities and inhibition of neutrophil serine proteases in cystic fibrosis sputum. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2012;47:80-6.
84. Conese M. Cystic fibrosis and the innate immune system: therapeutic implications. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 2011;11:8-22.
85. Hartl D, Latzin P, Hordijk P, et al. Cleavage of CXCR1 on neutrophils disables bacterial killing in cystic fibrosis lung disease. *Nature medicine* 2007;13:1423-30.
86. Devaney JM, Greene CM, Taggart CC, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS letters* 2003;544:129-32.
87. Taggart C, Coakley RJ, Grealley P, Canny G, O'Neill SJ, McElvaney NG. Increased elastase release by CF neutrophils is mediated by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-8. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2000;278:L33-41.
88. Voynow JA, Fischer BM, Zheng S. Proteases and cystic fibrosis. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2008;40:1238-45.

89. Sonawane A, Jyot J, During R, Ramphal R. Neutrophil elastase, an innate immunity effector molecule, represses flagellin transcription in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and immunity* 2006;74:6682-9.
90. Zhang Z, Louboutin JP, Weiner DJ, Goldberg JB, Wilson JM. Human airway epithelial cells sense *Pseudomonas aeruginosa* infection via recognition of flagellin by Toll-like receptor 5. *Infection and immunity* 2005;73:7151-60.
91. Taggart CC, Greene CM, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG. Elastolytic proteases: inflammation resolution and dysregulation in chronic infective lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005;171:1070-6.
92. Ulrich M, Worlitzsch D, Viglio S, et al. Alveolar inflammation in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2010;9:217-27.
93. Brockbank S, Downey D, Elborn JS, Ennis M. Effect of cystic fibrosis exacerbations on neutrophil function. *International immunopharmacology* 2005;5:601-8.
94. Stocker W, Bode W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins. *Current opinion in structural biology* 1995;5:383-90.
95. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology* 2001;17:463-516.
96. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of pathology* 2003;200:448-64.
97. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007;8:221-33.
98. Gaggar A, Hector A, Bratcher PE, Mall MA, Griesse M, Hartl D. The role of matrix metalloproteinases in cystic fibrosis lung disease. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2011;38:721-7.
99. Brown MD, Hudlicka O. Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. *Angiogenesis* 2003;6:1-14.
100. Kumagai K, Ohno I, Okada S, et al. Inhibition of matrix metalloproteinases prevents allergen-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1999;162:4212-9.
101. Geraghty P, Rogan MP, Greene CM, et al. Neutrophil elastase up-regulates cathepsin B and matrix metalloprotease-2 expression. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2007;178:5871-8.
102. Roderfeld M, Rath T, Schulz R, et al. Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2009;8:338-47.
103. Dunsmore SE, Saarialho-Kere UK, Roby JD, et al. Matrilysin expression and function in airway epithelium. *The Journal of clinical investigation* 1998;102:1321-31.
104. Ratjen F, Hartog CM, Paul K, Wermelt J, Braun J. Matrix metalloproteases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha. *Thorax* 2002;57:930-4.
105. Sagel SD, Kapsner RK, Osberg I. Induced sputum matrix metalloproteinase-9 correlates with lung function and airway inflammation in children with cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology* 2005;39:224-32.
106. Hilliard TN, Regamey N, Shute JK, et al. Airway remodelling in children with cystic fibrosis. *Thorax* 2007;62:1074-80.
107. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science (New York, NY)* 1997;277:2002-4.

108. Houghton AM, Hartzell WO, Robbins CS, Gomis-Ruth FX, Shapiro SD. Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature* 2009;460:637-41.
109. Dasilva AG, Yong VW. Expression and regulation of matrix metalloproteinase-12 in experimental autoimmune encephalomyelitis and by bone marrow derived macrophages in vitro. *Journal of neuroimmunology* 2008;199:24-34.
110. Trojanek JB C-CA, Diemer S, Kormann M, Schubert SC, Zhou-Suckow Z, Agrawal R, Duerr J, Wagner CJ, Schatterny J, Hirtz S, Sommerburg O, Hartl D, Schultz C, Mall MA. Airway Mucus Obstruction Triggers Macrophage Activation and MMP12-dependent Emphysema. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2014.
111. Gaggar A LY, Weathington N, Winkler M, Kong M, Jackson P, Blalock JE, Clancy JP. Matrix metalloprotease-9 dysregulation in lower airway secretions of cystic fibrosis patients. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L96-L104.
112. Jensen PO, Moser C, Kharazmi A, Presler T, Koch C, Hoiby N. Increased serum concentration of G-CSF in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2006;5:145-51.
113. Martin SL, Moffitt KL, McDowell A, et al. Association of airway cathepsin B and S with inflammation in cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology* 2010;45:860-8.
114. Sagel SD, Sontag MK, Wagener JS, Kapsner RK, Osberg I, Accurso FJ. Induced sputum inflammatory measures correlate with lung function in children with cystic fibrosis. *The Journal of pediatrics* 2002;141:811-7.
115. Eickmeier O, Huebner M, Herrmann E, et al. Sputum biomarker profiles in cystic fibrosis (CF) and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and association between pulmonary function. *Cytokine* 2010;50:152-7.
116. Sloane AJ, Lindner RA, Prasad SS, et al. Proteomic analysis of sputum from adults and children with cystic fibrosis and from control subjects. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005;172:1416-26.
117. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiological reviews* 1997;77:1033-79.
118. Andersson CK, Andersson-Sjoland A, Mori M, et al. Activated MCTC mast cells infiltrate diseased lung areas in cystic fibrosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory research* 2011;12:139.
119. Del Porto P, Cifani N, Guarnieri S, et al. Dysfunctional CFTR alters the bactericidal activity of human macrophages against *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS one* 2011;6:e19970.
120. Ratner D, Mueller C. Immune responses in cystic fibrosis: are they intrinsically defective? *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2012;46:715-22.
121. Zaman MM, Gelrud A, Junaidi O, et al. Interleukin 8 secretion from monocytes of subjects heterozygous for the deltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutation is altered. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 2004;11:819-24.
122. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *The Journal of experimental medicine* 1994;179:1895-902.
123. Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 2001;414:920-4.
124. Bozza M, Satoskar AR, Lin G, et al. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *The Journal of experimental medicine* 1999;189:341-6.
125. Adamali H, Armstrong ME, McLaughlin AM, et al. Macrophage migration inhibitory factor enzymatic activity, lung inflammation, and cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2012/05/18 ed2012:162-9.

126. Balghi H, Robert R, Rappaz B, et al. Enhanced Ca²⁺ entry due to Orai1 plasma membrane insertion increases IL-8 secretion by cystic fibrosis airways. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2011;25:4274-91.
127. Brodlie M, McKean MC, Johnson GE, et al. Raised interleukin-17 is immunolocalised to neutrophils in cystic fibrosis lung disease. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2011;37:1378-85.
128. Tan HL, Regamey N, Brown S, Bush A, Lloyd CM, Davies JC. The Th17 pathway in cystic fibrosis lung disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011;184:252-8.
129. McAllister F, Henry A, Kreindler JL, et al. Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2005;175:404-12.
130. Decraene A, Willems-Widyastuti A, Kasran A, De Boeck K, Bullens DM, Dupont LJ. Elevated expression of both mRNA and protein levels of IL-17A in sputum of stable Cystic Fibrosis patients. *Respiratory research* 2010;11:177.
131. Xu Y, Tertilt C, Krause A, Quadri LE, Crystal RG, Worgall S. Influence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator on expression of lipid metabolism-related genes in dendritic cells. *Respiratory research* 2009;10:26.
132. Roghanian A, Drost EM, MacNee W, Howie SE, Sallenave JM. Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006;174:1189-98.
133. Schneiderman JE WD, Atenafu EG, Nguyen T, Wells GD, Alarie N, Tullis E, Lands LC, Coates AL, Corey M, Ratjen F. Longitudinal relationship between physical activity and lung health in patients with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2014;43:817-23.
134. Spanevello A, Migliori GB, Sharara A, et al. Induced sputum to assess airway inflammation: a study of reproducibility. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 1997;27:1138-44.
135. Pizzichini E, Pizzichini MM, Efthimiadis A, et al. Indices of airway inflammation in induced sputum: reproducibility and validity of cell and fluid-phase measurements. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996;154:308-17.
136. Quittner AL BA, Messer MA, Modi AC, Watrous M. Development and validation of The Cystic Fibrosis Questionnaire in the United States: a health-related quality-of-life measure for cystic fibrosis. *Chest* 2005;128:2347-54.
137. Borg GA. Psychophysical bases of perceived exertion. *Med Sci Sports Exerc* 1982;14:377-81.
138. Wilson RC, Jones, P.W. A comparison of the visual analogue scale and modified Borg scale for the measurement of dyspnoea during exercise. *Clin Sci (Lond)* 1989;Mar;76.:277-82.
139. Quittner AL, Modi AC, Wainwright C, Otto K, Kirihara J, Montgomery AB. Determination of the minimal clinically important difference scores for the Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised respiratory symptom scale in two populations of patients with cystic fibrosis and chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway infection. *Chest* 2009;Jun;135.:1610-8.
140. Konstan MW, Berger M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatric pulmonology* 1997;24:137-42; discussion 59-61.
141. Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, et al. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995;152:2111-8.
142. Paul K, Rietschel E, Ballmann M, et al. Effect of treatment with dornase alpha on airway inflammation in patients with cystic fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2004;169:719-25.

143. Osika E, Cavaillon JM, Chadelat K, et al. Distinct sputum cytokine profiles in cystic fibrosis and other chronic inflammatory airway disease. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 1999;14:339-46.
144. Rosa JS, Schwindt CD, Oliver SR, Leu SY, Flores RL, Galassetti PR. Exercise leukocyte profiles in healthy, type 1 diabetic, overweight, and asthmatic children. *Pediatric exercise science* 2009;21:19-33.
145. Lavie CJ, Church TS, Milani RV, Earnest CP. Impact of physical activity, cardiorespiratory fitness, and exercise training on markers of inflammation. *Journal of cardiopulmonary rehabilitation and prevention* 2011;31:137-45.
146. West JB. *Structure and function*. 8th ed. ed. Philadelphia (PA): Lippincott Williams and Wilkins; 2008.
147. Cholewa JM, Paolone VJ. Influence of exercise on airway epithelia in cystic fibrosis: a review. *Medicine and science in sports and exercise* 2012;44:1219-26.
148. van de Weert-van Leeuwen PB, Arets, H.G.M., van der Ent, K.C., Beekman, J.M. Infection, inflammation and exercise in cystic fibrosis. . *Respiratory research* 2013;14.