

Université de Montréal

**IMPORTANCE DU STRESS OXYDANT DANS LE
DIABÈTE SECONDAIRE À LA FIBROSE KYSTIQUE**

par

Thierry NTIMBANE

Département de Nutrition

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Nutrition

décembre 2009

© Thierry Ntimbane, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

IMPORTANCE DU STRESS OXYDANT DANS LE DIABÈTE ASSOCIÉ À LA
FIBROSE KYSTIQUE

Présentée par :
Thierry Ntimbane

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-Marie EKOE, président-rapporteur
Dr Émile LEVY, directeur de recherche
Dre Blandine COMTE, co-directeur
Dre Guylaine FERLAND, membre du jury
Dr Abdel KHALIL, examinateur externe
Dre Madhu B. Anand-Srivastava, représentante du Doyen

RÉSUMÉ

Introduction : La fibrose kystique (FK) est une maladie génétique mortelle qui touche principalement les poumons et l'appareil digestif. Elle est causée par des mutations sur le gène codant la protéine du CFTR, un canal chlore exprimé à la surface des organes à sécrétions exocrines. Les fonctions principales du CFTR sont les suivantes: 1) la régulation de l'homéostasie ionique des sécrétions; 2) le maintien de la fluidité des sécrétions et; 3) le transport du glutathion. Le dysfonctionnement de la protéine du CFTR rend les sécrétions visqueuses et épaisses, avec des phénomènes obstructifs qui sont responsables de l'apparition de fibrose au sein des divers organes. Dans le poumon, l'accumulation du mucus épais rend difficile l'élimination des bactéries inhalées, ces dernières établissent alors des cycles d'infection qui endommagent les tissus pulmonaires à travers des processus inflammatoires. Dans le tube digestif, le mucus épais entrave l'absorption d'une quantité suffisante d'éléments nutritifs incluant les principaux antioxydants. L'infection et l'inflammation des poumons favorisent l'apparition d'un stress oxydant qui détruit davantage le tissu pulmonaire. Le déficit en glutathion, probablement lié au dysfonctionnement de la protéine du CFTR, et la malabsorption des antioxydants favorisent l'augmentation du stress oxydant. Une augmentation du stress oxydant a été démontrée au cours du diabète et les produits dérivés du stress oxydant ont été mis en évidence dans la pathogenèse des complications associées au diabète. Une augmentation du stress oxydant a également été montrée durant la FK, mais sans pour autant expliquer la survenue du diabète secondaire à la FK dont la prévalence augmente sans cesse. **Objectifs** : Notre étude consiste à évaluer l'impact du stress oxydant dans les anomalies du métabolisme du glucose

durant la FK, et à étudier son rôle dans les mécanismes de sécrétion d'insuline induite par le glucose. Pour ce faire, nous avons déterminé l'impact de la peroxydation lipidique sur la tolérance au glucose et la défense antioxydante globale, *in vivo*, chez des patients FK présentant une altération du métabolisme du glucose. De plus, nous avons évalué le rôle du stress oxydatif sur la synthèse et la sécrétion d'insuline, *in vitro*, dans les cellules pancréatiques β TC-tet. **Résultats** : Dans l'étude *in vivo*, nous avons démontré que l'intolérance au glucose et le diabète étaient associés à une augmentation de la peroxydation lipidique, traduite par la hausse des niveaux sanguins de 4-hydroxynonanal lié aux protéines (HNE-P). La défense antioxydante évaluée par la mesure du glutathion sanguin démontre que les niveaux de glutathion oxydé restent également élevés avec l'intolérance au glucose. Dans l'étude *in vitro*, nos résultats ont mis en évidence que l'exposition de la cellule β TC-tet au stress oxydant: 1) induit un processus de peroxydation lipidique; 2) augmente la sécrétion basale d'insuline; 3) diminue la réponse de la sécrétion d'insuline induite par le glucose; et 4) n'affecte que légèrement la synthèse *de novo* de l'insuline. Nous avons aussi démontré que les cellules pancréatiques β TC-tet résistaient au stress oxydant en augmentant leur synthèse en glutathion tandis que la présence d'un antioxydant exogène pouvait restaurer la fonction sécrétoire de ces cellules. **Conclusion** : Le stress oxydant affecte le fonctionnement de la cellule pancréatique β de plusieurs manières : 1) il inhibe le métabolisme du glucose dont les dérivés sont nécessaires à la sécrétion d'insuline; 2) il active la voie de signalisation impliquant les gènes pro-inflammatoires et; 3) il affecte l'intégrité membranaire en induisant le processus de peroxydation lipidique.

Mots-clés : Fibrose kystique, stress oxydant, peroxydation lipidique, sécrétion d'insuline, diabète.

ABSTRACT

Introduction: Cystic fibrosis (CF) is the most prevalent lethal genetic disorder affecting mostly lungs and the gastro-intestinal tract. CF is caused by mutations in the gene encoding the CFTR protein, a chloride channel expressed in organs with exocrine secretions. The main functions of the CFTR channel are the following: 1) regulation of electrolyte composition of secretions; 2) maintenance of fluid secretions and; 3) transport of glutathione. The CFTR protein dysfunction leads to thick and viscous secretions with obstructive phenomena responsible for fibrosis occurrence in various organs. In the lungs, accumulation of the thick mucus reduces their capacity to eliminate inhaled bacteria responsible for repeated infections and pulmonary tissue damage through inflammatory processes. In the gastro-intestinal tract, the thickened mucus leads to nutritive elements and the major antioxidants malabsorption. Increased oxidative stress has been associated with the onset of diabetes and oxidative stress by-products have been involved in the pathogenesis of diabetic complications. Increased oxidative stress has also been shown in CF but the relationship between oxidative stress and the occurrence of CF-related diabetes (CFRD) remains unclear. **Objectives:** Our study aims to investigate the role of oxidative stress in the impaired glucose metabolism in CF patients and its relation with the altered glucose-stimulated insulin secretion process. We first determined the impact of lipid peroxidation on glucose tolerance and the antioxidant status in CF patients with altered glucose tolerance. Secondly, we evaluated the role of oxidative stress on insulin synthesis and secretion in the murine pancreatic β -cell line β TC-tet. **Results:** In CF patients, we demonstrated that conditions of glucose intolerance and diabetes are associated with

increased lipid peroxidation as seen with increased blood levels of 4-hydroxynonenal bound to proteins (HNE-P). The antioxidant status evaluated with blood levels of glutathione showed a strong correlation between levels of oxidized glutathione and glucose intolerance. Acute exposure of β TC-tet to oxidative stress led to: 1) increased lipid peroxidation marker levels; 2) increased insulin release in basal conditions; 3) altered glucose-stimulated insulin secretion process and; 4) no effect on the insulin synthesis pathway. We also demonstrated that pancreatic β TC-tet cells can fight against oxidative stress by upregulating their glutathione synthesis whereas the presence of an exogenous antioxidant can restore their secretory function. **Conclusion:** Oxidative stress can induce β -cell dysfunction through many pathways: 1) it inhibits the glucose metabolism and its by-products which are required for insulin secretion, 2) it activates the signalling pathway involving the pro-inflammatory genes and; 3) it damages the cell structure by inducing the lipid peroxidation process.

Keywords: Cystic fibrosis, oxidative stress, lipid peroxidation, insulin secretion, diabetes.

Table des matières

1	INTRODUCTION	1
1.1	FIBROSE KYSTIQUE : GÈNE ET PROTÉINE DU CFTR	2
1.1.1	HISTORIQUE.....	2
1.1.2	PATHOPHYSIOLOGIE.....	3
1.1.3	GÈNE DU <i>CFTR</i>	7
1.1.3.1	Description du gène du <i>CFTR</i>	7
1.1.3.2	Mutations du gène du <i>CFTR</i>	8
1.1.3.3	Incidence des mutations sur la pathologie	13
1.1.3.4	Incidence des mutations dans la population.....	15
1.1.4	PROTÉINE DU CFTR.....	16
1.1.4.1	Biosynthèse	16
1.1.4.2	Structure	18
1.1.4.3	Fonction	20
1.2	STRESS OXYDANT ET FIBROSE KYSTIQUE	25
1.2.1	HISTORIQUE.....	25
1.2.2	LES OXYDANTS CELLULAIRES.....	27
1.2.2.1	Les oxydants radicalaires	28
1.2.2.1.1	Le superoxyde	32
1.2.2.1.2	Le radical hydroxyle	33
1.2.2.1.2	Le radical peroxyde.....	35
1.2.2.1.3	L'oxyde nitrique	36
1.2.2.2	Les oxydants non radicalaires	37
1.2.2.2.1	Le peroxyde d'hydrogène.....	39
1.2.2.2.2	Le peroxyde nitrique.....	39
1.2.3	LES PRINCIPALES SOURCES DE ROS ET RNS	40
1.2.3.1	La chaîne respiratoire mitochondriale.....	41
1.2.3.2	Les cellules phagocytaires	43

1.2.3.3	Les oxydases	45
1.2.3.3.1	La xanthine oxydoréductase	45
1.2.3.3.2	La monoamine oxydase	46
1.2.3.3.3	Les oxyde nitrique synthases	47
1.2.3.3.4	La myéloperoxydase	49
1.2.3.3.5	Les lipoxygénases	50
1.2.3.3.6	Les métaux de transition	50
1.2.4	LES ANTIOXYDANTS CELLULAIRES	51
1.2.4.1	Les antioxydants enzymatiques	52
1.2.4.1.1	Les superoxydes dismutases	53
1.2.4.1.2	La catalase	54
1.2.4.1.3	La glutathion peroxydase	55
1.2.4.1.4	Les peroxyredoxines	59
1.2.4.1.5	Les thioredoxines et glutarédoxines	60
1.2.4.2	Les antioxydants non enzymatiques	63
1.2.4.2.1	Le glutathion	63
1.2.4.2.2	L'acide ascorbique	65
1.2.4.2.3	L'acide urique	67
1.2.4.2.4	La bilirubine et l'albumine	67
1.2.4.2.5	Le tocophérol	68
1.2.4.2.6	Le coenzyme Q ₁₀	70
1.2.5	LA BALANCE OXYDANTS/ANTIOXYDANTS	72
1.2.5.1	Le potentiel redox	73
1.2.5.2	Le statut redox	74
1.2.5.3	Les réactions redox et la signalisation cellulaire	75
1.2.5.3.1	Modifications rédox des protéines	75
1.2.5.3.2	Modifications des voies de signalisation	76
1.2.5.3.2.1	<u>Inhibition des protéines phosphatases</u>	76
1.2.5.3.2.2	<u>Activation des protéines kinases</u>	77

1.2.5.3.2.3	<u>Activation des facteurs de transcription</u>	78
1.2.6	STRESS OXYDANT DANS LA FIBROSE KYSTIQUE	81
1.2.6.1	La peroxydation lipidique	84
1.2.6.1.1	Les aldehydes	87
1.2.6.1.1.1	<u>Le 4-Hydroxynonéal</u>	87
1.2.6.1.1.2	<u>Le malondialdéhyde</u>	90
1.2.6.1.1.3	<u>Les F₂-isoprostanes</u>	91
1.2.6.2	L'oxydation des protéines	94
1.2.6.3	L'oxydation de l'ADN	94
1.3	STRESS OXYDANT ET DIABÈTE.....	95
1.3.1	MÉCANISMES DU STRESS OXYDANT DANS LE DIABÈTE	98
1.3.1.1	Stress oxydant et synthèse d'insuline.....	98
1.3.1.2	Stress oxydant et sécrétion d'insuline	99
1.3.1.3	Stress oxydant et résistance à l'insuline.....	101
1.3.1.4	Stress oxydant et CFRD	103
1.3.1.4.1	Étiologie et épidémiologie du CFRD	103
1.3.1.4.1.1	<u>Étiologie</u>	103
1.3.1.4.1.2	<u>Épidémiologie</u>	104
1.3.1.4.2	Classification et Physiopathologie du CFRD	105
1.3.1.4.2.1	<u>Classification</u>	105
1.3.1.4.2.2	<u>Physiopathologie</u>	106
1.3.1.4.3	Prise en charge du CFRD	108
2	BUTS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	111
3	ARTICLE 1	115
4	ARTICLE 2.....	166
5	ARTICLE 3.....	256
6	DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	303
6.1	STRESS OXYDANT ET CFRD	306
6.2	STRESS OXYDANT ET SÉCRÉTION D'INSULINE	313

6.2.1	Stress oxydant, peroxydation lipidique et sécrétion d'insuline.....	316
6.2.2	Stress oxydant, réponse antioxydante et inflammation.....	320
7	PERSPECTIVES	326
	Bilan des essais thérapeutiques avec des traitements antioxydants dans la FK.....	328
8	RÉFÉRENCES.....	333

Liste des tableaux

Tableau 1 Radicaux libres et leur réactivité dans les systèmes biologiques	31
Tableau 2 Réactivité des oxydants non radicalaires	38
Tableau 3 : Isoformes des glutathion peroxydases chez les mammifères.....	56

Liste des figures

Figure 1 : Principaux organes touchés par la fibrose kystique.....	4
Figure 2 : Du gène du <i>CFTR</i> à la protéine du CFTR	8
Figure 3 : Délétion de la phénylalanine en position 508 dans la protéine du CFTR	10
Figure 4 : Classes de mutations et leurs effets sur la protéine du CFTR	12
Figure 5 : Mutation $\Delta F508$ et dégradation de la protéine du CFTR	17
Figure 6 : Structure et fonctionnement du canal CFTR	19
Figure 7 : Protéine du CFTR et ses interactions protéiques.....	23
Figure 8 : Représentation des diverses fonctions de la protéine du CFTR	25
Figure 9 : Chaîne respiratoire mitochondriale	43
Figure 10 : Représentation de NOX2 et ses sous-unités constitutives.....	44
Figure 11 : Représentation schématique d'oxyde nitrique synthase.....	48
Figure 12 : Réduction des cystéines oxydées par le système Thiorédoxine/Glutarédoxine	62
Figure 13 : Représentation de la molécule de glutathion réduit	64
Figure 14 : Représentation de l'acide ascorbique	66
Figure 15 : Représentation de l'acide urique	67
Figure 16 : Représentation de l' α -tocophérol	69
Figure 17 : Formes oxydée, radicalaire et réduite du Coenzyme Q ₁₀	71
Figure 18 : Régulation redox et stress oxydant.....	73
Figure 19 : Couples redox et leur participation dans l'équilibre redox.....	74
Figure 20 : Étapes du processus de peroxydation lipidique.....	86
Figure 21 : Molécule de 4-hydroxy-2-nonéanal avec ses insaturations α et β	88
Figure 22 : Principales voies métaboliques du HNE	89
Figure 23 : Tautomérie au sein de la molécule de MDA	90
Figure 24 : Structure et formation des F ₂ -isoprostanes.....	93
Figure 25 : Étapes conduisant à l'exocytose des granules d'insuline	100
Figure 26 : Mécanismes liant le stress oxydant à la résistance à l'insuline	101

Liste des abbréviations

α -TO•	:	Radical alpha-tocophéryl
α -TOH	:	Alpha-tocophérol
AA	:	Acide arachidonique
AAL	:	Acide alpha linoléinique
ABC	:	ATP binding cassette
ADH	:	Acide docosahexanoïque
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADP	:	Adénosine diphosphate
AEP	:	Acide eicosapentaénoïque
AGE	:	Advanced glycation product
AGPI	:	Acide gras poly-insaturé
AL	:	Acide linoléique
AMPc	:	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	:	Activator protein-1
ARNm	:	Acide ribonucléique messenger
Asc	:	Ascorbate
ATP	:	Adénosine triphosphate
BH ₄	:	(6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin
Ca	:	Calcium
CF	:	Cystic fibrosis
CFRD	:	Cystic fibrosis related-diabetes

CFTR	:	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cl ⁻	:	Ions chlorures
ClO ⁻	:	Hypochlorite
Cu	:	Cuivre
DSP	:	Dual specificity phosphatase
DuOX	:	Dual oxydase
ec	:	Extracellulaire
ENaC	:	Epithelial sodium channel
eNOS	:	NO synthase endothéliale
ERK	:	Extracellular signal-regulated kinase
FAD	:	Flavin adenine dinucléotide
Fe	:	Fer
FK	:	Fibrose kystique
GPx	:	Glutathion peroxydase
GR	:	Glutathion réductase
GSH	:	Glutathion
GSSG	:	Glutathion disulfide
GST	:	Glutathion transférase
HCO ₃ ⁻	:	Bicarbonates
H ₂ O	:	Eau
H ₂ O ₂	:	Peroxyde d'hydrogène
HI	:	Haemophilus influenzae

HNE	:	4-Hydroxynonenal
HOCl	:	Acide hypochlorique
IL	:	Interleukine
IGT	:	Impaired glucose tolerance
I κ B	:	Inhibitor kappa B
iNOS	:	NO synthase inductible
IPF _{2α} -III	:	8-iso-prostaglandine F _{2α} (isoprostanes)
IR	:	Insulin receptor
IRS	:	Insulin receptor substrate
JNK	:	c-Jun N-terminal kinase
kDa	:	kilodalton
kg	:	kilogramme
LDL	:	Low density lipoprotein
LOO \bullet	:	Radical lipidique peroxy
LOOH	:	Hydroperoxyde lipidique
LTB ₄	:	Leucotriène B ₄
MAPK	:	Mitogen-activated protein kinase
MBL	:	Mannose binding lectin
MDA	:	Malonyldialdéhyde
mg	:	Milligramme
mmol	:	Millimole
Mn	:	Manganèse

MSD	:	Membrane spanning domain
Na	:	Sodium
NADH	:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
NBD	:	Nucleotide binding domain
NF- κ B	:	Nuclear factor-kappa B
nNOS	:	NO synthase neuronale
NO	:	Oxyde nitrique
NO ₂ [•]	:	Radical dioxyde d'azote
NOX	:	NADPH oxydase
NR	:	Non radicalaire
Nrf2	:	Nuclear-related-factor-2
O ₂	:	Oxygène moléculaire
O ₂ ^{•-}	:	Anion superoxyde
OH [•]	:	Radical hydroxyl
ONOO ⁻	:	Peroxyde nitrique
ONOOH	:	Acide peroxyntrique
ORCC	:	Outward rectifying chloride channel
PA	:	Pseudomonas aeruginosa
PI-3-kinase	:	Phospahtidylinostol-3-kinase
PK	:	Protéine kinase
Prdx	:	Peroxyredoxine

PP	:	Protéine phosphatase
PPAR	:	Proliferator-activated receptor
PPRE	:	PPAR Response Element
PTP	:	Protéine tyrosine phosphatase
RAGE	:	Récepteur des « Advanced glycation products »
RE	:	Réticulum endoplasmique
RNS	:	Reactive nitrogen species
ROMK	:	Renal outer medullary potassium channel
ROO•	:	Radical peroxy
ROS	:	Reactive oxygen species
SA	:	Staphylococcus aureus
SH	:	Groupement thiol
SNARE	:	SNAREceptor
SOD	:	Superoxyde dismutase
TMD	:	Transmembrane domain
TNF- α	:	Tumor necrosis factor alpha
Trx	:	Thioredoxine
Trx-R	:	Thioredoxine réductase
XDH	:	Xanthine déshydrogénase
XO	:	Xanthine oxydase
XOR	:	Xanthine oxydoréductase
Zn	:	Zinc

Pour mes défunts parents

Remerciements

J'adresse de profonds et sincères remerciements à mes directeurs de thèse, le Dr Emile Levy et le Dre Blandine Comte, pour leur aide et soutien dans l'accomplissement de ce doctorat. Grâce à eux, j'ai pu apprendre les bases et les rudiments de la recherche nord américaine. Le Dre Comte a commencé mon initiation avec rigueur et délicatesse, en m'inculquant des valeurs telles que la motivation, l'ardeur au travail et le désir d'aller plus loin dans la recherche. Le Dr Levy a parachevé cette initiation en devenant mon mentor au cours de mes dernières années de doctorat. Il m'a appris la persévérance, le sens des responsabilités et les bienfaits du travail en équipe. Je vous exprime toute ma reconnaissance et ma profonde gratitude.

J'adresse mes sincères remerciements à toute l'équipe du laboratoire pour les encouragements et les conseils prodigués à mon égard. Je remercie particulièrement le Dre Geneviève Mailhot pour son aide, son assistance et ses précieux conseils durant mes manipulations en laboratoire. Je remercie spécialement Mme Carole Garofalo pour sa gentillesse et son support technique dans la mise au point des mes divers protocoles de recherche. Je remercie Mme Schohraya Spahis pour son aide et sa disponibilité au quotidien. Je remercie très particulièrement M. Maurice Bouity-Voubou pour son amitié et son support moral.

J'adresse de profonds remerciements à mes défunts parents pour leur amour et leur soutien dans les études. Ils m'ont appris à ne jamais baisser les bras et je leur dois ce diplôme aujourd'hui. Je remercie toute ma famille pour le soutien et les conseils.

1 INTRODUCTION

1.1 FIBROSE KYSTIQUE : GÈNE ET PROTÉINE DU CFTR

1.1.1 HISTORIQUE

La fibrose kystique du pancréas (FK) est aussi connue sous le nom de *cystic fibrosis* (CF) ou mucoviscidose (mucus visqueux). Elle représente une maladie génétique de transmission autosomique récessive dont la fréquence varie selon les groupes ethniques, avec une forte prévalence dans les populations d'origine caucasienne. Au Canada, la FK affecte en moyenne un nouveau-né sur 3 600 [1] tandis qu'au Québec elle touche une naissance sur 1 200, une proportion estimée à une personne sur 20 [2]. Selon le rapport du registre canadien pour l'année 2007, une personne sur 25 correspond à un porteur asymptomatique de la mutation responsable de la FK.

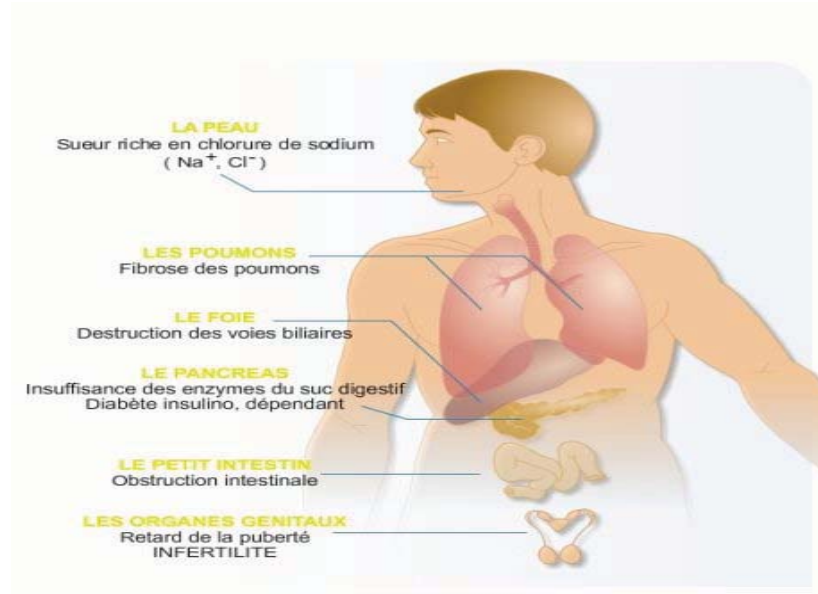
Les premières observations de la maladie datent du XVI^{ème} siècle mais l'absence de corrélation entre les différents symptômes et la maladie rendait le diagnostic difficile. Vers la fin des années 1930, le Dr Fanconi et son équipe décrivent pour la première fois cette maladie au cours des bronchiectasies (dilatation des bronches) survenant en majorité chez les enfants. Avec une espérance de vie moyenne de 5 ans pour les malades à cette époque, la FK était rare chez l'adulte et n'était par ailleurs identifiée qu'après le décès de l'enfant qui survenait à la suite de complications pulmonaires ou pour cause de malnutrition. L'origine génétique de la FK est découverte dans les années 1940 [3] et l'anomalie de

transport des électrolytes est découverte par Di Sant’Agnese et ses collaborateurs en 1953 [4]. En 1983, Quinton et ses collaborateurs découvrent qu’une anomalie dans le transport des ions chlorures (Cl⁻) est à l’origine de la maladie [5]. Dès lors, la mesure systématique de la concentration en ions chlorures dans la sueur est devenue un outil de diagnostic incontournable pour le dépistage de la FK. En 1985, les travaux de recherche sur la FK aboutissent à l’identification et à la localisation du gène *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)* [6] dont les mutations sont à l’origine de la maladie. La caractérisation de la protéine du CFTR, codée par le gène du *CFTR*, dont l’absence et/ou le dysfonctionnement sont impliqués dans la FK survient en 1989 après d’intenses travaux biochimiques électrophysiologiques [7-9].

1.1.2 PATHOPHYSIOLOGIE

Les manifestations de la FK surviennent dans la majorité des organes à sécrétions exocrines (figure 1) comme les voies respiratoires, le tractus gastro-intestinal, les glandes sudoripares et les organes sexuels. L’expression de la protéine du CFTR au sein de ces différents organes permet le passage des ions chlorures, assure la composition électrolytique des sécrétions organiques et favorise la fluidité de ces dernières.

Figure 1 : Principaux organes touchés par la fibrose kystique



Tirée de : www.planetegene.com

Le dysfonctionnement de la protéine du CFTR en qualité de canal chlore est à l'origine d'un défaut de sécrétion d'ions chlorures et d'eau au niveau des épithélia respiratoires. La réduction et/ou la suppression du transport des ions chlorures au niveau de ces épithélia cause une hyper-absorption de sodium et d'eau à partir de la lumière pour produire un mucus déshydraté et visqueux. La présence d'un tel mucus engendre des phénomènes obstructifs qui conduisent à long terme à la destruction du tissu pulmonaire [10, 11]. L'insuffisance respiratoire représente la majeure cause de mortalité chez les patients FK et la détérioration de la fonction pulmonaire survient par ailleurs suite à une inflammation chronique aggravée par des infections bactériennes récurrentes par des

germes spécifiques comme *Staphylococcus aureus* (SA), *Haemophilus influenzae* (HI) et *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

Parallèlement à ce qui est observé dans les poumons, une sécrétion altérée de Cl⁻ est à l'origine de la production d'un mucus épais responsable de l'obstruction des canaux pancréatiques. Les enzymes digestives sont alors séquestrées au niveau du pancréas où elles s'activent prématurément en entraînant la fibrose et la destruction de l'organe. Par ailleurs, l'absence de sécrétion d'ions chlorures produit un suc pancréatique appauvri en eau et en ions bicarbonates [12-15] ainsi qu'en enzymes pancréatiques [16], favorable à la précipitation des sécrétions acineuses riches en protéines [17]. Ces précipitations forment des obstacles ductulaires responsables de l'atrophie du pancréas qui donnent progressivement naissance à une insuffisance pancréatique qui devient symptomatique lorsque environ 98% de la fonction pancréatique a disparu [18]. Les analyses des lésions histologiques du pancréas montrent une obstruction des canaux proximaux par des sécrétions visqueuses, des acini peu développés voire détruits, une surcharge lipidique et la destruction progressive du tissu pancréatique fonctionnel par la fibrose [13, 19-21]. L'évolution de l'insuffisance pancréatique exocrine vers l'atrophie du pancréas en général et l'extension de la fibrose jusqu'au pancréas endocrine en particulier, notamment les îlots de Langerhans, sont retenues comme les principales causes favorisant la survenue du diabète secondaire à la FK ou *cystic fibrosis related-diabetes* (CFRD). Le CFRD apparaît majoritairement chez les malades ayant une insuffisance pancréatique exocrine ainsi que

ceux souffrant d'insuffisance respiratoire [22], devenant ainsi une importante complication de la FK qui est associée à une augmentation de la mortalité et de morbidité [23].

Un tiers des patients FK possède des défauts dans les fonctions hépatiques à cause de l'obstruction des petites voies biliaires qui est à l'origine d'un défaut de sécrétion des acides biliaires et de la survenue de cirrhose biliaire. Des sécrétions visqueuses et épaisses vont perturber les fonctions digestives et métaboliques tant au niveau hépatique qu'au niveau intestinal. Plus de 10% des enfants touchés par la FK présentent une obstruction de l'intestin par un méconium anormalement épais et visqueux (iléus méconial) résultant d'une sécrétion d'enzymes pancréatiques insuffisante. L'adhésion du méconium aux cellules des villosités intestinales va créer une barrière physicochimique qui limite la diffusion et l'absorption des nutriments [24]. De manière concomitante, le pool réduit d'acides biliaires est mal réabsorbé dans l'iléon [19] et majore par la même occasion la malabsorption lipidique [25]. La stéatorrhée qui émane de la malabsorption lipidique va induire un déséquilibre prononcé au niveau de la balance énergétique et favoriser le développement d'une malnutrition [26-28], faisant de l'atteinte gastro-intestinale la deuxième cause de mortalité chez les malades FK.

Divers progrès ont été réalisés dans le domaine de la recherche clinique et fondamentale si bien que l'espérance de vie moyenne des patients FK a considérablement augmenté, passant de 17 ans au cours de la dernière décennie à 34 ans de nos jours [29].

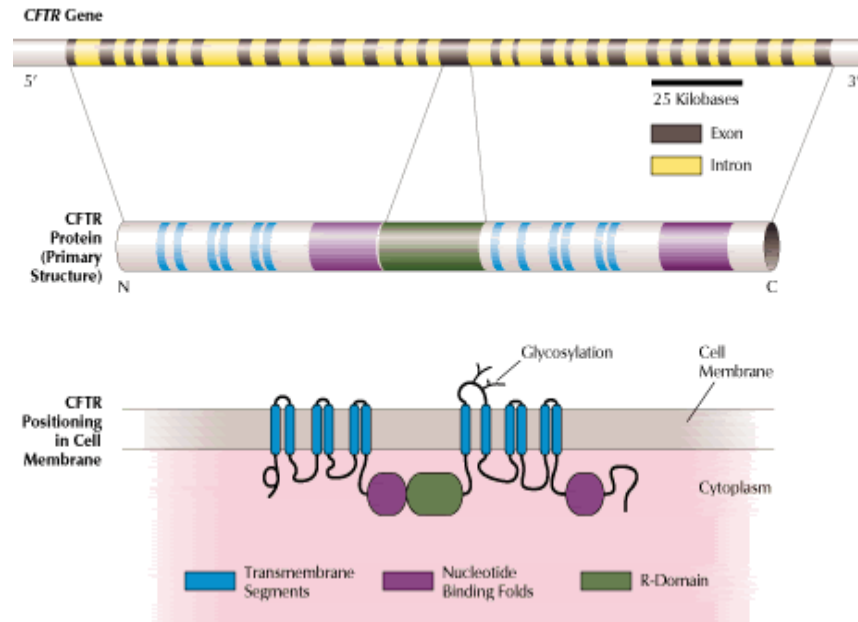
Cependant, cette prolongation de la vie a été associée à l'apparition de nouvelles complications associées à la maladie telles que le diabète, l'ostéoporose et l'agénésie bilatérale des canaux déférents. L'implication du CFRD comme complication sévère de la maladie est souvent citée dans la hausse de la mortalité et de la morbidité des patients. Cependant, l'amélioration des conditions de vie des malades repose essentiellement sur la kinésithérapie respiratoire, l'antibiothérapie pour lutter contre l'infection bronchique et la prise en charge digestive et nutritionnelle.

1.1.3 GÈNE DU *CFTR*

1.1.3.1 Description du gène du *CFTR*

Le gène du *CFTR* se localise sur le bras long du chromosome 7 [6] au niveau du locus q31 [7-9]. Ce gène de 250 kilobases (figure 2) est constitué de 27 exons et code pour la glycoprotéine de 1 480 acides aminés [6-9].

Figure 2 : Du gène du *CFTR* à la protéine du CFTR



Tirée de : www.chromosome7.htmlplanet.com

1.1.3.2 Mutations du gène du *CFTR*

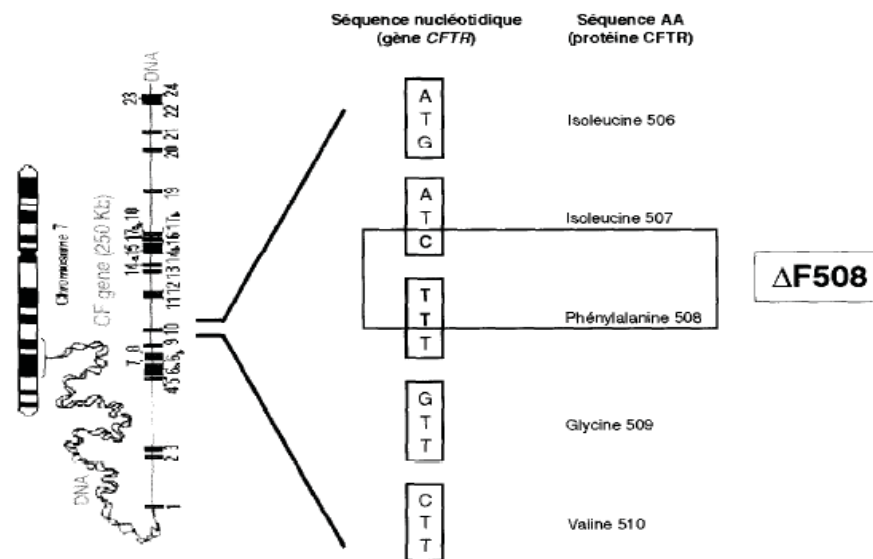
La présence de mutations dans le gène du *CFTR* est à l'origine des manifestations cliniques de la FK à travers l'expression d'une protéine du CFTR non fonctionnelle. Plus de 1600 mutations distinctes, en majorité ponctuelles, ont été identifiées à ce jour et répertoriées au sein d'un consortium international d'études des mutations du gène *CFTR* (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). Ces nombreuses mutations ont été classées selon leur fréquence d'apparition dans la fibrose kystique et elles englobent :

- 42% de mutations faux-sens
- 16% d'insertions ou délétions décalant le cadre de lecture
- 14,5% de variations de séquences
- 12,5% de mutations entraînant un défaut d'épissage
- 3% de larges insertions/délétions
- 2% de courtes insertions/délétions respectant le cadre de lecture
- 0,5% de mutations dans le promoteur du gène.

Les mutations sont regroupées en six classes selon le niveau d'altération de la protéine du CFTR [30], allant du simple dysfonctionnement à l'absence d'expression de la protéine en passant par la réduction de son expression au niveau de la membrane plasmique des organes. À l'époque de sa découverte, la principale mutation identifiée sur le gène *CFTR* représentait une délétion de trois paires de bases à cheval sur les codons 507 (ATC) et 508 (TTT) au niveau de l'exon 10 [9]. Les deux nucléotides provenant du codon 507 (AT) et le nucléotide provenant du codon 508 (T) reconstituent un codon ATT (isoleucine) sans perturbation du cadre de lecture ni changement de sens du codon 507. Cette délétion, bien que courte, entraîne la perte d'un résidu de phénylalanine en position 508 de la protéine du CFTR (figure 3); on parle alors de la mutation $\Delta F508$ à l'origine de la fibrose

kystique. La mutation $\Delta F508$ est retrouvée sur près de 70% des malades, devenant ainsi « la » mutation responsable de la FK. Toutefois, ce chiffre bien qu'important, ne rend pas compte de la grande disparité dans la distribution des mutations impliquées dans la maladie.

Figure 3 : Délétion de la phénylalanine en position 508 dans la protéine du CFTR



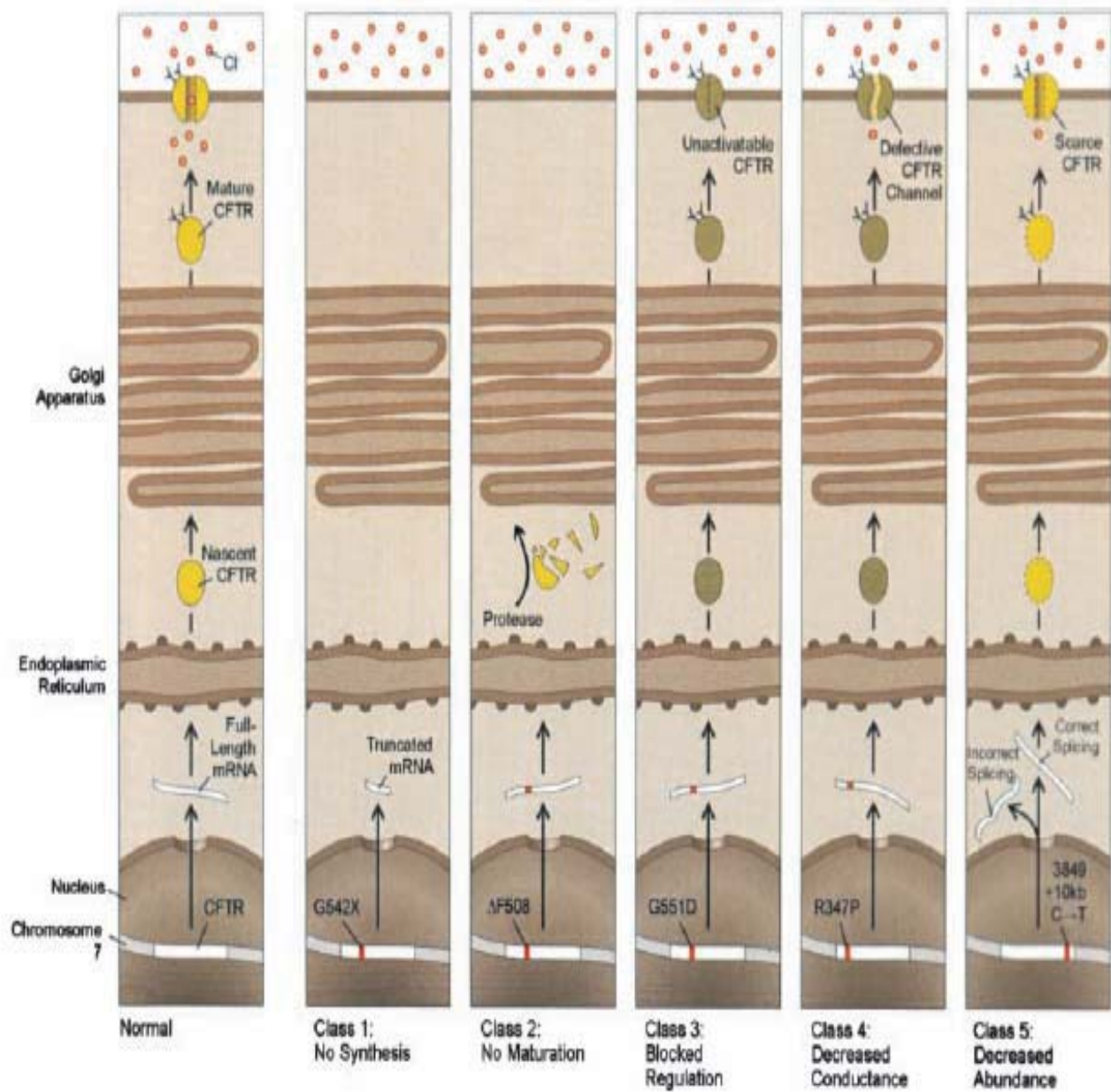
Tirée de Bienvenu et al. [31]

Les mutations de **classe 1** regroupent celles qui provoquent un arrêt prématuré de la traduction aboutissant à une protéine tronquée ou à l'absence de la protéine, et les mutations qui aboutissent à la production d'une protéine aberrante.

De manière générale, les mutations de cette classe induisent une absence de synthèse de la protéine du CFTR car elles englobent les mutations affectant le cadre de

lecture (ex. : 394delTT) dites « frameshift », les mutations non-sens (ex. : G542X) et les mutations affectant l'épissage des introns (ex. : 1717-1G→A). Les mutations de **classe 2** conduisent à un défaut de maturation et une absence de glycosylation de la protéine qui ne se rend pas correctement à la membrane cellulaire. Cette classe comporte des mutations faux-sens (ex. : N1303K) ou des délétions d'acides aminés (ex. : ΔF508). Les mutations de **classe 3** affectent, quant à elles, la régulation de l'activité du canal Cl⁻ de la protéine. Ce sont des mutations faux-sens (ex. : G551D) localisées dans les exons codant pour les domaines de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP). Les mutations de **classe 4** altèrent la conduction ionique et représentent des mutations faux-sens (ex. : R117H) retrouvées dans les exons codant pour les domaines transmembranaires de la protéine. Les mutations de **classe 5** altèrent la stabilité de l'ARN messenger (ARNm). Elles se localisent soit dans le promoteur, soit dans les sites d'épissage du gène *CFTR* (3849+10kbC→T), soit sur sa partie codante avec des mutations faux-sens (ex. : A455E). Ces mutations conduisent à une synthèse protéique réduite [32]. Les mutations de **classe 6** conduisent essentiellement à une réduction de la stabilité de la protéine du CFTR au niveau de la membrane plasmique [32]. En effet, la protéine fonctionnelle est capable d'atteindre la membrane plasmique, mais elle est rapidement dégradée par le protéasome [33-35].

Figure 4 : Classes de mutations et leurs effets sur la protéine du CFTR



Tirée de Tsui et al. [36]

1.1.3.3 Incidence des mutations sur la pathologie

Le développement clinique de la FK au sein des différents organes qu'elle affecte présente une sévérité qui peut être variable d'un patient à un autre, allant de l'insuffisance pancréatique à la détresse respiratoire en passant par la cirrhose hépatique. Encore aujourd'hui, aucune corrélation stricte n'a pu être établie entre la nature de la mutation (génotype) et la manifestation clinique de la maladie (phénotype). Par exemple, l'insuffisance pancréatique semble survenir chez la majorité (90%) des patients homozygotes pour la mutation $\Delta F508$ alors que les patients hétérozygotes pour cette mutation (30%) ainsi que les porteurs d'autres mutations (non $\Delta F508$) sont exemptés de troubles pancréatiques [37-39]. L'insuffisance pancréatique serait associée à la présence de deux mutations dites « sévères », tandis qu'un patient porteur d'une mutation « sévère » et d'une mutation « modérée » restera suffisant pancréatique [37, 40]. Les mutations « sévères » englobent les mutations non-sens, celles affectant les séquences consensus d'épissage et celles entraînant un décalage du cadre de lecture alors que les mutations « modérées » sont représentées essentiellement par les mutations faux-sens [41]. Dans le cadre de l'atteinte pulmonaire, l'on pense que la présence de deux mutations « sévères », surtout la mutation $\Delta F508$, accroît la susceptibilité aux infections bactériennes pulmonaires de manière plus précoce comparativement à la présence d'au moins une mutation « modérée » [38, 42, 43].

L'on pense que le développement de la FK est influencé par les facteurs environnementaux ainsi que d'autres facteurs génétiques [44, 45], distincts du locus codant pour la protéine du CFTR, que l'on appelle « gènes modificateurs » [46-50]. Ces gènes modificateurs peuvent contrôler l'expression phénotypique de la maladie en modulant la susceptibilité à l'infection du patient ou en activant des canaux chlorures différents de la protéine du CFTR [51]. Un exemple bien connu de gène modificateur concerne le gène *MBL* (*mannose-binding lectin*), et la protéine qu'il code, qui est associé à la sévérité de la maladie pulmonaire durant la FK. La protéine MBL appartient au système immunitaire et sert à l'activation du complément et des mutations dans ce gène ont été observées uniquement chez des patients FK ayant une détresse respiratoire une fois infecté par PA [52, 53]. L'atteinte pulmonaire chronique durant la FK repose sur le déséquilibre continu entre les molécules pro- (neutrophiles et protéinases) et anti-inflammatoires (anti-protéinases) comme α_1 -AT [54]. L'infection des voies respiratoires par PA semble survenir de manière systématique chez les patients porteurs des allèles mutés de α_1 -AT [50]. Finalement, le locus CMF1 retrouvé dans le chromosome 19 semble induire l'apparition d'un iléus méconium chez les patients porteurs de deux mutations sévères [55]. L'existence des gènes modificateurs repose sur des données recueillies avec peu de patients et au cours d'études répétées, cela soulève la difficulté de la validation de leur impact dans la modulation du phénotype des patients au cours de la maladie la FK.

1.1.3.4 Incidence des mutations dans la population

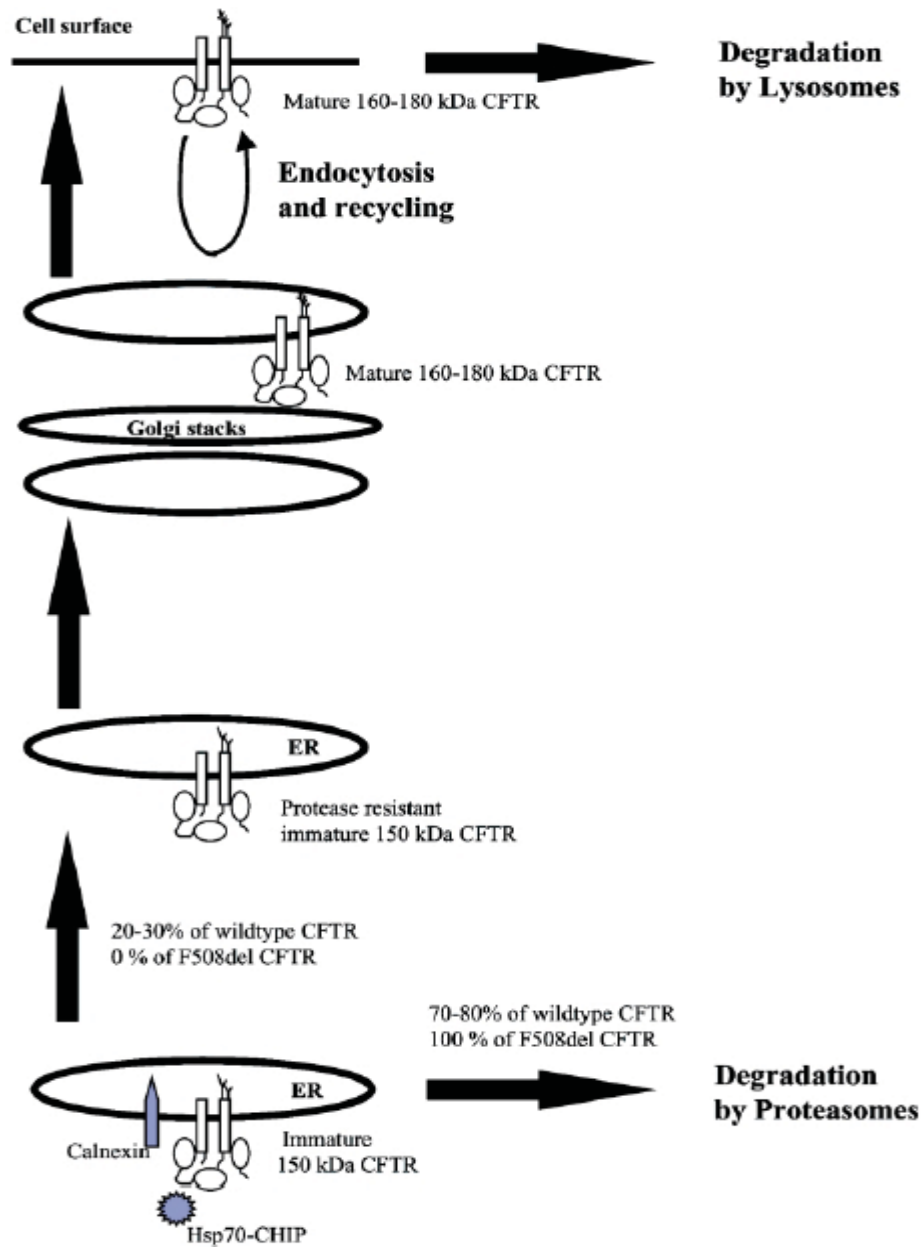
La caractérisation des diverses mutations retrouvées dans le gène du *CFTR* permet désormais une meilleure compréhension de la maladie FK. L'incidence de la maladie dépend fortement de l'origine ethnique puisqu'elle affecte une naissance sur 3 000 dans les populations d'origine caucasienne [56], une naissance sur 15 000 dans la population afro-américaine [57] ou une naissance sur 350 000 au Japon [58]. Les mutations qui induisent une absence de synthèse et/ou de maturation de la protéine telles que $\Delta F508$ et G542X sont très présentes au sein des populations caucasiennes où elles semblent leur conférer un avantage sélectif face à certaines maladies. En effet, la présence d'un allèle *CFTR* muté (hétérozygotie) confère au porteur une certaine résistance au choléra, la fièvre typhoïde et la tuberculose [59]. Il semblerait que la diminution de l'expression et de la fonction de la protéine du CFTR diminuent également les sécrétions fluides (diarrhées) induites par la toxine cholérique ou l'entérotoxine d'*Escherichia coli* [60-62]. Cette observation nécessite néanmoins d'être confirmée, puisque certains auteurs ont démontré l'absence de différences de sécrétions d'ions chlorures entre les populations hétérozygotes et homozygotes pour la mutation du gène du *CFTR* [63].

1.1.4 PROTÉINE DU CFTR

1.1.4.1 Biosynthèse

La protéine du CFTR se localise majoritairement à la surface apicale des organes à sécrétions exocrines. Comme toutes les protéines membranaires, elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique (RE) sous forme d'un précurseur qui va ensuite subir un processus de maturation complexe (N-glycosylation) sur des résidus en position 894 et 900 sur les boucles extracellulaires. Le précurseur non glycosylé de la protéine du CFTR (forme A) a un poids moléculaire avoisinant 130 kDa. Il est glycosylé au niveau du RE pour donner une forme immature de 140 kDa appelée core-glycosylée (forme B), riche en mannoses et sensible à l'action de l'enzyme endoglycosidase H (Endo H) [64-66]. La forme mature ou complexe glycosylé (forme C) est formée dans l'appareil de Golgi, où les mannoses sont remplacés par des glucides complexes. Cette forme de 170 kDa est insensible à l'action de l'Endo H mais sensible à l'enzyme peptide N-Glycanase F. Malgré un processus de maturation étroitement contrôlé, une proportion de près de 70% de la forme B reste séquestrée au niveau du RE et est rapidement dégradée, alors que seul 30% de la forme B atteint l'appareil de Golgi pour la maturation en forme C. Les processus de glycosylation et de repliement de la protéine du CFTR, tels que décrits dans la figure 5, sont des événements complexes qui limitent fortement sa maturation en dépit de toute mutation [67-70].

Figure 5 : Mutation $\Delta F508$ et dégradation de la protéine du CFTR



Tirée de Vankeerberghen et al. [30]

1.1.4.2 Structure

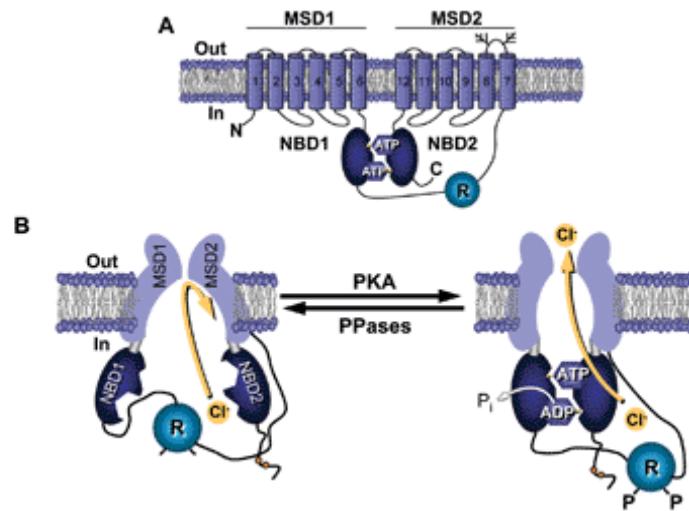
La protéine du CFTR appartient à la superfamille des protéines *ATP-binding cassette* (ABC) [71], des protéines de transport utilisant l'ATP comme source d'énergie pour véhiculer des substrats contre un gradient de concentration. Cette protéine forme un canal transmembranaire dont l'activité est régulée par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) [72] et qui assure la sécrétion des fluides au sein des organes qui l'exprime. L'analyse de la séquence primaire de la protéine montre qu'elle possède cinq domaines distincts [73] répartis de la manière suivante :

- Deux groupes d'hélices α -hydrophobes; *membrane-spanning domains* (MSD1 et MSD2) comprenant chacun 6 domaines transmembranaires; *transmembrane domains* (TMDs) permettent l'insertion de la protéine dans la membrane plasmique en formant un canal.
- Deux domaines intra-cytoplasmiques hydrophiles; *nucleotide-binding domains* (NBD1 et 2) assurent la liaison de l'ATP.
- Un domaine régulateur (R) détermine l'ouverture et la fermeture du canal.

Le domaine R contient plusieurs sites de phosphorylation par des protéines kinases (PK) [8] et l'on pense que c'est la phosphorylation des résidus sérine par la PKA [67, 74], en présence d'AMPc, qui active la fonction canal [71, 75]. La PKC participe également à la régulation du canal en potentialisant l'action de la PKA [76-78]. Selon la séquence

d'évènements décrits dans la figure 6, la phosphorylation du domaine R favorise l'hétérodimérisation des 2 domaines NBD1 et 2 en favorisant la fixation et l'hydrolyse des molécules d'ATP pour le contrôle de l'ouverture du canal [71, 75, 79, 80].

Figure 6 : Structure et fonctionnement du canal CFTR



Tirée de Li et al. [81]

1.1.4.3 Fonction

L'épithélium des organes qui expriment la protéine du CFTR étant essentiellement de type sécréteur, la sécrétion de Cl^- et l'absorption de sodium (Na^+) sont des éléments majeurs pour leur fonctionnement. Dans les glandes exocrines, le canal CFTR favorise le passage des ions Cl^- et bicarbonates (HCO_3^-) de l'intérieur de la cellule vers la lumière de l'organe, sauf pour les glandes sudoripares où la sécrétion se fait dans le sens inverse [7, 8, 82, 83]. La fonction du canal CFTR n'est pas exclusive au transport des ions Cl^- , mais elle est hautement spécifique aux anions incluant les ions halogénures (Br^- , I^- et F^-) [84, 85] et les ions polyatomiques (NO_3^- , HCOO^- et CH_3COO^-) [86-88]. Il a par ailleurs été démontré que le canal CFTR est aussi impliqué dans la perméabilité et l'homéostasie du glutathion, un peptide essentiel dans la protection cellulaire contre les dommages occasionnés par des molécules oxydantes [89-91].

Le transit membranaire des ions Cl^- est important pour l'aboutissement de nombreux processus physiologiques tels que la régulation du pH intracellulaire, le fonctionnement d'enzymes impliquées dans les processus d'endocytose, le recyclage membranaire et le maintien du volume cellulaire [92]. Des mutations qui affectent la fonctionnalité du canal CFTR (ΔF508) empêchent l'interaction entre les domaines NBD et les parties transmembranaires MSD, conférant ainsi à la protéine mutée une faible conductance vis-à-vis des ions Cl^- [74, 93]. Dans la FK, le défaut de transport de chlore

affecte indirectement le passage d'autres ions et, ainsi, le transit des molécules [5], ce qui démontre que le canal CFTR module l'activité d'autres canaux ioniques de la famille des protéines ABC [30]. Il participe en particulier à l'activation du canal chlorure *Outward Rectifying Chloride Channel* (ORCC), inhibe le canal sodique *Epithelial Sodium Channel* (ENaC) et contrôle l'activation des canaux potassiques *Renal Outer Medullary Potassium Channel* (ROMK) [94, 95]. En plus d'assurer directement le transport des ions HCO_3^- , le canal CFTR assure leur sécrétion par couplage avec un échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ dans les canaux pancréatiques [96, 97] et les intestins [98].

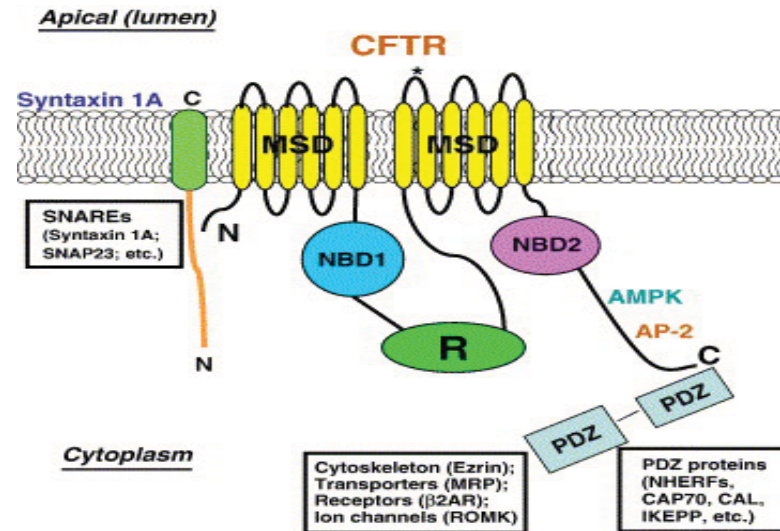
Hormis son interaction avec les autres protéines de la famille ABC, la protéine du CFTR est capable, grâce à la présence de motifs essentiels à ses extrémités N et C terminales, d'interagir avec d'autres protéines (figure 7). L'extrémité N-terminale interagit avec les protéines de la famille *SNAP REceptor* (SNARE), impliquées dans le trafic cellulaire et en particulier la fusion vésiculaire [99]. Parmi ces protéines, la syntaxine 1A est connue pour inhiber l'activité AMPc dépendante de la protéine [100] en rompant les interactions interdomaines existant au sein de la protéine [101]. Par ailleurs, l'interaction de la protéine du CFTR avec la protéine SNAP23 facilite son ancrage dans la membrane plasmique [102]. Des interactions entre l'extrémité N-terminale de la protéine du CFTR et les filamines, des protéines impliquées dans le pontage des molécules d'actine, ont été démontrées récemment, elles assureraient l'ancrage et la stabilité membranaire de la protéine du CFTR [103]. L'extrémité C-terminale quant à elle possède une séquence

consensus DTRL, située entre les résidus 1477 et 1480, qui est reconnue par les domaines PDZ des protéines [104-106]. Ces domaines PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) représentent des motifs de 90 acides aminés capables d'interagir avec l'extrémité C-terminale de certaines protéines cibles. L'on pense que l'interaction entre les domaines PDZ et la protéine du CFTR n'influence aucunement l'activité canal mais favorise plutôt son ancrage [107] et sa stabilité [108]. Cinq protéines possédant des domaines PDZ sont capables de se lier à la protéine du CFTR :

- *Na⁺-H⁺ Exchange-Regulatory Factor* (NHE-RF1) [105]
- *CFTR Associated Ligand* (CAL) [106]
- *CFTR Associated Protein70* (CAP70) [104]
- *Intestinal and Kidney Enriched PDZ Protein* (IKEPP) [109]

L'interaction entre la protéine du CFTR et NHE-RF1 favorise la migration de la protéine vers la membrane plasmique tandis que son interaction avec CAL favorise sa séquestration dans la cellule [106, 110].

Figure 7 : Protéine du CFTR et ses interactions protéiques

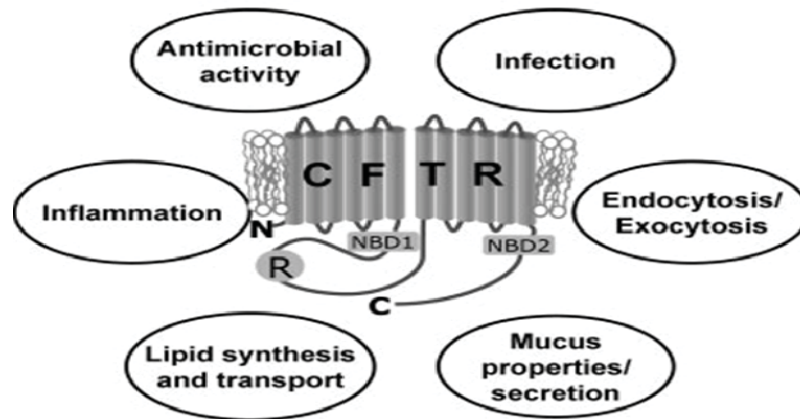


Tirée de Li et al. [111].

L'ajustement du pH intracellulaire par le canal CFTR, surtout l'acidification des organelles, procure aux enzymes des lysosomes un pH optimal pour détruire les bactéries phagocytées par les macrophages. Plusieurs études réalisées *in vitro* ont démontré que le manque de fonctionnalité du canal CFTR dans les cellules phagocytaires rend leur pH intracellulaire basique [112, 113] et par conséquent les rend incapables de lyser les bactéries phagocytées qui continuent alors d'y proliférer [114]. La prolifération des agents pathogènes SA et PA dans les cellules épithéliales pulmonaires des patients FK est caractéristique d'un défaut d'acidification du pH dans les phagolysosomes [115, 116]. D'autre part, la protéine du CFTR joue un rôle important dans les réponses immunitaire et inflammatoire ainsi que dans la défense antimicrobienne [117] en raison de sa perméabilité

aux thiocyanates [118, 119]. Ces molécules jouent un rôle important dans la défense antibactérienne des lactoperoxydases et le dysfonctionnement du canal CFTR; en fait le déficit en thiocyanates pourrait expliquer la défaillance en lactoperoxydases au cours de la réponse immunitaire induite par la maladie [120]. De manière générale, le dysfonctionnement du canal CFTR entraîne une augmentation de la susceptibilité à l'infection (poumon), perturbe le processus de maturation (sulfatation et glycosylation) des mucines, altère le trafic cellulaire (fusion vésiculaire), inhibe les mécanismes de transport (lipides) et réduit les mouvements d'endo et exocytose (récepteurs membranaires) [99, 100, 102, 103, 121-123]. L'établissement d'infections pulmonaires chroniques est responsable, en grande partie, de la survenue de processus inflammatoires durant la FK; des processus inflammatoires qui sont à l'origine du stress oxydant et de la destruction tissulaire des principaux organes affectés par la maladie [124-130].

Figure 8 : Représentation des diverses fonctions de la protéine du CFTR



Tirée de Ollero et al. [131]

1.2 STRESS OXYDANT ET FIBROSE KYSTIQUE

1.2.1 HISTORIQUE

La notion de stress oxydant dans les systèmes biologiques remonte aux années 1970 suite aux recherches sur l'activation de l'oxygène moléculaire et sur sa potentielle toxicité dans les organes des mammifères. Le concept de stress oxydant fut développé par Sies et ses collaborateurs [132], avec des termes synonymes tels que «stress pro-oxydant» ou «stress réducteur», décrivant le stress oxydant comme un déséquilibre entre pro-oxydants et antioxydants en faveur des premiers [132]. Cette notion a depuis été modifiée

en se définissant comme un déséquilibre entre les niveaux d'oxydants et d'antioxydants en faveur des oxydants, pouvant causer des dommages potentiels [133].

L'implication du stress oxydant dans la survenue de nombreuses maladies inflammatoires et/ou chroniques comme le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, a été suggérée depuis longtemps. Cependant, savoir si le stress oxydant contribue à la cause ou à l'aggravation de ces maladies demeure encore mal connu. Ceci est probablement dû en partie à la difficulté d'évaluer le phénomène mais aussi aux différentes méthodes d'évaluation du statut oxydant *in vivo* [134] et à leur manque de sensibilité et/ou de spécificité [135]. Le stress oxydant se définit de nos jours comme une perturbation du statut oxydatif intracellulaire [136], induite soit par la production excessive d'oxydants radicalaires (radicaux libres) et/ou non radicalaires, principalement dérivés de l'oxygène, soit par la diminution de la capacité de défense antioxydante, pouvant causer des dégâts tissulaires plus ou moins irréversibles. Les effets des oxydants, en particulier ceux des radicaux libres, étant proportionnels à l'intensité et à la durée de leur production, une production transitoire et modérée des radicaux libres correspond à un mécanisme de défense de la cellule lui permettant de détruire des agents pathogènes ou potentiellement des cellules cancéreuses. Cependant, lorsque cette production devient récurrente ou chronique, la balance entre la production de radicaux libres et les systèmes de détoxification cellulaire est perturbée de manière continue; on parle alors de stress oxydant. Un contrôle précis du niveau d'oxydants par les différents systèmes

antioxydants intra- et extra-cellulaires s'avère indispensable pour maintenir l'intégrité cellulaire et tissulaire.

1.2.2 LES OXYDANTS CELLULAIRES

Un oxydant se définit comme toute molécule acceptant un ou plusieurs électrons, devenant ainsi une substance réduite. À travers sa configuration électronique, la molécule d'oxygène (O₂) possède un caractère oxydant qui se manifeste par son avidité vis-à-vis des électrons. L'oxygène est à l'origine d'oxydants radicalaires, capables d'exister avec un électron non apparié, et d'oxydants non radicalaires possédant une configuration électronique stable. Ces deux classes d'oxydants se regroupent généralement dans la catégorie « espèces réactives de l'oxygène » et du monoxyde d'azote qu'on reconnaît sous les noms de *Reactive Oxygen Species* (ROS) et de *Reactive Nitrogen Species* (RNS).

Les ROS et les RNS (RONS) jouent un rôle essentiel dans la physiologie cellulaire dans le sens qu'ils participent au bon fonctionnement de certaines enzymes, favorisent les mécanismes de transduction du signal, aident à la défense immunitaire contre certains agents pathogènes, permettent la vasodilatation, régulent certains gènes et assurent la destruction des cellules tumorales par apoptose. Par exemple, la phagocytose des bactéries et des parasites par les macrophages ou les polynucléaires s'accompagne d'une intense production de RONS connue sous le nom de « burst oxydatif » ou explosion respiratoire.

Cette production de RONS, utile à travers des mécanismes physiologiques, demeure contrôlée par l'efficacité du complexe réseau antioxydant intra et extracellulaire. Toutefois, la production excessive ou incontrôlée de RONS est souvent associée au développement de nombreuses maladies [137-139]. Même si les RONS sont indispensables dans divers processus cellulaires, ils peuvent aussi s'avérer hautement nocifs, si bien que l'on parle souvent du « paradoxe des RONS ». Ces RONS peuvent se lier à certaines macromolécules (lipides, protéines et glucides) en induisant leur oxydation qui, en retour, peuvent causer des dommages membranaires, structuraux et fonctionnels (exemple : inactivation d'enzymes) [140]. Grâce à ses défenses antioxydantes, la cellule s'adapte continuellement par rapport à la quantité de RONS générée (homéostasie redox cellulaire) afin de limiter leurs effets nocifs et de prévenir le stress oxydant. Une altération de l'homéostasie redox, comme c'est le cas lors d'un stress oxydant, a souvent été suggérée comme étant impliquée dans les pathogénèses associées au vieillissement incluant l'athérosclérose, le diabète, le cancer et certaines maladies dégénératives [140].

1.2.2.1 Les oxydants radicalaires

Un radical libre se définit comme un atome, une molécule ou une espèce chimique contenant un ou plusieurs électrons non appariés [141]. Ce déséquilibre structural, souvent transitoire, peut être comblé par l'acceptation d'autres électrons ou par le transfert d'électrons non appariés vers une autre molécule. La présence d'électrons libres augmente

la réactivité des molécules et les rend hautement instables. La probabilité que surviennent les réactions d'acceptation et de transfert d'électrons d'une molécule à une autre dépend essentiellement de l'instabilité du radical libre considéré. Une instabilité modérée favorisera grandement l'acceptation d'électrons, tandis que le transfert d'électrons surviendra dans le cas d'une grande instabilité. Par ailleurs, plus cette instabilité est grande, moins la réaction du radical libre est spécifique. C'est en raison de leur manque de spécificité réactionnelle que les radicaux libres sont susceptibles de réagir avec les molécules biologiques, les oxyder et ainsi retrouver un état énergétique plus stable.

Dans les systèmes biologiques, une grande variété de radicaux libres peut être produite et leur réactivité dépend de leur nature et de celle des molécules rencontrées (tableau 1). Un radical libre est capable de soustraire un atome d'hydrogène au sein des molécules biologiques stables pour en faire des composés radicalaires qui, en retour sont susceptibles de réagir avec d'autres molécules avoisinantes en induisant un mécanisme de réaction radicalaire en chaîne. La peroxydation lipidique représente un bon exemple de mécanisme de réaction en chaîne dans lequel les radicaux libres attaquent principalement les acides gras polyinsaturés (AGPI) des membranes cellulaires, du fait de leur insaturation en altérant leur structure et leurs fonctions. Bien qu'il arrive parfois que deux radicaux libres établissent un lien covalent pour former des espèces non radicalaires stables, un radical libre doit être considéré comme un agent oxydant acceptant un simple électron de la part d'un composé non-radical, ou un agent réducteur donnant un simple électron à un

composé non-radical [142]. La nature, l'abondance et la localisation (membranaire, en grande partie) des AGPI en font une des cibles privilégiées des attaques radicalaires.

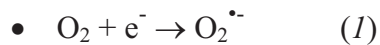
Tableau 1 Radicaux libres et leur réactivité dans les systèmes biologiques

Nom	Formule	Description
Radical avec centre de carbone	$\begin{array}{c} \\ -\text{C}^\bullet \\ \end{array}$	L'électron non pairé de ces radicaux réside sur le carbone et réagit rapidement avec l'O ₂ pour former des radicaux peroxy
Anion superoxyde et radical hydroperoxy	$\text{O}_2^\bullet, \text{HO}_2^\bullet$	Radicaux primaires aux centres d'oxygène dans leurs formes anioniques et protonées
Radicaux peroxy et alkoxy	$\text{RO}_2^\bullet, \text{RO}^\bullet$	Radicaux avec centre d'oxygène qui peuvent être formés à partir de la réaction des radicaux aux centres de carbone ou de la dégradation des peroxydes organiques, comme le LOOH.
Radical hydroxyl	OH^\bullet	Hautement réactif, radical avec centre d'oxygène qui réagit avec toutes les biomolécules.
Oxyde nitrique (monoxyde de nitrogène) et dioxyde de nitrogène	$\text{NO}^\bullet, \text{NO}_2^\bullet$	L'oxyde nitrique est formé à partir de la L-arginine et le dioxyde d'azote de la réaction du NO• avec le O ₂ •.
Radicaux thiyl et perthiyl	$\text{RS}^\bullet, \text{RSS}^\bullet$	Un groupe de radicaux avec des électrons non pairés résident sur le sulfure.
Ions des métaux de transition	Fe, Cu, Zn, etc	Permettent d'accepter ou de donner des électrons simples et peuvent être des catalyseurs des réactions de radicaux libres.

Adaptée de Stocker et al. [142].

1.2.2.1.1 *Le superoxyde*

Le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est formé par réduction de l'oxygène moléculaire (O_2) lorsque ce dernier accepte ou capture un électron provenant d'un autre atome ou molécule (*réaction 1*).



Ce radical est produit en grande quantité dans les macrophages pendant la destruction bactérienne (phagocytose) [143], dans la chaîne respiratoire mitochondriale (phosphorylation oxydative) [144] et dans d'autres types cellulaires comme les lymphocytes [145], les cellules endothéliales [146] et les fibroblastes [147]. La réactivité et le pouvoir oxydant de l' $O_2^{\bullet-}$ sont faibles, mais son pouvoir réducteur en présence des métaux de transition (fer, cuivre et zinc) présents dans les sites actifs des enzymes est la base de la formation d'espèces plus réactives. Dans cette logique, il est désormais bien établi que le radical superoxyde est le principal précurseur conduisant à la formation d'un puissant radical libre qui est le radical hydroxyle.

1.2.1.1.2 Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (OH^\bullet) est produit à partir de l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), en présence d'ions ferriques (*réactions 2, 3 et 4*).

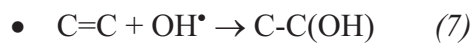
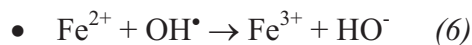
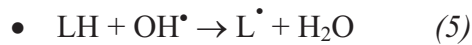
- $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$ (2)
- $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$ (3), réaction de Fenton
- $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^\bullet + \text{OH}^- + \text{O}_2$ (4), réaction d'Haber-Weiss

Haber et Weiss, en 1934, proposèrent le concept selon lequel le radical hydroxyle, OH^\bullet , pouvait être généré suite à l'interaction entre l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ et l' H_2O_2 [148].

Dans la mesure où l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ est un métabolite cellulaire, la réaction d'Haber-Weiss est considérée dans les systèmes biologiques, comme un moyen de production des radicaux plus toxiques que l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ et l' H_2O_2 . Cependant, du point de vue thermodynamique, la réaction 4 nécessite des catalyseurs pour se produire car elle n'est pas très favorable en milieu aqueux. La nécessité d'un métal de transition comme catalyseur évoquée par Haber et Weiss, était associée à une réaction nette de production d' OH^\bullet (*réaction 4*) séparée en deux réactions distinctes (*réaction 2 et 3*) ou réaction de Fenton. La réaction d'Haber-Weiss, catalysée par le fer, est aujourd'hui considérée en biologie comme le mécanisme principal de production d' OH^\bullet [148].

La production d'OH[•] par la réaction de Fenton peut également se produire *in vitro* avec des métaux de transition autres que le fer, tels que le cuivre, le cobalt et le chrome. Cependant *in vivo*, c'est principalement le fer et dans une moindre mesure le cuivre, qui participent à la réaction [149]. Dans les conditions physiologiques, la disponibilité du fer catalytique libre est relativement faible en raison de sa séquestration par les protéines [150]. Néanmoins, dans certaines conditions (exemple : hémochromatose, β -thalassémie, hémodialyse) la quantité de fer libre peut augmenter et avoir des effets délétères pour la cellule. Le rôle du cuivre dans la réaction de Fenton *in vivo* demeure controversé sachant que la quantité de cuivre libre est de moins d'un atome par cellule [151]. La formation d'OH[•] peut également survenir lorsque les molécules d'eau sont exposées à des radiations ionisantes [152]. Ce radical est le plus puissant oxydant connu, possédant une durée de vie extrêmement courte (demi-vie de l'ordre de 10^{-9} secondes à la température du corps humain), capable de réagir à partir de son site de formation grâce à sa capacité d'attaquer les molécules, pour ensuite engendrer une chaîne de réactions radicalaires capables d'atteindre d'autres molécules environnantes. En effet, l'HO[•] peut oxyder un substrat par arrachement d'un atome d'hydrogène (*réaction 5*), par arrachement d'un électron (*réaction 6*) ou par simple addition sur une double liaison (*réaction 7*). L'on pense d'ailleurs que le radical hydroxyle serait le principal initiateur de la série de mécanismes conduisant au processus de peroxydation lipidique au niveau des AGPI et des lipoprotéines. En vertu de sa réactivité non spécifique, l'HO[•] est capable de soustraire un atome d'hydrogène dans une

chaîne d'acides gras (LH) contenant des atomes de C avec des H en position vicinale (*réaction 5*). Il est capable d'oxyder également les protéines, l'ADN et les glucides, étant ainsi à l'origine de radicaux libres dits « secondaires ».



1.2.2.1.2 Le radical peroxyde

Le radical peroxyde (LOO^\bullet) prend naissance durant le processus d'initiation de la peroxydation lipidique tel que présenté dans la *réaction 5*. Au cours de ce processus, la formation d'un radical centré sur un atome de carbone (L^\bullet) provenant de l'abstraction d'une molécule d'hydrogène sur le squelette hydrocarboné de l'acide gras, permet une réaction rapide de ce dernier avec une molécule d'oxygène pour donner naissance à des radicaux peroxydes (*réaction 8*).



Les radicaux (LOO^\bullet) sont très réactifs, à tel point qu'ils sont capables d'oxyder les protéines membranaires et les AGPI en générant un nouveau radical L^\bullet qui pourra continuer la réaction en chaîne tandis qu'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) se forme (*réaction 9*).

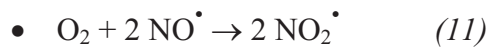
Lorsque la chaîne d'acide gras est assez longue, le radical peroxyde peut de nouveau arracher un atome d'hydrogène pour donner naissance à des peroxydes cycliques [153]. Alors que l' OH^\bullet peut soustraire des atomes d'hydrogène presque sans discrimination, des radicaux moins réactifs comme le LOO^\bullet soustraient préférentiellement les atomes d'hydrogène des molécules avec des liens plus faibles comme la liaison O-H de la molécule d' α -tocophérol (α -TOH) ou vitamine E. Dans ce cas, un radical α -tocophéryl (α - TO^\bullet) et un LOOH peuvent être produits (*réaction 10*) [142, 154].

- $\text{LOO}^\bullet + \text{LH} \rightarrow \text{L}^\bullet + \text{LOOH} \quad (9)$
- $\text{LOO}^\bullet + \alpha\text{TOH} \rightarrow \text{LOOH} + \alpha\text{TO}^\bullet \quad (10)$

1.2.2.1.3 L'oxyde nitrique

Le radical oxyde nitrique (NO^\bullet) ou monoxyde d'azote, est produit par diverses cellules à partir de l'arginine et de l'oxygène dans une réaction catalysée par des NO synthases constitutives et induites, présentes au sein des cellules endothéliales, vasculaires et neuronale ainsi que dans les macrophages et les neutrophiles [155]. Même si le NO^\bullet n'est pas un ROS *per se*, comme la majorité de ces molécules, il possède des capacités oxydantes et peut avoir des propriétés néfastes vis-à-vis des cellules. Toutefois, il est bien établi que le NO^\bullet peut agir comme une molécule de signalisation clé puisqu'il favorise la relaxation endothéliale, régule le tonus vasculaire et participe à la transduction du signal au

niveau neuronal [156-158]. Le radical NO^\bullet représente la principale espèce radicalaire contenant un atome d'azote qui, dans les conditions aérobiques est capable de réagir avec l'oxygène moléculaire pour donner naissance au radical dioxyde d'azote (NO_2^\bullet) selon le mécanisme proposé dans la *réaction 11*. Du fait de son grand pouvoir oxydant, le NO_2^\bullet est impliqué dans plusieurs voies oxydatives [159, 160], incluant la peroxydation lipidique au sein des molécules de cholestérol (LDL) en circulation [161, 162] et la formation de résidus de nitrotyrosine [163].



1.2.2.2 Les oxydants non radicalaires

La réactivité chimique des radicaux libres repose essentiellement sur leur caractère réducteur qui représente la capacité d'un radical libre à réduire un autre. Dans le but de retrouver un niveau énergétique plus stable, les radicaux libres mettent souvent en commun leurs électrons non appariés pour former des liaisons covalentes et ainsi donner naissance à des espèces non radicalaires possédant néanmoins un caractère oxydant (tableau 2).

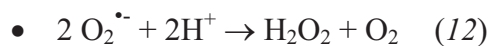
Tableau 2 Réactivité des oxydants non radicalaires

Nom	Formule	Description
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2	Oxydant diffusible et faible agent oxydant généralement peu réactif qui participe à la signalisation cellulaire et, en présence des métaux de transition, peut entraîner l'élévation de OH^\bullet
Hypochlorite, acide hypochlorique	$^{\ominus}OCl, HOCl$	Agent oxydant puissant qui réagit avec les groupements Fe-S, les ions métalliques présents dans les protéines, l'hème, les résidus acides aminés (méthionine, cystéine) des protéines et le GSH. Peut entraîner la formation de dérivés réactifs secondaires incluant les chloramines et les aldéhydes dérivés des acides aminés.
Ozone	O_3	Puissant oxydant qui attaque les protéines et les lipides incluant le cholestérol. L'oxygène singulet peut être formé comme produit intermédiaire.
Oxygène singulet	$^1\Delta O_2$	Réagit chimiquement avec les molécules ou par transfert de son énergie d'excitation. Sa réaction avec les doubles liaisons entre carbone est la mieux connue.
Peroxynitrite, acide peroxynitrique	$ONOO^{\ominus}, ONOOH$	Peut être formé via la réaction du O_2^{\ominus} avec le NO^\bullet . La forme protonée est hautement réactive.
Alkylperoxynitrites, trioxyde d'azote, chlorure nitryle et ion nitronium	$ROONO, N_2O_3, NO_2Cl$ et NO_2^+	Autres dérivés réactifs de l'azote.
Nitrosothiols	RSNO	Formés via la réaction du RS^\bullet avec le NO^\bullet , ou des thiols avec des oxydes de l'azote. Les nitrosothiols sont des oxydants faibles.

Adaptée de Stocker et al. [142]

1.2.2.2.1 Le peroxyde d'hydrogène

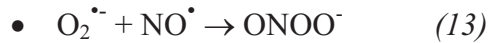
La majorité des réactions associées à la production d'H₂O₂ impliquent la réduction spontanée ou catalysée de l'O₂^{•-} sous l'action des oxydases et/ou de l'enzyme superoxyde dimutase (SOD) (*réaction 12*).



En dépit de la réactivité variable des espèces non radicalaires, l'H₂O₂ se comporte généralement comme un oxydant faible, même s'il est capable d'oxyder de manière directe les groupements thiols (-SH) de molécules biologiques. Cependant, H₂O₂ affiche un potentiel toxique dans le sens qu'il peut donner naissance à l'OH[•] à travers les réactions de Fenton et de Haber-Weiss décrites dans les *réactions 3* et *4*. Cette décomposition de H₂O₂ en présence de métaux de transition est considérée comme le dommage oxydant le plus important généré dans la cellule. Par sa capacité à réagir avec les protéines hémiques (myoglobine et le cytochrome C), le H₂O₂ a été fortement cité dans la formation de radicaux acides aminés capables de propager les réactions d'oxydation [142].

1.2.2.2.2 Le peroxyde nitrique

Le peroxyde nitrique (ONOO⁻) est un puissant oxydant qui résulte de la réaction entre le NO[•] et l'O₂^{•-} selon le mécanisme proposé dans la *réaction 13*.



En dehors de son action directe sur les molécules biologiques, le $ONOO^-$ est capable de générer le radical dioxyde d'azote NO_2^{\bullet} dont l'implication a souvent été démontrée dans plusieurs voies oxydatives [159, 160], incluant la peroxydation des AGPI [161, 162] et la formation de résidus de nitrotyrosine [163]. Le $ONOO^-$ possède un pouvoir oxydant faible dans les conditions basiques mais ce pouvoir oxydant peut devenir fort dans les conditions acides, notamment sous forme d'acide peroxynitrique ($ONOOH$). Ce dernier ainsi que d'autres oxydants non radicalaires ayant des propriétés similaires comme l'acide hypochlorique ($HOCl$) semblent s'attaquer de manière préférentielle aux protéines plutôt qu'aux lipides [164]. Les résidus cystéine et méthionine de certaines protéines constituent des cibles de premier choix pour ces acides; viennent ensuite les résidus phénylalanine et lysine [165, 166].

1.2.3 LES PRINCIPALES SOURCES DE ROS ET RNS

La production des RONS est quasi continue dans la cellule, à travers différents processus incluant le transfert mitochondrial d'électrons (cytochrome C), l'activation des cellules phagocytaires (NADPH oxydase), l'activation de certaines enzymes (oxydases), le métabolisme intracellulaire des toxines et des drogues (cytochrome P450, monoxygénases) et l'exposition à des facteurs environnementaux tels que l'irradiation aux rayons ultra-

violet. D'autres oxydants comme le H_2O_2 et le ONOO^- , ne possédant pas d'électrons non appariés, peuvent aussi être générés au niveau cellulaire et agir en qualité de pro-oxydants.

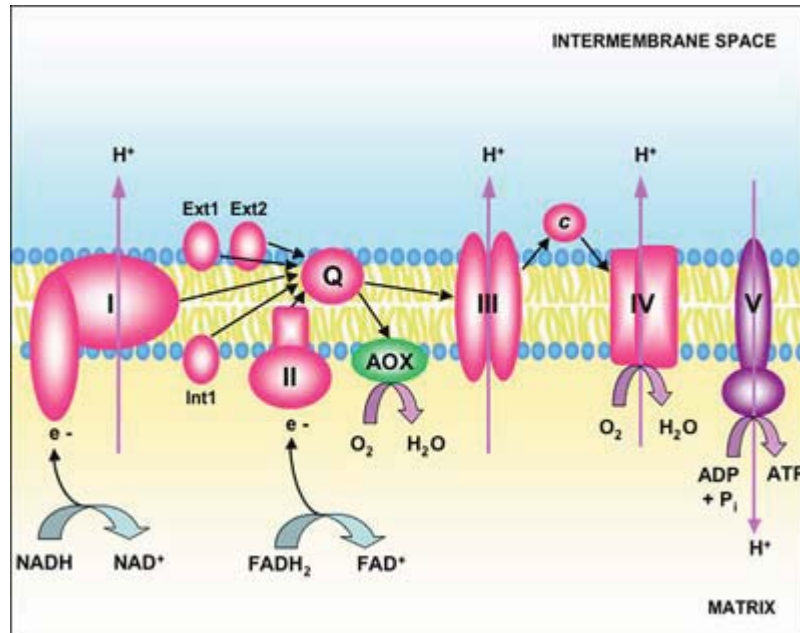
1.2.3.1 La chaîne respiratoire mitochondriale

La respiration mitochondriale des cellules aérobies constitue la principale ressource énergétique cellulaire. Au cours de ce processus, près de 95% de l'oxygène respiré subira une réduction tétravalente ($\text{O}_2 + 4\text{e}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$), progressive et contrôlée, pour produire de l'eau et de l'ATP. Une formation de $\text{O}_2^{\bullet-}$ se produit de façon continue lors du fonctionnement normal de la chaîne respiratoire mitochondriale par réaction de l'oxygène avec un radical semi-ubiquinone [167, 168]. Au cours de la phosphorylation oxydative, l'oxydation des coenzymes réduits NADH et FADH_2 , et le transport des électrons par les complexes de la chaîne respiratoire sont utilisés pour produire un gradient électrochimique de H^+ de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie. L'énergie libre emmagasinée dans ce gradient électrochimique est utilisée par l'ATP-synthase qui catalyse la phosphorylation de l'ADP par le phosphate inorganique. Cependant, en plusieurs endroits de la chaîne respiratoire, les électrons peuvent réagir prématurément avec l' O_2 et former l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ au lieu de contribuer à la réduction de l' O_2 en H_2O (Figure 9). Le phénomène peut être important : dans des études *in vitro*, de 1 à 4% de l' O_2 consommé serait converti en $\text{O}_2^{\bullet-}$ [169]. La formation de l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ survient en particulier au niveau du complexe I où la réaction est énergétiquement favorable mais également au niveau du complexe III [170].

Cette fuite d'électrons et la production nette de RONS mitochondriaux dépendent de l'état énergétique de la mitochondrie, du potentiel membranaire [171] et de l'activité des systèmes antioxydants mitochondriaux. Elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense comme c'est le cas dans certaines conditions telles que lors de l'exercice physique ou dans certaines pathologies.

Les mécanismes de découplage entre le flux d'électrons et la production d'énergie au sein de la mitochondrie peuvent également être à l'origine d'une surproduction de RONS. La production continue et ubiquitaire de $O_2^{\bullet-}$ par les mitochondries n'est pas spécifiquement liée à une pathologie même si l'on pense qu'elle est à l'origine d'un stress oxydant favorable au processus du vieillissement connu sous le nom de *free radical theory of aging* [158, 172]. Par ailleurs, certains défauts innés ou acquis par la résultante d'une maladie au sein de l'ADN mitochondrial sont capables d'augmenter la production de RONS par ces organelles [173, 174]. Les niveaux de $O_2^{\bullet-}$ dépendent aussi de l'activité de la SOD à manganèse (Mn-SOD), une enzyme localisée au niveau de la matrice mitochondriale qui converti l' $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et en oxygène moléculaire [175, 176].

Figure 9 : Chaîne respiratoire mitochondriale



Tirée de www.cgm.cnrs-gif.fr

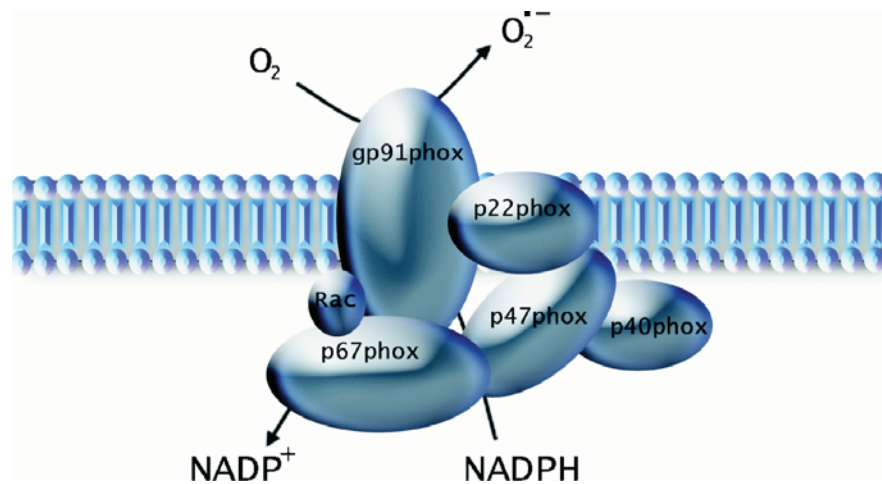
1.2.3.2 Les cellules phagocytaires

Les polynucléaires, les neutrophiles et les macrophages possèdent une enzyme membranaire, NADPH oxydase (NOX), spécialisée dans la production de $O_2^{\bullet -}$ à partir d'électrons dérivés du NADPH pour réduire l'oxygène moléculaire (*réaction 14*) [177]. A ce jour, 6 membres ont été identifiés en plus de la NOX des phagocytes (NOX2 ou gp91^{phox}, Figure 10) : NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DuOX1 et DuOX2 [178]. Ces protéines sont classées en trois groupes qui se distinguent par la présence de domaines

additionnels, en plus de la sous-unité catalytique NADPH oxydase. Le premier groupe comprend les NOX 1 à 4 qui possèdent uniquement la sous-unité catalytique [179]. La NOX5, constituant le deuxième groupe, possède en plus un domaine *calmodulin-like* qui contient 4 structures *calcium binding EF-hand* en N-terminal [180]. Le troisième groupe comprend les Dual oxydases ou DuOX, nommées ainsi car elles possèdent la sous-unité NADPH oxydase, un domaine *calmodulin-like* mais également un domaine homologue aux peroxydases à hème comme les myéloperoxydases et les lactoperoxydases.

- $\text{NAD(P)H} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{NAD(P)}^\cdot + \text{H}^+ + 2 \text{O}_2^{\cdot-}$ (14)

Figure 10 : Représentation de NOX2 et ses sous-unités constitutives



Tirée de www.clinsci.org.

La NOX2 est constituée de quatre sous-unités dont deux sous-unités membranaires, p22^{phox} et gp91^{phox}, deux sous-unités cytosoliques p67^{phox} et p47^{phox} et la GTPase rac1. La

sous-unité p22^{phox} joue le rôle de protéine d'encrage des autres sous-unités en même temps qu'elle stabilise le complexe [181]. Normalement dormante, la NOX2 est activée lorsque la cellule phagocytaire est stimulée à travers un processus qui débute avec la phosphorylation de p47^{phox} entraînant son association avec le cytochrome *b*₅₅₈. Il s'ensuit une production accrue de O₂^{•-} que l'on pense être à l'origine du « burst oxydatif » responsable de la synthèse de molécules telles que le H₂O₂ ou l'hypochlorite (ClO⁻), indispensables à la destruction du matériel phagocyté. Cette voie de production des ROS est particulièrement stimulée au cours des processus infectieux [142].

1.2.3.3 Les oxydases

1.2.3.3.1 La xanthine oxydoréductase

La xanthine oxydoréductase (XOR) existe sous deux formes inter-convertibles, la xanthine déshydrogénase (XDH) et la xanthine oxydase (XO) [182]. Un des rôles les mieux connus de la XOR consiste en la conversion de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique [183]. La XDH est une enzyme ubiquitaire impliquée dans le catabolisme de l'ATP et qui utilise le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) pour capter les électrons de l'hypoxanthine et de la xanthine afin de former le NADH et l'acide urique. Lorsque la pression partielle d'O₂ change, comme c'est le cas pendant le phénomène d'ischémie/reperfusion, la XDH est modifiée en XO. À la différence de la XDH, la XO

utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons de ces mêmes substrats pour former l' $O_2^{\bullet-}$ et l' H_2O_2 . L'activité de la XOR représente une source importante de RONS dans les cellules des mammifères, surtout dans des conditions pathologiques et le ratio XO/XDH cellulaire détermine la quantité de RONS produite. Toutefois, il a été démontré que la production des RONS dépend essentiellement de la XO car son activité change au cours de certaines pathologies, comme l'athérosclérose, impliquant le stress oxydant [184-187].

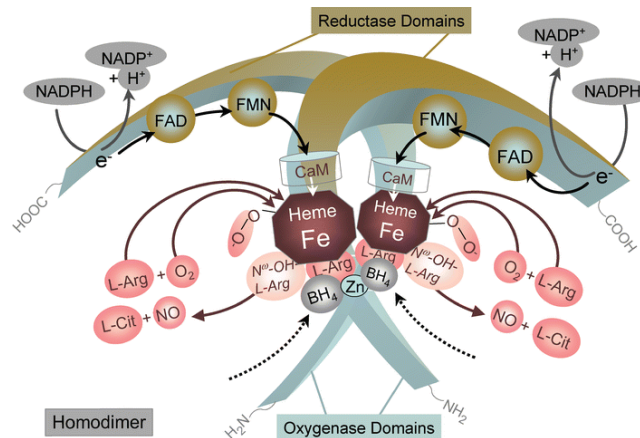
1.2.3.3.2 La monoamine oxydase

La monoamine oxydase (MAO) est une flavoprotéine ubiquitaire très exprimée dans les cellules eucaryotes qui se localise au niveau de la membrane externe mitochondriale. La MAO catalyse la désamination oxydative des amines primaires et tertiaires. Au cours de cette réaction, la production de H_2O_2 contribue à augmenter les niveaux de RONS dans la matrice mitochondriale tout comme dans le cytosol. Des évidences suggèrent que l' H_2O_2 produit durant la désamination des catécholamines pourrait jouer un rôle important dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et d'Alzheimer à travers des dommages oxydatifs affectant la membrane mitochondriale [188].

1.2.3.3.3 Les oxyde nitrique synthases

Les oxyde nitrique synthases (NOS) représentent une famille d'enzymes qui catalysent l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline pour donner naissance au NO^\bullet à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. L'activité de NOS endothéliale (eNOS) a été étudiée en détails pour son implication dans la protection des dommages vasculaires et demeure de ce fait la mieux connue. La eNOS (figure 11) a besoin de la tetrahydrobiopterine (BH_4) comme cofacteur pour transférer les électrons à la L-arginine afin de former la L-citrulline et le NO^\bullet . En absence de L-arginine ou de BH_4 , la eNOS peut produire l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ et l' H_2O_2 à travers un phénomène qualifié de découplage de eNOS. Le découplage de cette enzyme peut générer des ROS à travers trois mécanismes : premièrement, la diminution de la production enzymatique de NO^\bullet permet aux radicaux avec lesquels il réagit habituellement d'attaquer d'autres molécules; deuxièmement, la production de $\text{O}_2^{\bullet-}$ par la eNOS peut engendrer de nouveaux processus radicalaires, finalement, la production simultanée de $\text{O}_2^{\bullet-}$ et de NO^\bullet peut favoriser la production de ONOO^- et ultimement celle de ONOOH [189].

Figure 11 : Représentation schématique d'oxyde nitrique synthase



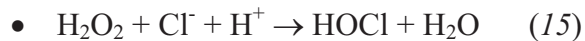
Tirée de Forstermann et al. [190].

Même si la réaction de la eNOS reste bien contrôlée dans les conditions normales, l'on pense que le découplage peut survenir dans certaines conditions pathologiques [191, 192] en provoquant une importante production de RONS. De plus, le NO^\bullet formé par la eNOS peut réagir avec les complexes métalliques, l' O_2 ou l' $\text{O}_2^{\bullet-}$ afin de former d'autres RONS. En absence de quantités suffisantes de co-facteurs comme la BH_4 l'enzyme peut réduire l'oxygène moléculaire plutôt que de transférer des électrons à la l'arginine, générant ainsi du $\text{O}_2^{\bullet-}$. La génération de $\text{O}_2^{\bullet-}$ par le domaine oxygénase de l'enzyme est normalement stabilisée par la BH_4 . D'autre part, le NO^\bullet présente la faculté de se lier à des protéines hémiques comme la guanylyl cyclase, la NOS et l'hémoglobine. Une liaison du NO^\bullet au

noyau hémique de la NOS peut entraîner une inhibition de son activité de manière irréversible [142].

1.2.3.3.4 La myéloperoxydase

La myéloperoxydase, une enzyme hémique présente dans les neutrophiles et les monocytes, se localise autour et à l'intérieur de ces cellules après dégranulation des leucocytes et est sécrétée durant leur activation (*réaction 15*).



La myéloperoxydase est capable de générer le HOCl et diverses molécules chlorées d'ailleurs considérées chez l'Homme, comme des marqueurs spécifiques des réactions d'oxydation catalysées par cette enzyme. Le HOCl peut générer une série de produits d'oxydation secondaires qui ont la capacité d'attaquer des biomolécules, comme par exemple les lipides [142]. La myéloperoxydase est également dotée d'une activité peroxydase classique au cours de laquelle elle oxyde divers substrats organiques tels que la tyrosine et le nitrite en radical tyrosyl et en radical dioxyde d'azote [193].

1.2.3.3.5 Les lipoxygénases

Les lipoxygénases sont des enzymes contenant du fer qui catalysent l'insertion de l'oxygène moléculaire dans les AGPI dans le but de former une famille complexe de lipides biologiquement actifs, incluant les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes dont certains sont des médiateurs lipidiques importants de la réponse inflammatoire qui participent au recrutement des phagocytes. Lors de l'action catalytique des lipoxygénases, les hydroperoxydes lipidiques générés, peuvent induire un processus peroxydation lipidique non enzymatique [142].

1.2.3.3.6 Les métaux de transition

Les métaux de transition libres comme le fer et le cuivre sont de puissants catalyseurs des réactions d'oxydation en présence des hydroperoxydes comme le LOOH. Ils catalysent la rupture homolytique du LOOH en radicaux alkoyls lipidiques, ce qui peut initier la peroxydation lipidique et d'autres réactions d'oxydation. En plus du fer libre, les formes biologiques du fer comme l'hémoglobine et la myoglobine peuvent potentiellement catalyser les réactions oxydatives au sein des lipides et des lipoprotéines [142].

1.2.4 LES ANTIOXYDANTS CELLULAIRES

Les cellules aérobies possèdent un système antioxydant complexe très efficace pour contrôler le niveau de RONS. Une partie de leur efficacité est associée à la complémentarité des différents antioxydants : localisation (intra- vs extracellulaire, compartiments), nature (exemple : lipophile vs hydrophyle). Il est important de considérer les sources d'oxydants dans un contexte de disponibilité des antioxydants, car plusieurs substances peuvent prévenir ou du moins retarder l'oxydation d'autres substrats. Un antioxydant se définit comme toute substance, présente en faible quantité par rapport à un substrat oxydable, capable de réduire ou de retarder de manière efficace l'oxydation de ce substrat. En d'autres termes, un antioxydant protège contre les dommages oxydatifs lorsqu'il est présent en quantités inférieures à celle de(s) la substance(s) qu'il protège. Par conséquent, les antioxydants doivent protéger contre les RONS et leurs effets secondaires, tant à l'intérieur qu'à l'extérieur de la cellule [142].

Plusieurs mécanismes permettent de ralentir la production des RONS en les captant directement, en les détoxifiant ou en séquestrant certains de leurs initiateurs comme les métaux de transition [140]. Les antioxydants peuvent agir à travers des mécanismes enzymatiques ou fonctionner comme des piègeurs, « scavengers », dans le but d'éliminer la surproduction de RONS. En qualité de piègeurs, les antioxydants peuvent capter ou céder un électron célibataire dans le but de générer des molécules plus stables. Il peut arriver que

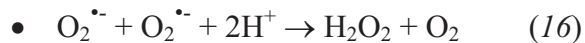
le composé piègeur devienne à son tour radical libre, à ce moment il sera éliminé ou régénéré par un autre système antioxydant. Le réseau antioxydant cellulaire inclut des défenses enzymatiques et non-enzymatiques (endogènes) ainsi que les défenses apportées par l'alimentation (exogènes).

1.2.4.1 Les antioxydants enzymatiques

Les systèmes antioxydants enzymatiques sont largement représentés par les protéines cellulaires dont la principale fonction est de maintenir un environnement réduit à l'intérieur de la cellule [141] en plus de maintenir les niveaux d'antioxydants extracellulaires [194]. Les principales enzymes antioxydantes cellulaires sont représentées par la SOD, la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la glutathion réductase (GR). Leurs niveaux sont normalement régulés de manière à combattre une production excessive de RONS dans la cellule. Lorsque la production de ces derniers augmente, les cellules vont réguler les défenses antioxydantes en augmentant leur activité et leur niveau d'expression dans le but de restaurer la balance avec la production de RONS. De telles modifications métaboliques sont souvent attribuées au phénomène d'adaptation cellulaire face au stress oxydant [195].

1.2.4.1.1 Les superoxydes dismutases

La famille des SOD représente un important système d'enzymes contenant des métaux dans leur centre catalytique afin de favoriser la dismutation de $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 et en O_2 . En effet les SOD ont pour but d'éliminer l' $O_2^{\bullet -}$ par une réaction qui permet la formation de O_2 et H_2O_2 en présence de $O_2^{\bullet -}$ (réaction 16).



Les SOD existent sous trois isoformes dont la structure d'ensemble est restée conservée lors de l'évolution, formant un puits hydrophobe au centre de la protéine dans lequel se glisse l'anion superoxyde [196]. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme dont la nature permettra de distinguer les SOD à manganèse (Mn-SOD) protégeant la mitochondrie, des SOD à cuivre-zinc (Cu,Zn-SOD) protégeant le cytosol et la face externe des cellules (ec-SOD). Il est cependant important de noter que la présence de la Cu,Zn-SOD n'est pas exclusive au cytosol car cette dernière présente également une certaine activité au niveau des lysosomes, des peroxysomes, du noyau et de la membrane mitochondriale. C'est la présence de l'ion cuivre qui facilite la réaction de dismutation par sa capacité d'alterner entre son état oxydé et réduit. C'est d'ailleurs par ce mécanisme que certains agents chélateurs du cuivre peuvent inhiber cette enzyme [142]. À la différence des Cu,Zn-SOD, celles à manganèse se retrouvent principalement au niveau de la mitochondrie où elles contribuent à environ 10% de

l'activité cellulaire totale [142]. La ec-SOD représente la forme extracellulaire de l'enzyme qui contient aussi le zinc et le cuivre. Elle est liée aux protéoglycanes héparane sulfate dans une variété de cellules, incluant les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Des évidences suggèrent que cette enzyme existe sous deux formes, chacune ayant une configuration en pont disulfure unique, avec une seule des formes étant active [197]. La principale fonction de cette SOD est de prévenir l'interaction de $O_2^{\bullet-}$ avec NO au niveau des cellules endothéliales [142]. La distribution ubiquitaire des SOD montre qu'elles constituent la première ligne de défense contre le stress oxydant dans les cellules.

1.2.4.1.2 La catalase

La catalase (CAT) est une protéine ubiquitaire mais fortement concentrée dans le foie et les érythrocytes. Dans toutes les cellules de mammifères, à l'exception des érythrocytes, elle est localisée presque exclusivement dans les peroxysomes (riches en oxydases) ce qui limite son action par rapport à des peroxydases cytoplasmiques. Cette enzyme métabolise l' H_2O_2 résultant de l'action des SOD ou celui généré par l'action des oxydases pour donner de l'eau (*réaction 17*).



En éliminant l' H_2O_2 , la CAT détoxifie indirectement la cellule des $\text{O}_2^{\bullet-}$ qui sont transformés en H_2O_2 par les différentes SOD. Cette enzyme possède également une activité de peroxydase qui lui permet de réagir avec des peroxydes et les alcools organiques ainsi que toute molécule capable de donner de l'hydrogène à l'eau [193]. La CAT est très efficace en présence d'un stress oxydant élevé et protège les cellules contre la production de H_2O_2 . Des études sur des modèles animaux ont montré que la CAT peut être induite par diverses cytokines en condition d'hyperoxie et par certains oxydants *in vitro* [198, 199]. Cependant, d'autres travaux ont rapporté des résultats contradictoires [200, 201].

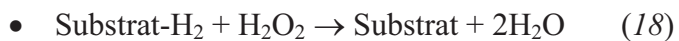
1.2.4.1.3 La glutathion peroxydase

La famille des glutathion peroxydases (GPx) représente des enzymes tétramériques qui catalysent la réduction du H_2O_2 en eau à travers GSH en GSSG. Il existe quatre GPx (GPx1-4) communes à tous les mammifères. Elles possèdent une sélénocystéine, un acide aminé rare, au sein de leur site catalytique. Deux autres GPx ont également été identifiées : la GPx5, qui n'est pas une séléno-protéine, chez les rongeurs et le singe et la GPx6 qui est retrouvée uniquement chez l'homme [202]. Alors que toutes les GPx catalysent le même type de réaction, celles-ci diffèrent par leurs substrats, leur rôle et leur localisation (Tableau 3).

Tableau 3 : Isoformes des glutathion peroxydases chez les mammifères

GPx	Synonymes	Distribution	Structure	Substrats
GPx1	Cytosolique (cGPx)	Cytosolique/foie, rein, érythrocytes, poumon	Homo tétramère	Hydroperoxydes solubles (H ₂ O ₂), organiques (acides gras peroxydés)
GPx2	Gastro-intestinal (GIGPx)	Cytosolique/Tractus gastro-intestinal, foie	Homo tétramère	Identiques à GPx1
GPx3	Plasma (pGPx) ou extracellulaire (eGPx)	Rein, Plasma	Homo tétramère	Identiques à GPx1
GPx4	Phospholipide hydroperoxyde (PHGPx)	Testicules	Monomère	Identiques à GPx1, phospholipides hydroperoxydés, esters de cholestérol
GPx5	Rongeurs uniquement (sans Se-Cys)	Épididyme	-	-
GPx6	Homme uniquement	Epithélium olfactif	-	-

De façon générale, la cGPx métabolise le H_2O_2 ainsi que les hydroperoxydes des acides gras (LOOH) en H_2O et en alcools lipidiques (LOH) correspondants. Durant cette réaction dépendante du GSH, l' H_2O_2 est utilisé pour oxyder un autre substrat (*réactions 18-19*) tandis que le GSH s'oxyde en GSSG.



Des études faites sur les animaux transgéniques montrent que les souris invalidées pour la GPx1 se développent normalement et sont capables de tolérer un stress oxydant causé par l'hyperoxie et de faible dose de paraquat (12,5 mg/kg) [203].

Ces souris GPx1^{-/-} présentent des niveaux de GPx2, GPx3 et GPx4 identiques à ceux présents chez des souris sauvages [204], ce qui suggère que les autres séléno-GPx ne peuvent pas compenser la fonction antioxydante de la GPx1. La GPx2 présente dans les cellules tapissant le tractus gastro-intestinal est quant à elle plus impliquée dans la détoxification des peroxydes alimentaires [205]. Les souris invalidées pour la GPx2 présentent un phénotype normal [206]; par contre celles invalidées à la fois pour GPx1 et GPx2 développent des cancers intestinaux et des iléo-colites (maladie de Crohn) [207, 208] en présence de bactéries gastro-intestinales. L'expression de la GPx2 étant induite par la colonisation de l'intestin par les bactéries, cette GPx aurait un rôle anti-inflammatoire

destiné à limiter les réponses inflammatoires constamment induites par la flore gastro-intestinale [209].

La GPx4 est l'unique forme de l'enzyme connue pour réduire les hydroperoxydes lipidiques complexes en lipoprotéines [210, 211] au niveau des membranes. Elle est localisée en partie dans le cytosol et en partie liée aux membranes des mitochondries et des noyaux [212, 213]. Trois formes de GPx4 sont synthétisées à partir du même gène, appelées forme cytosolique, forme mitochondriale et forme nucléaire [214]. Les souris invalidées pour la forme cytosolique meurent au stade embryonnaire, suggérant un rôle essentiel de la forme cytosolique de la GPx4 dans l'embryogenèse [215]. Les lipides peroxydés étant des activateurs des lipoxygénases, en diminuant le niveau de lipides peroxydés, la forme cytosolique de la GPx4 inactive les lipoxygénases et les cyclooxygénases et participe ainsi à la régulation de la production des leukotriènes et des prostaglandines [216]. La GPx4 pourrait donc aussi jouer un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire. Par ailleurs, la GPx4 mitochondriale pourrait avoir une fonction antiapoptotique : en diminuant les niveaux de cardiolipine peroxydée de la membrane interne mitochondriale, elle empêcherait le signal pro-apoptotique constitué par la sortie mitochondriale du cytochrome C [217]. Enfin, les souris invalidées pour la forme nucléaire de la GPx4 sont parfaitement viables [218]. Cette forme joue un rôle essentiel dans la spermatogenèse et un déficit en GPx4 au niveau des spermatozoïdes serait impliqué dans

l'infertilité humaine [219]. Si la GPx4 exerce sa fonction de peroxydase pour les lipides peroxydés dans le cytosol et dans les membranes mitochondriales et nucléaires, aucune étude n'a pu mettre en évidence un rôle au niveau des membranes plasmiques.

Les GPx agissent de concert avec la GR pour la réduction du GSSG en GSH aux dépens du NADPH qui est oxydé en NADP⁺ (*réaction 20*). Le système GPx/GSH est considéré comme un mécanisme de défense majeur dans les conditions de faible stress oxydant car il représente le principal système de protection cellulaire capable de détruire le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes organiques toxiques formés par oxydation des acides gras.



1.2.4.1.4 Les peroxyredoxines

Il existe une classe indépendante à ces GPx : les peroxyrédoxines. Ce sont des peroxydases qui possèdent une simple cystéine dans leur site actif et non pas une sélénocystéine comme les GPx. Ces protéines constituent une famille d'enzymes de 20-30 kDa, capables de réduire le peroxyde d'hydrogène, les hydroperoxydes organiques et les peroxy-nitrites en alcools correspondants (*réaction 21*). Elles possèdent un repliement caractéristique des thiorédoxines et un résidu cystéine conservé qui au cours du cycle catalytique passe d'un état oxydé dépendant d'un peroxyde à un état réduit dépendant d'une

fonction thiol. Les thiorédoxines, les glutarédoxines, les GPx et les GSH *S*-transférases (GST) ainsi que d'autres protéines impliquées dans des réactions rédox renferment ce même motif. Les peroxyrédoxines sont très abondantes : elles représentent de 0,1 à 0,8% des protéines solubles dans les cellules de mammifères [220]. Six isoformes ont été identifiées, divisées en 3 classes, les peroxyrédoxines typiques à 2 résidus cystéines (Prdx 1 à 4), les atypiques à 2 résidus cystéines (Prdx 5) et les peroxyrédoxines à résidu cystéine (Prdx 6).

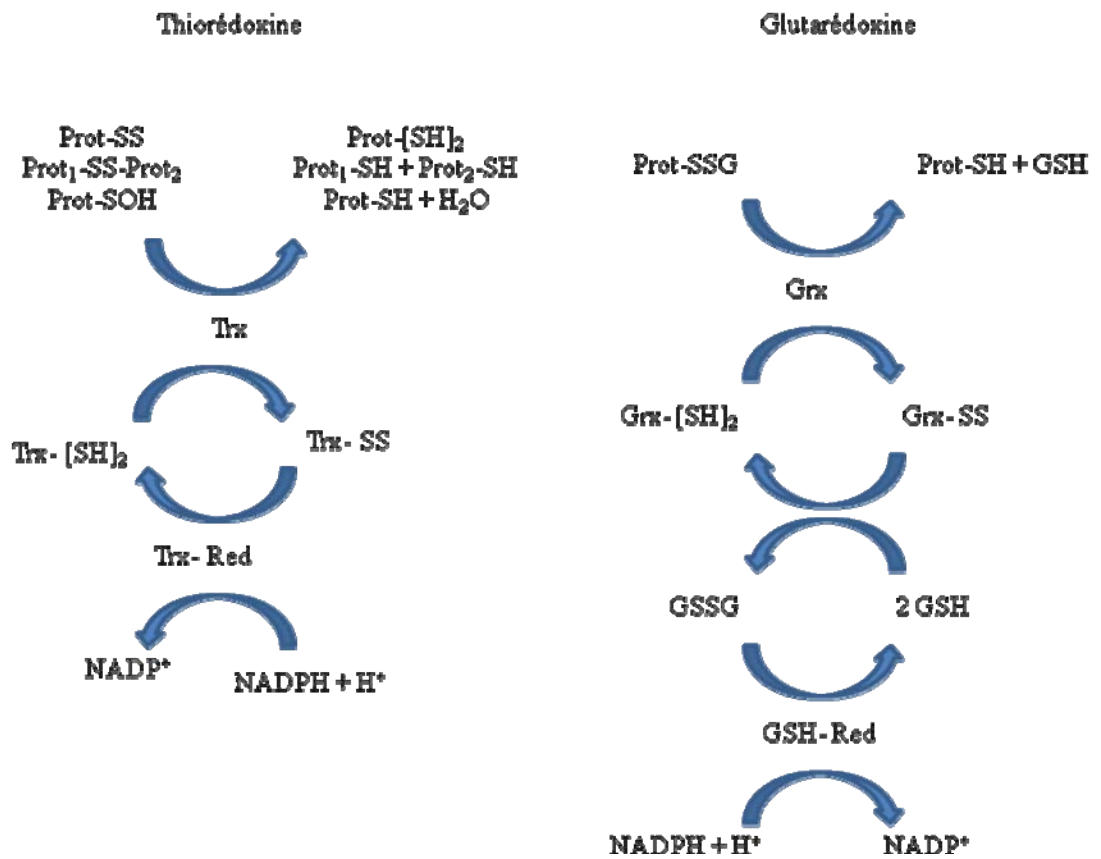


1.2.4.1.5 Les thiorédoxines et glutarédoxines

Les thiorédoxines constituent un système antioxydant qui comprend une thiorédoxine (Trx), protéine de faible poids moléculaire (10-12 kDa) et une thiorédoxine-réductase (Trx-R), séléno-protéine dépendante du NADPH. Les Trx sont des dithiol-disulfide oxydoréductases qui catalysent la réduction des disulfides en sulfhydriles correspondants. La thiorédoxine oxydée est ensuite régénérée par la thiorédoxine-réductase (Figure 12). Chez les mammifères, il existe deux isoformes de thiorédoxine, la Trx1 cytosolique et nucléaire et la Trx2, mitochondriale [221]. Les thiorédoxines sont responsables du maintien des cystéines dans leur état réduit. Certains résidus cystéines, en réponse aux changements de l'état rédox de la cellule, sont la cible de modifications oxydatives capables de modifier l'activité de nombreuses protéines (voir plus bas, section

1.2.5.3.1 sur l'état rédox). Ces modifications telles que la formation de ponts disulfures, la glutathionylation, la nitrosylation et l'oxydation sont des réactions réversibles grâce à l'action des thiorédoxines et des glutarédoxines (Figure 12). Les Trx-R permettent de régénérer la thiorédoxine qui servira en qualité d'équivalent réducteur dans les processus cellulaires quand elle ne réduit pas directement les hydroperoxydes lipidiques [222]. Cette enzyme est aussi connue pour son rôle dans le maintien des niveaux cellulaires d'autres antioxydants comme la Mn-SOD [193, 223].

**Figure 12 : Réduction des cystéines oxydées par le système
Thiorédoxine/Glutarédoxine**



Tirée de Holmgren et al. [222]

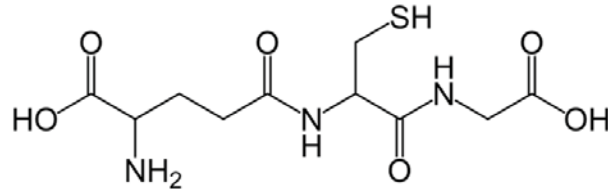
1.2.4.2 Les antioxydants non enzymatiques

Tout comme les antioxydants protéiques, différents composés de faibles poids moléculaires contribuent aux défenses antioxydantes de l'organisme. Ces antioxydants consistent en des molécules possédant un groupement thiol (glutathion), des molécules liposolubles et hydrosolubles. Les composés hydrosolubles sont principalement représentés par la vitamine C, l'acide urique et la bilirubine tandis que les antioxydants liposolubles sont représentés majoritairement par la vitamine E et le coenzyme Q₁₀.

1.2.4.2.1 Le glutathion

Le glutathion réduit (GSH; Figure 13) est un tripeptide (L- γ -glutamyl-L-cysteinyl-L-glycine) synthétisé par deux enzymes qui sont la γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCS) et la glutathion synthétase [224]. Le GSH est considéré comme la molécule non-protéique possédant un groupement thiol, la plus répandue dans la cellule. Ce peptide est retrouvé en grande majorité dans les organes fréquemment exposés aux toxines (reins, foie, poumons et intestins) [225] tandis qu'une quantité limitée est retrouvée dans les fluides biologiques [226].

Figure 13 : Représentation de la molécule de glutathion réduit



Tirée de *www.en.wikipedia.org*

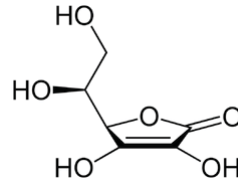
Sous sa forme réduite, le GSH agit comme antioxydant i) en tant que piègeur de radicaux, il possède la capacité de lier, « scavenger », directement les radicaux libres et de détoxifier indirectement les oxydants à travers des réactions enzymatiques [227]; ii) en tant que cofacteur de plusieurs d'enzymes antioxydantes (GPx, GST); iii) en participant à la détoxification des lipides hydroperoxydés par l'action de la peroxyrédoxine 6, et iv) en régénérant l' α -tocophérol et l'acide ascorbique sous leur forme active [140]. Au cours de telles réactions, le GSH agit comme un donneur d'électrons en s'oxydant en GSSG, la réduction du GSSG en GSH est catalysée en retour par la GR au cours d'un processus nécessitant le NADPH. Le GSH est impliqué dans la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau, et dans la réduction des hydroperoxydes à travers une réaction catalysée par la GPx [228]. Deuxièmement, le GSH peut se conjuguer aux xénobiotiques par une liaison directe/spontanée ou via une réaction catalysée par la GST, une réaction qui augmente les propriétés hydrophiles des xénobiotiques favorisant ainsi leur élimination. Troisièmement, le GSH peut se conjuguer au NO pour former un adduit S-nitrosoglutathion, lequel est clivé par le système thioredoxine pour régénérer le GSH et du NO [227]. Le couple GSH et

GSSG est un acteur important du statut rédox cellulaire. Le glutathion constitue un tampon redox cellulaire majeur et la mesure du potentiel réducteur du glutathion, calculé à partir des concentrations de glutathion réduit et oxydé selon l'équation de Nernst, permet d'estimer l'environnement redox de la cellule [229] (voir section 1.2.3). Le ratio GSH/GSSG est de fait, un bon moyen d'évaluation du stress oxydant [230].

1.2.4.2.2 L'acide ascorbique

L'acide ascorbique ou ascorbate (vitamine C; Figure 14) est connu pour sa fonction d'agent réducteur et son rôle de cofacteur dans les réactions enzymatiques d'hydroxylation. Il est généralement considéré comme une ligne protectrice de premier plan, qui répare ou neutralise les radicaux libres en donnant un simple électron, suivi par un proton, afin d'obtenir un produit chimiquement réduit, non radicalaire. Le radical ascorbyl peut ensuite subir une dismutation en ascorbate et en acide déhydroascorbique. Tant le radical ascorbyl que l'acide déhydroascorbique peuvent être réduits par les systèmes enzymatiques dépendants du glutathion, ce qui permet de recycler efficacement le pool de vitamine C biodisponible [142].

Figure 14 : Représentation de l'acide ascorbique



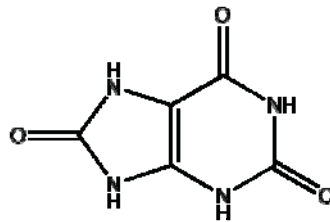
Tirée de www.fr.wikipedia.org

L'ascorbate représente une défense antioxydante importante dans le plasma humain [231, 232] où il est considéré comme l'antioxydant hydrosoluble le plus efficace [233]. De plus, l'ascorbate possède la capacité de régénérer la vitamine E afin de prévenir l'oxydation des lipides présents dans les membranes biologiques [223]. Le couple ascorbate/radical ascorbyle possède un faible potentiel rédox et la vitamine C peut céder facilement un électron à quasiment tous les radicaux libres ($O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , $\alpha\text{-TO}^{\bullet}$, LOO^{\bullet}). Le radical ascorbyle est peu réactif envers les constituants cellulaires et réagit avec lui-même pour former les acides ascorbique et déhydroascorbique. L'arrêt de la propagation des réactions radicalaires en chaîne est associé aux capacités de régénération de l'acide ascorbique (NADPH avec ou sans Trx, GSH). Par sa réactivité vis à vis des métaux de transition, l'ascorbate peut développer une activité pro-oxydante en présence de fer en produisant des radicaux hydroxyles à travers la réaction de Fenton. Il semble par ailleurs que ce phénomène bien établi *in vitro* ne soit pas retrouvé *in vivo*, où l'ascorbate protège de manière générale les molécules biologiques de l'oxydation [234].

1.2.4.2.3 L'acide urique

L'acide urique (Figure 15) est produit par l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine, réaction catalysée par la xanthine oxydase et déshydrogénase. Le rôle de l'acide urique comme antioxydant n'est pas totalement clarifié, mais il possède la capacité de réagir directement avec l'oxygène moléculaire, les radicaux hydroxyl et peroxy, les dérivés du peroxy-nitrite [235], l'oxygène singulet mais aussi l'acide hypochloreux. La réaction de l'acide urique avec les oxydants entraîne la formation du radical urate, qui peut être réduit par l'ascorbate [142].

Figure 15 : Représentation de l'acide urique



Tirée de www.upload.wikimedia.org

1.2.4.2.4 La bilirubine et l'albumine

La bilirubine représente un produit terminal de la dégradation de l'hémoglobine. Chez l'Homme, environ 275 mg de bilirubine sont produits chaque jour [142]. La bilirubine est un puissant agent réducteur et un antioxydant physiologique potentiel. Au niveau des

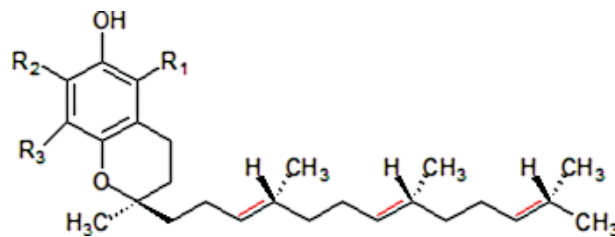
fluides extracellulaires, elle est principalement liée à l'albumine, ce qui rend ce pigment hydrophobe, hydrosoluble. La molécule libre et celle liée à l'albumine ont la capacité de réduire la vitamine E et d'inhiber la peroxydation lipidique dans le plasma et les lipoprotéines [236]. À ce jour, peu d'études ont apporté des évidences directes sur la capacité antioxydante de la bilirubine *in vivo*, quoique les animaux présentant une hyperbilirubinémie démontrent un dommage oxydant réduit en réponse à une hyperoxie [142, 237]. La molécule d'albumine contient de nombreux groupements thiols qui lui permettent de jouer le rôle de trappe radicalaire comme le GSH, sauf que les réactions dans lesquelles elle est impliquée sont plus lentes que celle observées avec le GSH.

1.2.4.2.5 *Le tocophérol*

Tout comme les antioxydants hydrosolubles, les antioxydants liposolubles jouent un rôle important dans la prévention des dommages oxydants. L'efficacité du système antioxydant repose en partie sur la complémentarité des éléments qui le composent : molécules hydro- (GSH, vit C) vs lipo-solubles (vitamine E, ubiquinone) avec des conséquences directes sur la (sous)compartmentation : membranaire vs cytosol. Huit différentes substances naturelles sont apparentées à la vitamine E chez les animaux : *d-α*-, *d-β*-, *d-γ*- et *d-δ*-tocophérols et *d-α*-, *d-β*-, *d-γ*- et *d-δ*-tocotriénols. Les tocophérols possèdent trois atomes de carbone asymétriques, ce qui permet huit isomères optiques, desquels le *RRR-α*-tocophérol (formellement appelé *d-α*-tocophérol) est la forme la plus

active de vitamine E [142]. L' α -tocophérol est un antioxydant essentiel dans la prévention de l'oxydation des lipides, surtout des lipoprotéines qui sont les principaux véhicules assurant son transfert du foie vers les tissus périphériques : son caractère lipophile lui permet d'agir au site même de la peroxydation lipidique membranaire.

Figure 16 : Représentation de l' α -tocophérol



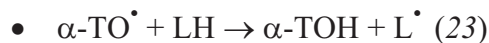
Tirée de www.en.wikipedia.org

Les tocophérols sont d'excellents capteurs de LOO^\bullet , ce qui est considéré comme une action antioxydante très importante de la vitamine. Dans le cas de l' α -tocophérol, il peut réagir avec les peroxylys lipidiques ou une autre espèce radicalaire, et ainsi former un produit non radicalaire (NR) (*réaction 22*).

- $\alpha\text{-TO}^\bullet + \text{LOO}^\bullet \rightarrow \text{NR}$ (22a)
- $\alpha\text{-TO}^\bullet + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{NR}$ (22b)

En plus de réagir avec les radicaux peroxylys, l' α -tocophérol peut réagir avec l' O_2 , l' HOCl et le ONOO^- [142]. Le radical tocophéroxyly est peu réactif de par sa structure cyclique et peut-être régénéré par l'acide ascorbique, qui devient alors radicalaire. Tout

comme l'ascorbate, l' α -tocophérol permet la réduction des métaux de transition tels que le fer et le cuivre, ce qui est un autre effet pro-oxydant de la vitamine. L' α -tocophérol peut aussi, de manière importante, réagir avec les lipides et peut soustraire l'atome d'hydrogène du LH (*réaction 23*), réaction considérablement impliquée dans l'oxydation des LDL:



En plus de l' α -tocophérol, le γ -tocophérol est présent dans les lipoprotéines, mais constitue un antioxydant moins actif que l' α -tocophérol et serait moins en mesure de contrôler la peroxydation lipidique [142]. Il a été rapporté que le γ -tocophérol, mais non l' α -tocophérol, inhibe l'inflammation induite chez les rats, ainsi que l'augmentation des éicosanoïdes pro-inflammatoires associée à la peroxydation lipidique [238]. Il semble aussi que, *in vitro*, le γ -tocophérol soit plus efficace que l' α -tocophérol pour protéger contre les dérivés réactifs de l'azote. Plusieurs études tentent maintenant d'évaluer son potentiel de protection contre l'inflammation et les maladies cardiovasculaires *in vivo* [239].

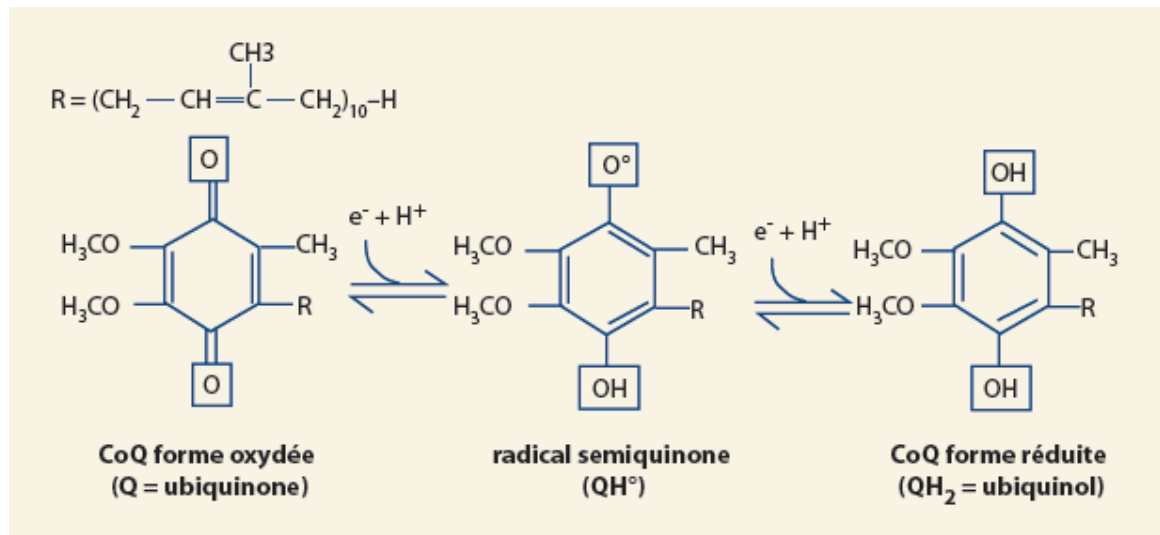
1.2.4.2.6 Le coenzyme Q_{10}

Le coenzyme Q_{10} appartient à une famille de composés connus sous le nom d'ubiquinones, qui sont des molécules liposolubles synthétisées par les animaux, incluant l'Homme, et qui contiennent une structure benzoquinone possédant de 1 à 12 unités d'isoprène. Le coenzyme Q_{10} possède 10 unités isoprène et constitue la forme prédominante

d'ubiquinone chez l'Homme. Il est retrouvé virtuellement dans toutes les membranes cellulaires, ainsi que dans les lipoprotéines. Sa capacité à donner et à recevoir des électrons est importante pour les fonctions physiologiques. Il joue aussi un rôle important comme agent de transfert d'électrons et de protons au niveau de la production mitochondriale d'ATP et dans le maintien d'un pH optimal dans les lysosomes [240].

La molécule d'ubiquinol (forme entièrement réduite du coenzyme Q₁₀) est un antioxydant efficace qui peut inhiber l'oxydation des protéines et des lipides membranaires [241]. Il constitue aussi une ligne de défense antioxydante liposoluble primaire contre la peroxydation lipidique des LDL, même s'il est présent en plus faibles quantités que l' α -tocophérol [142]. L'ubiquinol réduit l' α -tocophérol et cette propriété compte probablement fortement pour sa capacité de contrôler la peroxydation lipidique [142].

Figure 17 : Formes oxydée, radicalaire et réduite du Coenzyme Q₁₀

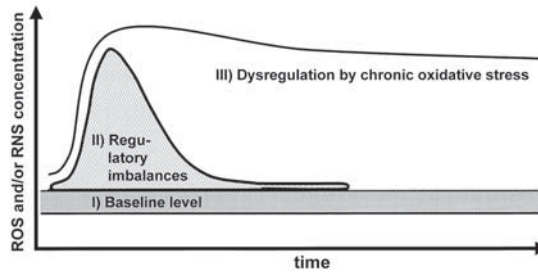


Tirée de Haleng et al. [242]

1.2.5 LA BALANCE OXYDANTS/ANTIOXYDANTS

Les espèces réactives sont maintenant reconnues pour avoir un double rôle, à la fois bénéfique dans le cadre des défenses de l'organisme, et délétère dans le cadre d'un stress oxydant intense. À de faibles concentrations, les espèces réactives sont bénéfiques puisqu'elles jouent un rôle dans la régulation redox de plusieurs fonctions physiologiques. Au contraire, une surproduction, résultant par exemple de l'activité mitochondriale de la chaîne de transport des électrons ou d'une stimulation excessive des NADPH oxydases, provoque un stress oxydant qui peut entraîner des dommages à des macromolécules cellulaires (lipides, protéines, ADN). L'amplitude et la durée de l'augmentation des niveaux de RONS déterminent la régulation redox et le stress oxydant tel qu'illustré dans la figure 18. Dans les conditions normales, les espèces réactives sont retrouvées à des concentrations relativement faibles dans les cellules (« I - baseline level »). L'augmentation contrôlée des RONS, dans certaines conditions, conduit à un déséquilibre temporaire, nécessaire à l'activation de certaines fonctions cellulaires (« II - Regulatory imbalances »). La production continue et excessive d'espèces réactives conduit à des modifications persistantes de certaines voies de signalisation et d'expression génique ainsi qu'à des dommages oxydants (« III - Dysregulation by chronic oxidative stress »).

Figure 18 : Régulation redox et stress oxydant



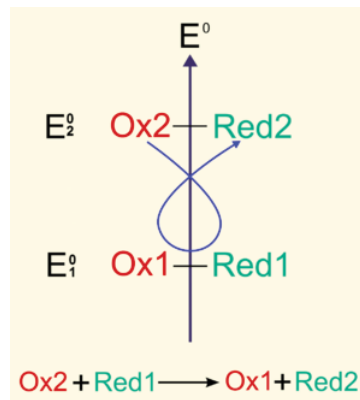
Tirée de Droge et al. [243]

1.2.5.1 Le potentiel redox

Une molécule est dite oxydante si elle a le pouvoir de gagner un électron, la molécule fournissant cet électron passe alors de l'état réduit à l'état oxydé tandis que la molécule oxydante se retrouve dans un état réduit (Figure 19). Les deux états, oxydé et réduit, d'une même molécule forment un couple redox dont le potentiel redox (E°) croît avec le pouvoir oxydant de l'espèce oxydée du couple [244]. Le potentiel redox intracellulaire représente la résultante de l'ensemble des couples redox présents dans la cellule, et il est évalué par le rapport des concentrations des formes oxydée et réduite d'un couple redox prépondérant. Par exemple, le potentiel redox intracellulaire va déterminer les proportions relatives des espèces oxydée ou réduite de chaque couple redox en fonction de leur E° . On se sert généralement du couple formé par GSH et GSSG pour mesurer le

potentiel redox intracellulaire; à ne pas confondre avec le statut redox cellulaire qui règle l'homéostasie redox intracellulaire.

Figure 19 : Couples redox et leur participation dans l'équilibre redox



Tirée de [www. wikipedia.fr](http://www.wikipedia.fr)

1.2.5.2 Le statut redox

Les processus redox contrôlent et ajustent les niveaux extra- et intra-cellulaires des RONS. Les couples redox forment ainsi un réseau dans le but d'échanger des électrons, en les acceptant ou en les donnant à des équivalents réducteurs, afin de garantir la fonctionnalité de certaines enzymes. Le statut redox cellulaire est déterminé par trois principaux couples redox : (NADPH/NADP⁺), (TRXred/TRXox) et (GSH/GSSG). Ces acteurs modulent l'état de plusieurs molécules biologiques (protéines, lipides et glucides) ayant des rôles essentiels dans la signalisation cellulaire. Des fluctuations dans le statut redox de la cellule vont aussitôt affecter son fonctionnement et/ou son intégrité par

l'activation des voies de signalisation sensibles à l'état redox (réponse immunitaire, apoptose) ou par la dégradation des constituants cellulaires (oxydation des lipides, protéines, glucides) [229, 243, 245].

1.2.5.3 Les réactions redox et la signalisation cellulaire

Lorsque les espèces réactives sont produites physiologiquement, elles agissent sur des cibles spécifiques pour moduler des voies de signalisation. Cette spécificité est importante puisqu'elle distingue la signalisation redox du stress oxydant. La signalisation redox implique donc que l'état redox cellulaire soit transitoirement perturbé par une augmentation de la production des RONS ou par une diminution de l'activité des systèmes antioxydants. Dans ce contexte, les réactions redox impliquent l'oxydation réversible par une espèce réactive, d'un acteur d'une voie de signalisation dont l'activité globale va être modulée. Le stress oxydant quant à lui entraînera une oxydation irréversible des acteurs de la cascade de signalisation pour engendrer les phénomènes bien connus tels que l'apoptose et les processus inflammatoires [142].

1.2.5.3.1 Modifications redox des protéines

L'action des RONS sur certains groupements fonctionnels des protéines, changeant par exemple leur état thiol/disulfide, est souvent impliquée dans la signalisation cellulaire.

Les groupements sulfhydriles de la vaste majorité de résidus cystéine des protéines ont un pKa supérieur à 8 et sont donc protonés (Cystéine-SH) au pH physiologique. Cependant à ce pH, certaines protéines possèdent des résidus cystéine sous la forme d'un anion thiolate (Cystéine-S⁻), et ceci grâce à des interactions avec des acides aminés particuliers qui diminuent leur pKa [246]. Il semblerait que ce soit ces Cystéine-S⁻ qui servent de « switch » sensible à l'état redox et qui régulent la fonction de ces protéines [247]. L'oxydation des résidus cystéine-S⁻ peut conduire à la formation : 1) de ponts disulfures intra- et inter- protéines; 2) de protéines glutathionylées (protéine-SSG); 3) de protéines nitrosylées (protéine-SNO); et 4) de protéines oxydées sous les formes d'acide sulfénique (protéine-SOH).

1.2.5.3.2 Modifications des voies de signalisation

1.2.5.3.2.1 Inhibition des protéines phosphatases

L'inhibition de protéines phosphatases spécifiques est la première phase de l'activation de certaines voies de signalisation dépendantes des protéines kinases. Trois principales classes de phosphatases sont identifiées : les tyrosine phosphatases (PTP); les « dual-specificity » (thréonine/tyrosine) phosphatases (DSP); et les sérine/thréonine phosphatases (PP). Dans le site catalytique des PTP et DSP, un résidu cystéine existe sous la forme d'anion thiolate et participe à la déphosphorylation. L'H₂O₂ mais aussi l'O₂^{•-} et

l' OH^\bullet ont été démontrés capables de réagir avec l'anion thiolate et de former un résidu cystéine sulfonylée (cystéine acide sulfonique) rendant les phosphatases inactives [248]. Le site actif des PP ne possède pas de résidus cystéine mais des métaux (fer, zinc), un élément important pour l'activité et la structure de ce type de phosphatases. L'oxydation de ces métaux rend l'enzyme inactive [249].

1.2.5.3.2.2 Activation des protéines kinases

Il est maintenant bien établi que les oxydants peuvent augmenter l'activité de tyrosine et de sérine/thréonine kinases. Cependant, pour plusieurs d'entre elles il n'est encore pas clairement démontré si cette activation est causée par une modification rédox de la kinase elle-même, d'un activateur en amont dans la voie de signalisation, ou de l'inhibition de phosphatases. Parmi les sérine/thréonine kinases la famille des *mitogen activated protein kinase* (MAPKs) est certainement la mieux connue. Les membres de la famille des MAPKs : *extracellular signal-regulated kinases* 1 et 2 (ERK1/2), *c-Jun N-terminal kinase* (JNK1, 2, 3), p38 et BMK1 sont fortement activées par les espèces réactives ou par un léger déséquilibre de l'état redox cellulaire [250, 251].

1.2.5.3.2.3 Activation des facteurs de transcription

Suite à l'activation de facteurs de transcription, la stimulation des voies de signalisation induit la transcription de gènes spécifiques. Plusieurs facteurs de transcription peuvent être régulés par l'environnement redox cellulaire, soit principalement le *nuclear-related factor-2* (Nrf2), le *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), l'*activator protein-1* (AP1) et les *peroxysome proliferator-activated receptors* (PPAR). La réparation de l'ADN, la stimulation du système immunitaire, l'induction de l'apoptose et l'arrêt de la prolifération des cellules endommagées sont les principales fonctions des gènes sous le contrôle de ces facteurs de transcription : le facteur Nrf2 régule l'expression des enzymes antioxydantes; NF- κ B est principalement impliqué dans la réponse inflammatoire; AP-1 est important pour la croissance cellulaire et la différenciation; et p53 contrôle la division cellulaire. La majorité de ces facteurs possèdent des résidus cystéine redox sensibles, permettant une régulation directe de leur activité. Cependant d'autres mécanismes ont également été mis en évidence tels que des modifications oxydatives de leurs partenaires de régulation ou des protéines en amont dans la voie de signalisation.

- **Nrf2**

Ce facteur contrôle la transcription de nombreuses enzymes antioxydantes et, joue donc un rôle central dans la régulation de l'équilibre redox cellulaire [252]. En condition

normale, la transcription par Nrf2 est inhibée par son répresseur cytosolique, Keap-1 qui possède un résidu cystéine, cible de modifications redox qui permettront la dissociation de Nrf2. L'exposition aux RONS induit la dissociation de Nrf2 et Keap-1 et permet à Nrf2 d'être acheminé au noyau où il se lie alors aux séquences ARE des promoteurs des gènes cibles [253].

- **NF-κB**

Le facteur nucléaire NF-κB est un facteur de transcription qui régule l'expression de la chaîne κ dans les lymphocytes B. Il fait partie d'une classe de facteurs de transcription inductibles, dimériques, qui est impliquée dans l'activation d'une centaine de gènes impliqués dans la réponse à l'infection, la réponse inflammatoire, la défense anti-apoptotique, la prolifération cellulaire et le stress oxydant [254]. Le NF-κB joue un rôle important dans la modulation de l'expression de plusieurs gènes pro-inflammatoires impliqués dans la réponse inflammatoire comme les cytokines, et plus particulièrement les interleukines (IL-1, IL-6, et IL-8) et les chémokines (*tumor necrosis factor* : TNF-α) [255]. Dans les cellules non stimulées, le NF-κB est séquestré dans le cytoplasme grâce à sa liaison à IκB, protéine inhibitrice qui empêchent sa translocation vers le noyau [254]. Différents stimuli tels que les cytokines (TNFα), les infections et les radicaux libres induisent la dégradation de IκB et la translocation de NF-κB dans le noyau [256]. Une fois activé par les RONS, IκB est dégradé puis l'hétérodimère p65-p50 (abondant dans la majorité des types cellulaires) va migrer dans le noyau pour se lier à des sites spécifiques

sur l'ADN (sites κ B), situés dans les régions promotrices ou amplificatrices de certains gènes [254, 256]. La terminaison du signal se fait par une nouvelle séquestration de NF- κ B dans le cytoplasme à travers une nouvelle synthèse de I κ B, induite par NF- κ B [257].

- **AP-1**

AP-1 est un facteur de transcription sensible à l'oxydation et à la présence des facteurs de stress dans la cellule dont l'expression est diminuée par les antioxydants [258]. Le processus d'activation d'AP-1 est contrôlé par les MAPK, les signaux de différenciation et les cytokines pro-inflammatoires [259] qui favorisent sa fixation à des éléments de réponse *tetradecanoylphorbol-13-acetate response element* (TRE), situés dans les régions promotrices de nombreux gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et la réponse inflammatoire [260]. Peu d'information concernant les mécanismes exacts d'activation de l'AP-1 par les RONS est connue, mais il est possible que des modifications post-transcriptionnelles ou encore des interactions avec d'autres facteurs de transcription modulent son activité [261].

- **PPAR**

Les PPAR définissent un groupe de récepteurs nucléaires agissant comme des facteurs de transcription [262] qui contrôlent l'expression de différents gènes impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire et l'apoptose [263, 264]. Trois types de PPAR

(α , β et γ) ont été identifiés chez l'Homme, l'isoforme α (exprimé en majorité dans le foie) contrôle l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des principales défenses antioxydantes (CAT, SOD, GSH) [257, 261] tandis que l'isoforme γ (exprimé dans le tissu adipeux et l'intestin) supprime la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages activés [265, 266]. Les PPAR sont activés par les lipides et les eicosanoïdes et une fois activés, ils exercent des activités anti-inflammatoires dans différents types cellulaires en inhibant l'expression de gènes tels que ceux codant pour les cytokines et les facteurs de transcription pro-inflammatoires, par exemple le NF- κ B et l'AP-1 [263, 264].

1.2.6 STRESS OXYDANT DANS LA FIBROSE KYSTIQUE

L'inflammation est reconnue comme un phénomène majeur participant au développement de la FK. En effet, les atteintes tissulaires caractéristiques de la maladie sont constituées d'un grand nombre de réactions impliquant les défenses immunitaires, principalement les cellules phagocytaires mononucléés (monocytes et macrophages) et les neutrophiles polynucléaires. Ces derniers vont induire une synthèse accrue de cytokines pro-inflammatoires (interleukines et chemokines) et de protéases (élastase, gélatinase et collagénase) qui vont dégrader les organes à sécrétions exocrines et plus particulièrement le poumon [267]. Au cours de ce processus, les cellules immunitaires augmentent leur production de RONS dans le but de combattre l'infection bactérienne [128, 129] si bien qu'elles finissent par générer un stress oxydant qui, en retour va activer les facteurs de

transcription sensibles à l'état rédox et ainsi maintenir l'inflammation de manière chronique.

La protéine du CFTR joue un rôle essentiel dans le processus inflammatoire au niveau pulmonaire, surtout lorsqu'elle est non fonctionnelle, puisqu'elle bloque l'acidification des phagolysosomes et empêche l'élimination des bactéries phagocytées. Cette protéine mutée perd également son rôle de récepteur bactérien et devient incapable d'induire le recrutement de la protéine *lung resistance-related protein* pour l'internalisation et la destruction des bactéries par le biais de l'apoptose [268, 269]. Cependant, certaines évidences suggèrent que les processus inflammatoires dans la FK ne sont pas toujours une conséquence de l'infection bactérienne [270, 271], mais que ces derniers sont opérationnels dès la naissance en réponse à la présence d'une protéine du CFTR mutée au niveau des voies respiratoires [272]. De plus l'atteinte pulmonaire semble associée à une dérégulation de certaines voies de signalisation puisque les cellules épithéliales bronchiques porteuses de mutations dans le gène du *CFTR* présentent une activation permanente du facteur de transcription NF- κ B et celle des MAPKs sans compter une production spontanément augmentée d'IL-8 [273, 274], tandis qu'à l'inverse elles produisent moins d'IL-10 (interleukine anti-inflammatoire) connue pour son effet suppresseur sur les cytokines pro-inflammatoires [275].

La perte de fonctionnalité de la protéine du CFTR dans le tractus gastro-intestinal est à l'origine de graves problèmes de malnutrition [26] qui influencent largement le profil inflammatoire [276-278]. En effet, les acides gras essentiels comme l'acide linoléique (AL, 18:2n-6) et l'acide α -linoléique (AAL, 18:3n-3) jouent un rôle fondamental dans la fonction immunitaire et leurs apports dépendent entièrement d'une alimentation et d'une absorption intestinale adéquate puisqu'ils seront par la suite convertis en acide gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique (AA, 20:4n-6), l'acide eicosapentaénoïque (AEP, 20:5n-3) et l'acide docosahexaénoïque (ADH, 22:6n-3). Une déficience en acides gras essentiels a été démontrée dans la FK [279-281] mais les niveaux plasmatiques d'AA demeurent généralement élevés [282]. L'implication de l'AA dans le processus inflammatoire se distingue parce qu'il est un précurseur d'éicosanoïdes inflammatoires [283] et un médiateur potentiel de l'inflammation [284]. Plusieurs études ont montré une hausse des concentrations des molécules inflammatoires dérivées de l'AA, incluant les prostaglandines [285, 286], les thromboxanes [284] et les leukotriènes [287-289] dans le sang [285] et, l'air expiré [290] ainsi que dans les lavages broncho-alvéolaires [289] chez les patients FK.

La FK se manifeste par un mauvais contrôle des niveaux de RONS générés durant les diverses réactions inflammatoires à cause de la malabsorption des vitamines [267] et la mauvaise distribution du GSH [90, 91] causées par le mauvais fonctionnement de la protéine du CFTR. La production chronique d'espèces réactives réduit considérablement

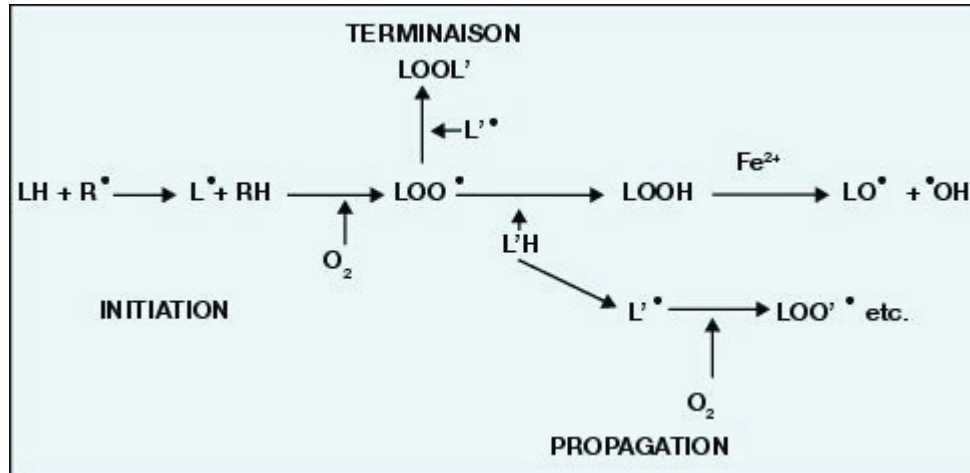
les niveaux plasmatiques de GSH chez la plupart des patients [291, 292]. À la différence des autres maladies génétiques affectant le métabolisme du glutathion, son mécanisme de recyclage demeure fonctionnel durant la FK. Puisque le GSH est essentiel à la régénération des vitamines, sa déficience s'accompagne d'une diminution des niveaux d'acide ascorbique et d' α -tocophérol [293]. La diminution des principales défenses antioxydantes en parallèle avec la production exagérée de RONS va favoriser les attaques radicalaires au sein des molécules biologiques pour aboutir à l'oxydation des lipides, des protéines, des glucides et de l'ADN. Les produits dérivés de ces différents processus d'oxydation sont connus pour accroître l'inflammation et par conséquent la production d'espèces réactives en favorisant ainsi l'établissement d'un cercle vicieux pendant la maladie [294].

1.2.6.1 La peroxydation lipidique

Du fait de leur structure et abondance, les lipides polyinsaturés, tels que les phospholipides, le cholestérol, les esters de cholestérol, les glycolipides des membranes cellulaires et les lipoprotéines sont particulièrement sensibles à l'oxydation par les métaux et les radicaux libres oxygénés [141]. Cette oxydation déclenche une série de réactions en chaîne, la peroxydation lipidique, qui conduit à la formation de lipides hydroperoxydés (LOOH) ou d'aldéhydes [295]. En effet, les LOOH étant instables en milieu aqueux, ils se décomposent facilement en produits secondaires, tels que les aldéhydes. La peroxydation lipidique se décompose en trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (Figure

20). La phase d'initiation est due à l'attaque d'une espèce radicalaire (R^\bullet : HO^\bullet , RO^\bullet , ROO^\bullet , $ONOO^\bullet$) suffisamment réactive pour arracher un hydrogène situé en α d'une double liaison (hydrogène le plus labile) au niveau d'un acide gras polyinsaturé (LH) pour former un radical lipidique (L^\bullet). Ce radical se stabilise par réarrangement intramoléculaire en formant un diène conjugué capable de réagir facilement avec l' O_2 pour donner LOO^\bullet . Ce dernier peut arracher un hydrogène d'une autre molécule d'acide gras adjacente, créant ainsi une réaction en chaîne (propagation) ou évoluer en peroxyde cyclique qui, au contact d'un autre acide gras donne naissance à un nouveau radical diène. La combinaison de LOO^\bullet avec un atome d'hydrogène conduit à la formation d'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) qui, sous l'action des métaux (Fe^{2+} ou Cu^+), formera LO^\bullet et HO^\bullet . Le radical LOO^\bullet peut également subir une coupure non enzymatique pour donner naissance à divers produits : aldéhydes (α et β insaturés) plus ou moins toxiques comme le 4-hydroxynonanal (HNE), le malondialdéhyde (MDA) et le 2-propenal (acroléine) [296, 297], ainsi que les isoprostanes [298].

Figure 20 : Étapes du processus de peroxydation lipidique



Tirée de Michel et al. [299]

L'intensité et la multiplicité des produits dépendent de la nature des acides gras attaqués (exemple : le C18:2 conduit à la formation de 2 hydroperoxydes alors que le C22:6 conduit à la formation de 10 hydroperoxydes : ce processus est non directement proportionnel au nombre de C). L'oxydation des lipides, des lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires ont des conséquences différentes. Lorsque l'attaque se porte sur les lipoprotéines, ces dernières s'oxydent et sont captées par les macrophages en induisant la formation de dépôts lipidiques que l'on trouve au niveau des plaques d'athéromes (athérosclérose) à l'origine des maladies cardiovasculaires [300]. Dans la FK, l'attaque des phospholipides membranaires modifiera la structure de l'épithélium pulmonaire et affectera le bon fonctionnement des récepteurs et transporteurs membranaires [301].

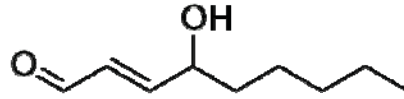
1.2.6.1.1 *Les aldéhydes*

Comparés aux radicaux libres très réactifs, les aldéhydes sont plus stables et possèdent une durée de vie plutôt longue leur permettant par conséquent, de diffuser à partir de leur lieu de formation (membranes plasmiques) pour atteindre et attaquer des cibles intra- et extracellulaires distantes de l'évènement radicalaire d'origine. Les aldéhydes exhibent une grande réactivité envers les molécules biologiques (protéines, lipides et ADN) si bien qu'ils sont capables de former des adduits covalents avec ces dernières. Trois principaux groupes d'aldéhydes sont souvent cités dans la fibrose kystique : les 2-alkenals (exemple : hexenal), les 4-hydroxy-2-alcenals (exemple : HNE) et les cetoaldéhydes (exemple : MDA) [302, 303].

1.2.6.1.1.1 Le 4-Hydroxynonéal

La première caractérisation du HNE (ou trans-4-hydroxy-2-nonenal; Figure 21) a été faite par Esterbauer et collaborateurs en 1991 [295] et depuis ce composé a fait l'objet d'une recherche constante quant à sa formation, la compréhension de son rôle dans le développement des maladies inflammatoires chroniques [296]. Cet aldéhyde est formé à partir des acides gras de la série n-6 et l'on sait avec exactitude qu'il provient des hydroperoxydes émanant de l'oxydation de l'acide linoléique et l'acide arachidonique [304].

Figure 21 : Molécule de 4-hydroxy-2-nonéanal avec ses insaturations α et β

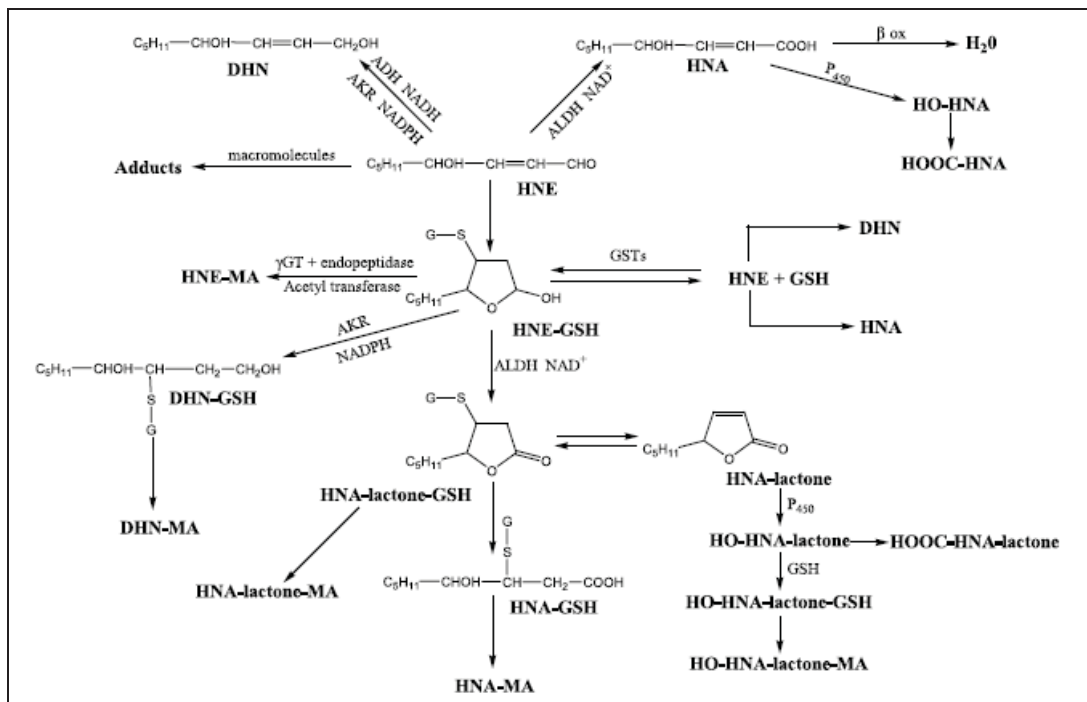


Tirée de *www.wikipedia.fr*

Dans les conditions physiologiques, la concentration cellulaire de HNE varie entre 0.1-3 μM [296] alors qu'elle peut atteindre 5-10 μM dans les conditions pathologiques [305]. Le HNE agit comme un second messager toxique, capable d'altérer diverses activités biologiques dans la cellule allant de l'inhibition de la synthèse et de la fonction des peptides (GSH), jusqu'à l'inactivation des enzymes (enzymes contenant des fonctions -SH) en passant par la stimulation de processus inflammatoires (induction de la cyclooxygénase 2) et l'inhibition des gènes de la réponse antioxydante (Nrf2) [305-307]. La formation d'adduits covalents (adduit de Michael ou base de Schiff) entre le HNE et les protéines (HNE-protéines) possédant une chaîne aminée latérale (lysine ou histidine) représente également un évènement toxique à travers lequel les biomolécules perdent leur activité biologique [308]. Une augmentation des concentrations en HNE a été démontrée durant la FK dans l'air expiré [309], les sécrétions bronchiques et les lavages broncho-alvéolaires [310]. Plus récemment, une augmentation des niveaux sanguins d'adduits HNE-protéines a également été démontrée dans cette maladie [311] (article 1 joint à ce document). Il existe trois grandes voies de détoxification du HNE dans la cellule : 1) sa liaison au GSH pour former les adduits GS-HNE; 2) son oxydation en acide 4-hydroxynonénoïque (HNA); et 3)

sa réduction en alcool 1,4-dihydroxynonene (DHN) [312]. La formation des complexes GS-HNE constitue la principale voie de détoxification du HNE dans les érythrocytes et le foie [313, 314]. Les complexes GS-HNE sont éliminés par voie urinaire après réduction en GS-DHN (acide mercapturique) ou ω -oxydation en GS-HNA (lactone) [315] alors que les adduits HNE-protéines sont essentiellement dégradés au niveau du protéasome 20S [316].

Figure 22 : Principales voies métaboliques du HNE

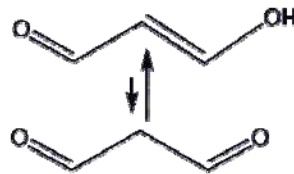


Tirée de Alary et al. [315]

1.2.6.1.1.2 Le malondialdéhyde

À la différence du HNE qui provient à la fois de la dégradation de l'acide linoléique et de l'acide arachidonique, le MDA (Figure 23), le β -dialdéhyde tricarboné le plus simple et le plus connu, est produit lors de la coupure des AGPI (n-6 et peu de n-3) possédant au moins deux doubles liaisons (acide arachidonique, acide éicosapentaénoïque, acide docosapentaénoïque, acide linoléique). Plus précisément, ce sont les hydroperoxydes très sujets à des réactions de cyclisation, qui conduisent à la formation d'hydrobicycloendoperoxydes qui eux, se décomposeront par scission pour donner du MDA [295].

Figure 23 : Tautomérie au sein de la molécule de MDA



Tirée de www.commonswikimedia.org

D'autres composés non lipidiques tels que le désoxyribose ou le saccharose tout comme la biosynthèse des éicosanoïdes [317, 318] sont capables de générer le MDA. Même si à pH physiologique le MDA est principalement sous forme d'ion enolate qui a relativement une faible réactivité [295], il est capable de réagir avec des groupements ε -

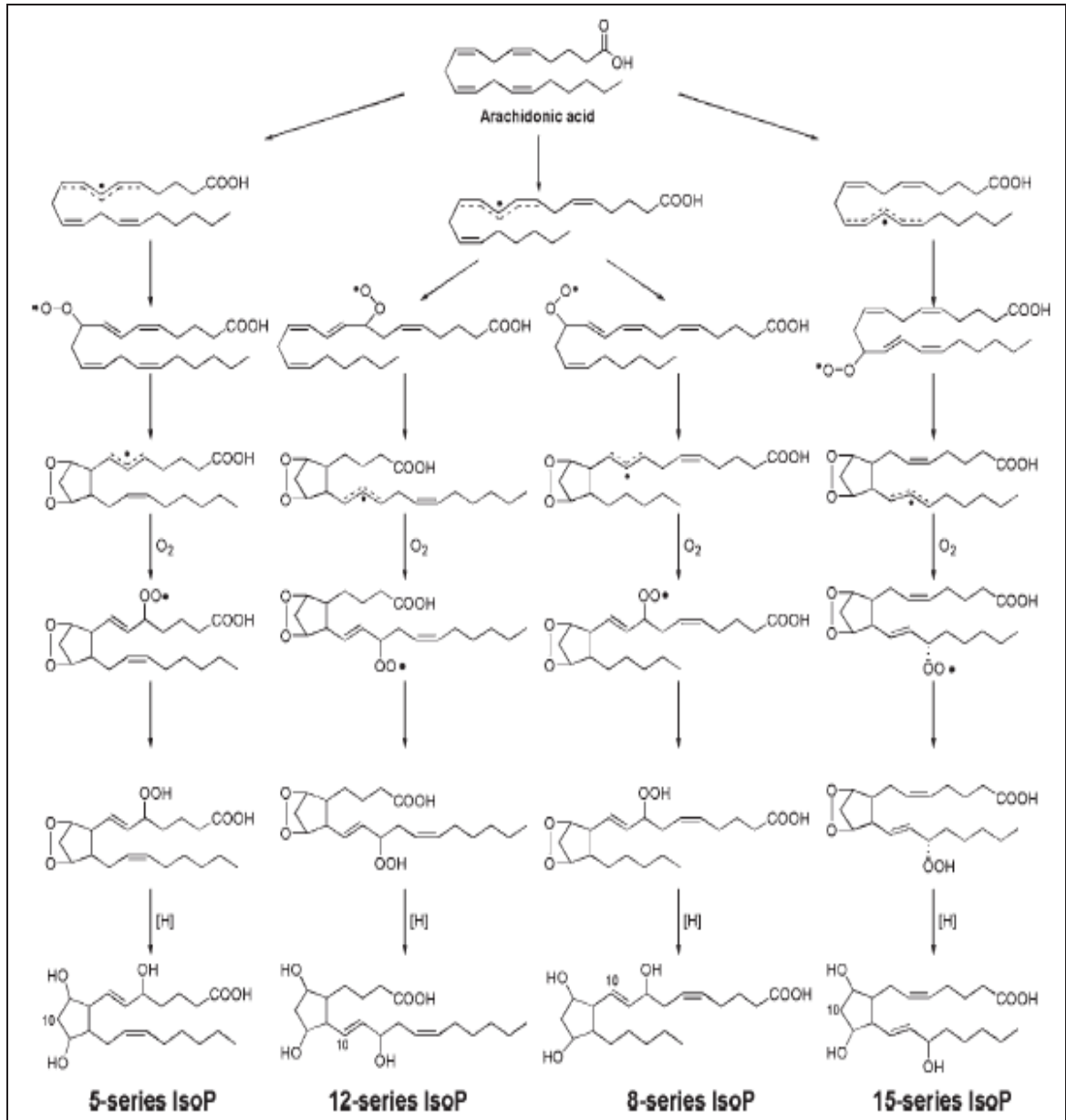
aminés de lysine au sein des protéines, pour former des adduits MDA-protéines. Hormis le fait que la modification des protéines altère leurs propriétés biologiques, les adduits MDA-protéines sont immunogéniques et des anticorps dirigés contre ces derniers ont été détectés dans les sérums humains [142]. Certaines études ont rapporté que le titre de ces anticorps était étroitement associé à la progression des complications dans certaines maladies pulmonaires comme la FK et l'asthme [142, 301]. Chez les patients FK, une augmentation dans la modification des protéines plasmatiques par le MDA [319-324] ainsi qu'une forte excrétion urinaire de MDA [325] ont été rapportés.

1.2.6.1.1.3 Les F₂-isoprostanes

Les F₂-isoprostanes (Figure 24) forment une famille de substances semblables aux prostaglandines PGF_{2α} qui sont produites *in vivo* par une attaque radicalaire des RONS sur l'acide arachidonique [326]. Lors de leur formation, les F₂-isoprostanes sont initialement estérifiés sur les phospholipides, puis ils sont détachés sous forme libre dans la circulation sanguine par des phospholipases [327] avant leur excrétion dans les urines. Les F₂-isoprostanes sont des composés relativement stables, présents en quantité dosable dans les conditions physiologiques, dont les concentrations urinaires et plasmatiques sont modulées par un stress oxydant *in vivo* tout comme leur formation est modulée par certains antioxydants [135, 328]. Parmi les 64 isomères des F₂-isoprostanes disponibles, la classe des 8-iso-Prostaglandines F_{2α} (iPF_{2α}-III ou 15-F_{2t}-IsoP) est celle que l'on retrouve dans les

urines chez l'Homme. La quantification de cette classe d'isoprostanes est d'ailleurs la référence actuelle pour l'évaluation du stress oxydant *in vivo* [329] et comme biomarqueur de la peroxydation lipidique dans le cadre de nombreuses pathologies inflammatoires et chroniques [330-333]. De plus, les isoprostanes $iPF_{2\alpha}$ -III ont été associés à la vasoconstriction [328] dans le lit vasculaire rénal et pulmonaire [326]. Chez les malades FK, une augmentation des concentrations en F_2 -isoprostanes a été rapportée dans l'air expiré, les urines, le plasma et le sang [332, 334-338]. Tout comme le HNE et le MDA, les molécules d'isoprostanes sont maintenant considérées non seulement comme des biomarqueurs du stress oxydant mais aussi comme des molécules bioactives impliquées dans la pathologie de la FK [339, 340].

Figure 24 : Structure et formation des F₂-isoprostanes



Tirée de www.media.wiley.com

1.2.6.2 L'oxydation des protéines

Les protéines comportant un groupement sulfhydryle (SH) sont les plus affectées par l'action des RONS durant le stress oxydant. La présence de groupement SH dans les enzymes et les protéines de transport est généralement impliquée dans le maintien de la structure tridimensionnelle mais aussi dans le fonctionnement du site catalytique et par conséquent dans la fonctionnalité. L'oxydation de ces protéines entraîne généralement une perte des propriétés biologiques en plus de les rendre sensibles à l'action des protéases. Ces protéines oxydées deviennent hydrophobes, soit par suppression des groupements amines ionisables, soit par extériorisation des zones hydrophobes centrales si bien qu'elles forment des amas dans les cellules qui, une fois associés aux lipides, forment des dépôts de lipofuschines [341]. Une accumulation de protéines oxydées dans le tissu pulmonaire a été démontrée durant la FK [342, 343]. La formation de protéines carbonylées, résultant de l'oxydation ou de la glycation (résidus lysine) des acides aminés des chaînes latérales (résidus lysine, arginine, proline et thréonine) a aussi été démontrée dans le plasma des patients FK [297, 344].

1.2.6.3 L'oxydation de l'ADN

L'ADN et les bases qui le composent, essentiellement la guanine, sont également sensibles à l'action du stress oxydant. Une attaque radicalaire des RONS entraîne une

oxydation des bases en engendrant la formation de molécules modifiées telles que la 8-hydroxy-20-deoxyguanosine (8OHdG) oxo-guanine, la 8 nitro-guanine et la 8 oxo-adénine, la 5-hydroxy-methyl uracile. Habituellement, la mesure de 8OHdG sert d'indicateur fiable de dommage oxydatif de l'ADN [330, 345, 346]. Une augmentation des niveaux plasmatiques et urinaires de 8OHdG a été démontrée durant la fibrose kystique [139]. Cependant il est important de souligner qu'une augmentation des niveaux de 8OHdG peut aussi provenir de la dégradation du dGTP oxydé dans le pool précurseur d'ADN de manière totalement différente du processus de réparation de l'ADN qui élimine les résidus oxydés de guanine.

1.3 STRESS OXYDANT ET DIABÈTE

L'importance du stress oxydant dans le diabète (type 1 et 2) a été mise en évidence grâce à l'augmentation dans les niveaux de différents marqueurs du stress oxydant (section 1.2.6) [347-349] mais également à une diminution dans les mécanismes de défense antioxydante (section 1.2.3) [350, 351]. Cependant, l'on ignore encore si le stress oxydant représente une cause ou simplement une conséquence dans la survenue du diabète même s'il est maintenant largement accepté qu'il contribue au développement de certaines de ses complications comme l'hypertension, l'athérosclérose, la rétinopathie et la neuropathie [352-355]. Néanmoins, l'on sait que la présence d'une hyperglycémie est une condition

favorisant la production de RONS et diminuant la capacité antioxydante cellulaire [356, 357]. Trois voies métaboliques importantes sont impliquées dans la production de RONS dans les conditions d'hyperglycémie : 1) la formation des produits terminaux de glycation ou *advanced glycation end products* (AGE); 2) l'activation de la protéine kinase C (PKC); et 3) l'activation de la voie des polyols [358, 359].

- **Formation des AGEs**

L'abondance en glucose dans les conditions d'hyperglycémie peut entraîner la formation de résidus glycosylés ou produits d'Amidori, émanant de réactions non enzymatiques entre le glucose et les amines primaires des protéines [360]. Ces produits d'Amidori vont subir une série de réactions (déshydratation et réarrangement) avant d'être convertis en adduits covalents stables ou AGEs [357]. La formation des AGEs peut également provenir de l'auto-oxydation intracellulaire du glucose en glyoxal [361] et de la fragmentation de certains composés de la glycolyse comme le glycéraldéhyde-3-phosphate (PGAL) et dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en méthylglyoxal [359]. L'interaction des AGEs avec leurs récepteurs cellulaires (RAGEs) induit une production massive de RONS [362] à travers l'activation de la NOX [363]. La production de ROS par l'intermédiaire des AGE a été clairement démontrée dans la survenue des complications vasculaires du diabète [362].

- **Activation PKC**

La PKC est une enzyme dont la régulation dépend du statut redox et qui est activée en présence de RONS et inhibée par les antioxydants [364]. Des études suggèrent que l'interaction entre les AGE et les RAGE durant une hyperglycémie est capable d'activer la PKC [365] qui, à son tour, activera NOX en augmentant la production de RONS [366].

- **Voies des polyols**

L'aldose réductase est une enzyme qui régule la conversion cellulaire des aldéhydes (toxiques) en alcools (inactifs) [367]. Dans les conditions physiologiques, le glucose représente un substrat de faible affinité pour cette enzyme, mais en présence d'une hyperglycémie, une partie de l'excès de glucose est converti en sorbitol [357]. L'aldose réductase utilisant le NADPH comme cofacteur, une hyperglycémie prolongée diminue les niveaux de NADPH, rendant ainsi la cellule vulnérable à l'action des ROS [357] via en particulier des effets potentiels sur le GSH. Par ailleurs, l'oxydation du sorbitol en fructose via la voie des polyols, augmente le ratio NADH/NAD^+ [357], inhibe l'activité de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, et augmente l'accumulation des trioses phosphates (PGAL et DHAP) qui vont induire la formation des AGEs [359].

1.3.1 MÉCANISMES DU STRESS OXYDANT DANS LE DIABÈTE

Dans la littérature, de nombreuses études expliquent et détaillent divers mécanismes à travers lesquels le stress oxydant favorise la survenue de complications dans le diabète de manière générale. Dans cette section, je me limiterai à l'impact du stress dans la fonction de la cellule β pancréatique et la signalisation de l'insuline afin de mieux expliquer ce qui se passe dans le CFRD.

1.3.1.1 Stress oxydant et synthèse d'insuline

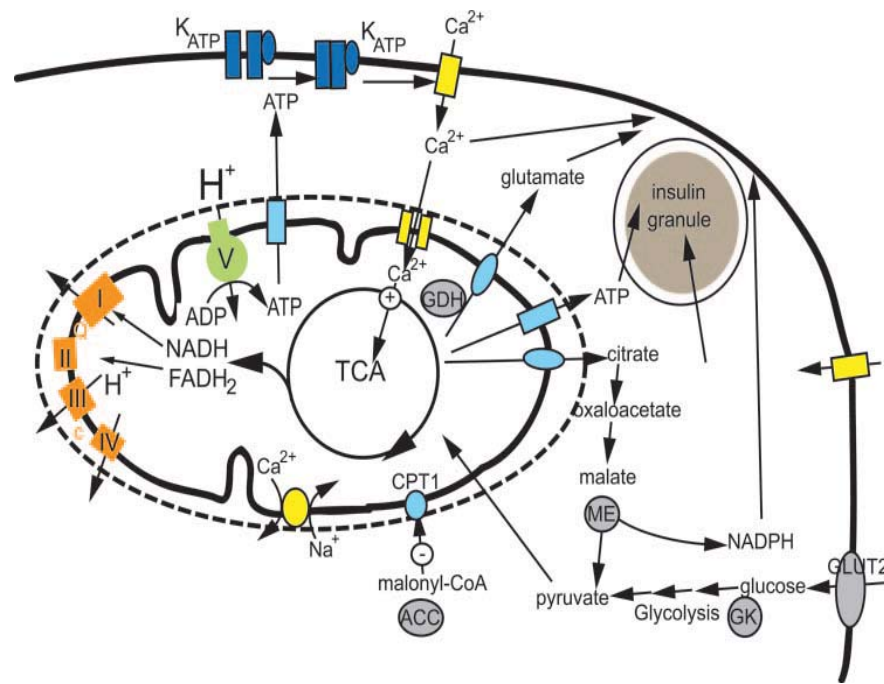
Chez la souris diabétique *ob/ob*, l'activation de la voie de signalisation impliquant JNK de la famille des MAPKs, en présence d'espèces pro-oxydantes (H_2O_2 , HO^\bullet et ONOO^-), est associée à une réduction de la production endogène d'insuline dans les cellules β [368]. Cette voie de signalisation qui a déjà été associée à la détérioration de la fonction pancréatique durant le diabète, agit sur le facteur de transcription PDX-1 [361]. Par sa fixation sur le gène de l'insuline, ce facteur de transcription assure la synthèse et la maturation de l'insuline. Toutefois, la modification de l'état de phosphorylation des molécules impliquées dans la signalisation de l'insuline par JNK va également réduire la fixation de PDX-1 à la molécule d'ADN [368]. Néanmoins, il a été démontré chez ces animaux *ob/ob*, qu'un traitement à base d'antioxydants (vitamine E et N-acétyl-cystéine)

protège la fonction pancréatique β en restaurant son contenu en insuline ainsi que l'expression de son gène [369].

1.3.1.2 Stress oxydant et sécrétion d'insuline

Le glucose déclenche la sécrétion d'insuline au niveau des cellules β du pancréas (Figure 25) selon la séquence d'évènements suivante : 1) entrée du glucose dans la cellule; 2) métabolisation par la voie de la glycolyse; 3) augmentation du ratio ATP/ADP dans le cytosol; 4) fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}); 5) ouverture des canaux calciques voltage-dépendants; et finalement 6) exocytose des granules d'insuline [370-372].

Figure 25 : Étapes conduisant à l'exocytose des granules d'insuline



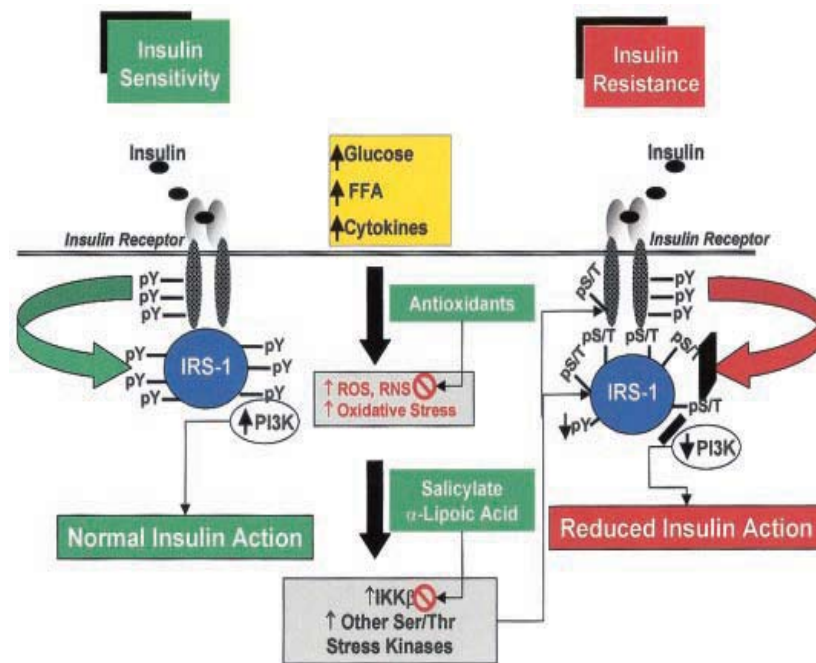
Tirée de Wiederkehr et al. [373]

Dans des conditions de stress oxydant, il a été montré que la présence de RONS tels que H_2O_2 et HO^\bullet inhibe la sécrétion d'insuline en interférant avec les enzymes de la glycolyse aboutissant à la diminution de la production d'ATP [372] et affectant par conséquent le ratio ATP/ADP [374]. Ces espèces réactives sont également capables de provoquer une hyperpolarisation membranaire en activant directement les canaux K_{ATP} , un processus qui maintiendra la fermeture des canaux calciques voltage-dépendants et altèrera la sécrétion d'insuline [375].

1.3.1.3 Stress oxydant et résistance à l'insuline

Les effets du stress oxydant impliqué dans le phénomène de résistance à l'insuline ont été particulièrement mis en évidence à travers les actions de l' H_2O_2 et l' HO^\bullet dans la voie de signalisation de l'insuline au niveau de son récepteur (IR) et de ses substrats (IRS-1 et 2) [376, 377].

Figure 26 : Mécanismes liant le stress oxydant à la résistance à l'insuline



Tirée de Evans et al. [377]

La fixation de l'insuline sur son récepteur (sous-unité α) induit une autophosphorylation d'un résidu tyrosine de la sous-unité β [377]. Une fois phosphorylé, IR va activer les molécules de IRS-1 dans un processus de phosphorylation, sur des résidus tyrosine, avant de compléter la voie de signalisation de l'insuline par l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) [378]. Des études réalisées chez l'animal ont démontré que l' H_2O_2 inhibe la transduction du signal de l'insuline en bloquant l'activation de IR et IRS, ainsi que celle de la PI 3-kinase [376]. La présence d' H_2O_2 et celle d' $O_2^{\bullet -}$ augmente la phosphorylation des molécules de IRS sur certains résidus sérine et/ou thréonine, ce qui a pour effet de réduire leur association avec IR et d'inhiber la cascade de signalisation impliquant la PI 3-kinase [379].

Hormis l'action directe d'espèces réactives, le rôle des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, $TNF\alpha$) dans la résistance à l'insuline a également été suggéré dans le diabète de type 2 [380, 381]. La succession des événements précis conduisant à la résistance à l'insuline dans ce mécanisme n'est pas totalement connue, mais elle passe par un processus de phosphorylation des résidus sérine et thréonine au niveau de IRS-1 ainsi que par l'activation de NF- κ B (par les cytokines), puisque certains inhibiteurs de NF- κ B et certains ligands des PPAR γ restaurent la sensibilité à l'insuline [381]. Il a été également démontré qu'une inactivation prolongée PTP par des oxydants (H_2O_2) et les métaux de transition (zinc et cuivre) pouvait favoriser l'installation de la résistance à l'insuline dans le

diabète de type 2 [382]. En effet, les PTP assurent également la biodisponibilité des résidus phosphotyrosine nécessaires au transport du glucose stimulé par l'insuline au niveau des adipocytes et du muscle [383]. Dans les conditions physiologiques, l'inhibition sélective et réversible de PTP-1B par l' H_2O_2 améliore l'action de l'insuline [384, 385]. Toutefois, l'oxydation irréversible des résidus $-SH$ requis pour leur activité catalytique inactive les PTP et favorise l'installation de la résistance à l'insuline [386].

1.3.1.4 Stress oxydant et CFRD

1.3.1.4.1 Étiologie et épidémiologie du CFRD

1.3.1.4.1.1 Étiologie

C'est en 1940 que des changements dans le métabolisme du glucose ont été décrits pour la première fois chez les malades FK, et en 1955 le diabète était reconnu comme une complication de cette maladie [387]. Le CFRD est considéré comme une entité différente des autres diabètes (types 1 et 2) puisqu'il se caractérise par une perte progressive de la masse des cellules β , une déficience en insuline et une résistance à l'insuline [388] ainsi qu'une altération dans la clairance de l'insuline [389]. Dans le diabète de type 1, la destruction (90%) des cellules β (insulite) est auto-immune, à médiation cellulaire, et en relation avec les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité HLA-DR [390]. Dans le cadre du CFRD, les études anatomo-pathologiques du pancréas n'ont montré ni insulite, ni

aucune corrélation avec le système HLA-DR [391, 392]. De plus, le CFRD semble apparaître après la destruction de 50% des cellules β , laissant supposer l'existence d'autres facteurs agissant sur l'apparition de l'hyperglycémie. Le diabète de type 2 résulte de l'association de plusieurs phénomènes complexes, mais principalement d'une résistance périphérique à l'action de l'insuline combinée à un déficit de la sécrétion d'insuline par le pancréas [393]. Le CFRD se caractérise par une période d'intolérance au glucose ou *impaired glucose tolerance* (IGT), où la glycémie postprandiale n'est plus normale mais n'a pas encore atteint le seuil caractéristique au diabète [394].

1.3.1.4.1.2 Épidémiologie

Le CFRD est exceptionnel avant l'âge de 10 ans puisqu'il n'affecte que 2% de la population pédiatrique alors qu'il est présent chez plus de 50% de la population FK adulte [395]. Cependant, l'intolérance au glucose affecte la grande majorité des patients FK, et elle est à l'origine de l'apparition précoce de certaines complications du diabète (vaisseaux, yeux, reins) [395-397]. Dans son rapport de l'année 2000, la Fondation Américaine de Fibrose Kystique a démontré que l'intolérance au glucose touche près de 14% des patients nord-américains [398, 399]. Une phase prolongée d'IGT confère au malade FK un risque important de développer ultérieurement le CFRD [400] et par conséquent une augmentation des risques de mortalité au sein de cette population. L'espérance de vie des patients FK est autour de 34 ans de nos jours, mais moins de 25% des patients CFRD atteignent cet âge comparé aux 60% exempts de CFRD [401]. Certaines études révèlent que le CFRD semble

survenir plus précocement dans la population féminine avec une prévalence supérieure (17%) à celle observée dans la population masculine (12%) [402-404]. D'autres études ont par ailleurs démontré que la mortalité associée au CFRD touche en majorité la population féminine [405, 406] chez laquelle la fonction respiratoire décline avec le statut d'IGT [407].

1.3.1.4.2 Classification et Physiopathologie du CFRD

1.3.1.4.2.1 Classification

Le CFRD est le plus souvent asymptomatique mais l'apparition des symptômes peut être précipitée par un facteur aggravant tel que l'hyperglycémie, la surinfection pulmonaire [408, 409] et la corticothérapie [410-412]. Puisque la glycémie à jeun reste longtemps normale chez la majorité des patients CFRD, seule une minorité (16%) présente une glycémie à jeun pathologique [413], l'hyperglycémie provoquée orale (HGPO) demeure le test de dépistage du CFRD. Ce test consiste à administrer à jeun, une solution de glucose (1,75 g/kg de poids corporel, avec un maximum de 75 g) avec des mesures de glycémie et d'insulinémie avant et 2 heures après la charge de glucose. Selon les critères de diagnostic et de classification du diabète, le CFRD sera établi pour une glycémie supérieure ou égale à 11,1 mM (2 g/L) à 2 heures [398]. Compte tenu de la phase silencieuse de la maladie, la Fondation Américaine de Fibrose Kystique (*The North American Cystic Fibrosis Foundation*) recommande un dépistage précoce de l'IGT et du CFRD chez les

patients de plus de 10 ans par la pratique annuelle d'HGPO [414]. En vertu des différences (diagnostic et caractéristiques) existant entre le CFRD et les autres formes de diabète, l'Association Américaine du Diabète (*The American Diabetes Association*) classe encore le CFRD dans la catégorie des maladies du pancréas exocrine « disease of exocrine pancreas » [415].

1.3.1.4.2.2 Physiopathologie

Au niveau pancréatique, le rôle de la protéine du CFTR dans le développement du CFRD ainsi que les causes exactes de la maladie ne sont pas encore connues. Chez l'Homme, la présence de la protéine du CFTR a été confirmée dans le pancréas exocrine (cellules centro-acinaires et canaux pancréatiques) mais sa présence dans le pancréas endocrine (îlots de Langerhans) ne fait guère l'unanimité puisque certains auteurs ne la confirment pas [416-418] à part un récent travail [419]. Ces observations discordantes s'expliquent probablement par la qualité et la sensibilité des techniques utilisées dans la localisation de la protéine du CFTR dans le pancréas endocrine : hybridation *in situ* (absence d'ARNm) vs microarray (présence d'ADN) [417, 419]. La présence de la protéine du CFTR a été cependant confirmée dans le pancréas endocrine chez l'animal mais son rôle dans la fonction endocrine demeure inconnu [420].

La compréhension du dysfonctionnement du CFTR dans la survenue du CFRD reste encore grandement manquante. Il est intéressant de noter que le CFRD survient en majorité chez les malades ayant une insuffisance pancréatique exocrine et une insuffisance respiratoire; c'est-à-dire ceux possédant généralement un génotype *CFTR* sévère ($\Delta F508$) [22]. Puisque les poumons et le pancréas sont des organes sujets à l'infection et/ou à l'inflammation durant la maladie, plusieurs hypothèses ont été émises quant à leur implication dans la survenue du CFRD. Une des hypothèses suggère que l'évolution de l'insuffisance pancréatique exocrine (voir section 1.1.2) vers l'atrophie du pancréas (y compris les îlots de Langerhans) constitue un élément favorisant le développement du CFRD [421, 422]. Dans ce processus, l'on pense que l'obstruction des canaux pancréatiques (sécrétions épaisses et visqueuses) réduit considérablement le flux sanguin dans le tissu pancréatique et contribue à une ischémie et à la mort des cellules β [402, 423]. En d'autres termes, l'attaque endocrine semble s'établir de manière progressive et tardive dans la maladie, expliquant probablement pourquoi la survenue du diabète est rare dans les dix premières années de vie des patients tandis que la prévalence du CFRD augmente avec l'âge [395, 410]. D'autre part, l'insuffisance pancréatique exocrine est associée à des phénomènes inflammatoires continus (production d'éicosanoïdes) [284, 424, 425] qui subsistent même en absence d'infection bactérienne dans la maladie [272, 289, 426]. La persistance de ces processus inflammatoires favorise la progression de la fibrose vers le pancréas endocrine et contribue à l'installation du CFRD [427]. Sachant que les phénomènes inflammatoires sont associés à une production de RONS (sections 1.2.3 et

1.2.6) et qu'ils ne se limitent pas simplement au niveau pancréatique et pulmonaire [428], une autre hypothèse suggère l'implication de l'inflammation dans l'installation d'un stress oxydant dont les effets peuvent affecter la survenue du CFRD [311]. Dans ce contexte, la perte graduelle de la masse et/ou du nombre des cellules β ainsi que leur dysfonctionnement [388] pourraient s'expliquer par l'activation de la voie de signalisation impliquant JNK (section 1.3.1.1) [361, 368] et celle impliquant NF- κ B (section 1.2.2.3.2.3) [254, 255]. La résistance à l'insuline s'expliquerait quant à elle par un effet des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF- α) au niveau du récepteur IRS-1 (section 1.3.1.3) [376, 377, 379, 381].

1.3.1.4.3 Prise en charge du CFRD

Des règles ont été établies pour le suivi, les objectifs de prise en charge, les modalités de traitement et la nutrition chez les patients FK [429, 430]. Ces règles conseillent d'abord le maintien d'un état nutritionnel optimal favorisant une bonne croissance et ensuite le contrôle des hyperglycémies afin d'éviter les complications du diabète, la fourchette glycémique souhaitable étant la même que dans les autres diabètes [389, 430]. Ainsi, les recommandations nutritionnelles habituellement données aux diabétiques (type 1 et 2) doivent être réajustées dans le cadre des patients FK. À cause de la malnutrition, secondaire à l'insuffisance pancréatique exocrine, les apports caloriques doivent viser 120 à 150% des besoins caloriques théoriques (les patients sont encouragés à

manger autant que possible), l'alimentation doit être riche en lipides (35-40% des apports caloriques) et, les glucides ne doivent pas être limités, même en proportion de la ration calorique, mais plutôt en termes d'index glycémique [431]. Les protéines ne doivent pas être limitées (même s'il existe une néphropathie) et, un plan alimentaire de trois repas et trois collations doit être encouragé.

Puisque le déficit en insuline représente la principale anomalie dans la population CFRD, l'insulinothérapie est conseillée même en absence d'hyperglycémie à jeun [432]. Les hypoglycémiantes oraux augmentent la sécrétion d'insuline en agissant sur son récepteur au niveau de la cellule β . Ces agents, en particulier les sulfamides, sont les seuls qui ont été étudiés dans le CFRD, mais peu de données sont publiées. Les données actuelles montrent que les sulfamides sont capables d'augmenter la sécrétion d'insuline, sans la normaliser, et sans que l'on puisse pour l'instant objectiver sur une amélioration clinique. Cependant, ils sont utilisés dans plusieurs centres européens et américains, permettant de repousser le début de l'insulinothérapie. L'usage des agents qui réduisent la résistance à l'insuline comme les biguanides (metformine) est strictement déconseillé dans le CFRD à cause des risques éventuels d'effets secondaires importants tels que l'acidose lactique, l'anorexie, les diarrhées et l'atteinte hépatique. L'ascarbose réduit l'absorption intestinale de glucose, avec pour conséquence une quasi-normalisation du pic glycémique au cours de la charge de glucose, mais également une diminution de la sécrétion d'insuline [433], ce qui laisse prévoir l'absence de bénéfice nutritionnel, sans compter les nombreux effets secondaires.

La Fondation de Fibrose Kystique considère que dans l'état actuel des données, l'utilisation des agents oraux antidiabétiques dans la FK doit être limitée à des essais thérapeutiques.

2 BUTS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

La susceptibilité au stress oxydant est fonction de l'équilibre entre les processus qui initient la production de molécules oxydantes et les mécanismes de défenses antioxydantes cellulaires. L'inflammation pulmonaire chronique durant la FK est dominée par un afflux de neutrophiles en réponse à l'infection bactérienne des voies respiratoires. La libération de protéines granulaires et la production accrue d'espèces radicalaires par les neutrophiles activés favorisent grandement l'apparition d'un stress oxydatif dans le tissu pulmonaire au cours de la maladie [303]. Une production accrue de RONS a déjà été démontrée dans la destruction du parenchyme pulmonaire [434] et plusieurs marqueurs du stress oxydant sont augmentés durant la maladie FK [303, 311, 334, 435].

Parallèlement au stress oxydant, un déficit en glutathion, probablement lié au dysfonctionnement du CFTR, a été montré durant la FK [292, 436, 437]. Ce déficit en glutathion peut occasionner des changements dans les niveaux des autres antioxydants, augmenter le stress oxydatif en provoquant des dommages au niveau hépatique, pancréatique et intestinal, induire le processus de peroxydation lipidique et une oxydation des protéines en provoquant leur dénaturation et leur agrégation [438, 439]. De plus, la persistance de l'inflammation pulmonaire, même en absence d'infection, active les facteurs de transcription sensibles à l'état rédox et stimule la production de cytokines pro-inflammatoires qui vont maintenir le stress oxydant de manière chronique [440, 441].

La viscosité du mucus durant la FK pose un problème dans les organes du tractus gastro-intestinal, puisqu'elle tend à bloquer les intestins ainsi que les canaux pancréatiques et hépatiques. L'activation prématurée d'enzymes digestives dans les canaux pancréatiques est à l'origine de l'apparition de fibrose, responsable d'une insuffisance pancréatique exocrine [442] qui évolue progressivement pour atteindre le pancréas endocrine et causer le CFRD [389]. Ce diabète se caractérise par une phase d'intolérance au glucose et une phase de résistance à l'insuline associée à un défaut de sécrétion et/ou une absence de sécrétion d'insuline [387]. Cette anomalie du métabolisme glucidique reste toutefois complexe et peut provenir de plusieurs facteurs : 1) la destruction progressive des cellules β par la fibrose ; 2) l'augmentation du nombre de cellules α sécrétrices de glucagon ; et 3) les changements dans la sensibilité à l'insuline [400].

La survenue du CFRD est souvent associée à une détérioration de la fonction pulmonaire [23], probablement en relation avec l'inflammation et le stress oxydant. Une augmentation du stress oxydant a été montrée au cours du diabète [443] avec d'importantes modifications au niveau de la balance oxydants/antioxydants, qui sont impliquées dans la destruction des îlots des cellules β [348]. Étant donné que la FK est associée au stress oxydatif tout comme le diabète, nous avons émis l'hypothèse que *le développement du CFRD peut être en relation avec l'augmentation du stress oxydant*. Dans ce contexte, l'objectif global de notre projet étudie la corrélation entre le stress oxydant et le

métabolisme du glucose chez les sujets avec FK. Pour ce faire, nous avons évalué les changements dans le métabolisme du glucose et l'évolution des fonctions pulmonaires dans la population pédiatrique FK. Nous avons également évalué un des éléments clés des défenses antioxydantes, le glutathion et quantifier un marqueur du stress oxydatif, les adduits HNE-protéines chez ces patients en fonction de leur tolérance au glucose.

Dans une autre étude, nous avons évalué le rôle du stress oxydant sur la fonctionnalité de la cellule β . Des cellules β TC-tet, d'origine murine, connues pour maintenir une grande capacité de sécrétion d'insuline même en présence de faibles concentrations de glucose [444], ont été utilisées à cet effet. L'ampleur du stress oxydant a été évalué par la modulation des niveaux de glutathion (GSH et GSSG) et la quantification des marqueurs de la peroxydation lipidique : adduits HNE-protéines et MDA libre. Nous avons également vérifié de quelle façon le stress oxydant affecte la réponse inflammatoire en quantifiant l'expression d' $\text{I}\kappa\text{B}$ et NF- κB . Puisque le ratio ATP/ADP est au centre du processus d'exocytose des granules d'insuline, nous avons évalué l'effet du stress oxydant sur le contenu cellulaire des ces nucléotides.

Les articles inclus dans ce document représentent la majeure partie du travail de doctorat de l'auteur principal de cette thèse. La quasi-totalité des expériences a été réalisée par l'auteur principal.

3 ARTICLE 1

Oxidative stress and cystic fibrosis-related diabetes: a pilot study in children

Thierry Ntimbane¹, Preetha Krishnamoorthy^{2,4}, Céline Huot², Laurent Legault⁴, Sheila V. Jacob³, Suzanne Brunet³, Emile Levy¹, Françoise Gueraud⁶, Larry C. Lands⁵ and Blandine Comte¹

From the ¹Department of Nutrition, University of Montreal, Montreal, Canada; the Department of Pediatrics, ²Division of Endocrinology and ³Division of Respiratory Medicine, the CHU Sainte-Justine, University of Montreal, Montreal, Canada; and the Department of Pediatrics, ⁴Division of Endocrinology and ⁵Division of Respiratory Medicine, the Montreal Children's Hospital, McGill University Health Centre, Montreal, Canada, ⁶INRA, UMR-1089 Xénobiotiques, F-31931 Toulouse, France.

Acknowledgments: This study has been funded by Diabète Québec (BC and LCL) and the Canadian Institutes for Health Research (BC). PK was funded by a post-doctoral physician fellowship from Eli Lilly Canada Inc.

We thank Dr Jean-Claude Lavoie for his help with the statistical analyses and Shawn Mohammed and Brian Meehan for performing the glutathione assays.

Address correspondence and reprint requests to: Blandine Comte, INRA, Centre de Recherche de Clermont-Ferrand/Theix, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France. ■

Running title: CFRD and oxidative stress

Abstract**Background**

Cystic fibrosis (CF) is characterized by chronic inflammation with increased oxidative stress. We evaluated the relationship between glucose tolerance and oxidative stress in CF children.

Methods

Patients 10-18 years old underwent oral glucose tolerance testing (n=31). At 2-h, we assessed blood glutathione and 4-hydroxynonenal-protein adducts (HNE-P), and urine 1,4-dihydroxynonane-mercapturic acid conjugate (DHN-MA). Plasma fatty acid (FA) profile was performed. Patients with impaired glucose tolerance (IGT) were retested 6 to 24 months later and received additional nutritional recommendations (NR) when possible.

Results

Fifty-two percent of patients had normal glucose tolerance (NGT), 42% IGT and 6% cystic fibrosis-related diabetes (CFRD). HNE-P concentrations significantly increased with diabetes (109%). Two-h BG correlated positively with HNE-P and negatively with DHN-MA. FA profile was modified with IGT. Of retested IGT patients, 25% received no NR; they remained IGT at 6 months and progressed to CFRD. Of those who received NR, 67% normalized, 11% remained intolerant and 22% developed CFRD. HNE-P levels dropped (88%) in IGT patients reverting to NGT, increased (94%) in the IGT patients with NR developing CFRD, decreased (90%) with persistent IGT.

Conclusion

CF children showed evidence of increased oxidative stress with worsening of glucose metabolism. NR may delay the appearance of CFRD.

Keywords: cystic fibrosis, diabetes, 4-hydroxynonenal, protein modifications, glucose tolerance, lipid peroxidation.

1. Introduction

Cystic fibrosis (CF), the most common lethal genetic disease in Caucasians (1), is caused by mutations of a gene encoding the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). The most frequent mutation is the deletion of a phenylalanine residue at position 508 ($\Delta F508$). The CFTR protein, a chloride channel, is also involved in homeostasis of other ions and metabolites such as glutathione (2). In CF, the defective water and chloride transport leads to viscous secretions causing scarring and destruction of organs. This may result in exocrine and endocrine pancreatic insufficiency as well as cystic fibrosis-related diabetes (CFRD). The largest U.S. survey of CF patients revealed a prevalence of treatment-requiring diabetes of 17% in females and 12% in males aged ≥ 13 years (3).

The pathophysiology of abnormal glucose metabolism in CF patients is multifactorial. Endocrine pancreatic dysfunction may be due to impairment of β -cell function with progressive fibrosis of Langerhans islets, resulting in distortion, ischemia, cell death, a decrease in number of islets and disturbances of other islet cell functions. Other contributory factors may include defects in insulinotropic gut hormone secretion and changes in insulin sensitivity and clearance rate (4-7). Islet cell antibodies, the $\Delta F508$ genotype and hepatic as well as peripheral insulin resistance may also be involved (8;9).

Oxidative stress has been implicated in the pathophysiology of several chronic diseases. CF is characterized by chronic inflammation with increased oxidative stress and glutathione

imbalance (10;11), possibly by abnormal glutathione transport across the CFTR. The resulting glutathione deficiency has been associated with changes in other antioxidant levels, increased oxidative stress with hepatic and pancreatic damage, increased lipid peroxidation, and enhanced protein oxidation, denaturation and aggregation (12-15). However, this systemic glutathione deficiency is not related to defects in glutathione synthesis nor in the transferase, redox or recycling systems (11).

Evaluation of oxidative stress requires accurate quantification of secondary products such as isoprostanes, aldehydes and oxidized proteins (16). Furthermore, polyunsaturated fatty acids (PUFA) are major targets of free radical attacks leading to lipid peroxidation and production of several toxic metabolites (17). Compared to isoprostanes, the longer half-life of aldehydes makes them good candidates for propagation and amplification of effects elicited by free radicals. Amongst aldehydes, the 4-hydroxy-2-alkenals, including 4-hydroxynonenal (HNE), a normal constituent of mammalian cell membranes, are considered the most reactive species. HNE reacts with thiol and amino residues of proteins, peptides, lipids and nucleic acids (18). Accumulation of modified proteins, particularly HNE-protein adducts, depends on the degree of insult and can lead to increased production of reactive oxygen species (ROS). Growing evidence supporting HNE's role as a (patho)physiological modulator of signal transduction, transcriptional regulation and protein activities, targets HNE in the development and progression of diseases (19). In diabetes, the production of reactive oxygen and nitrogen species appears to be a

consequence of hyperglycemia, the effects of which are partly mediated through increased protein glycation and oxidation (20). Molecular rearrangements occurring in such reactions result in the formation of more ROS (21), which can decrease antioxidant capacity and activate redox-sensitive transcription factors (22). Moreover, the evaluation of *in vivo* HNE metabolism has been shown to be possible with the HNE urinary end-product, 1,4-dihydroxynonane-mercapturic acid adduct (DHN-MA) (23;24).

Abnormal fatty acid composition and metabolism have been associated with the development of CF. It has been estimated that an essential fatty acid deficiency (EFAD) occurs in up to 85% of CF patients (25), characterized by increased plasma levels of oleic (18:1n-9) and palmitoleic (16:1n-7) acids (26;27) and low levels of arachidonic (C20:4n-6; AA), linoleic (C18:2n-6; LA) and docosahexaenoic (22:6n-3; DHA) acids (28). In CF, EFAD is clinically more severe in infants and may occur even before the condition is diagnosed (29). Although many factors related to fat malabsorption (30) or altered utilisation of fatty acids in cells (31) can explain the modification in the fatty acid profile, peroxidation of PUFA (32;33) seems to be more relevant.

Given that increased oxidative stress has been implicated in the progression of both CF and diabetes, this raises the possibility of its involvement in the development of CFRD. Our goals were as follows: 1) To evaluate glucose metabolism in CF patients from 2 pediatric centers, 2) To determine whether markers of oxidative stress, such as glutathione, HNE-P

adducts and DHN-MA, are correlated to and possibly predictive of glucose metabolism in CF patients, and 3) To evaluate whether plasma FA profiles are related to markers of oxidative stress or glucose tolerance in CF.

2. Methods

2.1. Patients

Patients were recruited through the pediatric CF clinics at the CHU Sainte-Justine and the Montreal Children's Hospital. Informed consent was obtained after institutional review board approval. Inclusion criteria were a documented diagnosis of CF, age > 10 years, previously normal glucose metabolism and follow-up by a collaborating physician. Patients taking medications known to interfere with glucose metabolism and those with psychological problems, acute illness or other ongoing medical problems were excluded. During the recruitment period (2 months), 2 patients attending the clinics refused to participate. Two patients had CFRD and a comparable number of patients for normal and impaired glucose intolerance were selected: 16 and 13 for NGT and IGT respectively, for a total of 31 patients.

2.2. Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

After an overnight fast, patients underwent oral glucose tolerance testing using 1.75 g/kg (maximum 75 g) of dextrose solution. Blood was taken at time 0 (fasting) for evaluation of glucose, insulin and A1c, and at 2 hours for glucose, insulin and oxidative stress markers. Glucose tolerance was classified according to the Canadian Diabetes Association guidelines

(34). Patients with CFRD were referred to an endocrinologist. At the CHU Sainte-Justine, IGT patients received additional nutritional recommendations (NR) from a dietician to avoid simple concentrated sugars and high glycemic index foods. All IGT patients underwent repeat OGTT after 6 to 24 months

2.3. Pulmonary function

Pulmonary function was assessed using forced expiratory volume in one second (FEV_1) and forced expiratory flow₂₅₋₇₅ (FEF_{25-75}) and was expressed as percent predicted FEV_1 and percent predicted FEF_{25-75} .

2.4 Pseudomonas aeruginosa

Sputum cultures were performed to identify pseudomonas aeruginosa (PA) colonization at the time of the OGTT.

2.5. Analyses of oxidative stress

To avoid measurement bias, 2-h samples were coded and glucose tolerance status was revealed after analyses were completed.

2.5.1. Glutathione assay

Oxidized glutathione (GSSG) and total glutathione (GSH+GSSG) measurements were assessed by a spectrophotometric method using vinylpyridine as described (35) in aliquots (500 μ l) of whole blood (heparinized tubes). Reduced glutathione (GSH) concentration was calculated as the difference between total and oxidized glutathione.

2.5.2. HNE-protein adducts assay

Chemicals and organic solvents were supplied by Laboratoire Mat (Montreal, QC, Canada), Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) and J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Biomol (Plymouth Meeting, PA, USA) provided unlabeled HNE while Regis Chemical (Morton Grove, IL, USA) supplied N-methyl-N-(*t*-butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide. NaB^2H_4 and trans-4-hydroxy-2-nonenal-[5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9- $^2\text{H}_{11}$]diethyl acetal were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA) and CDM Isotopes (Pointe-Claire, QC, Canada), respectively. Quantification of HNE bound to proteins in whole blood samples (400 μ l, EDTA tubes) (36) was assessed as follows: After addition of 200 μ l of NaB^2H_4 (1 M) reducing HNE to its corresponding alcohol chemically stable [^2H]DHN, proteins were precipitated with saturated sulfosalicylic acid (200 μ l). The protein pellet was extracted twice with mixed methanol:chloroform (3 ml; 2:1, vol:vol), rinsed thrice with water (1 ml) before resuspension in guanidine buffer (0.5 ml; pH 7.2) and addition of internal standard [$^2\text{H}_{11}$]1,4-dihydroxynonene (DHN; 0.1 nmol). After treatment with Raney Nickel, extraction and evaporation, the residue was treated with N-methyl-N-(*t*-

butyldimethylsilyl)-trifluoroacetamide (75 μ l), heated (90°C, 3 h) and left overnight (70°C) for derivatization.

Two μ l aliquots were injected into a Hewlett Packard 6890 Series GC System version A.02.14 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with HP-5 capillary column (50m x 0.2mm x 0.33 μ m) coupled to a Mass Spectrometer (Agilent Technologies Mass Selective Detector 5973 Network) operated in ammonia positive chemical ionization mode. Two ion sets were measured: m/z 389, 390 and 400, corresponding to the molecular ion and 257, 258 and 268, resulting from fragmentation, for the analyses of DHN, [²H]DHN and internal standard [²H₁₁]DHN respectively. The MS source and quadrupole were set at 180°C-126°C and 300°C-176°C for the 2 ion sets respectively. The chromatograph temperature program was: 170°C for 1 min, increased by 10°C/min up to 210°C, increased by 5°C/min up to 280°C and by 20°C/min up to 320°C for 10 min. Levels of HNE-proteins were calculated over a minimum of duplicate injections.

2.5.3 DHN-MA assay

Levels of the conjugate, dihydroxynonane-mercapturic acid, were determined in aliquots (400 μ L) of 2h-urine samples when available by enzyme immunoassay using polyclonal antibodies as described by Gueraud *et al* (37). Concentrations were calculated and expressed relative to the creatinine levels assayed in the same urine samples.

2.6. Fatty acid analysis

Fasting free fatty acids were extracted from plasma following the method previously described by Lepage *et al* (38) and analyzed by gas chromatography using nonadecenoic acid (C19:1) as internal standard.

2.7. Calculations

BMI *z*-scores were calculated using the *Epi Info* software from the Centers for Disease Control and Prevention (www.cdc.gov/epiinfo/).

Peripheral insulin resistance was evaluated using the Homeostatic Model Assessment (39) (HOMA) where $HOMA = ([\text{fasting BG (mM)}] \times [\text{fasting insulin (pM)}]) / 22.5$.

Percentage of functional β -cells was estimated as calculated by Tofe *et al*:

$$\beta\text{-cell (\%)} = [\text{fasting insulin (pM)} \times 3.33] / [\text{fasting BG (mM)} - 3.35] \quad (40).$$

Mean Plasma Glucose was estimated using the equation validated by Brennan *et al*:

$$MPG = (1.47 \times A1c) - 1.15 \quad (41).$$

2.8. Statistical analyses

Data are expressed as means \pm SE. Statistical differences were assessed by factorial ANOVA, unpaired or paired Student's *t*-test after verification of the normal value distribution of the populations. When variances were significantly different (F test), Welch's correction was used. Correlation analyses were performed with determination of the Pearson correlation coefficient. Statistical significance was considered when $p < 0.05$.

Note that theoretically, taking into account all the patients (tested once and re-tested) should give a total of 47 sets of data with 22 NGT, 18 IGT and 7 CFRD. However, for several parameters, the data set was not always complete because of missing samples (not available; i.e. pulmonary function, genotype)

3. Results

3.1. Metabolic parameters and pulmonary function

For the 31 patients (18 males), initial tests showed 16 (52%) normal, 13 (42%) intolerant and 2 (6%) diabetic. Of the IGT patients, one was transferred to adult care and the remaining 12 were retested 6 to 24 months later. Twenty-two patients classified as NGT, 13 as IGT and 7 as CFRD at some point during the study. We have analysed our data in different ways: **(i)** taking into consideration the patients only tested once in comparison with those who have been re-tested and who changed in terms of their glucose tolerance over time; **(ii)** taking into account the evolution of patients with IGT (longitudinal approach: 13 IGT but only 12 who have been re-tested, of whom 6 became NGT, 5 became

CFRD and 1 remained IGT), **(iii)** taking into account only the patients who have been tested once (16 NGT, 13 IGT and 2GT) in comparison with data obtained from all tests performed. For all the parameters considered in this study, there was no evidence of statistical difference between patients tested once and those who changed their glucose tolerance. Therefore, data are presented and analysed taking into account all OGTT performed. Table 1 describes the patients' demographic, genetic and anthropometric data according to glucose tolerance taking into account the patients only tested once and all tests performed. Average age of the whole population was 14 ± 0.2 years. There was no significant difference when taking into account only the patients tested once *vs* including data from IGT patients who have been re-tested. No significant difference was observed for age or BMI *z*-score between females and males. Most patients were homozygous for the $\Delta F508$ mutation. BMI *z*-score tended to be lower in the intolerant and diabetic groups but without statistical significance. Among the 12 retested IGT patients, 6 (50%) reverted to NGT, 1 (8%) remained IGT and 5 (42%) progressed to CFRD.

Table 1 also presents OGTT results, A1c levels and estimation of insulin resistance and functional β -cell mass. Fasting BG values were comparable across all groups. The groups differed significantly by their 2-h BG values ($p < 0.001$). Fasting insulin levels were similar among the groups. The 2-h insulin levels tended to be higher in intolerant and diabetic groups compared to the NGT group and did reach significance ($p < 0.05$) in the diabetic group. A1c trended upwards from normal to intolerant to diabetic status without statistical significance. A similar trend was observed for the estimate of insulin resistance with

glucose tolerance but did not reach significance nor did the functional β -cell mass (15 and 23% decrease with IGT and CFRD respectively), suggesting no significant β -cell loss. A recent study has shown a strong correlation between A1c and mean plasma glucose in CFRD (41). Using the authors' equation, we observed a significant difference in mean plasma glucose between NGT and IGT patients when considering only the patients tested once: 6.78 ± 0.10 (n=12), 7.15 ± 0.12 (n=13) and 7.52 (n=2) mM for NGT, IGT and CFRD patients respectively ($p < 0.05$ using unpaired *t*-test) but also between NGT and CFRD patients when considering all OGTT performed: 6.96 ± 0.11 (n=18), 7.15 ± 0.12 (n=17) and 7.46 ± 0.14 mM (n=7) for NGT, IGT and CFRD patients respectively ($p < 0.05$ using factorial ANOVA).

A close analysis of the positive correlation between 2-h insulin and glucose levels ($r^2 = 0.09$, $p < 0.05$, not shown) outlined 2 subgroups of patients. In the first subgroup there was a strong positive correlation between 2-h insulin and BG concentrations (insulin level ranging from 49 to 270 pM; $r^2 = 0.60$ and $r^2 = 0.27$, $p < 0.05$, for taking into account only the patients tested once or the whole population, respectively), whereas this correlation disappeared in the second subgroup (insulin level > 270 pM; $r^2 = 0.10$ or 0.07 , ns, for taking into account only the patients tested once or the whole population, respectively). Figure 1 shows the relationship between 2-h insulin and 2-h BG concentrations. At 2h after the glucose challenge, insulin and BG increased until glucose reached 7.7 mM on average. Then insulin levels rose further to maintain the same glucose concentrations. At that point, the linear relationship between insulin and glucose levels disappeared; more insulin had to

be secreted to maintain similar BG values. Furthermore, insulin levels were significantly higher in females: at baseline: 60 ± 9 (n=15) vs 40 ± 3 pM (n=28, $p < 0.05$ using unpaired *t*-test) and at 2-h: 529 ± 87 (n=15) vs 293 ± 41 pM (n=31) for females and males respectively ($p < 0.01$ using unpaired *t*-test, n=number of tests for all OGTT performed). Consequently, the evaluation of insulin resistance using the HOMA model was significantly higher in females compared to males: 14 ± 2 (n=15) vs 9 ± 1 (n=28; $p < 0.05$) as well as the evaluation of functional β -cell mass (135 ± 18 (n=15) vs 98 ± 8 (n=28) for females and males respectively; $p < 0.05$, n=number of tests for all OGTT performed). Females also tended to have higher BMI z-score: -0.05 ± 0.24 (n=15) and -0.39 ± 0.17 (n=28) for females and males respectively.

Percent predicted FEV₁ and FEF₂₅₋₇₅ were slightly diminished with IGT and CFRD (8.9%; Table 2). Females tended to have lower % predicted FEV₁ (12% decrease compared to males; $p = 0.060$ using unpaired *t*-test) and % predicted FEF₂₅₋₇₅ (23% decrease compared to males; $p = 0.08$ using unpaired *t*-test).

3.2. Lung inflammation and infection

In order to evaluate the status of patients for lung inflammation and infection, colonization by PA in sputum cultures was tested. When considering only the patients tested once, 9 of the 16 NGT patients were PA positive (56%), 1 was identified as scanty and 6 (37%) were PA negative; of the 13 IGT patients, 8 tested positive (62%) and 5 negative (38%) whereas 1 of CFRD patients was identified PA positive and 1 scanty. Of the 12 re-tested IGT

patients, 3 of the 6 patients who had their glucose tolerance reverted to normal were PA negative and 2 remained PA positive (no data for 1 patient) whereas 5 of the patients who became CFRD were PA positive. Therefore, taking into consideration all the data, there is a trend for an increase in PA positivity from NGT to CFRD: 52% (11 positive, 9 negative, 1 scanty and 1 NA), 72% (13 positive, 5 negative) and 86% (6 positive, 1 scanty) and for the NGT, IGT and CFRD groups respectively. There is no evidence of difference between males and females for colonization by PA (data not shown).

3.3. Oxidative stress markers

3.3.1. Glutathione assay

Total, reduced and oxidized glutathione levels were not significantly different between groups (Table 3). The analyses of glutathione according to gender, regardless of glucose tolerance, revealed a trend for a more reduced environment in females: redox ratio = $2 \text{ GSSG}/(\text{GSH} + 2\text{GSSG})$ (9.7 ± 2.1 (n=13) vs 13.8 ± 3.0 (n=18)) with a significant increase in total glutathione levels: GSH+GSSG (Table 3) and GSH levels: 740 ± 74 (n=14) vs 585 ± 25 μM (n=20) for females and males respectively ($p < 0.05$, n=number of measurements for all OGTT performed).

3.3.2. HNE-Protein adducts assay

HNE-P adduct levels increased significantly with abnormal glucose tolerance (Figure 2, 45% increase with IGT and 109% with CFRD; $p < 0.05$ using factorial ANOVA). Results

were similar if concentrations were expressed in pmol/mg protein (results not shown). HNE-P levels correlated positively with 2h-BG concentrations ($r^2 = 0.16$, $p < 0.05$, Figure 3A), attributing 16% of the increase in glucose levels in CF patients to increased oxidative stress. There was no correlation between HNE-P levels and glutathione (reduced, oxidized or ratios). No significant change was observed between male and female levels of blood HNE-protein levels (97.6 ± 15.8 (n=13) vs 88.2 ± 10.4 nM (n=23) for females and males respectively; n=number of tests performed).

3.3.3. DHN-MA assay

The HNE fraction bound to GSH was estimated with its urinary end-product concentration, DHN-MA, measured in urine samples of some patients (14 NGT, 11 IGT and 1 CFRD). Urine concentrations of DHN-MA conjugate were significantly decreased in IGT patients compared to NGT: 1.22 ± 0.09 (n=11) vs 1.83 ± 0.23 (n=14) pg/ μ g creatinine ($p < 0.05$ using unpaired *t*-test). These levels were not associated with measured blood concentrations of HNE-P adducts but negatively correlated with 2h-BG concentrations ($r^2 = 0.23$, $p < 0.05$, Figure 3A).

Of the 12 IGT patients retested, 3 did not receive NR (Figure 4). These patients remained IGT at 6 months and progressed to CFRD at 12 months. Of the 9 patients who underwent NR, 2 progressed to CFRD (22%), 1 remained intolerant (22%) and 6 normalized (67%). Table 4 presents the HNE-protein levels in some patients with NR. Three of the 6 IGT

patients reverting to NGT had their HNE-protein adduct levels repeated, showing a significant drop (88%) once glucose metabolism normalized ($p < 0.05$, paired *t*-test), while levels increased (94%) in the 2 IGT patients with NR progressing to CFRD. The patient who received NR and remained intolerant had an initial drop of HNE-protein level of 84% and then 44% compared to the original measurement. These observations were unaccompanied by changes in BMI z-score, pulmonary function and glutathione levels (data not shown).

3.4. Fatty acid profiles

Of the 31 patients enrolled in the study, samples from only 12 patients (8 NGT and 4 IGT) were available for determination of plasma fatty acid profile. None of the IGT patients were re-analyzed when re-tested for glucose tolerance. In general, total fatty acid levels were 26% lower with IGT compared to NGT. As presented in Table 5, saturated and monounsaturated fatty acids were decreased in patients with impaired glucose tolerance compared to those with normal tolerance but the difference reached significance only in the concentration of monounsaturated fatty acids (sum of saturated + monounsaturated fatty acids: 32% decreased; $p = 0.055$ using unpaired *t*-test). Compared to NGT patients, levels of n-6 fatty acids as LA (C18:2n-6) and AA (C20:4n-6) as well as n-3 fatty acids were found to be decreased in IGT patients. Nevertheless, the significance was observed for DHA only (C22:6n-3; $p < 0.05$). EFAD has been reported in CF patients with pancreatic insufficiency.

Its evaluation through the ratio (C20:3n-9)/(C20:4n-6) showed no deficiency and no significant difference between the two groups.

The levels of n-3 (C18:3n-3, C20:5n-3, C22:6n-3), n-6 (C18:2n-6) and total polyunsaturated fatty acids were significantly increased in females (n=5) compared to males (n=7) (104, 28 and 32 % for n-3, n-6 and PUFA respectively; $p < 0.05$, unpaired *t*-test). Furthermore, the ratio n-3/n-6 was significantly higher in females compared to males (59%, 0.094 ± 0.001 (n=5) vs 0.059 ± 0.003 (n=7) for females and males respectively; $p < 0.05$). No gender difference was observed for EFAD.

4. Discussion

This study is the first involving a cohort of pediatric CF patients investigating glucose metabolism and oxidative stress. The $\Delta F508$ mutation was the most common genotype in our population as previously published (42). We were unable to draw conclusions regarding genotype and risk for abnormal glucose metabolism given the small number of IGT and CFRD patients genotyped.

Studies have shown that deterioration in pulmonary function, weight loss, decreased BMI and increased need for pancreatic enzymes precede CFRD (43). However, a large Canadian study (5.2% CFRD) showed no change in pulmonary function or survival 5 years before and after diagnosis (44). Our patients with CFRD tended to have diminished pulmonary

function and lower BMI *z*-scores. However, these trends were subtle. This may be explained by early diagnosis of abnormal glucose metabolism in our cohort.

Normal fasting BG levels do not predict glucose tolerance in CF patients (Table 1). This underscores the importance of routine oral glucose tolerance testing in this population. A1c, though trending upwards in IGT and CFRD groups, was not significantly different and is not indicative of glucose metabolism in CF as previously published (45). However, the evaluation of the mean plasma glucose using A1c values (41) showed a significant difference between NGT and CFRD patients. A1c may therefore be a useful tool for this estimation in the follow-up of CF patients. This finding remains to be confirmed in a larger cohort of pediatric patients.

Impaired insulin secretion has been demonstrated in CF and may be secondary to β -cell dysfunction (46). Reports of reduced and increased insulin secretion in CFRD imply that both insulinopenia and insulin resistance may be involved in abnormal glucose metabolism (9;47). We found no frank insulinopenia in children with IGT or CFRD. In our patients, 2-h insulin correlated positively with 2-h BG levels. Insulin levels increased with BG up to a plateau after which significant levels of insulin were required to maintain glucose concentration, suggesting a component of insulin resistance (Fig. 1). Evaluation of insulin resistance did not reveal any change but the HOMA model does not take into account area under the curves of insulin secretion and/or BG. CF patients may also present a decrease and/or delay in peak insulin secretion (48). Estimation of functional β -cell mass was not

significantly decreased (15%) in patients with CFRD. This may be explained by the calculation method which relied solely on fasting insulin and glucose levels. However, these data are not compared to those found in a healthy pediatric population. Similar observations have been recently reported on glucose tolerance and insulin secretion in children (49).

Insulin levels in females were significantly higher. Studies have suggested that females are intrinsically more insulin resistant, possibly because of specific sex-linked gene expression and differences in metabolic controls, such as signaling pathways, substrate shuttling and receptor function (50). This is confirmed by our observation with a significant higher average value of the HOMA for females when compared to males. Furthermore, insulin resistance increases with higher BMI z-score, and percentage of body fat is greater in females (51;52).

Our female patients had a 23% decrease in % predicted FEF₂₅₋₇₅ compared to males regardless of glucose status. Reduced pulmonary function in CF female adults has been reported (53), possibly due to reduced energy intake and higher resting energy expenditure but also to genetic factors (54). Studies have shown that female CFRD patients have a poorer prognosis (55) and Sims *et al* recently revealed that their percent predicted FEV₁ is 20% lower compared to CF patients without CFRD (56). However, females with newly diagnosed CFRD did not have significant reduction in pulmonary function compared to

matched controls. This suggests that early intervention in females with CFRD may prevent worsening of pulmonary function. We were unable to demonstrate a difference in pulmonary function in females with CFRD versus those with NGT but numbers were small (2 and 9 respectively). Also, patients were newly diagnosed and may not yet have shown a decline in pulmonary function (56). Of the 4 retested female IGT patients, 3 became NGT and 1 CFRD. All showed an improvement in pulmonary function (data not shown) over the study period.

Nutritional recommendations given to IGT patients appeared to have a beneficial impact on progression to diabetes. CFRD is preceded by a variable period of glucose intolerance (57). Ours is the first study to consider nutritional intervention as a means of delaying progression to diabetes. However, given our small numbers, the lack of objective measures of compliance to NR and of meticulous evaluation of nutritional status, further studies investigating the effects of nutritional intervention in patients with glucose intolerance on the progression to CFRD are warranted.

CF is characterized by chronic inflammation, lung infection and is associated with increased oxidative stress (10;11). Our data show a trend for an increase of PA colonization with impairment of glucose tolerance but that remains to be confirmed in a larger population of patients. Reduced antioxidant capacity in CF also suggests a state of

increased oxidative stress (11;58) due to production and release of reactive oxygen and nitrogen species by inflammatory processes (59) and/or CFTR dysfunction. Similarly, diabetes has been associated with increased oxidative stress. The formation of ROS consequent to hyperglycemia is likely mediated through nonenzymatic glycation (60) and oxidation of proteins (20) and molecular rearrangements with production of more ROS (21) which can result in diminished antioxidant capacity and activation of redox-sensitive transcription factors (16). The positive correlation between blood HNE-P and glucose levels suggests that 16% of the increase in glucose levels in this group of patients can be associated with an increase in HNE-P concentrations related to increased oxidative stress.

Erythrocyte GSSG appeared to be greater in the IGT group although a small decrease was observed in the CFRD group. However, due to the small number of patients and the high variability in the latter group, no conclusion can be drawn. Also, there were no significant group differences in GSSG/GSH ratios. As previously described in children (61), we observed a difference in glutathione levels between males and females, with significantly higher total glutathione levels, GSH levels and a more reduced environment in females. This may be related to different hormonal environments (62).

Under normal conditions, cells contain basal levels of HNE ($<1 \mu\text{M}$), which may act as a signaling molecule (63). Under oxidative stress conditions, the increased HNE production can lead to modifications of biological molecules and proteins (19). We measured HNE-P adducts in whole blood to provide an accurate assessment of ongoing oxidative stress in

CF. CFRD patients had increased (109%) HNE-P levels compared to NGT patients, suggesting further oxidative stress with CFRD. Exogenous HNE altered glucose-induced β -cell insulin secretion in an animal model (64). It is likely that such HNE processes have not significantly modified β -cell function in newly diagnosed patients given the absence of frank insulinopenia in our patients. To the best of our knowledge, this study is the first to identify a direct link between 2-h BG and oxidative stress evaluated by HNE-P adducts. Moreover, in 3 patients, we measured similar levels of HNE-P at fasting and 2-h post OGTT (data not shown). This suggests that HNE-P may represent a long-term index of oxidative stress associated with chronic hyperglycemia. However, this remains to be further investigated. Differences observed in glutathione levels between males and females may suggest that females have better defence mechanisms against oxidative stress (i.e. more GSH). However, concentrations of HNE-P did not differ significantly between females and males.

DHN-MA is the major urinary metabolite of HNE and presents at physiological levels in urine (23). In conditions of induced oxidative stress, increased levels of DHN-MA levels have been reported in animals (24). Although this metabolite originates from the conjugation of HNE with GSH, no decrease in GSH levels was observed in IGT patients. This may represent a GSH synthetic response to ongoing oxidative stress, as represented by the increasing HNE-P adduct concentrations in the IGT and CFRD groups. NGT patients showed higher of DHN-MA levels compared to IGT whereas they presented lower

concentrations of HNE-P (Figure 3). In an attempt to bring together these results and, assuming that the nutrition and intake of exogenous HNE are similar across groups, we can raise two possibilities. Firstly, one can speculate that the increased HNE production is associated with a higher formation of conjugates with GSH but the malfunction/absence of CFTR could also affect the DHN-MA conjugates, decreasing their levels in urine. Another possibility is that the HNE produced by n-6 FA peroxidation is mainly diverted toward proteins as glutathione imbalance may also affect HNE metabolism in CF. However, not much is known about these metabolic pathways and they remain to be investigated.

Notably, among the IGT patients retested, HNE-P levels significantly decreased in those reverting to NGT whereas levels increased in patients who became diabetic. These results confirm the link observed between BG and oxidative stress evaluated by HNE-P adducts. It may be speculated that the decrease in HNE-P levels in the IGT patient who remained intolerant preceded an improvement in glucose tolerance. This would support the hypothesis that changes in oxidative stress precede disturbances in glucose metabolism.

Among the metabolic abnormalities in CF, disturbances in FA profile were reported in children and adults (65). However, a large number of studies have characterized the FA composition in different compartments (i.e. serum *vs* plasma *vs* erythrocyte phospholipids) (66-68), using different methods (i.e. capillary GC, GCMS) making comparisons and data interpretation difficult. The most common observation concerns a decrease in both the n-6

fatty acids (69;70) and DHA (C22:6n-3) (71). Moreover, the severity of the perturbations has been related to pancreatic status (30), genotype (72) and pulmonary function with increased oxidative stress (32). In our patients, fatty acid abnormalities are probably already present as stated in previous studies (69;73). Moreover, using a recently validated tool that could be an efficient diagnostic marker of CF (74), the product of plasma levels of (C18:2n-6) x (C22:6n-3) revealed that all our patients are within the expected range for CF (~ 20 : 18.4 ± 3.2 ; $n=12$ vs ~ 40 for healthy controls (74)) without significant change with glucose tolerance. The absence of EFAD with the ratio (C20:3n-9)/(C20:4n-6), is consistent with others reports (30;75) and may be due to the fact that no pancreatic insufficiency was reported in our patients. Not much information is available related to FA and glucose metabolism in CF. Our results showed significant decreases for the sum of monounsaturated fatty acids, DHA and the ratio (sum FAn-3)/(sum FAn-6) with the impairment of glucose tolerance. However, further studies including diabetic CF patients and controls are needed to confirm our findings.

HNE results from the lipid peroxidation of n-6 unsaturated fatty acids and lipoprotein phospholipids (76;77). Although IGT patients exhibited an increase in HNE-P levels (43%) compared to NGT patients, levels of n-6 fatty acids such as LA (C18:2n-6) and AA (C20:4n-6) were found to be only slightly decreased (~ 12 %). Notably, concentrations of HNE-P were measured in whole blood, referring to a contribution of erythrocyte membrane status, whereas fatty acid profile was analyzed in plasma. Since FA of the n-3 and n-6

families are essentially structural components of membrane phospholipids, analyses of the fatty acid composition in erythrocyte membrane could be more appropriate to relate with HNE-P levels and the major lipids ongoing the peroxidation. Fatty acids such as AA and the precursor of DHA, EPA (C20:5n-3), are involved in the production of eicosanoids such as prostaglandins, prostacyclins, thromboxanes and leukotrienes which affect inflammation in CF. One can speculate that the observed decrease in n-3 fatty acid levels with IGT may be explained by a suppressive anti-inflammatory effect of n-3 on the increased formation of proinflammatory products by n-6 fatty acids.

During the course of CF, it has been shown that female patients were more prone to inflammation and had decreased pulmonary function (percent predicted FEV₁) compared to males (53). Increased levels of LA and decreased levels in major n-3 fatty acids were found to be positively correlated with pulmonary function in pre-adolescent CF children (78). Consistently, our female patients exhibited significantly lower levels of n-3 FA compared to males, which could potentially be linked to lower pulmonary function.

5. Conclusion

In summary, this study is the first showing a direct link between blood levels of glucose and oxidative stress as evaluated with blood levels of HNE-P in patients with CF. Previously published methods for measuring HNE-protein adducts using immunohistochemistry are mostly semi-quantitative. Further documentation of the

relationship between glutathione, HNE-protein adducts and HNE metabolism in healthy controls and diabetic patients is required. Our preliminary data regarding the potential role of nutritional intervention for the prevention or delay of CFRD in patients with IGT suggest the need for larger clinical studies designed specifically for proper documentation of diet implementation and compliance, effect on growth and clinical status, quality of life, as well as impact on the development of CFRD. Finally, our data on FA profile with glucose intolerance suggest that inflammation and oxidative stress could be related to the development of CFRD and mediated through changes in lipid peroxidation.

Acknowledgments: We thank Dr Jean-Claude Lavoie for his help with the statistical analyses and Shawn Mohammed and Brian Meehan for performing the glutathione assays.

Grants: This study has been funded by Diabète Québec (BC and LCL) and the Canadian Institutes for Health Research (BC). PK was funded by a post-doctoral physician fellowship from Eli Lilly Canada Inc.

References

- (1) Ostedgaard LS, Baldursson O, Welsh MJ. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by its R domain. *J Biol Chem* 2001 Mar 16;276(11):7689-92.
- (2) Kogan I, Ramjeesingh M, Li C, Kidd JF, Wang Y, Leslie EM, et al. CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J* 2003 May 1;22(9):1981-9.
- (3) Marshall BC, Butler SM, Stoddard M, Moran AM, Liou TG, Morgan WJ. Epidemiology of cystic fibrosis-related diabetes. *J Pediatr* 2005 May;146(5):681-7.
- (4) Hardin DS, LeBlanc A, Marshall G, Seilheimer DK. Mechanisms of insulin resistance in cystic fibrosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001 Nov;281(5):E1022-E1028.
- (5) Moran A, Diem P, Klein DJ, Levitt MD, Robertson RP. Pancreatic endocrine function in cystic fibrosis. *J Pediatr* 1991 May;118(5):715-23.
- (6) Handwerger S, Roth J, Gorden P, Di Sant' AP, Carpenter DF, Peter G. Glucose intolerance in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1969 Aug 28;281(9):451-61.
- (7) Nousia-Arvanitakis S, Tomita T, Desai N, Kimmel JR. Pancreatic polypeptide in cystic fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 1985 Aug;109(8):722-6.
- (8) Lanng S, Schwartz M, Thorsteinsson B, Koch C. Endocrine and exocrine pancreatic function and the delta F508 mutation in cystic fibrosis. *Clin Genet* 1991 Nov;40(5):345-8.
- (9) Moran A, Pyzdrowski KL, Weinreb J, Kahn BB, Smith SA, Adams KS, et al. Insulin sensitivity in cystic fibrosis. *Diabetes* 1994 Aug;43(8):1020-6.

- (10) Carpagnano GE, Barnes PJ, Francis J, Wilson N, Bush A, Kharitonov SA. Breath condensate pH in children with cystic fibrosis and asthma: a new noninvasive marker of airway inflammation? *Chest* 2004 Jun;125(6):2005-10.
- (11) Hull J, Vervaart P, Grimwood K, Phelan P. Pulmonary oxidative stress response in young children with cystic fibrosis. *Thorax* 1997 Jun;52(6):557-60.
- (12) Wang S, Yue H, Derin RB, Guggino WB, Li M. Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* 2000 Sep 29;103(1):169-79.
- (13) Ho E, Bray TM. Antioxidants, NFkappaB activation, and diabetogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999 Dec;222(3):205-13.
- (14) Rosenblat M, Aviram M. Macrophage glutathione content and glutathione peroxidase activity are inversely related to cell-mediated oxidation of LDL: in vitro and in vivo studies. *Free Radic Biol Med* 1998 Jan 15;24(2):305-17.
- (15) Freeman ML, Huntley SA, Meredith MJ, Senisterra GA, Lepock J. Destabilization and denaturation of cellular protein by glutathione depletion. *Cell Stress Chaperones* 1997 Sep;2(3):191-8.
- (16) Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, et al. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1997 Sep;46(9):1481-90.
- (17) Nourooz-Zadeh J, Halliwell B, Anggard EE. Evidence for the formation of F3-isoprostanes during peroxidation of eicosapentaenoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Jul 18;236(2):467-72.
- (18) Schaur RJ. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* 2003 Aug;24(4-5):149-59.

- (19) Zarkovic N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med* 2003 Aug;24(4-5):281-91.
- (20) Ha H, Lee HB. Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney Int Suppl* 2000 Sep;77:S19-S25.
- (21) Sakurai K, Ogawa Y, Miura T, Ogiso T. [Studies on biological damage by active oxygens. II. Inhibition of insulin release from isolated pancreatic islets by exposure to O₂(-)-generating system of hypoxanthine-xanthine oxidase]. *Yakugaku Zasshi* 1988 Feb;108(2):150-5.
- (22) Cooper D, Stokes KY, Tailor A, Granger DN. Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc Toxicol* 2002;2(3):165-80.
- (23) Alary J, Bravais F, Cravedi JP, Debrauwer L, Rao D, Bories G. Mercapturic acid conjugates as urinary end metabolites of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal in the rat. *Chem Res Toxicol* 1995 Jan;8(1):34-9.
- (24) Peiro G, Alary J, Cravedi JP, Rathahao E, Steghens JP, Gueraud F. Dihydroxynonene mercapturic acid, a urinary metabolite of 4-hydroxynonenal, as a biomarker of lipid peroxidation. *Biofactors* 2005;24(1-4):89-96.
- (25) Bezard J, Blond JP, Bernard A, Clouet P. The metabolism and availability of essential fatty acids in animal and human tissues. *Reprod Nutr Dev* 1994;34(6):539-68.
- (26) Chase HP, Dupont J. Abnormal levels of prostaglandins and fatty acids in blood of children with cystic fibrosis. *Lancet* 1978 Jul 29;2(8083):236-8.

- (27) Roulet M, Frascarolo P, Rappaz I, Pilet M. Essential fatty acid deficiency in well nourished young cystic fibrosis patients. *Eur J Pediatr* 156, 952-956. 1997.
- (28) Steinkamp G, Demmelmair H, Ruhl-Bagheri I, von der HH, Koletzko B. Energy supplements rich in linoleic acid improve body weight and essential fatty acid status of cystic fibrosis patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000 Oct;31(4):418-23.
- (29) Lloyd-Still JD, Bibus DM, Powers CA, Johnson SB, Holman RT. Essential fatty acid deficiency and predisposition to lung disease in cystic fibrosis. *Acta Paediatr* 1996 Dec;85(12):1426-32.
- (30) Farrell PM, Mischler EH, Engle MJ, Brown DJ, Lau SM. Fatty acid abnormalities in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 1985 Jan;19(1):104-9.
- (31) Bhura-Bandali FN, Suh M, Man SF, Clandinin MT. The deltaF508 mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator alters control of essential fatty acid utilization in epithelial cells. *J Nutr* 2000 Dec;130(12):2870-5.
- (32) Portal BC, Richard MJ, Faure HS, Hadjian AJ, Favier AE. Altered antioxidant status and increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 1995 Apr;61(4):843-7.
- (33) Lepage G, Champagne J, Ronco N, Lamarre A, Osberg I, Sokol RJ, et al. Supplementation with carotenoids corrects increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 1996 Jul;64(1):87-93.
- (34) Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert Committee. Canadian Diabetes Association 2003 Clinical Practice Guidelines for the Prevention and Management of Diabetes in Canada. Definition, Classification and Diagnosis of

Diabetes and Other Dysglycemic Categories. *Can J Diabetes* 2003;27(suppl 2):S7-S9.

- (35) Lands LC, Grey V, Smountas AA, Kramer VG, McKenna D. Lymphocyte glutathione levels in children with cystic fibrosis. *Chest* 1999 Jul;116(1):201-5.
- (36) Asselin C, Bouchard B, Tardif JC, Desrosiers C. Circulating 4-hydroxynonenal-protein thioether adducts assessed by gas chromatography-mass spectrometry are increased with disease progression and aging in spontaneously hypertensive rats. *Free Radic Biol Med* 2006 Jul 1;41(1):97-105.
- (37) Gueraud F, Peiro G, Bernard H, Alary J, Creminon C, Debrauwer L, et al. Enzyme immunoassay for a urinary metabolite of 4-hydroxynonenal as a marker of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 2006 Jan 1;40(1):54-62.
- (38) Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1986 Jan;27(1):114-20.
- (39) Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985 Jul;28(7):412-9.
- (40) Tofe S, Moreno JC, Maiz L, Alonso M, Escobar H, Barrio R. Insulin-secretion abnormalities and clinical deterioration related to impaired glucose tolerance in cystic fibrosis. *Eur J Endocrinol* 2005 Feb;152(2):241-7.
- (41) Brennan AL, Gyi KM, Wood DM, Hodson ME, Geddes DM, Baker EH. Relationship between glycosylated haemoglobin and mean plasma glucose concentration in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005 Sep 29;in press.

- (42) Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med* 1990 Nov 29;323(22):1517-22.
- (43) Lanng S, Thorsteinsson B, Nerup J, Koch C. Influence of the development of diabetes mellitus on clinical status in patients with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr* 1992 Sep;151(9):684-7.
- (44) Reisman J, Corey M, Canny G, Levison H. Diabetes mellitus in patients with cystic fibrosis: effect on survival. *Pediatrics* 1990 Sep;86(3):374-7.
- (45) Stutchfield PR, O'Halloran S, Teale JD, Isherwood D, Smith CS, Heaf D. Glycosylated haemoglobin and glucose intolerance in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1987 Aug;62(8):805-10.
- (46) De Luca F, Arrigo T, Di Benedetto A, Tedeschi A, Sferlazzas C, Crisafulli G, et al. Four-year follow-up of glucose tolerance and beta-cell function in nondiabetic cystic fibrosis patients. *Horm Res* 1995;44(2):45-50.
- (47) Hardin DS, LeBlanc A, Lukenbaugh S, Para L, Seilheimer DK. Proteolysis associated with insulin resistance in cystic fibrosis. *Pediatrics* 1998 Mar;101(3 Pt 1):433-7.
- (48) Moran A, Phillips J, Milla C. Insulin and glucose excursion following premeal insulin lispro or repaglinide in cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes Care* 2001 Oct;24(10):1706-10.
- (49) Elder DA, Wooldridge JL, Dolan LM, D'Alessio DA. Glucose tolerance, insulin secretion, and insulin sensitivity in children and adolescents with cystic fibrosis and no prior history of diabetes. *J Pediatr* 2007 Dec;151(6):653-8.

- (50) Mittendorfer B. Insulin resistance: sex matters. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005 Jul;8(4):367-72.
- (51) Bloch CA, Clemons P, Sperling MA. Puberty decreases insulin sensitivity. *J Pediatr* 1987 Mar;110(3):481-7.
- (52) Lemieux S, Prud'homme D, Bouchard C, Tremblay A, Despres JP. Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness. *Am J Clin Nutr* 1993 Oct;58(4):463-7.
- (53) Verma N, Bush A, Buchdahl R. Is there still a gender gap in cystic fibrosis? *Chest* 2005 Oct;128(4):2824-34.
- (54) Stallings VA, Tomezsko JL, Schall JI, Mascarenhas MR, Stettler N, Scanlin TF, et al. Adolescent development and energy expenditure in females with cystic fibrosis. *Clin Nutr* 2005 Oct;24(5):737-45.
- (55) Milla CE, Billings J, Moran A. Diabetes is associated with dramatically decreased survival in female but not male subjects with cystic fibrosis. *Diabetes Care* 2005 Sep;28(9):2141-4.
- (56) Sims EJ, Green MW, Mehta A. Decreased lung function in female but not male subjects with established cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes Care* 2005 Jul;28(7):1581-7.
- (57) Lanng S. Glucose intolerance in cystic fibrosis patients. *Paediatr Respir Rev* 2001 Sep;2(3):253-9.
- (58) Brown RK, Kelly FJ. Role of free radicals in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Thorax* 1994 Aug;49(8):738-42.

- (59) Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995 Apr;151(4):1075-82.
- (60) Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, et al. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 1999 Apr;48(4):927-32.
- (61) Lavoie JC, Chessex P. Gender and maturation affect glutathione status in human neonatal tissues. *Free Radic Biol Med* 1997;23(4):648-57.
- (62) Vina J, Borras C, Gambini J, Sastre J, Pallardo FV. Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett* 2005 May 9;579(12):2541-5.
- (63) Uchida K, Szweda LI, Chae HZ, Stadtman ER. Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Sep 15;90(18):8742-6.
- (64) Miwa I, Ichimura N, Sugiura M, Hamada Y, Taniguchi S. Inhibition of glucose-induced insulin secretion by 4-hydroxy-2-nonenal and other lipid peroxidation products. *Endocrinology* 2000 Aug;141(8):2767-72.
- (65) Coste TC, Armand M, Lebacq J, Lebecque P, Wallemacq P, Leal T. An overview of monitoring and supplementation of omega 3 fatty acids in cystic fibrosis. *Clin Biochem* 2007 May;40(8):511-20.
- (66) Underwood BA, Denning CR, Navab M. Polyunsaturated fatty acids and tocopherol levels in patients with cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 1972 Dec 18;203:237-47.
- (67) McEvoy FA. Letter: Essential fatty acids and cystic fibrosis. *Lancet* 1975 Aug 2;2(7927):236.

- (68) Farrell PM, Bieri JG, Fratantoni JF, Wood RE, di Sant'Agnese PA. The occurrence and effects of human vitamin E deficiency. A study in patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1977 Jul;60(1):233-41.
- (69) Kuo PT, Huang NN, Bassett DR. The fatty acid composition of the serum chylomicrons and adipose tissue of children with cystic fibrosis of the pancreas. *J Pediatr* 1962 Mar;60:394-403.
- (70) Christophe AB, Warwick WJ, Holman RT. Serum fatty acid profiles in cystic fibrosis patients and their parents. *Lipids* 1994 Aug;29(8):569-75.
- (71) Freedman SD, Blanco PG, Zaman MM, Shea JC, Ollero M, Hopper IK, et al. Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N Engl J Med* 2004 Feb 5;350(6):560-9.
- (72) Strandvik B, Gronowitz E, Enlund F, Martinsson T, Wahlstrom J. Essential fatty acid deficiency in relation to genotype in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2001 Nov;139(5):650-5.
- (73) Annibaldi L, Antonelli M, Ballati G, Giardini O, Cardi E. [Fatty acids composition of serum lipid fractions in children with cystic fibrosis of the pancreas before and after treatment with pancreatin]. *Riv Clin Pediatr* 1968 Sep;81(5):962-4.
- (74) Batal I, Ericsoussi MB, Cluette-Brown JE, O'Sullivan BP, Freedman SD, Savaille JE, et al. Potential utility of plasma fatty acid analysis in the diagnosis of cystic fibrosis. *Clin Chem* 2007 Jan;53(1):78-84.
- (75) Lloyd-Still JD, Johnson SB, Holman RT. Essential fatty acid status in cystic fibrosis and the effects of safflower oil supplementation. *Am J Clin Nutr* 1981 Jan;34(1):1-7.

- (76) Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11(1):81-128.
- (77) Eckl PM, Ortner A, Esterbauer H. Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes. *Mutat Res* 1993 Dec;290(2):183-92.
- (78) Maqbool A, Schall JI, Zemel BS, Garcia-Espana JF, Stallings VA. Plasma zinc and growth status in preadolescent children with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006 Jul;43(1):95-101.

Figure and Table legends

Figure 1 - Relationship between plasma 2h-insulin and glucose.

Plasma 2h-insulin concentrations were plotted in relation to plasma 2h-glucose levels. A: using the data of the patients tested once and B: all OGTT performed. In both case, the analysis of the insulin-glucose correlation ($r^2=0.10$ and 0.09 for A and B respectively, $p<0.05$) revealed two sub-groups of patients: one with a significant correlation (insulin ≤ 270 pM; $r^2=0.60$ and 0.27 ; $p=0.002$ and 0.015 for A and B respectively) and one without any significance (insulin > 270 pM; $r^2=0.10$ and 0.07 ; $p=0.20$ and 0.21 for A and B respectively). The dotted lines represent the 95% confidence interval.

Figure 2 - Concentrations of blood HNE-protein adducts with glucose tolerance.

HNE-protein levels were measured in whole blood of CF patients with normal (NGT, white bars), impaired (IGT, black bars) and diabetic (CFRD, hatched bars) glucose tolerance. Results are expressed as means \pm SE (n=number of tests) when available at 2-h. Data were analyzed by ANOVA after a natural logarithm transformation to meet homoscedasticity (Bartlett's chi squared) and showed a significant difference: #: $p<0.05$ vs NGT.

Figure 3 - 2h-blood glucose and levels of blood HNE-protein adducts and urine DHN-MA conjugates.

A: Taking into consideration all OGTT performed, the positive correlation ($r^2 = 0.16$, $p<0.05$, n=35 tests performed) between the 2h-BG and the levels of HNE-protein adducts suggests that 16% of the increase in glucose levels is associated with oxidative stress. The analysis of the urine concentration of the conjugate DHN-MA with the 2h-BG revealed a

negative correlation ($r^2 = 0.23$, $p < 0.05$, $n = 24$ samples measured). The dotted lines represent the 95% confidence interval. B: When taking into account the data obtained only from the patients tested once, the correlation between blood HNE-P and 2-h BG did not reach significance ($p = 0.19$) whereas it was very similar to what observed with the whole population for urinary DHN-MA ($r^2 = 0.23$, $p = 0.028$).

Figure 4 - Outcome of patients with Impaired Glucose Tolerance.

IGT patients were retested 6 to 12 months later. The numbers in brackets indicate the male/female ratio.

Table 1 - Demographic, genetic and anthropometric data and evaluation of glucose metabolism and pancreatic function.

Data are means \pm SE; n =number of tests performed. The percentages of $\Delta F508$ mutation were calculated from the genotyped patients. Insulin resistance was evaluated using the HOMA model. NGT: Normal Glucose Tolerance; IGT: Impaired Glucose Tolerance; CFRD: Cystic fibrosis-related diabetes. Data in bold are obtained from all OGTT performed whereas the others are obtained from the patients tested only once (no re-testing of IGT patients). *: $p < 0.05$; **: $p < 0.001$ vs NGT; †: $p < 0.001$ vs IGT using factorial ANOVA; \square : $p < 0.001$ vs NGT using Student unpaired t -test.

Table 2 - Pulmonary function in relation to glucose tolerance and gender.

Data are means \pm SE; n =number of tests performed. Pulmonary function is expressed as percentage predicted forced expiratory volume in one second: FEV₁ and forced expiratory

flow₂₅₋₇₅: FEF₂₅₋₇₅. NGT: Normal Glucose Tolerance; IGT: Impaired Glucose Tolerance; CFRD: Cystic fibrosis-related diabetes.

Table 3 - Blood glutathione levels in relation to glucose tolerance and gender.

Data are means \pm SE; n=number of tests performed. Whole blood glutathione levels (oxidized glutathione (GSSG), total glutathione) were measured and reduced glutathione (GSH) calculated. NGT: Normal Glucose Tolerance; IGT: Impaired Glucose Tolerance; CFRD: Cystic fibrosis-related diabetes. *: $p < 0.05$ vs males using unpaired *t*-test.

Table 4 - Blood levels of HNE-protein adducts with changes in glucose tolerance following nutritional recommendations.

Whole blood HNE-protein levels (nM) were measured in some IGT patients who received NR and repeated when they were retested for glucose tolerance.

Table 5 - Fatty acid profiles in CF patients with normal and impaired glucose tolerance.

Plasma fatty acid profile was determined in some patient with normal (NGT) and impaired (IGT) glucose tolerance. Data are means \pm SE; n=number of patients analyzed. *: $p < 0.05$ vs NGT using unpaired *t*-test.

FIGURE 1

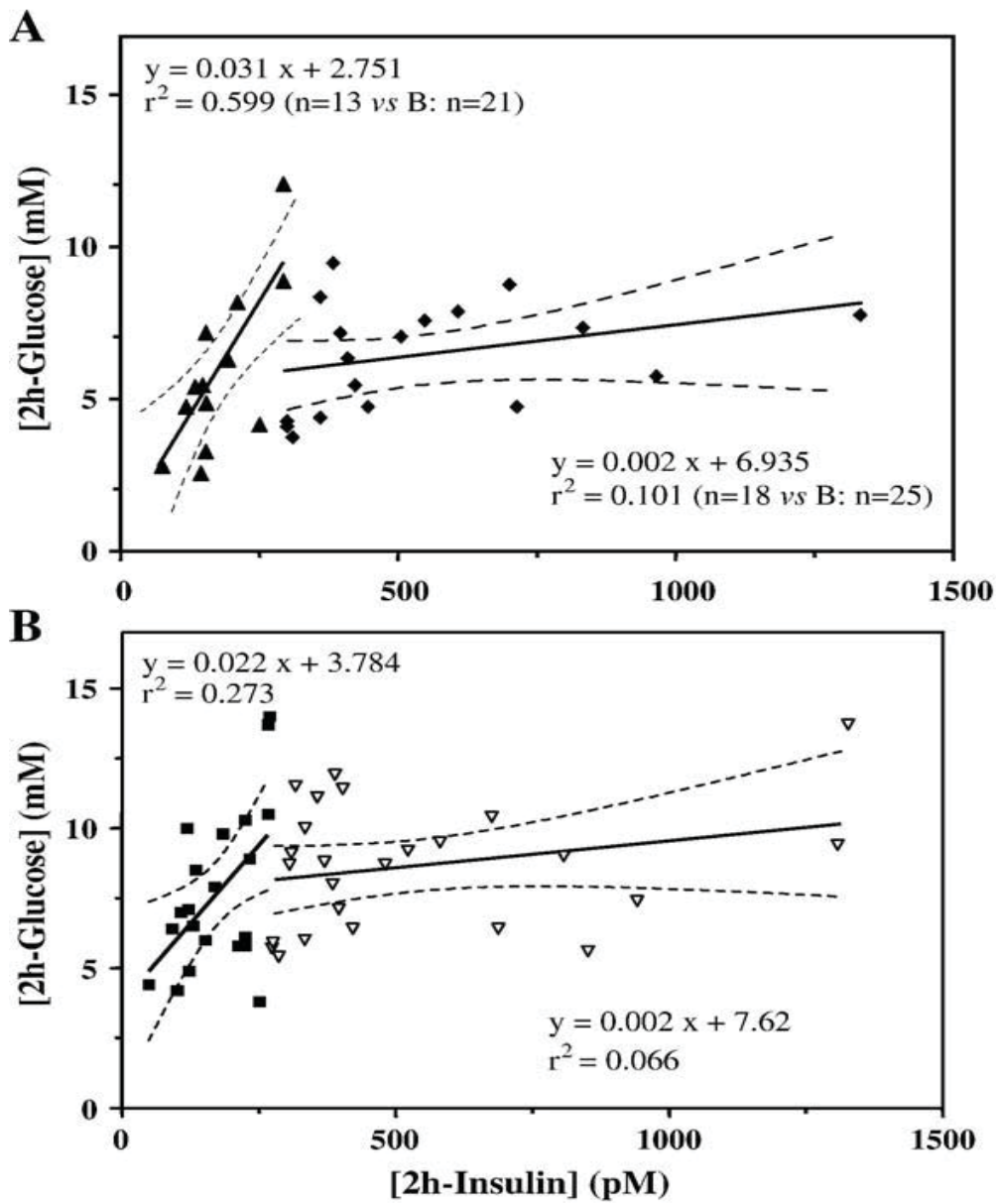


FIGURE 2

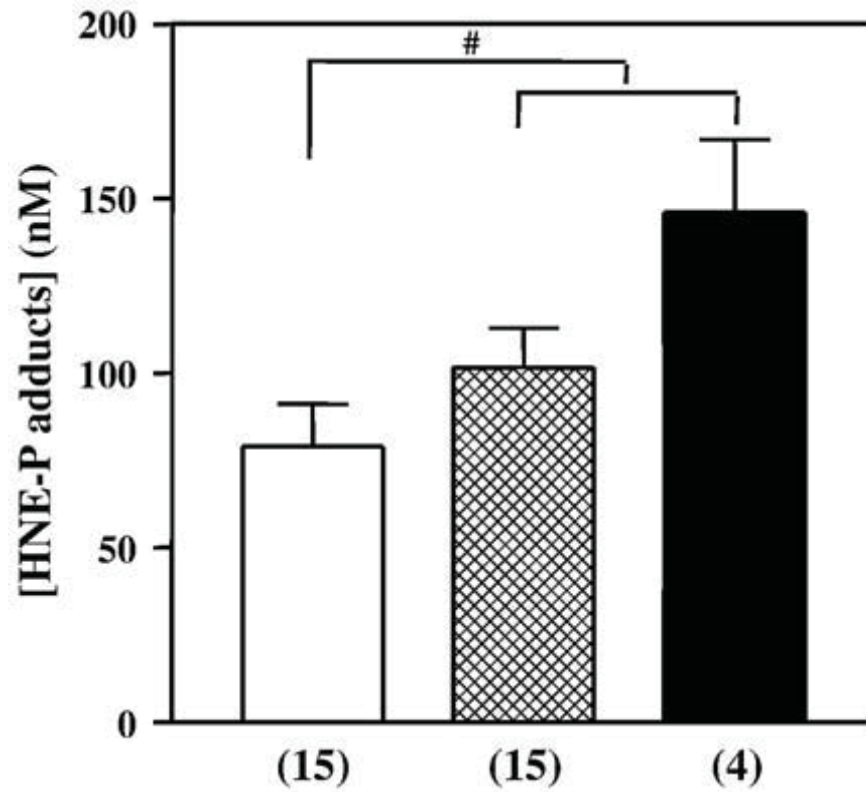


FIGURE 3

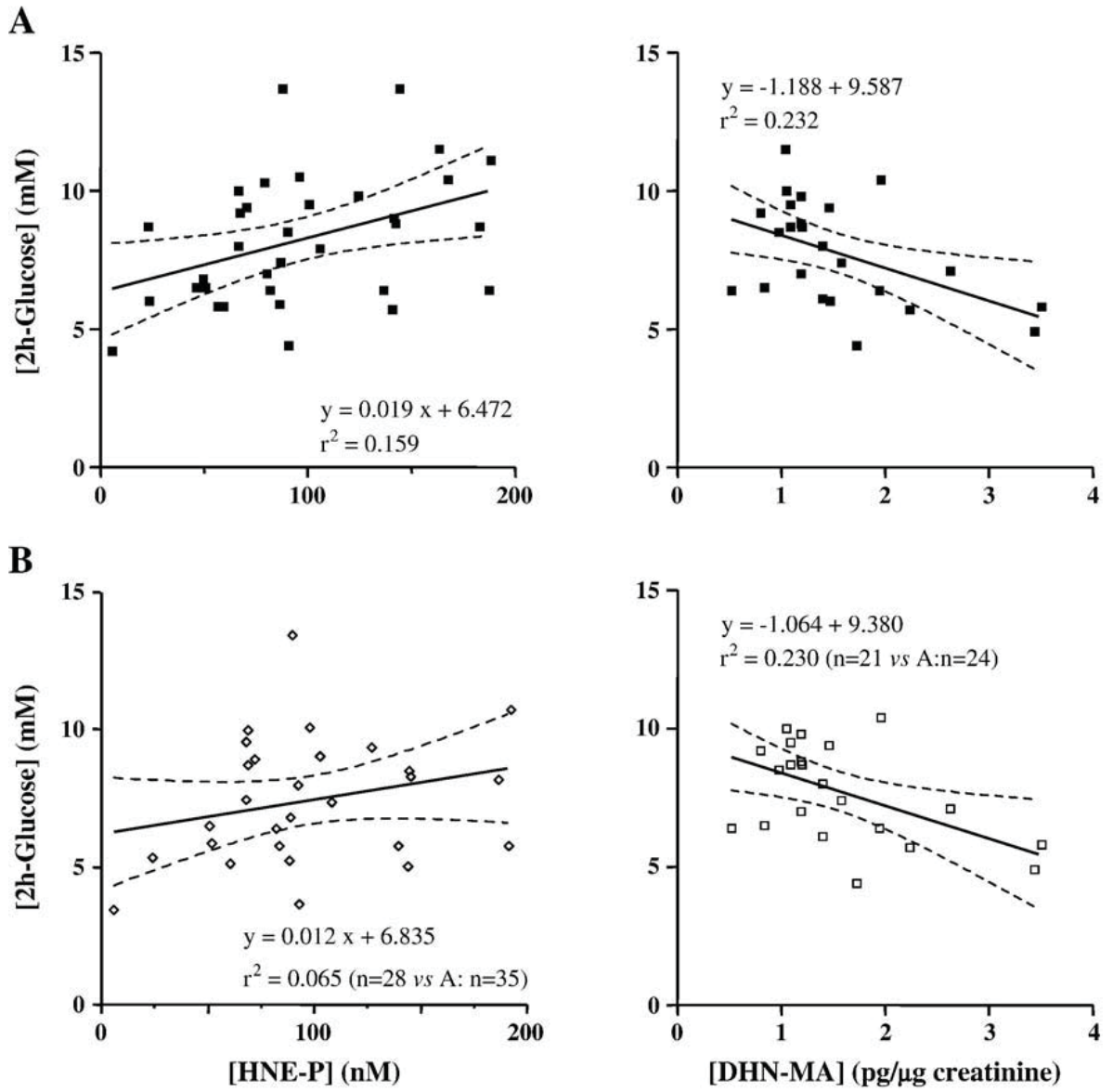


FIGURE 4

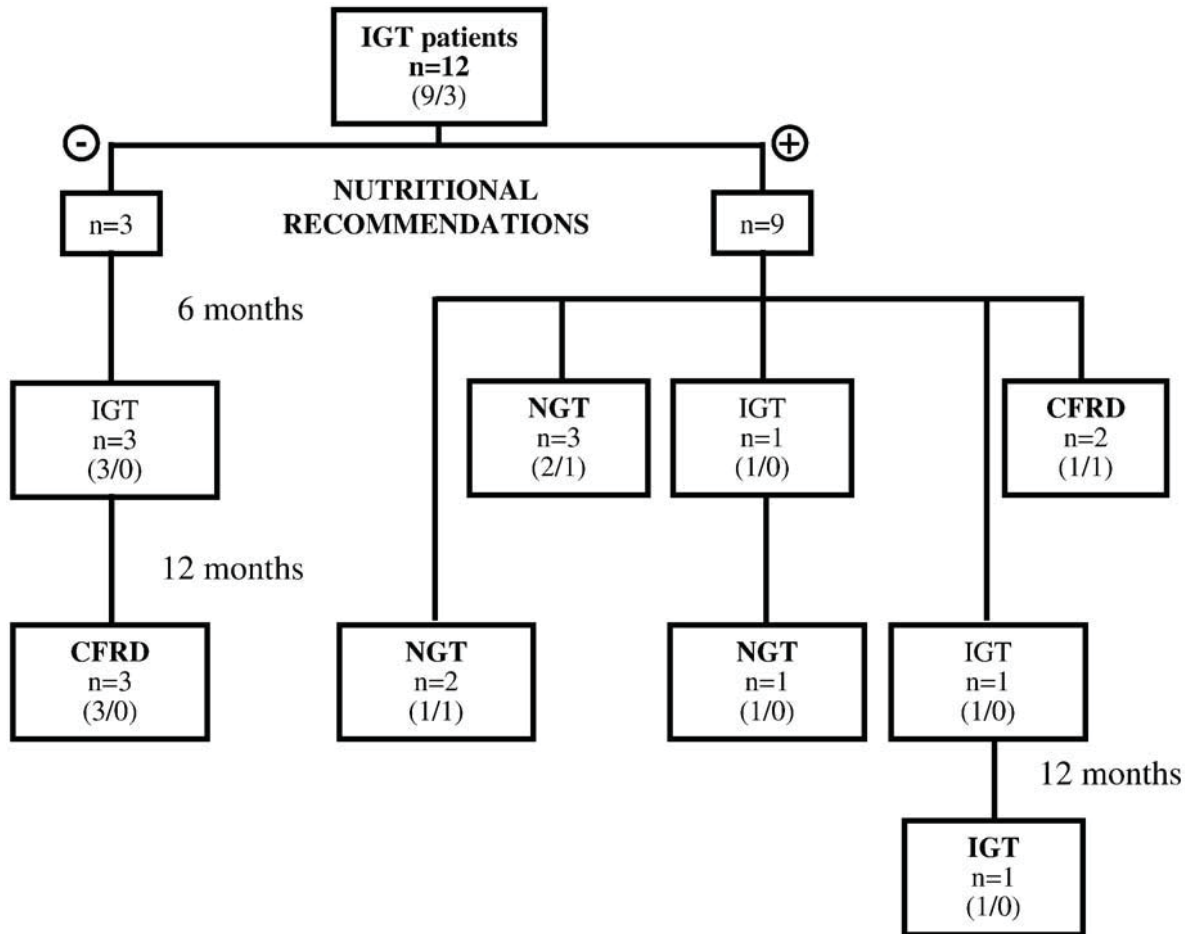


TABLE 1

	NGT	IGT	CFRD
M/F	9/7–13/9	9/4–9/4	0/2–4/3
Total (%)	16 (52)– 22 (52)	13 (42)– 13 (31)	2 (6)– 7 (17)
Age (years; <i>n</i>)	13.9±0.6 (16)	14.0±0.5 (13)	13.5 (2)
	14.0±0.5 (22)	14.0±0.5 (13)	14.4±0.8 (7)
Mutations ΔF508 (%; <i>n</i>)			
Homozygous	50.0 (7)– 52.6 (10)	55.6 (5)– 55.6 (5)	– 100 (2)
Heterozygous	42.9 (6)– 36.8 (7)	33.3 (3)– 33.3 (3)	–
Other mutations	7.1 (1)– 10.5 (2)	11.1 (1)– 11.1 (1)	–
Not genotyped	12.5 (2)– 13.6 (3)	30.8 (4)– 30.8 (4)	100 (2)– 71.4 (5)
BMI z-score	–0.35±0.17 (16) ^(<i>p</i>=0.49 vs all)	–0.17±0.28 (13) ^(<i>p</i>=0.46 vs all)	–0.63 (2)
	–0.18±0.16 (22)	–0.47±0.28 (16)	–0.57±0.39 (7)
Glucose (mM; <i>n</i>)			
0-h	5.0±0.1 (16)	4.9±0.1 (13)	5.1 (2)
	5.0±0.1 (22)	4.9±0.1 (18)	4.9±0.2 (7)
2-h	6.0±0.2 (16)	9.2±0.2 (13) ^d	12.4 (2)
	5.9±0.2 (22)	9.3±0.2 (18)^b	12.5±0.5 (7)^{bc}
Insulin (pM; <i>n</i>)			
0-h	52±7 (15)	53±11 (11)	31 (2)
	53±6 (21)	47±8 (18)	41±7 (7)
2-h	286±60 (16)	479±89 (13) ^(<i>p</i>=0.07 vs NGT)	312 (2)
	298±54 (21)	412±69 (18)	476±143 (7)^a
A1c (%; <i>n</i>)	5.47±0.10 (13)	5.65±0.08 (13)	5.90 (2)
	5.54±0.08 (18)	5.65±0.08 (17)	5.86±0.10 (7)
Pancreatic function			
HOMA (<i>n</i>)	11.6±1.6 (15)	12.1±2.5 (11)	7.8 (2)
	11.9±1.3 (20)	10.6±1.8 (16)	9.2±1.8 (7)
β-cell (%; <i>n</i>)	122±18 (15)	116±20 (11)	68 (2)
	127±16 (20)	109±14 (16)	98±13 (7)

TABLE 2

	Predicted FEV ₁ (%)	Predicted FEF ₂₅₋₇₅ (%)
<i>Glucose tolerance</i>		
NGT (<i>n</i>)	89.3±3.7 (22)	69.5±6.2 (22)
IGT (<i>n</i>)	83.6±4.5 (16)	63.0±7.4 (16)
CFRD (<i>n</i>)	81.5±8.6 (6)	63.4±12.0 (6)
<i>Gender</i>		
Males (<i>n</i>)	90.0±3.2 (30)	72.3±5.0 (30)
Females (<i>n</i>)	79.6±4.4 (15)	55.8±7.4 (15)

TABLE 3

	Total glutathione (μM)	GSSG/total	GSSG/GSH
<i>Glucose tolerance</i>			
NGT (<i>n</i>)	637 \pm 36 (19)	4.7 \pm 0.9 (16)	5.0 \pm 1.0 (16)
IGT (<i>n</i>)	647 \pm 52 (12)	7.0 \pm 1.7 (12)	7.9 \pm 2.1 (12)
CFRD (<i>n</i>)	795 \pm 230 (4)	4.2 \pm 2.1 (3)	4.4 \pm 2.2 (3)
<i>Gender</i>			
Males (<i>n</i>)	585 \pm 25 (20)	6.4 \pm 1.2 (18)	7.2 \pm 1.5 (18)
Females (<i>n</i>)	740 \pm 74 (14)*	4.2 \pm 0.9 (13)	4.5 \pm 1.0 (13)

TABLE 4

Patient	HNE-protein adducts (nM)	
	IGT	NGT
#1	105.9	1.9
#2	66.7	2.5
#3	182.8	56.7
	IGT	CFRD
#4	66.7	163.5
#5	100.6	144.5
	IGT	IGT
#6	142.4	23.1
		79.1

TABLE 5

Fatty acids (n; male:female)	NGT (8; 4:4)	IGT (4; 3:1)
<i>Saturated (SFA; mM) (% variation vs NGT)</i>		
C16:0	3.2±0.5	2.1±0.2 (33%)
C18:0	0.59±0.04	0.49±0.04 (17%)
Sum	4.3±0.6	2.9±0.3 (32%)
<i>Monounsaturated (MUFA; mM) (% variation vs NGT)</i>		
C16:1n-7	0.44±0.08	0.28±0.06 (36%)
C18:1n-9	2.1±0.2	1.4±0.1 (31%)
SUM	2.9±0.3	2.0±0.2* (31%)
<i>Polyunsaturated (PUFA) (% variation vs NGT)</i>		
n-6 (mM)		
C18:2n-6	2.2±0.2	2.0±0.2 (10%)
C20:4n-6	0.49±0.03	0.42±0.04 (14%)
n-3 (µM)		
C18:3n-3	61.6±14.0	46.5±6.5 (25%)
C20:5n-3	55.3±10.2	41.3±8.8 (25%)
C22:6n-3	94.5±19.8	43.0±6.9* (55%)
n-9 (µM)		
C20:3n-9	20.4±3.7	14.6±5.5 (29%)
SUM (mM)	3.2±0.3	2.8±0.2 (13%)
Total (SFA-MUFA-PUFA; mM)	10.4±1.1	7.7±0.5 (26%)
<i>Ratio (% variation vs NGT)</i>		
∑n-3/∑n-6	0.080±0.009	0.061±0.005 (25%)
C22:6n-3/Total	0.009±0.002	0.006±0.001 (35%)
C20:3n-9/C20:4n-6	0.043±0.009	0.034±0.013 (21%)

4 ARTICLE 2

List of Abbreviations:

AA, arachidonic acid; ASL, airway surface liquid; CF, cystic fibrosis; CFRD, cystic fibrosis-related diabetes; CFTR, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; DHA, docosahexaenoic acid; EBC, exhaled breath condensate; EFA, essential fatty acid; EFAD, essential fatty acid deficiency; EPA, eicosapentaenoic acid; ER, endoplasmic reticulum; ERK, extracellular-regulated kinase; GSH, reduced glutathione; GSH-Px, glutathione peroxidase; GSSG, oxidized glutathione; HNE, 4-hydroxynonenal; IGT, impaired glucose tolerance; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IR, insulin resistance; IRS, insulin receptor substrate; JNK, c-jun-NH₂-terminal kinase; LA, linoleic acid; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MDA, malondialdehyde; NF-κB, nuclear factor kappa B; NBD, nucleotide binding domain; OGTT, oral glucose tolerance test; PI, pancreatic insufficiency; PL, phospholipids; PUFA, polyunsaturated fatty acids; *P aeruginosa*, pseudomonas aeruginosa; ROS/RNS, reactive oxygen and nitrogen species; SERCA, sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase; SOD, superoxide dismutase; TNF-α, tumour necrosis factor α; TMD, transmembrane domain.

ABSTRACT

Cystic fibrosis (CF) represents the most common lethal autosomal recessive disorder in the Caucasian population. It is caused by mutations in the CF transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene, resulting in abnormal Na⁺ and Cl⁻ ion transport in several tissues. Its main clinical manifestations include bronchopulmonary infections along with gastrointestinal and nutritional disorders. Intense and recurrent inflammation ultimately leads to an overabundance of activated neutrophils and macrophages that contribute to free radical generation. Furthermore, *CFTR* defects directly affect glutathione transport and homeostasis, while intestinal fat malabsorption limits uptake of endogenous antioxidant vitamins. Collectively, these abnormal events disturb the balance between pro- and anti-oxidants and promote oxidative stress, which may play a significant role in CF-related diabetes, a severe complication associated with a drastic increase of morbidity and mortality. This review will focus on the involvement of oxidative stress in the CF pathology, especially on its role in the occurrence of CF-related diabetes. The multiple abnormalities in the oxidant/antioxidant balance could be a potential target for a new therapeutic approach.

Introduction

Cystic fibrosis (CF) is the most prevalent lethal recessive genetic disorder in Caucasian populations.¹ It is caused by mutations in a gene on chromosome 7, encoding the CF transmembrane conductance regulator protein (CFTR), which functions as a chloride channel within a number of epithelial tissues.²⁻⁴ CFTR represents an organic anion efflux channel in the cell membrane that is permeable to chloride and other larger organic ions such as the well known antioxidant reduced glutathione (GSH).^{5, 6} It also functions as a regulator of other ion channels, principally the epithelial Na^+ and HCO_3^- channels.⁷ Chloride ion (Cl^-) is abundant in most tissues and its transporters are involved in a range of physiological processes, including the regulation of intracellular pH, as well as cell volume and trans-epithelial transport.⁸ Mutations of the *CFTR* gene reduce the channel function of the CFTR protein leading to an altered fluid and electrolyte composition of secretions, thereby resulting in their increased viscosity which is responsible for progressive obstruction and fibrosis of various organs.⁹ These mutations are grouped into six classes ranging from defective CFTR protein synthesis, trafficking, regulation, conductance and stability.¹⁰⁻¹² The most common mutation belonging to class II is a 3-bp deletion of phenylalanine at amino-acid position 508 (ΔF508), present in up to 70% of Caucasian CF patients.^{9, 13} This mutation interferes with biogenesis and maturation of the ΔF508 -CFTR in the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus and is characterized by inefficient channel gating of the protein across the plasma membrane.^{14, 15} Although the

cause of CF is well established, the pathogenesis of this progressive multi-organ disease is still not fully understood. Indeed, the wide spectrum for CF phenotypes and severity in patients bearing the same combination of mutations suggests additional factors, such as environment and gene-gene interactions.¹⁶⁻²¹

CF leads to pathological changes in organs that express CFTR. For example, CFTR dysfunction in the lungs is associated with chronic bacterial infections,²² mostly *Pseudomonas aeruginosa* (*P aeruginosa*), sustained inflammation²³ (in part because of neutrophil activation) and obstruction of the lower airways,²⁴ which constitute the major causes of morbidity and mortality in CF patients. Repeated bacterial infections, chronically stimulated neutrophils with increased free radical release and abnormally low GSH efflux have been shown to increase oxidative stress in CF patient airways.²⁵⁻²⁸ CFTR dysfunction in pancreas causes an exocrine pancreatic insufficiency (PI) present in almost 90% of CF patients. This leads to fat malabsorption, which explains the difficulty to gain or at least maintain weight,²⁹⁻³¹ the high incidence of fat soluble antioxidant (vitamins and carotenoids)³²⁻³⁵ and essential fatty acid deficiency (EFAD).^{36, 37} Evidently, the reduced availability of dietary antioxidants following intestinal malabsorption can further increase oxidative stress in CF patients,³² which apparently plays an important role in CF multi-organ pathophysiology.³⁸⁻⁴⁰ Accordingly, lipid peroxidation products, which are markers of oxidative stress, have been detected in exhaled breath condensates (EBC), as well as in blood and urine samples of CF patients.⁴¹⁻⁴⁸ Most lipid peroxidation products are volatile molecules that may reach distant sites and exert various effects, including activation of

fibroblastic cells in the presence of inflammation,⁴⁹ which further augments oxidative stress.

Survival rates have progressively and steadily raised since the identification of CF, and many CF adults now reach middle age and are predicted to get older⁵⁰ in view of advances in medical management. The use of antimicrobial therapy, advances in the suppression of airway inflammation, efficient approaches capable of improving nutritional status, and the amelioration of socioeconomic factors are the main components that lead to steady life expectancy progression.^{13, 51-53} Nevertheless, lifespan improvement is associated with a raised prevalence of glucose abnormalities (e.g. impaired glucose tolerance (IGT) and CF-related diabetes (CFRD)).⁵⁴ The latter is the most frequently occurring comorbidity in patients with CF as reported in the *National Cystic Fibrosis Patient Registry* in 2001,⁵¹ It shows an increase with age and strikes 9% of children, 25% of adolescents and 40% of adults.⁵⁵⁻⁵⁷ Generally, CFRD is preceded by a period of IGT.⁵⁸⁻⁶¹ The main cause of CFRD is a reduced insulin secretion capacity⁶² combined with a variable state of insulin resistance (IR).⁶³⁻⁶⁷ Though the degree of IR is widely debated, its occurrence along with the limited insulin secretory capacity could have major clinical implications.⁶⁷ For most studies^{58, 68-70} but not all,⁷¹⁻⁷³ CFRD is related to pancreatic exocrine-endocrine insufficiency, which itself seems to correlate with CFTR mutations. It is believed that CFRD results from pancreatic exocrine damage evolving to dysfunctional endocrine islet cells.⁶³⁻⁶⁶ However, since there is no correlation between the severity of either exocrine pancreatic deficiency or islet β -cell loss and the occurrence of glucose tolerance abnormalities, additional mechanisms may

actively contribute to this major clinical problem.⁵¹ It is possible that increased oxidative stress that is observed during the course of the disease may induce β -cell injury^{74, 75} and precipitate the occurrence of diabetes in CF.^{48, 76} Additionally, various conditions can disturb ER function, including expression of misfolded proteins and altered calcium homeostasis, and provoke pro-toxicity, a phenomenon commonly termed “ER stress”.⁷⁷⁻⁷⁹ Evidence of defective folding (that may lead to cell death by apoptosis),⁸⁰ calcium depletion in the ER lumen and rapid degradation of mutant proteins are potentially among the causes involved in CF pathology.⁸¹ Because of their high protein synthesis rate, β -cells are particularly susceptible to ER stress,⁸² which may trigger CFRD.⁸³ Since CF is a multi-organ pathology, the present review is aimed to clarify our understanding about the relationship between the CFTR dysfunction, oxidative stress and the onset of CFRD.

Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein in Cystic Fibrosis Pathology

Structure and Function

The *CFTR* gene was isolated by positional cloning in 1989 and it spans 250 kB on the long arm of chromosome 7.^{3, 4, 84} This gene consists of 27 coding exons that result in a CFTR membrane glycoprotein of 1,480 amino acids with a molecular weight of 180 kDa.^{3, 4, 84} *CFTR* belongs to the ATP-binding cassette transporter superfamily and it is a cAMP-regulated channel,⁸⁵ involved in the secretion of fluids from secretory glands. *CFTR* is composed of two transmembrane domains (TMD)1 and TMD2 and two nucleotide-binding

domains NBD1 and NBD2, separated by a large polar regulatory domain containing multiple phosphorylation sites. The TMDs form the channel pore while phosphorylation of the regulatory domain determines channel activity, and ATP hydrolysis by the NBDs controls channel gating.⁸⁶ This channel protein is mostly cytoplasmic as 77% of the *CFTR* is present in the cytoplasm with 19% as membrane-spanning domains and 4% as extracellular loops (**Figure 1**). The latter are very short in length with two Asn-linked *N*-glycosylation sites (at positions 894 and 900) and the glycosylation process is important for the protein trafficking and function since only the fully glycosylated *CFTR* can reach the plasma membrane. It is believed that defective glycosylation of *CFTR* could be of significance regarding some events occurring during the course of the CF disease.⁸⁷⁻⁸⁹ *CFTR* is an apical membrane chloride channel^{2-4, 90} involved in salt and water transport as well as secretion across the apical membranes of polarized epithelia from exocrine systems.⁹¹ It also regulates other membrane conductance pathways or proteins that are members of the ATP-binding cassette transporter superfamily.¹⁰ Among these pathways are included the regulation of the epithelial Na⁺ channel, the outwardly rectifying chloride channel, the inwardly rectifying K⁺ channel, vesicle trafficking and intracellular compartment acidification and protein processing.⁹² There is also evidence that *CFTR* contributes to or regulates the HCO₃⁻ transport (through epithelial cell membranes⁷) and several other anions movement such as NO₃⁻, Cl⁻ and formate.⁹³ More recently, it has been shown that the *CFTR* is also permeable to glutathione and is involved in its homeostasis.^{5, 6,}
⁹⁴ Undoubtedly, our view of *CFTR* has evolved from a chloride channel important for fluid

composition to a protein involved in many cellular processes such as cytoskeleton networks, membrane transport of proteins, protein routing or degradation, receptor functions and apoptosis.⁹⁵

Genetic Abnormalities

Since the discovery of the *CFTR* gene, over 1,000 mutations have been described so far.⁹⁶ According to their classes (see the schematic view in Figure 1), mutations cause (I) no biosynthesis of CFTR protein because of nonsense (18%), frame shift (22%) or aberrant splicing (8%); (II) abnormal processing and trafficking due to failure of protein maturation; (III) Cl⁻ channel dysregulation; (IV) decreased Cl⁻ conductance; (V) reduction of protein synthesis; and (VI) decreased stability of the protein.⁹⁷ Defective processing with an improperly folded protein retained in the ER and/or eventually targeted for degradation (class II) is by far the most common mechanism accounting for more than 2/3 of clinical cases.^{98, 99} The most common mutation accounting for 70%¹⁰⁰ is the Δ F508 mutation, which consists in a deletion of a phenylalanine residue at position 508 in the CFTR protein,¹³ induces trapping of the protein in the ER, misfolding and proteasomal degradation.⁹⁸ CFTR is synthesized in the ER as an immature core-glycosylated 140 kDa precursor, which is associated with the cytoplasmic 70 kDa heat shock protein as well as the ER 90 kDa calcium-binding protein, calnexin, two molecular chaperones that assist its folding and prevent aggregation before maturation in the Golgi apparatus to a stable 160 kDa form.¹⁰¹ The Δ F508 mutation interferes with the folding step by increasing

intracellular calcium (Ca^{2+}) levels,¹⁰² then prolonging the association between calnexin and the nascent protein.¹⁰³ It is believed that the long-lived interaction with the chaperones marks the protein as misfolded or partially folded, which is subsequently conveyed to the degradation machinery, ultimately averting CFTR expression at the cell surface.¹⁰³

CFTR Protein Dysfunction and Cystic Fibrosis Manifestations

The loss of CFTR-mediated ion conductance depends on cellular and physiological profiles of duct-lining epithelia of exocrine organs. It can result in defective salt absorption by sweat ducts in the skin, leading to elevated sweat chloride levels or it can cause a lack of salt and watery components secretion. The defect may increase viscosity and thickness of the mucus in the respiratory and gastrointestinal tracts. Clinically, the most reliable and simple marker to estimate CFTR function is the sweat chloride test in which abnormal chloride concentrations (more than 60 mmol/l) can be demonstrated as the CFTR function is reduced to below 5%.¹⁰⁴ However, blood levels of immunoreactive trypsin measured at birth can also be used as a screening method since they are elevated in most patients with CF.¹⁰⁵

Airways Infection and Inflammation

Infection

Respiratory failure remains the leading cause of morbidity and mortality in patients with CF. Chronic pulmonary infection by pathogens such as *P aeruginosa* and others like

Burkholderia cepacia, *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus influenzae*, is thought to play a role in the progression of the disease. CF mutations by themselves do not appear to directly alter lung morphogenesis, but alterations occurring in airways, such as dehydrated secretions, bacterial colonisation and reduced air flow, seem to be more related to the consequences of CFTR abnormal functions.¹⁰⁶ Airways expression of CFTR in both the epithelium surface and the submucosal glands^{107, 108} is required to adjust the volume of the airway surface liquid (ASL), a fluid that helps maintain the hydration of epithelial cells while providing a protective barrier against toxins and infective agents. CFTR impairment causes a lack of fluid secretion, together with excessive electrolyte absorption,¹⁰⁹ leading to the thickening of the secretions that plug the airway system and impair the mucociliary clearance. Thus, mobile bacteria can penetrate into thickened mucus plaques and migrate into the zone above the epithelial layer.¹¹⁰ Additionally, failure of CFTR to secrete chloride leads to increased salt concentrations in secretions that inhibit the activity of the antimicrobial peptides, β -defensins and cathelicidins, which are secreted by airway epithelial cells.¹¹¹ The loss of airway protection by β -defensins facilitates chronic bacterial infection and it has been suggested that the antimicrobial mannose-binding lectin,¹¹² which opsonises bacteria in the airway through activated complement, is inactivated by high salt concentrations in CF-affected lungs.¹¹³ Finally, CFTR has been characterised as a receptor for *P aeruginosa* which normally contributes to its internalization and death.¹¹⁴ The mutant $\Delta F508$ -CFTR cannot bind this pathogen,¹¹⁵ leaving bacteria free to multiply in the airway lumen of patients with CF.¹¹⁴ Persistence of bacterial colonisation in the respiratory tract

usually coincides with increased expression of bacterial genes coding for the formation of micro colonies embedded in biofilms,^{116, 117} a mode of growth that protects them from host defence mechanisms and from antibiotics.

Inflammation

The colonisation of airways by bacterial pathogens leads to a sustained inflammatory response characterised by polymorphonuclear neutrophil influx,²² as well as the activation of macrophages, eosinophils, monocytes and lymphocytes.¹¹⁸ An integral part of this inflammation is the formation and release of free radicals such as superoxide radical (O_2^-) and hydroxyl radical (OH), which can lead to oxidative stress.¹¹⁹ Since it is well established that inflammation induced by bacterial infection in most tissues can cause oxidative stress, which maintains the inflammation and further causes damages to lung tissues. Indeed, it has been shown that the ASL of CF patients contains elevated levels of proinflammatory cytokines, especially interleukins (IL-1 β , IL-6 and IL-8), tumour necrosis factor- α (TNF- α), and potent neutrophilic chemoattractants,¹²⁰ involved in pro-oxidant production, tissue damage and cell apoptosis events. Conversely, the production of the immunosuppressive cytokine IL-10 with broad anti-inflammatory properties is down-regulated in CF respiratory epithelia.¹²⁰

Pancreatic Disorders in Cystic Fibrosis

Exocrine Dysfunction

The role of CFTR in pancreatic exocrine secretion is based on the concept that this channel is located in the apical membrane of the proximal duct epithelial cells.¹²¹ Immunocytochemical studies localized the CFTR in the proximal segment of the human pancreatic duct system¹²² and, interestingly, CFTR mRNA was found intercalated in intralobular ducts of the pancreas,¹²³ suggesting that ductal epithelial cells play a key role in the early events of altered pancreatic secretory function. Data from newborn screening programs reveal that a third of CF infants are pancreatic insufficient from birth whereas the remaining become insufficient in the first 2-3 years of life.¹²⁴ Pathological studies suggest that damage to the pancreas begins *in utero* with progressive acinar atrophy.¹²⁵ Exocrine PI is present in 90% of adult patients with CF and it occurs in patients carrying two severe alleles of a CFTR mutation (class I, II or III) such as $\Delta F508$ whereas those with mild CFTR mutations (class IV or V) are usually pancreatic sufficient.¹²⁶ The exact mechanism by which the exocrine pancreatic dysfunction occurs is still unknown, but there are a number of potential mechanisms proposed for CFTR dysfunction-induced exocrine PI.¹²⁷ Firstly, PI can result from a reduced volume and concentration of HCO_3^- ¹²⁸ secreted from duodenal submucosal glands, intestinal crypt epithelium and pancreatic and hepatic ductal system. Acidity in the duodenum liberates the gut hormone secretin into the circulation, which binds to its receptor on the pancreatic duct cells¹²⁹ and stimulates HCO_3^- -rich protein isotonic fluid secretion via an elevation of intracellular cAMP level. When CFTR is not

synthesized in the luminal membrane, duct cells cannot secrete Cl^- and HCO_3^- . Since anions act as the drawing force for water flow, this results in limited flow and thick pancreatic secretion with a high protein concentration, which may lead to ductal obstruction, pancreatic dysfunction and probably PI.^{128, 130} Furthermore, the acinar epithelium secretes digestive enzymes and the CFTR-expressing ductal epithelium releases HCO_3^- -rich liquids that flush the enzymes into the duodenum. Without sufficient fluid and HCO_3^- , digestive enzymes are retained in pancreatic ducts and prematurely activated, ultimately leading to tissue destruction, pancreatic fibrosis and function loss, resulting in impaired fat and protein digestion.

Essential Fatty Acid Deficiency

Fatty acids from membrane phospholipids (PL) are essential constituents for the cell since they influence not only membrane structure but also many membrane functions such as ion channelling and transport, endo- and exocytosis and functions of associated receptors¹³¹. Essential fatty acids (EFAs) as linoleic acid (LA, 18:2n-6) and α -linolenic acid (ALA, 18:3n-3) have been recognized fundamental for cell growth and membrane fluidity, but also for immune and vascular functions, and development of the central nervous system. As mammalian cells cannot synthesize *de novo* EFAs, adequate levels depend entirely on satisfactory dietary intake and absorption. If EFA absorption is appropriate, EFAs can then be converted into polyunsaturated fatty acids (PUFAs), such as arachidonic acid (AA,

20:4n-6), eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) upon the action of elongases and desaturases.

Among the metabolic abnormalities in CF, disturbances in fatty acid profile were reported in children and adults.¹³² Several studies have characterized the fatty acid composition in different compartments (i.e. serum *vs* plasma *vs* erythrocyte PL)¹³³⁻¹³⁶ and they found that CF patients show lower concentrations of EFAs than in healthy control subjects.^{29, 137, 138} The EFAD in CF patients has first been described in 1962¹³⁹ and has formerly been attributed to fat malabsorption due to PI. Nowadays, despite high fat nutritional strategies and pancreatic enzyme supplementation, several reports still indicate the occurrence of EFAD in CF.^{138, 140, 141} It appears that EFAD in CF patients is unlike the “classic” EFAD since it combines fat malabsorption and defective regulation of EFA metabolism, both conditions leading to fatty acid abnormalities.¹⁴² For example, despite low LA levels found, normal to increased levels of AA occur in plasma and tissue lipids of CF patients.¹⁴³⁻¹⁴⁵ Other fatty acid abnormalities, including a decrease in DHA levels and an increase in eicosatrienoic acid (20:3n-9) and palmitoleic acid (16:1n-7) levels, have been demonstrated in CF patients.¹⁴⁶ In spite of the relation existing between genotype (severity of the mutation) and EFAD (consequent to PI), residual fat malabsorption and increased EFA turnover have been suggested to compromise EFA status in CF.^{30, 147, 148} Beyond its function as a chloride channel, a direct link between CFTR dysfunction and EFA metabolism has been suggested.¹⁴⁹ It is believed that the CFTR protein may regulate membrane PL composition, and EFAD present in CF patients could be related to its

functional defect.^{142, 150} Indeed, active incorporation of fatty acids in PL is a dynamic process influenced by chloride channels¹⁵¹ and it has been shown that a defective CFTR reduces EFA incorporation into PL from CF epithelial cells whereas transfecting these cells with the “normal” gene increases EFA incorporation.¹⁴²

Essential Fatty Acid deficiency and Inflammation

It is well known that modifications in dietary fatty acids can modulate inflammatory activity.¹⁵²⁻¹⁵⁴ Differences in fatty acid intakes translate into changes in the fatty acid content of membrane lipids and other substrates,^{155, 156} which in turn constitute the substrates for eicosanoid production. Contrary to the generally accepted decrease of eicosanoid production in EFAD, patients with CF show an increased urinary excretion of inflammatory eicosanoid parallel to the deficiency¹⁴⁵ likely explaining why they are under continuous inflammatory processes very early in the course of the disease and even in the absence of bacterial infection.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹ These inflammatory events appear to play important roles in CF pathology since they occur in the lungs and other organs such as the intestine.¹⁶⁰ The involvement of AA in inflammation processes occurring during the CF pathology has been mentioned firstly for its role as a stimulant of mucus production, and secondly because it is a precursor of inflammatory eicosanoids¹⁶¹ and a potent mediator of inflammation, which can undergo cyclooxygenation, lipoxygenation and epoxygenation. Increased turnover of AA has been shown in CF patients^{143, 148, 162, 163} and multiple studies have been able to demonstrate increased inflammatory molecules, including

prostaglandins,^{164, 165} thromboxanes¹⁴⁵ and leukotrienes,^{157, 166, 167} derived from AA in blood,¹⁶⁴ EBC¹⁶⁸ and broncho-alveolar lavage fluid¹⁵⁷ from CF patients. Production of inflammatory molecules from the AA metabolism may constitute the link between EFAD and inflammation in CF, an association that is thought to increase susceptibility to pulmonary infection by staphylococcus and pseudomonas.¹⁶⁸ Supplementation of CF patients with various long-chain PUFA is recommended to restore EFA status.¹⁶⁹ Importantly, EPA can reduce inflammation^{170, 171} since these n-3 PUFA can lower the production of inflammatory eicosanoids particularly through an inhibition of the conversion of LA to AA.¹⁵⁵

Endocrine Dysfunction

Prevalence of Cystic Fibrosis-Related Diabetes

A change in glucose metabolism in CF patients was first described in 1940. In 1955, diabetes mellitus was noted as a complication of the disease. With improved lifespan to 30-40 years, CF patients are prone to developing IGT and CFRD, which can lead to specific complications in diabetes, such as nephropathy, retinopathy and neuropathy.^{57, 172-175} The prevalence of the diabetes condition is age-related, affecting up to 75% of the North American adult CF population.⁶³ In USA, 5-6% of CF patients are reported to have CFRD⁷⁰ with increasing prevalence as patients become older.⁵⁵ Two large registry-based studies from USA/Canada and Europe reported the prevalence of CFRD in about 5.1% and 3.5%, respectively.^{12, 176} In Europe, CFRD is present in 2.6% of patients under 18 years

and in 22.1% over 18 years.¹⁷⁶ In countries where oral glucose tolerance tests (OGTTs) are performed on a yearly basis among the CF populations, up to 50% of patients older than 30 years are reported to have CFRD.^{51, 173} Similarly, IGT is found in 18-47% of CF patients, showing an age-related increase in prevalence.^{55, 67, 177} Females are more affected by CFRD¹² with a prevalence of 17% compared with 12% in males.⁶⁴ The average age for CFRD occurrence is 18-21 years¹⁷⁸ and mortality is augmented with CFRD^{56, 179} (about six-fold greater compared to non CFRD subjects).¹⁸⁰ The clinical presentation of CFRD is often insidious as only a minority of CF patients has symptoms of hyperglycaemia such as fatigue, polyuria and polydypsia, which can be easily confounded with CF symptoms. Classic OGTT is used to identify patients with normal, impaired and diabetic glucose tolerance since fasting blood glucose levels remain normal for a long time during the course of the disease. This underlines the futility of fasting blood glucose as a screening tool in this population and underscores the importance of routine oral glucose tolerance testing,⁶⁷ particularly in children with CF.⁴⁸ Therefore, the *North American Cystic Fibrosis Foundation* recommends an annual oral glucose tolerance testing for early detection of IGT and diabetes in CF patients over 10 years old.¹⁸¹

Pathogenesis of Cystic Fibrosis-Related Diabetes

The aetiology of CFRD is complex and the involvement of CFTR in this pathology is not fully understood since the presence of CFTR in the human endocrine pancreas is still debated. For some investigators, there is no apparent expression of the CFTR protein in the

islets of Langerhans of CF patients,^{123, 182} whereas one author found the highest levels of CFTR being expressed in these islets more than in the whole pancreas.¹⁸³ These discordant observations may be explained by the relative sensitivity of methods used for CFTR localization in endocrine pancreas. Using *in situ* hybridization as a detection method, no CFTR mRNA expression was revealed in the islets¹²³ whereas CFTR cDNA expression was confirmed by microarray.¹⁸³ Further investigations are needed to assess the presence of CFTR in the human endocrine pancreas since various findings support a function for CFTR in pancreatic islets. Interestingly, CFTR mRNA has been identified in rats.¹⁸⁴ For now, it is widely accepted that abnormal expression of the CFTR in the exocrine pancreas is in part responsible of the CFRD. Basically, it is believed that obstruction of pancreatic ducts leads to reduced blood flow in the pancreatic tissue causing ischemic damage and β -cell death.⁶³⁻⁶⁶ As the vast majority of CF patients experience PI, it is thought that the islets of Langerhans are initially preserved but the acinar tissue is destroyed by fibrous fatty tissue later in life. This can explain why diabetes mellitus is rare in the first decade of the patient's life and why the prevalence of this disease rises with age.¹⁷³ Decreased islet cell function first results from loss of both β -cells and later from α -cells in the pancreas since post-mortem studies have documented fibrosis and fatty infiltration of the pancreas with a reduction in the absolute number of pancreatic islets.^{185, 186} It is believed that changes in the endocrine pancreas that occur on a background of exocrine PI are associated with CFRD.¹⁸⁷ Nevertheless, there is no real correlation between the severity of either exocrine pancreatic deficiency or islet β -cell loss and the occurrence of glucose tolerance

abnormalities, but patients with IGT, who are homozygous for the $\Delta F508$ mutation, present an increased risk for developing CFRD in the years following diagnosis.^{58, 173} Many other factors unique to CF seem to influence the onset and course of CFRD, including malnutrition, lung infection, malabsorption, abnormal intestinal transit, liver dysfunction, increased insulin clearance rate, glucagon deficiency and genetic factors. Accumulation of amyloid deposits has been suggested to play a role in CFRD since they have been found in CF patients with CFRD but not in non-diabetic patients.¹⁸⁸ It is not clear how amyloid is formed in islets, but it appears to originate from amylin,¹⁸⁹ a peptide composed of 37 amino acids, which is normally produced by β -cells and co-packaged with insulin.¹⁹⁰ Amyloid particles exhibit toxicity towards β -cell, which ends up with apoptosis following membrane disruption.¹⁹¹

Pathophysiology of Cystic Fibrosis-Related Diabetes

Several factors may be of importance for the development of abnormal glucose homeostasis in CF patients: (i) impairment of β -cell function with progressive fibrosis of islets of Langerhans with resultant distortion, ischemia, cell death and a decrease in islet numbers; (ii) impairment of other islet cell functions; (iii) impairment of the insulinotropic gut hormone secretion; (iv) changes in insulin sensitivity; and (v) altered insulin clearance rate.¹⁹²⁻¹⁹⁶ The primary cause of CFRD is thought to be insulin deficiency, especially the first-phase insulin secretion.⁶⁰ However, the prevailing mechanistic belief is that CFRD results from a combination of chronic pancreatic inflammation and potential loss of the islet

cells, resulting in less insulin reserve and production, together with a variable state of IR.^{63-66, 197} The contribution of IR to the aetiology of CFRD is unclear since results from various studies have not delivered the same message pertinent to insulin sensitivity. In fact, increased,¹⁹⁸ normal^{173, 199} and reduced magnitude have been reported.^{65, 67, 197} In general, obesity is the major risk factor for type 2 diabetes as it represents the main cause of IR. In CF, obesity is rare but infections and corticosteroid administration can both result in IR, explaining why certain patients may present intermittent altered glucose tolerance. Indeed, during the period of acute infection, there is an increase in TNF- α concentrations that can affect insulin signalling at the receptor level,²⁰⁰ while corticosteroid administration can reduce glucose uptake by skeletal muscles and impair insulin-mediated suppression of hepatic glucose production.²⁰¹ However, experiments with insulin kinetics have shown that insulin clearance rate is increased by 30 to 40% in CF patients with or without CFRD.^{202, 203} Evidence supports development of complications related to diabetes in patients with CFRD.^{174, 204} For example, CFRD subjects display a lower pulmonary function than those without diabetes^{64, 176, 205} and the rate of pulmonary decline is proportional to the severity of IGT.^{206, 207} The mechanism for this clinical decline is postulated to be related to increased protein catabolism due to insulin deficiency.⁵⁷ Individuals with diabetes (without CF) have lung parenchymal histological changes, including thickened basement membrane, fibrosis and septal obliteration,²⁰⁸ suggesting a direct deleterious effect of hyperglycemia. As a result, there is a growing interest in the management of the pulmonary function by diabetes treatment as a means to prevent diabetes-related complications in CF patients.²⁰⁹⁻²¹¹

Is Oxidative Stress Involved in the Cystic Fibrosis-Related Diabetes Onset?

Oxidative Stress: an Overview

Oxidative stress is defined as a disturbance in the balance between the production of free radicals (pro-oxidants) and host antioxidant defences, which may lead to cell/tissue injury or death.²¹² Free radicals can be defined as any species that contains one or more unpaired electrons.²¹² They are by-products of many biochemical processes occurring naturally within the aerobic organisms, including mitochondrial respiration, oxidation-reduction reactions and host defence mechanisms. At low concentrations, free radicals can play important roles in the cellular functionality whereas their high production can induce some deleterious effects that are repelled by an efficient cellular antioxidant system.²¹³⁻²¹⁵ However, in conditions where the host antioxidant system is overwhelmed by free radicals production, the intracellular oxidant/antioxidant homeostasis (redox state) is modified and processes related to oxidative stress are developed.

Free Radicals as Pro-Oxidants

Free radicals are produced through enzymatic and non-enzymatic reactions and are known to be part of the large family of radical and non-radical compounds, commonly represented by the reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) like $\cdot\text{OH}$, O_2^- , H_2O_2 , nitric oxide (NO), peroxynitrite (ONOO^-) and others. As ROS/RNS are highly reactive, they can react with non-radical biological molecules such as lipids, proteins, nucleic acids and carbohydrates leading to free radical chain reactions with the formation of new radicals and

by-products. One of the best examples of such reactions is the oxidation of low-density lipoprotein in atherogenesis process^{216, 217} where the resulting lipid peroxides can undergo degradation, catalyzed by transition metals, to produce alkoxy and peroxy radicals, which can further intensify lipid peroxidation. Enhanced polyunsaturated lipid peroxidation in cell membranes can result in changes in fluidity, increased permeability and eventually membrane rupture.²¹⁸ Additionally, formation of conjugated dienic hydroperoxides products²¹⁹ upon lipid peroxidation leads to their decomposition into other active substances such as isoprostanes (F_{2α}-isoprostanes) and aldehydes like malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (HNE) and 4-hydroxyhexenal,²¹⁹ which can be cytotoxic to cells.^{220, 221} These aldehydes are diffusible molecules with the capacity to induce many signalling pathways^{222, 223} by reacting with side chain amino acids of proteins.^{219, 223, 224} The F_{2α}-isoprostanes such as 8-epi-prostaglandin F_{2α} and 8-iso-prostaglandin F_{2α} are end products of AA peroxidation, which circulate in human plasma and are excreted in the urine.²²⁵⁻²²⁷ Measurement of isoprostane levels in biological fluids provides a quantitative index of lipid peroxidation *in vivo* and, for this reason, they are used as markers of oxidative stress.²²⁸ Addition of carbonyl derivatives in proteins can render them susceptible to proteolysis²²⁹ while inducing DNA double-strand breaks (conversion of guanine into 8-hydroxyguanine) and protein/DNA crosslinks.²³⁰⁻²³² However, these indices do not always relate to oxidative stress as they are also considered as indirect biomarkers of DNA damage and repair, found either in blood and urine samples.^{233, 234} ROS/RNS such as

NO can be trapped by thiol-containing biomolecules, like cysteine and glutathione, to form S-nitrosothiols that are considered as by-product of oxidative and nitrosative stress.²³⁵

Antioxidant Defences

Given the potential for tissue damage induced by oxidative stress processes, cells and organs have evolved major antioxidant defence mechanisms, including endogenous and exogenous antioxidants to protect them from free radical attack. An antioxidant can be defined as any substance that, when present at low concentrations in comparison with oxidizable substrate concentrations, considerably delays or inhibits oxidation of the substrate.²³⁶ Cells have formidable defences against oxidative damage that can operate at different levels (i.e. lipophilic molecules vs hydrophilic molecules, in different tissue/cell (sub)compartments) by (a) preventing radical formation; (b) intercepting radicals when formed; (c) repairing oxidative damage caused by radicals; (d) increasing the clearance of damaged molecules; and (e) preventing excessive repair mechanisms in order to prevent mutations.²³⁶ Endogenous antioxidants are mainly represented by enzymes such as superoxide dismutase (SOD), present in cytosol and mitochondria, which catalyzes the dismutation of $O_2^{\cdot -}$ to H_2O_2 and O_2 .^{237, 238} The product of the dismutation reaction, H_2O_2 , can be destroyed by two enzymes; catalase and glutathione peroxidase (GSH-Px; a selenium-containing enzyme requiring GSH). GSH is a low weight tripeptide, consisting of glutamic acid, cysteine and glycine, found in cell compartments including cytosol, mitochondria and nucleus as well as extracellular fluids like plasma and ASL making it the

most important water soluble antioxidant in the body. Indeed, it has several important functions, including (1) direct scavenging of free radicals through donation of its hydrogen atom; (2) acting as co-substrate in the reduction of hydrogen peroxide and other hydroperoxides by GSH-Px; (3) conjugating with various components by binding via its reactive sulphide group; and (4) playing a major role in the synthesis of certain leukotrienes and reduction of disulfide bonds in proteins and DNA precursors.²³⁹ In its role as a scavenger of free radicals, GSH is oxidized to GSH disulfide (GSSG) by the action of GSH-Px. The GSH/GSSG ratio is then often used as a marker of an ongoing oxidative stress.²⁴⁰ Exogenous antioxidants are represented by vitamin E (α -tocopherol) present within cell membranes with β -carotene and coenzyme Q. Once incorporated in the lipid core of cell membrane, α -tocopherol has the ability to scavenge intermediate peroxy radicals and, therefore, interrupts the chain reaction of lipid peroxidation by generating the radical tocopherol. Vitamin E is a chain-breaking antioxidant²⁴¹ and the tocopherol radical is converted back to α -tocopherol by the water-soluble antioxidant vitamin C (ascorbic acid). It should be noted that GSH, ascorbic acid and α -tocopherol exist in an interdependent regenerating system, where levels of each in reduced form are dependent on normal levels of others. Metal-binding proteins such as transferrin, lactoferrin and ceruloplasmin are other major cell extracellular antioxidant defences that ensure that free metals like iron and copper are maintained in a nonreactive state.

Oxidative Stress-Activated Signalling Pathways

Most cell types generate low concentrations of ROS/RNS when they are stimulated briefly by cytokines (IL-1 β and TNF- α), growth factors and/or hormones.²⁴² In the case of prolonged stimulation, excessive levels of ROS/RNS not only directly damage cell components but indirectly damage them by activating a variety of stress-sensitive intracellular systems such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways²⁴³ and transcription factors, including NF- κ B²⁴⁴ and AP-1.²⁴⁵ Activation of these pathways is involved in several cellular functions, ranging from proliferation to differentiation and apoptosis²⁴⁶ and it can thus play a major role in the aetiology of oxidative stress-related diseases.²⁴⁷ The exact mechanisms by which oxidative stress and its derived molecules activate these stress-sensitive pathways are extensive and still not fully understood. There are four MAPK families, including extracellular-regulated kinase (ERK), c-Jun-NH₂-terminal kinase (JNK), p38 MAPK and the big MAPK-1 (BMAPK-1), of which serine/threonine kinases are important in cell function processes.²⁴⁸ The ERK pathway is commonly associated with the regulation of cell proliferation whereas the balance between ERK and JNK activation is involved in cell survival since both a decrease in ERK and an increase in JNK activities are required for the induction of apoptosis.²⁴⁹ Through various phosphorylation mechanisms, the MAPKs are involved in the activation of nuclear transcription factors that control the expression of many genes important for cell survival and metabolism.²⁴⁹ Among these, NF- κ B is involved in inflammatory responses, AP-1 in cell growth and differentiation and p53 in proliferation and apoptosis.²⁴³ Based on

in vitro studies, recent results indicate that under normal/limited low cellular stress, low concentrations of p53 induce the expression of antioxidant genes, whereas in severe cellular stress, high concentrations of p53 promote the expression of genes that contribute to ROS/RNS formation and p53-mediated apoptosis.²⁵⁰ Thus, the relative pro-apoptotic and anti-apoptotic functions of p53 would appear to depend at least partly on its cellular concentration as well as on other factors such as p53 subcellular localization and phosphorylation status.²⁵⁰ Besides its activation by oxidation-derived molecules, NF- κ B activation is promoted by a number of proinflammatory cytokines and hormones.²⁵¹ This pathway proceeds through the phosphorylation and subsequent ubiquitination of the β subunit of the inhibitory I- κ B. The modified moiety, still associated with NF- κ B in the cytoplasm, is then selectively degraded, thus releasing the active NF- κ B to translocate into the nucleus and bind its target genes to initiate transcription. Through this pathway, proinflammatory cytokines such as TNF- α further stimulate the transcription of other cytokines,²⁵² which maintain inflammation along with several molecules involved in oxidative stress-related events (*i.e.* IL8, IL6). Increased inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and NO production in response to NF- κ B activation is one specific example of ROS/RNS regulated gene expression²⁵³ since TNF- α is also known to increase ROS production in vascular smooth muscle cells through activation of NADPH oxidase.²⁵⁴ Although there are many other pathways and mechanisms by which oxidative stress can regulate the expression of numerous genes, it should be noticed that increased ROS/RNS

production can directly damage both extra- and intra-cellular components and ultimately cause cell death.

Oxidative Stress in Cystic Fibrosis

In the previous section of this review, we have shown that CFTR dysfunction is associated with chronic bacterial infection and sustained inflammation, two processes that lead to oxidative stress by increased free radicals production. However, CF patients are particularly susceptible to oxidative stress as antioxidant protection is impaired and oxidant production is exaggerated.¹⁶⁹ The importance of antioxidant status in CF has been explored in the recent years and it appears that both endogenous and exogenous antioxidant profiles are disturbed. Malabsorption combined with the absence of currently recommended dietary pattern leads to an altered nutritional status in CF, with deficiencies in the antioxidant reserve.¹⁶⁹ Antioxidant status in CF is disturbed by CFTR dysfunction, which alters GSH transport across epithelial cell membranes.^{5,6} Consequently to increased oxidative stress, a profound extracellular deficit of GSH, i.e. ASL and plasma levels: 5-10% and 50% of normal concentrations, respectively, along with a dramatically decreased GSH/GSSG ratio in both fluids (approximately 1:1, in contrast to normal ranges of 9-200:1) were demonstrated in adult CF patients.²⁵⁵ Unlike other genetic diseases of the glutathione system, the redox, transferase and recycling systems are intact in CF. Thus, a decrease in GSH content can result from both abnormal transport through the CFTR and amplified inflammation processes during the course of CF.²⁵⁶ As GSH performs other tasks as

regenerating vitamins, its deficiency is often accompanied by lower levels of α -tocopherol and ascorbic acid.²⁵⁷ In this way, it has been shown that GSH concentrations can be up-regulated with redundant anion channels in erythrocytes²⁵⁸ and lymphocytes²⁵⁹ from CF patients. Oxidative stress biomarkers (**Table 1**) like lipid peroxidation products have been detected in EBC, bronchoalveolar lavage fluid and blood from CF patients.^{43, 48, 118, 260-264} These lipid peroxidation products were also found increased in peripheral blood, plasma and urine samples from the same CF patients, suggesting that oxidative stress originating from lungs can shift through other organs.^{40-42, 44, 265}

Oxidative Stress and the Cystic Fibrosis-Related Diabetes Onset

Generally in diabetes, hyperglycemia and hyperlipidemia are two emerging factors, which through complex mechanisms, lead to oxidative stress.²⁶⁶ On the one hand, elevated glucose levels can cause oxidative stress by many ways including an increased production of mitochondrial free radicals, nonenzymatic glycation of proteins^{267, 268} and glucose auto-oxidation.^{269, 270} On the other hand, elevated FFAs can also cause oxidative stress due to increased mitochondrial uncoupling^{271, 272} and β -oxidation,^{273, 274} ultimately leading to increased free radicals formation. A such oxidative stress can then lead to the activation of stress-sensitive signalling pathways, which in turn can worsen both insulin secretion and action leading to IR, IGT and overt diabetes.^{275, 276} Additionally, compared to other organs such as the lungs or liver, the expression of the major endogenous antioxidants (SOD, catalase, GSH-Px) is low in β -cells and this situation sets them up as an easy target for free

radical production and oxidative stress. Finally, GSH deficiency, as it occurs in CF patients, is known to cause oxidative damage in the pancreas,²⁷⁷ and is associated with the onset of diabetes.²⁷⁸⁻²⁸² **Figure 2** schematically summarises the potential link between CFTR defects, inflammatory processes and activation of stress-sensitive pathways.

Reduced Insulin Secretion

Beta-cells are responsible for sensing and secreting the appropriate amount of insulin in response to a glucose stimulus.²⁸³ This complex process depends on several factors and particularly mitochondrial glucose metabolism, which acts as a stimulus for insulin secretion.²⁸³⁻²⁸⁵ Basically, insulin secretion induced by glucose requires glucose transport across β -cell plasma membranes via specific transporters (GLUT1 and GLUT2), its oxidation through the glycolytic pathway and its later incorporation in the citric acid cycle within mitochondria for ATP production.²⁸⁴ An enhanced ATP to ADP ratio in the cytoplasm will result in the closure of ATP-sensitive potassium (K^+) channels, decreasing the hyperpolarizing outward K^+ flux. The ensuing plasma membrane depolarization will generate influx of extracellular Ca^{2+} and activation of protein kinases, which will then mediate insulin exocytosis.²⁴⁷ An elevation of intracellular level of Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), induced by an increased influx through voltage-gated Ca^{2+} channels, is the primary driver of the glucose-induced mechanism. However, further increases in $[Ca^{2+}]_i$ can stimulate mitochondrial generation of ROS/RNS while Ca^{2+} , via protein kinase C activation, may increase NADPH oxidase-dependant generation of free radicals and thus induce oxidative

stress and ultimately apoptosis.^{286, 287} Based on *in vitro* studies, it has been shown that ROS/RNS can decrease cytosolic ATP level and calcium flux in cytosol and mitochondria then causing apoptosis.²⁸⁵ Furthermore, it has been proved that inhibition of insulin secretion and glucose oxidation occurs when β -cells are exposed to fatty acids²⁸⁸ and lipid peroxidation products.²⁸⁹ Since increased oxidative stress²⁵⁶ and altered Ca^{2+} homeostasis²⁹⁰ are found in CF, it is believed that both elements could be involved in insulin deficiency observed in CFRD patients,⁶⁰ notably by an altered insulin secretion process. Abnormal intracellular calcium homeostasis is a common defect in both type 1 and type 2 diabetes,²⁹¹ and altered Ca^{2+} metabolism is reported to affect β -cell functions, including insulin biosynthesis.²⁹² As the ER plays an important role in the regulation of Ca^{2+} homeostasis, it is possible that the combination of oxidative stress with the ER stress during the course of CF further decreases insulin secretion.

Hypothesis of the synergic effects of oxidative and ER stresses

Besides its function as a cellular Ca^{2+} store, ER is an important organelle that serves other central functions, including post-translational modifications, folding and assembly of newly synthesized secretory proteins. In conditions of ER stress, cells can develop protective mechanisms by upregulating the level of ER stress response genes, by reducing the synthesis of new proteins and by eliminating misfolded proteins or they alternatively can experience apoptosis.⁸⁰ Defective folding and rapid degradation of the mutant ΔF508 -CFTR is one of the causes of CF⁸¹ and this severe disturbance in protein folding in the ER

can lead to cell death.⁸⁰ Because of their high rate of protein synthesis, β -cells are particularly susceptible to ER stress⁸² and ER stress-mediated apoptosis in these cells could constitute a potential cause of diabetes. Upon oxidative stress activation, NF- κ B regulates expression of iNOS in β -cells²⁹³ by producing NO that is known to trigger an ER stress response in β -cells leading to apoptosis.⁸³ Indeed, NO has been reported to serve as a mediator of β -cell failure in type 1 diabetes and 50% of the β -cell genes modified after cytokine exposure are secondary to iNOS-mediated NO formation.²⁹⁴ Inflammatory cytokines producing NO such as IL-1 β and TNF- α inhibit sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) expression, the protein responsible for Ca²⁺ uptake into the ER lumen.²⁹⁵ As cellular calcium is a critical element in the β -cell function,²⁹⁶⁻²⁹⁸ the protein SERCA pumps and sequesters excessive cytosolic calcium into the ER, especially after glucose stimulated-insulin secretion, thereby ensuring the calcium homeostasis required for insulin synthesis and exocytosis. Inhibition of SERCA expression resulting in depletion of ER Ca²⁺ stores is believed to cause gradual β -cell depletion in type 1 diabetes.²⁹⁹ One can therefore hypothesize that, in CF, cytokine-induced NF- κ B activation under oxidative stress condition with concomitant NO release, will cause ER stress in β -cells and ultimately activate the ER stress response pathway. This condition will then lead to an altered insulin secretion and likely to β -cells apoptosis, two conditions that promote the occurrence of CFRD in patients. **Figure 3** presents a schematic view of the effects of oxidative and ER stresses on β -cells.

Increased Insulin Resistance

The pathophysiology of IR involves a complex network of signalling pathways which is not fully understood. IR can be defined as the inability of insulin to produce its biological actions at circulating concentrations that are normally effective in healthy subjects.¹⁹⁰ This occurs especially when there is impaired ability of insulin to stimulate glucose uptake by skeletal and/or to suppress hepatic glucose production. Basically, after insulin binds to its plasma membrane receptor, both insulin receptor and insulin receptor substrate (IRS) proteins are phosphorylated on tyrosine residues leading to the activation of downstream insulin signalling pathways, including the translocation of glucose transporters to the plasma membrane to ensure glucose uptake³⁰⁰. However, serine phosphorylation of IRS-1 by various inflammatory signals seems to be one of the key aspects that disrupt insulin-receptor signalling.^{200, 301-303} This pathway of IR includes decreased number of insulin receptors, reduced insulin binding to receptors and impaired translocation of glucose transporters.¹⁹⁰ In individuals with CF, insulin-stimulated translocation of the glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane is substantially reduced³⁰⁴ and insulin binding affinity appears to be decreased.^{198, 305} IR conditions encountered among CF patients may result firstly from the anti-inflammatory therapy and secondly from increased oxidative stress. It is well known that among its effects, corticosteroid administration can cause reduced glucose uptake by skeletal muscles and impaired insulin-mediated suppression of hepatic glucose production.^{190, 201} As oxidative stress events are known to maintain inflammatory processes, it is believed that sustained cytokine production leads to the

activation of multiple stress-sensitive serine/threonine kinase signalling cascades.^{248, 306} These kinases can phosphorylate IRS-1 on specific serine and threonine sites, which lower the extent of insulin-stimulated tyrosine phosphorylation, thus resulting in diminished translocation of GLUT4 at the membrane surface³⁰⁷ and lessened insulin action leading to IR.³⁰⁸

Management of Oxidative Stress in Cystic Fibrosis

In CF, malnutrition, infection and inflammation are the leading cause of weakened antioxidant status, reduced energy intake, increased energy expenditure and increased oxidative stress in patients. CFRD may further increase calorie losses due to decreased insulin secretion and variable IR, which lead to glycosuria and increased protein catabolism.^{190, 309} Therefore, such conditions may contribute to an increased morbidity and mortality in the absence of any attempt to manage energy intake and antioxidant therapy. The importance of nutrition for the quality and life length of CF patients has been highlighted early in the past³¹⁰ and nowadays several correlations have been made between nutritional status and pulmonary function.^{311, 312} It is generally accepted that normal growth rates are achieved in most CF patients given access to appropriate nutritional support.³⁷ The exacerbated lung disease is often followed by anorexia and vomiting episodes that cause weight loss, which can be worse for survival³¹³ as it affects respiratory muscle strength, making them ineffective for mucus handling.³⁷ Due to malabsorption secondary to exocrine PI, pancreatic enzyme replacement therapy, high energy diet and

essential nutrient supplementation are required to achieve energy demand. For the CF population, it is commonly recommended to consume 120-150% of the Recommended Dietary Allowance for energy intake,³¹⁴ including a high proportion of fat (35-40%) and protein (15-20%).^{33, 37, 315} Oral pancreatic enzyme supplements, like lipase, are mostly required for fat digestion, and patients may need between 500 to 4000 units per gram of fat ingested per day³¹⁶ since they continuously have severe steatorrhea³⁷ with fecal energy losses remaining as high as 10-20% of energy intake. Enteral feeding with vegetable oils containing LA has been shown to improve EFA deficiency in CF.^{144, 164, 317} Supplementation with n-3 PUFA has also shown to ameliorate lung function in CF.^{318, 319} It is important to notice that large amounts of n-3 PUFA can inhibit desaturation and elongation of LA, resulting in reduced levels of AA along with the reduction of inflammatory processes,³²⁰ these two pathways being in competition for a number of common enzyme utilizations. However, the benefits of long-term use of n-3 PUFA remain to be clarified as well as the ideal n-6:n-3 ratio since both groups of fatty acids are oxidizable substrates in cell membrane that are susceptible to oxidative injury and subsequent lung damage.³²¹ In prevention of such damages, supplementation of CF patients with vitamin E and β -carotene has been effective towards preventing oxidative damage^{34, 46, 133, 322} as seen by a decrease in lipid peroxidation products. It is believed that these antioxidants have an important role in maintaining or restoring EFA status by protecting PUFAs from oxidative degradation since their supplementation augments plasma PUFAs levels.⁴⁴ Patients with CF show normal total glutathione (GSH + GSSG) content in

lung epithelial cells but exhibit significantly diminished efflux of GSH through CFTR channels at the apical cell surface.^{5, 6, 94, 323} GSH deficiency has largely been observed and it may worsen several respiratory diseases, including CF.³²⁴⁻³²⁶ The decline in GSH levels in CF lungs, a phenomenon aggravated by inflammation and infection, has prompted several investigators to propose new therapeutic avenues through the administration of large GSH quantities.³²⁷ Adequate delivery and a half-life of several hours are required for this antioxidant therapy.^{256, 328, 329} Accordingly, *in vivo* studies have shown an improvement of clinical parameters in CF lung disease using inhaled GSH (600 mg/day).^{330, 331} However, further investigation is needed to determine the extent of effectiveness of GSH on CF symptoms in view of the small number of clinical trials employing only short treatment duration (6 weeks), which resulted in limited amelioration of lung function.³²⁷

Conclusions

CF is a well established inflammatory disease affecting most of the secretory organs. CFTR dysfunction and the following viscous secretions are involved in the lung disease, pancreatic damages and intestinal dysfunction. Repeated bacterial infections, chronically stimulated neutrophils and defective GSH transport across the airway epithelium membrane lead to increased mucus viscoelasticity, exaggerated inflammation and ineffective immune responses coupled with an acute oxidative stress. As these conditions become amplified during the course of the disease, there is a progressive oxidative burden, which would cause further decrements in the major antioxidant defences and may be extended to other organs

due to dietary antioxidants malabsorption associated to PI. In the absence of an appropriate antioxidant network, the activation of stress-sensitive signalling pathways (i.e. NF- κ B and the release of inflammatory cytokines (i.e. TNF- α) further contribute to the appearance of fibrosis, especially in the pancreas. The fibrotic pattern of pancreas during the development of CF is thought to play a role in destruction of β -cells and to progressively reduce insulin secretion and deteriorate glucose tolerance. Since IGT commonly occurs without fasting hyperglycemia, it is possible that repeated insidious postprandial hyperglycemia episodes may favor the development and progression of CFRD by augmented ROS/RNS production that may induce β -cell injury or by altering the cascade of insulin signalling at the receptor level via IRS-1. Such an increase of oxidative stress concomitant with the ROS/RNS production may favour lipid peroxidation events, by reacting with PUFAs in membranes, leading to, EFAD and alteration of protein function via formation of adducts with lipid peroxidation derivatives, which amplifies oxidative damage in tissues. Therefore, the daily intake of antioxidants and the use of pharmacological inhibitors aimed at suppressing chronic activation of stress-sensitive signalling pathways may be very important to prevent the onset of CFRD in patients. Moreover, the use of mucolytics such as N-acetylcysteine can help to lower bacterial infection by clearing the respiratory airways. As the population of individuals with CF grows, the need for the development of animal models presenting phenotypes to parallel the human disease becomes crucial. Indeed, mouse models, with or without CFRD provide opportunities to study the pathophysiology of CF at the molecular level.

ACKNOWLEDGMENTS

The current work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP#82714) and Canadian Cystic Fibrosis Foundation. The authors thank Ms Schohraya Spahis for her expert technical assistance.

REFERENCES

- 1 Krauth C, Jalilvand N, Welte T, Busse R. Cystic fibrosis: cost of illness and considerations for the economic evaluation of potential therapies. *Pharmacoeconomics* 2003;21:1001-24.
- 2 Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 1992;256:774-9.
- 3 Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, . Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989;245:1059-65.
- 4 Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, . Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989;245:1066-73.
- 5 Linsdell P, Hanrahan JW. Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* 1998;275:C323-C326.
- 6 Gao L, Kim KJ, Yankaskas JR, Forman HJ. Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol* 1999;277:L113-L118.
- 7 Quinton PM. The neglected ion: HCO₃⁻. *Nat Med* 2001;7:292-3.
- 8 Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 2002;82:503-68.
- 9 Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005;352:1992-2001.

- 10 Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 2002;1:13-29.
- 11 Rowntree RK, Harris A. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet* 2003;67:471-85.
- 12 Adler AI, Shine BS, Chamnan P, Haworth CS, Bilton D. Genetic determinants and epidemiology of cystic fibrosis-related diabetes: results from a British cohort of children and adults. *Diabetes Care* 2008;31:1789-94.
- 13 Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, Tsui LC, Durie P. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med* 1990;323:1517-22.
- 14 Wang F, Zeltwanger S, Hu S, Hwang TC. Deletion of phenylalanine 508 causes attenuated phosphorylation-dependent activation of CFTR chloride channels. *J Physiol* 2000;524 Pt 3:637-48.
- 15 Dalemans W, Barbry P, Champigny G, Jallat S, Dott K, Dreyer D, Crystal RG, Pavirani A, Lecocq JP, Lazdunski M. Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature* 1991;354:526-8.
- 16 Lester LA, Kraut J, Lloyd-Still J, Karrison T, Mott C, Billstrand C, Lemke A, Ober C. Delta F508 genotype does not predict disease severity in an ethnically diverse cystic fibrosis population. *Pediatrics* 1994;93:114-8.

- 17 Bronsveld I, Mekus F, Bijman J, Ballmann M, de Jonge HR, Laabs U, Halley DJ, Ellemunter H, Mastella G, Thomas S, Veeze HJ, Tummler B. Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings. *J Clin Invest* 2001;108:1705-15.
- 18 Aron Y, Polla BS, Bienvenu T, Dall'ava J, Dusser D, Hubert D. HLA class II polymorphism in cystic fibrosis. A possible modifier of pulmonary phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1464-8.
- 19 Grasemann H, Knauer N, Buscher R, Hubner K, Drazen JM, Ratjen F. Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxide synthase gene. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2172-6.
- 20 Doring G, Krogh-Johansen H, Weidinger S, Hoiby N. Allotypes of alpha 1-antitrypsin in patients with cystic fibrosis, homozygous and heterozygous for deltaF508. *Pediatr Pulmonol* 1994;18:3-7.
- 21 Büscher R GH. Disease modifying genes in cystic fibrosis: therapeutic option or one-way road? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 65-77. 2006.
- 22 Conese M, Copreni E, Di Gioia S, De Rinaldis P, Fumarulo R. Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros* 2(3): 129-135. 2003.
- 23 Courtney JM, Dunbar KE, McDowell A, Moore JE, Warke TJ, Stevenson M, Elborn JS. Clinical outcome of *Burkholderia cepacia* complex infection in cystic fibrosis adults. *J Cyst Fibros* 2004;3:93-8.

- 24 Hayes D Jr. Obstructive sleep apnea syndrome: a potential cause of lower airway obstruction in cystic fibrosis. *Sleep Med.* 7(1), 73-75. 2006.
- 25 Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Garg ML. Increased plasma fatty acid concentrations after respiratory exacerbations are associated with elevated oxidative stress in cystic fibrosis patients. *Am J Clin Nutr* 2002;75:668-75.
- 26 Range SP, Dunster C, Knox AJ, Kelly FJ. Treatment of pulmonary exacerbations of cystic fibrosis leads to improved antioxidant status. *Eur Respir J* 1999;13:560-4.
- 27 McGrath LT, Mallon P, Dowey L, Silke B, McClean E, McDonnell M, Devine A, Copeland S, Elborn S. Oxidative stress during acute respiratory exacerbations in cystic fibrosis. *Thorax* 1999;54:518-23.
- 28 Brown RK, Wyatt H, Price JF, Kelly FJ. Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. *Eur Respir J* 1996;9:334-9.
- 29 Peretti N, Marcil V, Drouin E, Levy E. Mechanisms of lipid malabsorption in Cystic Fibrosis: the impact of essential fatty acids deficiency. *Nutr Metab (Lond)* 2005;2:11.
- 30 Roy CC, Weber AM, Lepage G, Smith L, Levy E. Digestive and absorptive phase anomalies associated with the exocrine pancreatic insufficiency of cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988;7 Suppl 1:S1-S7.
- 31 Welsh MJ, Fick RB. Cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1987;80:1523-6.
- 32 Lancellotti L, D'Orazio C, Mastella G, Mazzi G, Lippi U. Deficiency of vitamins E and A in cystic fibrosis is independent of pancreatic function and current enzyme and vitamin supplementation. *Eur J Pediatr* 1996;155:281-5.

- 33 Homnick DN, Cox JH, DeLoof MJ, Ringer TV. Carotenoid levels in normal children and in children with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1993;122:703-7.
- 34 Winklhofer-Roob BM, Ziouzenkova O, Puhl H, Ellemunter H, Greiner P, Muller G, van't Hof MA, Esterbauer H, Shmerling DH. Impaired resistance to oxidation of low density lipoprotein in cystic fibrosis: improvement during vitamin E supplementation. *Free Radic Biol Med* 1995;19:725-33.
- 35 Winklhofer-Roob BM. Antioxidant status in cystic fibrosis patients. *Am J Clin Nutr* 1996;63:138-9.
- 36 Levy E, Lepage G, Bendayan M, Ronco N, Thibault L, Galeano N, Smith L, Roy CC. Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *J Lipid Res* 1989;30:1197-209.
- 37 Pencharz PB, Durie PR. Nutritional management of cystic fibrosis. *Annu Rev Nutr* 1993;13:111-36.
- 38 van der Vliet A, Eiserich JP, Marelich GP, Halliwell B, Cross CE. Oxidative stress in cystic fibrosis: does it occur and does it matter? *Adv Pharmacol* 1997;38:491-513.
- 39 Brown RK, Kelly FJ. Role of free radicals in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Thorax* 1994;49:738-42.
- 40 Dominguez C, Gartner S, Linan S, Cobos N, Moreno A. Enhanced oxidative damage in cystic fibrosis patients. *Biofactors* 1998;8:149-53.

- 41 Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Collins CE, Garg ML. Oxidative stress in cystic fibrosis: dietary and metabolic factors. *J Am Coll Nutr* 2001;20:157-65.
- 42 Chelchowska M, Laskowska-Klita T, Nowaczewska I, Narolewska U. [Markers of oxidative damage in blood of children with cystic fibrosis]. *Pol Merkur Lekarski* 2002;13:123-5.
- 43 Paredi P, Kharitonov SA, Barnes PJ. Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:S31-S37.
- 44 Wood LG, Fitzgerald DA, Lee AK, Garg ML. Improved antioxidant and fatty acid status of patients with cystic fibrosis after antioxidant supplementation is linked to improved lung function. *Am J Clin Nutr* 2003;77:150-9.
- 45 Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattoni G, Corradi M, van RL, Geddes DM, Hodson ME, Barnes PJ. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* 2000;55:205-9.
- 46 Ciabattoni G, Davi G, Collura M, Iapichino L, Pardo F, Ganci A, Romagnoli R, Maclouf J, Patrono C. In vivo lipid peroxidation and platelet activation in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1195-201.
- 47 Back EI, Frindt C, Nohr D, Frank J, Ziebach R, Stern M, Ranke M, Biesalski HK. Antioxidant deficiency in cystic fibrosis: when is the right time to take action? *Am J Clin Nutr* 2004;80:374-84.

- 48 Ntimbane T, Krishnamoorthy P, Huot C, Legault L, Jacob SV, Brunet S, Levy E, Gueraud F, Lands LC, Comte B. Oxidative stress and cystic fibrosis-related diabetes: a pilot study in children. *J Cyst Fibros* 2008;7:373-84.
- 49 Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, Foschi M, Caligiuri A, Pinzani M, Surrenti C. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997;25:361-7.
- 50 Dodge JA, Lewis PA, Stanton M, Wilsher J. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947-2003. *Eur Respir J* 2007;29:522-6.
- 51 Costa M, Potvin S, Berthiaume Y, Gauthier L, Jeanneret A, Lavoie A, Levesque R, Chiasson J, Rabasa-Lhoret R. Diabetes: a major co-morbidity of cystic fibrosis. *Diabetes Metab* 2005;31:221-32.
- 52 Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003;361:681-9.
- 53 Schechter MS. Non-genetic influences on CF lung disease: the role of sociodemographic characteristics, environmental exposures and healthcare interventions. *Pediatr Pulmonol Suppl* 2004;26:82-5.
- 54 Fischman D, Nookala VK. Cystic fibrosis-related diabetes mellitus: etiology, evaluation, and management. *Endocr Pract* 2008;14:1169-79.
- 55 Moran A, Doherty L, Wang X, Thomas W. Abnormal glucose metabolism in cystic fibrosis. *J Pediatr* 1998;133:10-7.

- 56 Finkelstein SM, Wielinski CL, Elliott GR, Warwick WJ, Barbosa J, Wu SC, Klein DJ. Diabetes mellitus associated with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1988;112:373-7.
- 57 Schwarzenberg SJ, Thomas W, Olsen TW, Grover T, Walk D, Milla C, Moran A. Microvascular complications in cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:1056-61.
- 58 Cucinotta D, De Luca F, Scoglio R, Lombardo F, Sferlazzas C, Di Benedetto A, Magazzu G, Raimondo G, Arrigo T. Factors affecting diabetes mellitus onset in cystic fibrosis: evidence from a 10-year follow-up study. *Acta Paediatr* 1999;88:389-93.
- 59 Arrigo T, Cucinotta D, Conti NS, Di Cesare E, Di Benedetto A, Magazzu G, De Luca F. Longitudinal evaluation of glucose tolerance and insulin secretion in non-diabetic children and adolescents with cystic fibrosis: results of a two-year follow-up. *Acta Paediatr* 1993;82:249-53.
- 60 De Luca F, Arrigo T, Di Benedetto A, Tedeschi A, Sferlazzas C, Crisafulli G, Di Cesare E, Romano G, Magazzu G, Cucinotta D. Four-year follow-up of glucose tolerance and beta-cell function in nondiabetic cystic fibrosis patients. *Horm Res* 1995;44:45-50.
- 61 Lombardo F, De Luca F, Rosano M, Sferlazzas C, Lucanto C, Arrigo T, Messina MF, Crisafulli G, Wasniewska M, Valenzise M, Cucinotta D. Natural history of glucose tolerance, beta-cell function and peripheral insulin sensitivity in cystic fibrosis patients with fasting euglycemia. *Eur J Endocrinol* 2003;149:53-9.

- 62 Preumont V, Hermans MP, Lebecque P, Buyschaert M. Glucose homeostasis and genotype-phenotype interplay in cystic fibrosis patients with CFTR gene deltaF508 mutation. *Diabetes Care* 2007;30:1187-92.
- 63 Hardin DS, Moran A. Diabetes mellitus in cystic fibrosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999;28:787-800, ix.
- 64 Marshall BC, Butler SM, Stoddard M, Moran AM, Liou TG, Morgan WJ. Epidemiology of cystic fibrosis-related diabetes. *J Pediatr* 2005;146:681-7.
- 65 Moran A, Pyzdrowski KL, Weinreb J, Kahn BB, Smith SA, Adams KS, Seaquist ER. Insulin sensitivity in cystic fibrosis. *Diabetes* 1994;43:1020-6.
- 66 Moran A, Milla C. Abnormal glucose tolerance in cystic fibrosis: why should patients be screened? *J Pediatr* 2003;142:97-9.
- 67 Costa M, Potvin S, Hammana I, Malet A, Berthiaume Y, Jeanneret A, Lavoie A, Levesque R, Perrier J, Poisson D, Karelis AD, Chiasson JL, Rabasa-Lhoret R. Increased glucose excursion in cystic fibrosis and its association with a worse clinical status. *J Cyst Fibros* 2007;6:376-83.
- 68 The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1993;329:1308-13.
- 69 Hamdi I, Payne SJ, Barton DE, McMahon R, Green M, Shneerson JM, Hales CN. Genotype analysis in cystic fibrosis in relation to the occurrence of diabetes mellitus. *Clin Genet* 1993;43:186-9.

- 70 Rosenecker J, Eichler I, Kuhn L, Harms HK, von der Hardt H. Genetic determination of diabetes mellitus in patients with cystic fibrosis. Multicenter Cystic Fibrosis Study Group. *J Pediatr* 1995;127:441-3.
- 71 Lanng S, Thorsteinsson B, Erichsen G, Nerup J, Koch C. Glucose tolerance in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1991;66:612-6.
- 72 Cotellessa M, Minicucci L, Diana MC, Prigione F, Di Febbraro L, Gagliardini R, Manca A, Battistini F, Taccetti G, Magazzu G, Padoan R, Pizzamiglio G, Raia V, Iapichino L, Cardella F, Grinzich G, Lucidi V, Tuccio G, Bignamini E, Salvatore D, Lorini R. Phenotype/genotype correlation and cystic fibrosis related diabetes mellitus (Italian Multicenter Study). *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:1087-93.
- 73 Braun J, Arnemann J, Lohrey M, Donner H, Siegmund T, Usadel KH, Badenhoop K. No association between the deltaF508 cystic fibrosis mutation and type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999;107:568-9.
- 74 Poitout V, Tanaka Y, Reach G, Robertson RP. [Oxidative stress, insulin secretion, and insulin resistance]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu* 2001;75-86.
- 75 Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 2004;279:42351-4.
- 76 Kaneto H, Katakami N, Kawamori D, Miyatsuka T, Sakamoto K, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Yamasaki Y. Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:355-66.

- 77 Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000;101:451-4.
- 78 Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:411-21.
- 79 Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 2002;7:335-45.
- 80 Araki E, Oyadomari S, Mori M. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:1213-7.
- 81 Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 2000;10:524-30.
- 82 Harding HP, Zeng H, Zhang Y, Jungries R, Chung P, Plesken H, Sabatini DD, Ron D. Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* 2001;7:1153-63.
- 83 Oyadomari S, Takeda K, Takiguchi M, Gotoh T, Matsumoto M, Wada I, Akira S, Araki E, Mori M. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic beta cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10845-50.

- 84 Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989;245:1073-80.
- 85 Li M, McCann JD, Anderson MP, Clancy JP, Liedtke CM, Nairn AC, Greengard P, Welsh MJ. Regulation of chloride channels by protein kinase C in normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Science* 1989;244:1353-6.
- 86 Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* 1999;79:S23-S45.
- 87 Chang XB, Hou YX, Jensen TJ, Riordan JR. Mapping of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane topology by glycosylation site insertion. *J Biol Chem* 1994;269:18572-5.
- 88 Scanlin TF, Glick MC. Glycosylation and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Respir Res* 2001;2:276-9.
- 89 Scanlin TF, Glick MC. Terminal glycosylation in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1999;1455:241-53.
- 90 Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, Rommens J, Tsui LC. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* 1991;10:214-28.
- 91 Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, Smith AE, Welsh MJ. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 1991;253:202-5.

- 92 Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev* 1999;79:S145-S166.
- 93 Naruse S, Kitagawa M, Ishiguro H, Fujiki K, Hayakawa T. Cystic fibrosis and related diseases of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16:511-26.
- 94 Kogan I, Ramjeesingh M, Li C, Kidd JF, Wang Y, Leslie EM, Cole SP, Bear CE. CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J* 2003;22:1981-9.
- 95 Welsh MJ. *Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Scriver,CR (ed.) , 5121-5188. 2001.
- 96 Cystic Fibrosis Mutation Database. 2007.
- 97 Zielenski J, Tsui LC. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* 1995;29:777-807.
- 98 Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA, O'Riordan CR, Smith AE. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 1990;63:827-34.
- 99 Zhang F, Kartner N, Lukacs GL. Limited proteolysis as a probe for arrested conformational maturation of delta F508 CFTR. *Nat Struct Biol* 1998;5:180-3.
- 100 The Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Population variation of common cystic fibrosis mutations. *Hum Mutat* 1994;4:167-77.
- 101 Kopito RR. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev* 1999;79:S167-S173.

- 102 Rugolo M, Barzanti F, Gruenert DC, Hrelia S. Histamine activates phospholipase C in human airway epithelial cells via a phorbol ester-sensitive pathway. *Am J Physiol* 1996;271:L665-L671.
- 103 Pilewski JM, Frizzell RA. Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* 1999;79:S215-S255.
- 104 Stern RC. The diagnosis of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1997;336:487-91.
- 105 Davidson AG, Wong LT, Kirby LT, Applegarth DA. Immunoreactive trypsin in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1984;3 Suppl 1:S79-S88.
- 106 Lewis MJ, Lewis EH, Amos JA, Tsongalis GJ. Cystic fibrosis. *Am J Clin Pathol* 2003;120 Suppl:S3-13.
- 107 Engelhardt JF, Yankaskas JR, Ernst SA, Yang Y, Marino CR, Boucher RC, Cohn JA, Wilson JM. Submucosal glands are the predominant site of CFTR expression in the human bronchus. *Nat Genet* 1992;2:240-8.
- 108 Jacquot J, Puchelle E, Hinnrasky J, Fuchey C, Bettinger C, Spilmont C, Bonnet N, Dieterle A, Dreyer D, Pavirani A. Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway secretory glands. *Eur Respir J* 1993;6:169-76.
- 109 Hatta S, Sakamoto J, Horio Y. Ion channels and diseases. *Med Electron Microsc* 2002;35:117-26.
- 110 Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, Birrer P, Bellon G, Berger J, Weiss T, Botzenhart K, Yankaskas JR, Randell S, Boucher RC, Doring

- G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 2002;109:317-25.
- 111 Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 1997;88:553-60.
- 112 Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 2003;40:423-9.
- 113 Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hoiby N, Schwartz M, Koch C. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1999;104:431-7.
- 114 Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, Goldberg JB. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* 1996;271:64-7.
- 115 Krivan HC, Ginsburg V, Roberts DD. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2). *Arch Biochem Biophys* 1988;260:493-6.
- 116 Hoiby N, Koch C. Cystic fibrosis. 1. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and its management. *Thorax* 1990; 45:881-884.

- 117 Pedersen SS, Moller H, Espersen F, Sorensen CH, Jensen T, Hoiby N. Mucosal immunity to *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis. *APMIS* 1992;100:326-34.
- 118 Rahman I, Tomasi A. 2nd International Meeting on Free Radicals in Health and Disease. The role of oxidants and antioxidants in the regulation of chronic diseases, may 8-12, 2002, Istanbul, Turkey. *Free Radic Res* 2003;37:349-54.
- 119 Lands LC, Grey VL, Grenier C. Total plasma antioxidant capacity in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2000;29:81-7.
- 120 Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, Ghnaim H, Berger M. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:2111-8.
- 121 Nousia-Arvanitakis S. Cystic fibrosis and the pancreas: recent scientific advances. *J Clin Gastroenterol* 1999;29:138-42.
- 122 Marino CR, Matovcik LM, Gorelick FS, Cohn JA. Localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pancreas. *J Clin Invest* 1991;88:712-6.
- 123 Strong TV, Boehm K, Collins FS. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in the human gastrointestinal tract by in situ hybridization. *J Clin Invest* 1994;93:347-54.
- 124 Waters DL, Dorney SF, Gaskin KJ, Gruca MA, O'Halloran M, Wilcken B. Pancreatic function in infants identified as having cystic fibrosis in a neonatal screening program. *N Engl J Med* 1990;322:303-8.

- 125 Imrie JR, Fagan DG, Sturgess JM. Quantitative evaluation of the development of the exocrine pancreas in cystic fibrosis and control infants. *Am J Pathol* 1979;95:697-707.
- 126 Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, Durie P. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 1992;50:1178-84.
- 127 Freedman SD, Blanco P, Shea JC, Alvarez JG. Mechanisms to explain pancreatic dysfunction in cystic fibrosis. *Med Clin North Am* 2000;84:657-64.
- 128 Kopelman H, Durie P, Gaskin K, Weizman Z, Forstner G. Pancreatic fluid secretion and protein hyperconcentration in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1985;312:329-34.
- 129 Steward MC, Ishiguro H, Case RM. Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annu Rev Physiol* 2005;67:377-409.
- 130 Kopelman H, Corey M, Gaskin K, Durie P, Weizman Z, Forstner G. Impaired chloride secretion, as well as bicarbonate secretion, underlies the fluid secretory defect in the cystic fibrosis pancreas. *Gastroenterology* 1988;95:349-55.
- 131 Clarke SD, Jump DB. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu Rev Nutr* 1994;14:83-98.
- 132 Coste TC, Armand M, Lebacq J, Lebecque P, Wallemacq P, Leal T. An overview of monitoring and supplementation of omega 3 fatty acids in cystic fibrosis. *Clin Biochem* 2007;40:511-20.

- 133 Lepage G, Champagne J, Ronco N, Lamarre A, Osberg I, Sokol RJ, Roy CC. Supplementation with carotenoids corrects increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 1996;64:87-93.
- 134 Underwood BA, Denning CR, Navab M. Polyunsaturated fatty acids and tocopherol levels in patients with cystic fibrosis. *Ann N Y Acad Sci* 1972;203:237-47.
- 135 McEvoy FA. Letter: Essential fatty acids and cystic fibrosis. *Lancet* 1975;2:236.
- 136 Farrell PM, Bieri JG, Fratantoni JF, Wood RE, di Sant'Agnese PA. The occurrence and effects of human vitamin E deficiency. A study in patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* 1977;60:233-41.
- 137 Maqbool A, Schall JI, Garcia-Espana JF, Zemel BS, Strandvik B, Stallings VA. Serum linoleic acid status as a clinical indicator of essential fatty acid status in children with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;47:635-44.
- 138 Strandvik B, Gronowitz E, Enlund F, Martinsson T, Wahlstrom J. Essential fatty acid deficiency in relation to genotype in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 2001;139:650-5.
- 139 Kuo PT, Huang NN, Basset DR. The fatty acid composition of the serum chylomicrons and adipose tissue of children with cystic fibrosis of the pancreas. *J Pediatr* 1962;60:394-403.
- 140 Benabdeslam H, Garcia I, Bellon G, Gilly R, Revol A. Biochemical assessment of the nutritional status of cystic fibrosis patients treated with pancreatic enzyme extracts. *Am J Clin Nutr* 1998;67:912-8.

- 141 Roulet M, Frascarolo P, Rappaz I, Pilet M. Essential fatty acid deficiency in well nourished young cystic fibrosis patients. *Eur J Pediatr* 1997;156:952-956.
- 142 Bhura-Bandali FN, Suh M, Man SF, Clandinin MT. The deltaF508 mutation in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator alters control of essential fatty acid utilization in epithelial cells. *J Nutr* 2000;130:2870-5.
- 143 Carlstedt-Duke J, Bronnegard M, Strandvik B. Pathological regulation of arachidonic acid release in cystic fibrosis: the putative basic defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:9202-6.
- 144 Lloyd-Still JD, Johnson SB, Holman RT. Essential fatty acid status in cystic fibrosis and the effects of safflower oil supplementation. *Am J Clin Nutr* 1981;34:1-7.
- 145 Strandvik B, Svensson E, Seyberth HW. Prostanoid biosynthesis in patients with cystic fibrosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;55:419-25.
- 146 Freedman SD, Blanco PG, Zaman MM, Shea JC, Ollero M, Hopper IK, Weed DA, Gelrud A, Regan MM, Laposata M, Alvarez JG, O'Sullivan BP. Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N Engl J Med* 2004;350:560-9.
- 147 Portal BC, Richard MJ, Faure HS, Hadjian AJ, Favier AE. Altered antioxidant status and increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* 1995;61:843-7.
- 148 Rogiers V, Dab I, Michotte Y, Vercruyse A, Crokaert R, Vis HL. Abnormal fatty acid turnover in the phospholipids of the red blood cell membranes of cystic fibrosis patients (in vitro study). *Pediatr Res* 1984;18:704-9.

- 149 Gilljam H, Strandvik B, Ellin A, Wiman LG. Increased mole fraction of arachidonic acid in bronchial phospholipids in patients with cystic fibrosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1986;46:511-8.
- 150 Clandinin MT, Zuberbuhler P, Brown NE, Kielo ES, Goh YK. Fatty acid pool size in plasma lipoprotein fractions of cystic fibrosis patients. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1268-75.
- 151 Kang JX, Man SF, Brown NE, Labrecque PA, Clandinin MT. The chloride channel blocker anthracene 9-carboxylate inhibits fatty acid incorporation into phospholipid in cultured human airway epithelial cells. *Biochem J* 1992;285 (Pt 3):725-9.
- 152 Perez-Echarri N, Perez-Matute P, Marcos-Gomez B, Baena MJ, Marti A, Martinez JA, Moreno-Aliaga MJ. Differential inflammatory status in rats susceptible or resistant to diet-induced obesity: effects of EPA ethyl ester treatment. *Eur J Nutr* 2008;47:380-6.
- 153 Romieu I, Garcia-Esteban R, Sunyer J, Rios C, Alcaraz-Zubeldia M, Velasco SR, Holguin F. The effect of supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids on markers of oxidative stress in elderly exposed to PM(2.5). *Environ Health Perspect* 2008;116:1237-42.
- 154 Kang JX, Weylandt KH. Modulation of inflammatory cytokines by omega-3 Fatty acids. *Subcell Biochem* 2008;49:133-43.
- 155 Leaf A, Weber PC. Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *N Engl J Med* 1988;318:549-57.

- 156 Goodnight SH, Jr., Harris WS, Connor WE, Illingworth DR. Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia, and thrombosis. *Arteriosclerosis* 1982;2:87-113.
- 157 Konstan MW BM. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* 24, 137-142. 1997.
- 158 Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1075-82.
- 159 Armstrong DS, Grimwood K, Carzino R, Carlin JB, Olinsky A, Phelan PD. Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ* 1995;310:1571-2.
- 160 Raia V, Maiuri L, de Ritis G, de Vizia B, Vacca L, Conte R, Auricchio S, Londei M. Evidence of chronic inflammation in morphologically normal small intestine of cystic fibrosis patients. *Pediatr Res* 2000;47:344-50.
- 161 Murakami M, Kudo I, Inoue K. Molecular nature of phospholipases A2 involved in prostaglandin I2 synthesis in human umbilical vein endothelial cells. Possible participation of cytosolic and extracellular type II phospholipases A2. *J Biol Chem* 1993;268:839-44.
- 162 Levistre R, Lemnaouar M, Rybkine T, Bereziat G, Masliah J. Increase of bradykinin-stimulated arachidonic acid release in a delta F508 cystic fibrosis epithelial cell line. *Biochim Biophys Acta* 1993;1181:233-9.

- 163 Miele L, Cordella-Miele E, Xing M, Frizzell R, Mukherjee AB. Cystic fibrosis gene mutation (deltaF508) is associated with an intrinsic abnormality in Ca²⁺-induced arachidonic acid release by epithelial cells. *DNA Cell Biol* 1997;16:749-59.
- 164 Chase HP, Dupont J. Abnormal levels of prostaglandins and fatty acids in blood of children with cystic fibrosis. *Lancet* 1978;2:236-8.
- 165 Rigas B, Korenberg JR, Merrill WW, Levine L. Prostaglandins E₂ and E₂ alpha are elevated in saliva of cystic fibrosis patients. *Am J Gastroenterol* 1989;84:1408-12.
- 166 Carpagnano GE, Barnes PJ, Geddes DM, Hodson ME, Kharitonov SA. Increased leukotriene B₄ and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1109-12.
- 167 Greally P, Hussein MJ, Cook AJ, Sampson AP, Piper PJ, Price JF. Sputum tumour necrosis factor-alpha and leukotriene concentrations in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1993;68:389-92.
- 168 Harper TB, Chase HP, Henson J, Henson PM. Essential fatty acid deficiency in the rabbit as a model of nutritional impairment in cystic fibrosis. In vitro and in vivo effects on lung defense mechanisms. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:540-7.
- 169 Wood LG, Gibson PG, Garg ML. Circulating markers to assess nutritional therapy in cystic fibrosis. *Clin Chim Acta* 2005;353:13-29.
- 170 Kurlandsky LE, Bennink MR, Webb PM, Ulrich PJ, Baer LJ. The absorption and effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids on serum leukotriene B₄ in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1994;18:211-7.

- 171 Lawrence RH, Sorrell TC. Eicosapentaenoic acid modulates neutrophil leukotriene B4 receptor expression in cystic fibrosis. *Clin Exp Immunol* 1994;98:12-6.
- 172 Dolan TF Jr. Microangiopathy in a young adult with cystic fibrosis and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1986;314:991-2.
- 173 Lannig S, Thorsteinsson B, Lund-Andersen C, Nerup J, Schiøtz PO, Koch C. Diabetes mellitus in Danish cystic fibrosis patients: prevalence and late diabetic complications. *Acta Paediatr* 1994;83:72-7.
- 174 Sullivan MM, Denning CR. Diabetic microangiopathy in patients with cystic fibrosis. *Pediatrics* 1989;84:642-7.
- 175 Allen JL. Progressive nephropathy in a patient with cystic fibrosis and diabetes. *N Engl J Med* 1986;315:764.
- 176 Koch C, Cuppens H, Rainisio M, Madessani U, Harms H, Hodson M, Mastella G, Navarro J, Strandvik B, McKenzie S. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patients with different classes of mutations. *Pediatr Pulmonol* 2001;31:1-12.
- 177 Lannig S, Hansen A, Thorsteinsson B, Nerup J, Koch C. Glucose tolerance in patients with cystic fibrosis: five year prospective study. *BMJ* 1995;311:655-9.
- 178 Culler FL, McKean LP, Buchanan CN, Caplan DB, Meacham LR. Glipizide treatment of patients with cystic fibrosis and impaired glucose tolerance. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994;18:375-8.

- 179 Moran A, Hardin D, Rodman D, Allen HF, Beall RJ, Borowitz D, Brunzell C, Campbell PW, III, Chesrown SE, Duchow C, Fink RJ, Fitzsimmons SC, Hamilton N, Hirsch I, Howenstine MS, Klein DJ, Madhun Z, Pencharz PB, Quittner AL, Robbins MK, Schindler T, Schissel K, Schwarzenberg SJ, Stallings VA, Zipf WB. Diagnosis, screening and management of cystic fibrosis related diabetes mellitus: a consensus conference report. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45:61-73.
- 180 Rodman HM, Doershuk CF, Roland JM. The interaction of 2 diseases: diabetes mellitus and cystic fibrosis. *Medicine (Baltimore)* 1986;65:389-97.
- 181 Moran A. Cystic fibrosis-related diabetes: an approach to diagnosis and management. *Pediatr Diabetes* 1, 41-48. 2000.
- 182 Rolon MA, Benali K, Munck A, Navarro J, Clement A, Tubiana-Rufi N, Czernichow P, Polak M. Cystic fibrosis-related diabetes mellitus: clinical impact of prediabetes and effects of insulin therapy. *Acta Paediatr* 2001;90:860-7.
- 183 Polychronakos C. Early onset diabetes mellitus. Tip or iceberg? *Pediatr Diabetes* 2004;5:171-3.
- 184 Boom A, Lybaert P, Pollet JF, Jacobs P, Jijakli H, Golstein PE, Sener A, Malaisse WJ, Beauwens R. Expression and localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the rat endocrine pancreas. *Endocrine* 2007;32:197-205.
- 185 Iannucci A, Mukai K, Johnson D, Burke B. Endocrine pancreas in cystic fibrosis: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1984;15:278-84.

- 186 Kopito LE, Shwachman H. The pancreas in cystic fibrosis: chemical composition and comparative morphology. *Pediatr Res* 1976;10:742-9.
- 187 Moran A, Diem P, Klein DJ, Levitt MD, Robertson RP. Pancreatic endocrine function in cystic fibrosis. *J Pediatr* 1991;118:715-23.
- 188 Couce M, O'Brien TD, Moran A, Roche PC, Butler PC. Diabetes mellitus in cystic fibrosis is characterized by islet amyloidosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1267-72.
- 189 Hayden MR. Islet amyloid, metabolic syndrome, and the natural progressive history of type 2 diabetes mellitus. *JOP* 2002;3:126-38.
- 190 Brennan AL, Geddes DM, Gyi KM, Baker EH. Clinical importance of cystic fibrosis-related diabetes. *J Cyst Fibros* 2004;3:209-22.
- 191 Janson J, Ashley RH, Harrison D, McIntyre S, Butler PC. The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes* 1999;48:491-8.
- 192 Handwerger S, Roth J, Gorden P, Di Sant' AP, Carpenter DF, Peter G. Glucose intolerance in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1969;281:451-61.
- 193 Moran A, Phillips J, Milla C. Insulin and glucose excursion following premeal insulin lispro or repaglinide in cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes Care* 2001;24:1706-10.

- 194 Mohan V, Alagappan V, Snehalatha C, Ramachandran A, Thiruvengadam KV, Viswanathan M. Insulin and C-peptide responses to glucose load in cystic fibrosis. *Diabete Metab* 1985;11:376-9.
- 195 Nousia-Arvanitakis S, Tomita T, Desai N, Kimmel JR. Pancreatic polypeptide in cystic fibrosis. *Arch Pathol Lab Med* 1985;109:722-6.
- 196 Lanng S. Glucose intolerance in cystic fibrosis patients. *Paediatr Respir Rev* 2001;2:253-9.
- 197 Austin A, Kalhan SC, Orenstein D, Nixon P, Arslanian S. Roles of insulin resistance and beta-cell dysfunction in the pathogenesis of glucose intolerance in cystic fibrosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:80-5.
- 198 Lippe BM, Sperling MA, Dooley RR. Pancreatic alpha and beta cell functions in cystic fibrosis. *J Pediatr* 1977;90:751-5.
- 199 Cucinotta D, De Luca F, Gigante A, Arrigo T, Di Benedetto A, Tedeschi A, Lombardo F, Romano G, Sferlazzas C. No changes of insulin sensitivity in cystic fibrosis patients with different degrees of glucose tolerance: an epidemiological and longitudinal study. *Eur J Endocrinol* 1994;130:253-8.
- 200 Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4854-8.

- 201 Hardin DS, Ahn C, Rice J, Rice M, Rosenblatt R. Elevated gluconeogenesis and lack of suppression by insulin contribute to cystic fibrosis-related diabetes. *J Investig Med* 2008;56:567-73.
- 202 Lannig S, Thorsteinsson B, Roder ME, Nerup J, Koch C. Insulin sensitivity and insulin clearance in cystic fibrosis patients with normal and diabetic glucose tolerance. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994;41:217-23.
- 203 Ahmad T, Nelson R, Taylor R. Insulin sensitivity and metabolic clearance rate of insulin in cystic fibrosis. *Metabolism* 1994;43:163-7.
- 204 Lannig S, Thorsteinsson B, Nerup J, Koch C. Influence of the development of diabetes mellitus on clinical status in patients with cystic fibrosis. *Eur J Pediatr* 1992;151:684-7.
- 205 Sims EJ, Green MW, Mehta A. Decreased lung function in female but not male subjects with established cystic fibrosis-related diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:1581-7.
- 206 Milla CE, Warwick WJ, Moran A. Trends in pulmonary function in patients with cystic fibrosis correlate with the degree of glucose intolerance at baseline. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:891-5.
- 207 Milla CE, Billings J, Moran A. Diabetes is associated with dramatically decreased survival in female but not male subjects with cystic fibrosis. *Diabetes Care* 2005;28:2141-4.

- 208 Hsia CC, Raskin P. The diabetic lung: relevance of alveolar microangiopathy for the use of inhaled insulin. *Am J Med* 2005;118:205-11.
- 209 Schoni MH, Casaulta-Aebischer C. Nutrition and lung function in cystic fibrosis patients: review. *Clin Nutr* 2000;19:79-85.
- 210 Nousia-Arvanitakis S, Galli-Tsinopoulou A, Karamouzis M. Insulin improves clinical status of patients with cystic-fibrosis-related diabetes mellitus. *Acta Paediatr* 2001;90:515-9.
- 211 White H, Pollard K, Etherington C, Clifton I, Morton AM, Owen D, Conway SP, Peckham DG. Nutritional decline in cystic fibrosis related diabetes: The effect of intensive nutritional intervention. *J Cyst Fibros* 2009.
- 212 Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994;344:721-4.
- 213 Allen RG, Balin AK. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 1989;6:631-61.
- 214 Allen RG, Newton RK, Sohal RS, Shipley GL, Nations C. Alterations in superoxide dismutase, glutathione, and peroxides in the plasmodial slime mold *Physarum polycephalum* during differentiation. *J Cell Physiol* 1985;125:413-9.
- 215 Beckman BS, Balin AK, Allen RG. Superoxide dismutase induces differentiation of Friend erythroleukemia cells. *J Cell Physiol* 1989;139:370-6.

- 216 Witztum JL. Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart J* 1993;69:S12-S18.
- 217 Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996;20:707-27.
- 218 Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000;49:3-8.
- 219 Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.
- 220 Benedetti A, Casini AF, Ferrali M, Comporti M. Effects of diffusible products of peroxidation of rat liver microsomal lipids. *Biochem J* 1979;180:303-12.
- 221 Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta* 1980;620:281-96.
- 222 Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem* 1999;274:2234-42.
- 223 Parola M, Robino G, Dianzani MU. 4-hydroxy-2,3-alkenals as molecular mediators of oxidative stress in the pathogenesis of liver fibrosis (review). *Int J Mol Med* 1999;4:425-32.

- 224 Okada K, Wangpoengtrakul C, Osawa T, Toyokuni S, Tanaka K, Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. Identification of proteasomes as target molecules. *J Biol Chem* 1999;274:23787-93.
- 225 Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem* 1999;274:24441-4.
- 226 Reilly M, Delanty N, Lawson JA, FitzGerald GA. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 1996;94:19-25.
- 227 Pratico D, Basili S, Vieri M, Cordova C, Violi F, FitzGerald GA. Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F₂α-III, an index of oxidant stress. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:1709-14.
- 228 Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 1997;36:1-21.
- 229 Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1991;266:2005-8.
- 230 Spear N, Aust SD. Hydroxylation of deoxyguanosine in DNA by copper and thiols. *Arch Biochem Biophys* 1995;317:142-8.
- 231 Hall DB, Holmlin RE, Barton JK. Oxidative DNA damage through long-range electron transfer. *Nature* 1996;382:731-5.

- 232 Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 1991;281:9-19.
- 233 Halliwell B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr* 2000;72:1082-7.
- 234 Shen H, Ong C. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Radic Biol Med* 2000;28:529-36.
- 235 Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 2000;267:4928-44.
- 236 Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995;41:1819-28.
- 237 McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;244:6049-55.
- 238 Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1974;41:35-97.
- 239 Kelly FJ. Glutathione: in defence of the lung. *Food Chem Toxicol* 1999;37:963-6.
- 240 Sen CK. Oxidants and antioxidants in exercise. *J Appl Physiol* 1995;79:675-86.
- 241 Burton GW, Joyce A, Ingold KU. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 1982;2:327.
- 242 Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L1005-L1028.

- 243 Sun Y, Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med* 1996;21:335-48.
- 244 Brigelius-Flohe R, Friedrichs B, Maurer S, Schultz M, Streicher R. Interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation is inhibited by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in a human endothelial cell line. *Biochem J* 1997;328 (Pt 1):199-203.
- 245 Leonarduzzi G, Robbesyn F, Poli G. Signaling kinases modulated by 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1694-702.
- 246 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001;410:37-40.
- 247 Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol* 2007;583:9-24.
- 248 Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001;81:807-69.
- 249 Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.

- 250 Tomko RJ Jr., Bansal P, Lazo JS. Airing out an antioxidant role for the tumor suppressor p53. *Mol Interv* 2006;6:23-5, 2.
- 251 Sun Z, Andersson R. NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock* 2002;18:99-106.
- 252 Sonnenberg GE, Krakower GR, Kissebah AH. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. *Obes Res* 2004;12:180-6.
- 253 Collins T. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 1993;68:499-508.
- 254 Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 2000;28:463-99.
- 255 Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z, Crystal RG. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 1993;75:2419-24.
- 256 Hudson VM. Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. *Free Radic Biol Med* 2001;30:1440-61.
- 257 Thanislass J, Raveendran M, Devaraj H. Buthionine sulfoximine-induced glutathione depletion. Its effect on antioxidants, lipid peroxidation and calcium homeostasis in the lung. *Biochem Pharmacol* 1995;50:229-34.
- 258 Mangione S, Patel DD, Levin BR, Fiel SB. Erythrocytic glutathione in cystic fibrosis. A possible marker of pulmonary dysfunction. *Chest* 1994;105:1470-3.

- 259 Lands LC, Grey V, Smountas AA, Kramer VG, McKenna D. Lymphocyte glutathione levels in children with cystic fibrosis. *Chest* 1999;116:201-5.
- 260 Starosta V, Rietschel E, Paul K, Baumann U, Griese M. Oxidative changes of bronchoalveolar proteins in cystic fibrosis. *Chest* 2006;129:431-7.
- 261 Montuschi P, Barnes PJ. Analysis of exhaled breath condensate for monitoring airway inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:232-7.
- 262 Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1693-722.
- 263 Ho LP, Innes JA, Greening AP. Nitrite levels in breath condensate of patients with cystic fibrosis is elevated in contrast to exhaled nitric oxide. *Thorax* 1998;53:680-4.
- 264 Cunningham S, McColm JR, Ho LP, Greening AP, Marshall TG. Measurement of inflammatory markers in the breath condensate of children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 2000;15:955-7.
- 265 Benabdeslam H, Abidi H, Garcia I, Bellon G, Gilly R, Revol A. Lipid peroxidation and antioxidant defenses in cystic fibrosis patients. *Clin Chem Lab Med* 1999;37:511-6.
- 266 Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000;49:1939-45.

- 267 Brownlee M, Cerami A. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem* 1981;50:385-432.
- 268 Brownlee M. Negative consequences of glycation. *Metabolism* 2000;49:9-13.
- 269 Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J* 1987;245:243-50.
- 270 Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 1991;10:339-52.
- 271 Wojtczak L, Schonfeld P. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1993;1183:41-57.
- 272 Carlsson C, Borg LA, Welsh N. Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology* 1999;140:3422-8.
- 273 Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzman M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem* 2001;276:25096-100.
- 274 Rao MS, Reddy JK. Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001;21:43-55.
- 275 Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003;52:1-8.

- 276 Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2006;116:1802-12.
- 277 Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, Legros F, Louis H, Le MO, Deviere J. N-acetylcysteine decreases severity of acute pancreatitis in mice. *Pancreas* 2000;20:161-9.
- 278 Ho E, Chen G, Bray TM. Supplementation of N-acetylcysteine inhibits NFkappaB activation and protects against alloxan-induced diabetes in CD-1 mice. *FASEB J* 1999;13:1845-54.
- 279 Vijayalingam S, Parthiban A, Shanmugasundaram KR, Mohan V. Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* 1996;13:715-9.
- 280 Ciuchi E, Odetti P, Prando R. The effect of acute glutathione treatment on sorbitol level in erythrocytes from diabetic patients. *Diabetes Metab* 1997;23:58-60.
- 281 Ankrah NA, Appiah-Opong R. Toxicity of low levels of methylglyoxal: depletion of blood glutathione and adverse effect on glucose tolerance in mice. *Toxicol Lett* 1999;109:61-7.
- 282 Dominguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 1998;21:1736-42.
- 283 Meglasson MD, Matschinsky FM. Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabetes Metab Rev* 1986;2:163-214.

- 284 Malaisse WJ. Physiology, pathology and pharmacology of insulin secretion: recent acquisitions. *Diabetes Metab* 1997;23 Suppl 3:6-15.
- 285 Maechler P, Jornot L, Wollheim CB. Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 1999;274:27905-13.
- 286 Kruman I, Guo Q, Mattson MP. Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* 1998;51:293-308.
- 287 Morgan D, Oliveira-Emilio HR, Keane D, Hirata AE, Santos da RM, Bordin S, Curi R, Newsholme P, Carpinelli AR. Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia* 2007;50:359-69.
- 288 Nolan CJ, Madiraju MS, Ghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M. Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* 2006;55 Suppl 2:S16-S23.
- 289 Miwa I, Ichimura N, Sugiura M, Hamada Y, Taniguchi S. Inhibition of glucose-induced insulin secretion by 4-hydroxy-2-nonenal and other lipid peroxidation products. *Endocrinology* 2000;141:2767-72.
- 290 Antigny F, Norez C, Becq F, Vandebrouck C. Calcium homeostasis is abnormal in cystic fibrosis airway epithelial cells but is normalized after rescue of F508del-CFTR. *Cell Calcium* 2008;43:175-83.

- 291 Levy J, Gavin JR, III, Sowers JR. Diabetes mellitus: a disease of abnormal cellular calcium metabolism? *Am J Med* 1994;96:260-73.
- 292 Wang J, Takeuchi T, Tanaka S, Kubo SK, Kayo T, Lu D, Takata K, Koizumi A, Izumi T. A mutation in the insulin 2 gene induces diabetes with severe pancreatic beta-cell dysfunction in the Mody mouse. *J Clin Invest* 1999;103:27-37.
- 293 Darville MI, Eizirik DL. Regulation by cytokines of the inducible nitric oxide synthase promoter in insulin-producing cells. *Diabetologia* 1998;41:1101-8.
- 294 Kutlu B, Cardozo AK, Darville MI, Kruhoffer M, Magnusson N, Orntoft T, Eizirik DL. Discovery of gene networks regulating cytokine-induced dysfunction and apoptosis in insulin-producing INS-1 cells. *Diabetes* 2003;52:2701-19.
- 295 Borge PD, Moibi J, Greene SR, Trucco M, Young RA, Gao Z, Wolf BA. Insulin receptor signaling and sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase in beta-cells. *Diabetes* 2002;51 Suppl 3:S427-S433.
- 296 Newgard CB, McGarry JD. Metabolic coupling factors in pancreatic beta-cell signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1995;64:689-719.
- 297 Wolf BA, Colca JR, Turk J, Florholmen J, McDaniel ML. Regulation of Ca²⁺ homeostasis by islet endoplasmic reticulum and its role in insulin secretion. *Am J Physiol* 1988;254:E121-E136.
- 298 Henquin JC, Jonas JC, Gilon P. Functional significance of Ca²⁺ oscillations in pancreatic beta cells. *Diabetes Metab* 1998;24:30-6.

- 299 Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia* 2001;44:2115-33.
- 300 Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia* 2004;47:170-84.
- 301 Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;115:1111-9.
- 302 Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 2000;275:9047-54.
- 303 Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 2002;277:1531-7.
- 304 Hardin DS, Leblanc A, Marshall G, Seilheimer DK. Mechanisms of insulin resistance in cystic fibrosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E1022-E1028.
- 305 Dooghe C, Grizard G, Labbe A, Grigorescu F, Dardevet D, Grizard J. Decrease in insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) binding to erythrocytes from patients with cystic fibrosis. *Diabetes Metab* 1997;23:511-8.
- 306 Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002;23:599-622.

- 307 Tirosh A, Potashnik R, Bashan N, Rudich A. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem* 1999;274:10595-602.
- 308 Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* 2005;7:1040-52.
- 309 Ionescu AA, Nixon LS, Luzio S, Lewis-Jenkins V, Evans WD, Stone MD, Owens DR, Routledge PA, Shale DJ. Pulmonary function, body composition, and protein catabolism in adults with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:495-500.
- 310 Gurwitz D, Corey M, Francis PW, Crozier D, Levison H. Perspectives in cystic fibrosis. *Pediatr Clin North Am* 1979;26:603-15.
- 311 Luder E, Kattan M, Thornton JC, Koehler KM, Bonforte RJ. Efficacy of a nonrestricted fat diet in patients with cystic fibrosis. *Am J Dis Child* 1989;143:458-64.
- 312 Shepherd RW, Holt TL, Thomas BJ, Kay L, Isles A, Francis PJ, Ward LC. Nutritional rehabilitation in cystic fibrosis: controlled studies of effects on nutritional growth retardation, body protein turnover, and course of pulmonary disease. *J Pediatr* 1986;109:788-94.
- 313 Spicher V, Roulet M, Schutz Y. Assessment of total energy expenditure in free-living patients with cystic fibrosis. *J Pediatr* 1991;118:865-72.

- 314 Dodge JA. Nutritional requirements in cystic fibrosis: a review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988;7 Suppl 1:S8-11.
- 315 Ramsey BW, Farrell PM, Pencharz P. Nutritional assessment and management in cystic fibrosis: a consensus report. The Consensus Committee. *Am J Clin Nutr* 1992;55:108-16.
- 316 Borowitz DS, Grand RJ, Durie PR. Use of pancreatic enzyme supplements for patients with cystic fibrosis in the context of fibrosing colonopathy. Consensus Committee. *J Pediatr* 1995;127:681-4.
- 317 Mischler EH, Parrell SW, Farrell PM, Raynor WJ, Lemen RJ. Correction of linoleic acid deficiency in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 1986;20:36-41.
- 318 Gibson RA, Teubner JK, Haines K, Cooper DM, Davidson GP. Relationships between pulmonary function and plasma fatty acid levels in cystic fibrosis patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986;5:408-15.
- 319 Lawrence R, Sorrell T. Eicosapentaenoic acid in cystic fibrosis: evidence of a pathogenetic role for leukotriene B₄. *Lancet* 1993;342:465-9.
- 320 Garg ML, Sebokova E, Thomson AB, Clandinin MT. Delta 6-desaturase activity in liver microsomes of rats fed diets enriched with cholesterol and/or omega 3 fatty acids. *Biochem J* 1988;249:351-6.
- 321 Archer SL. Fish oil as a therapy for lung disease. *Nutrition* 1996;12:372-4.

- 322 Rust P, Eichler I, Renner S, Elmadfa I. Effects of long-term oral beta-carotene supplementation on lipid peroxidation in patients with cystic fibrosis. *Int J Vitam Nutr Res* 1998;68:83-7.
- 323 Velsor LW, van HA, Day BJ. Antioxidant imbalance in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L31-L38.
- 324 Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol* 1999;277:L1067-L1088.
- 325 Rahman I, Skwarska E, Henry M, Davis M, O'Connor CM, FitzGerald MX, Greening A, MacNee W. Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med* 1999;27:60-8.
- 326 Moss M, Guidot DM, Wong-Lambertina M, Ten HT, Perez RL, Brown LA. The effects of chronic alcohol abuse on pulmonary glutathione homeostasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:414-9.
- 327 Bishop C, Hudson VM, Hilton SC, Wilde C. A pilot study of the effect of inhaled buffered reduced glutathione on the clinical status of patients with cystic fibrosis. *Chest* 2005;127:308-17.
- 328 Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:3071-6.

- 329 Robinson MK, Rodrick ML, Jacobs DO, Rounds JD, Collins KH, Saporoschetz IB, Mannick JA, Wilmore DW. Glutathione depletion in rats impairs T-cell and macrophage immune function. *Arch Surg* 1993;128:29-34.
- 330 Roum JH, Borok Z, McElvaney NG, Grimes GJ, Bokser AD, Buhl R, Crystal RG. Glutathione aerosol suppresses lung epithelial surface inflammatory cell-derived oxidants in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 1999;87:438-43.
- 331 Griese M, Ramakers J, Krasselt A, Starosta V, Van Koningsbruggen S, Fischer R, Ratjen F, Mullinger B, Huber RM, Maier K, Rietschel E, Scheuch G. Improvement of alveolar glutathione and lung function but not oxidative state in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:822-8.
- 332 Collins CE, Quaggiotto P, Wood L, O'Loughlin EV, Henry RL, Garg ML. Elevated plasma levels of F2 alpha isoprostane in cystic fibrosis. *Lipids* 1999;34:551-6.
- 333 Hull J, Vervaart P, Grimwood K, Phelan P. Pulmonary oxidative stress response in young children with cystic fibrosis. *Thorax* 1997;52:557-60.
- 334 Wilson DO, Rogers RM, Hoffman RM. Nutrition and chronic lung disease. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:1347-65.

ACKNOWLEDGMENTS

The current work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP#82714) and Canadian Cystic Fibrosis Foundation. The authors thank Ms Schohraya Spahis for her expert technical assistance.

Figure and Table Legends

- Figure 1** CFTR structure and mutation categories
- The six classes of mutations frequently found on the *CFTR* gene that are involved in the absence or altered expression of the CFTR protein responsible of the cystic fibrosis pathology.
- Figure 2** CFTR dysfunction and inflammation in activated stress-sensitive pathways
- A decrease in both GSH and GSH/GSSG ratio, even in the absence of infection, leads to the activation of the transcription factor NF- κ B with a cascade of proinflammatory cytokines as IL-1 β and TNF- α . Altered CFTR function and increased oxidative stress events occurring in the CF pathology can further affect the glutathione homeostasis and induce cell death by sustained activation of stress-sensitive pathways.
- Figure 3** Hypothesis of oxidative and ER stresses-induced β -cells death
- Calcium homeostasis is important for the β -cell function as it is involved in the folding of insulin protein as well as the exocytosis mechanism of insulin granules in presence of glucose molecules. Oxidative stress and inflammatory events can both alter calcium homeostasis by inhibiting the protein SERCA which ensure the entry of calcium in the endoplasmic reticulum (ER) for insulin folding and

release. The accumulation of misfolded protein in the ER will lead to ER stress involved in apoptosis and death of β -cells

Figure 4

Possible links between CFTR dysfunction, oxidative stress and the occurrence of CFRD in CF

The multiorgans dysfunction of the CFTR protein is directly associated to an increase of oxidative stress which can alter glucose tolerance by reducing insulin secretion or inhibiting its signalling pathways then leading to CFRD

Table

Oxidative stress biomarkers and major antioxidants assessed in various compartments in CF

Figure 1

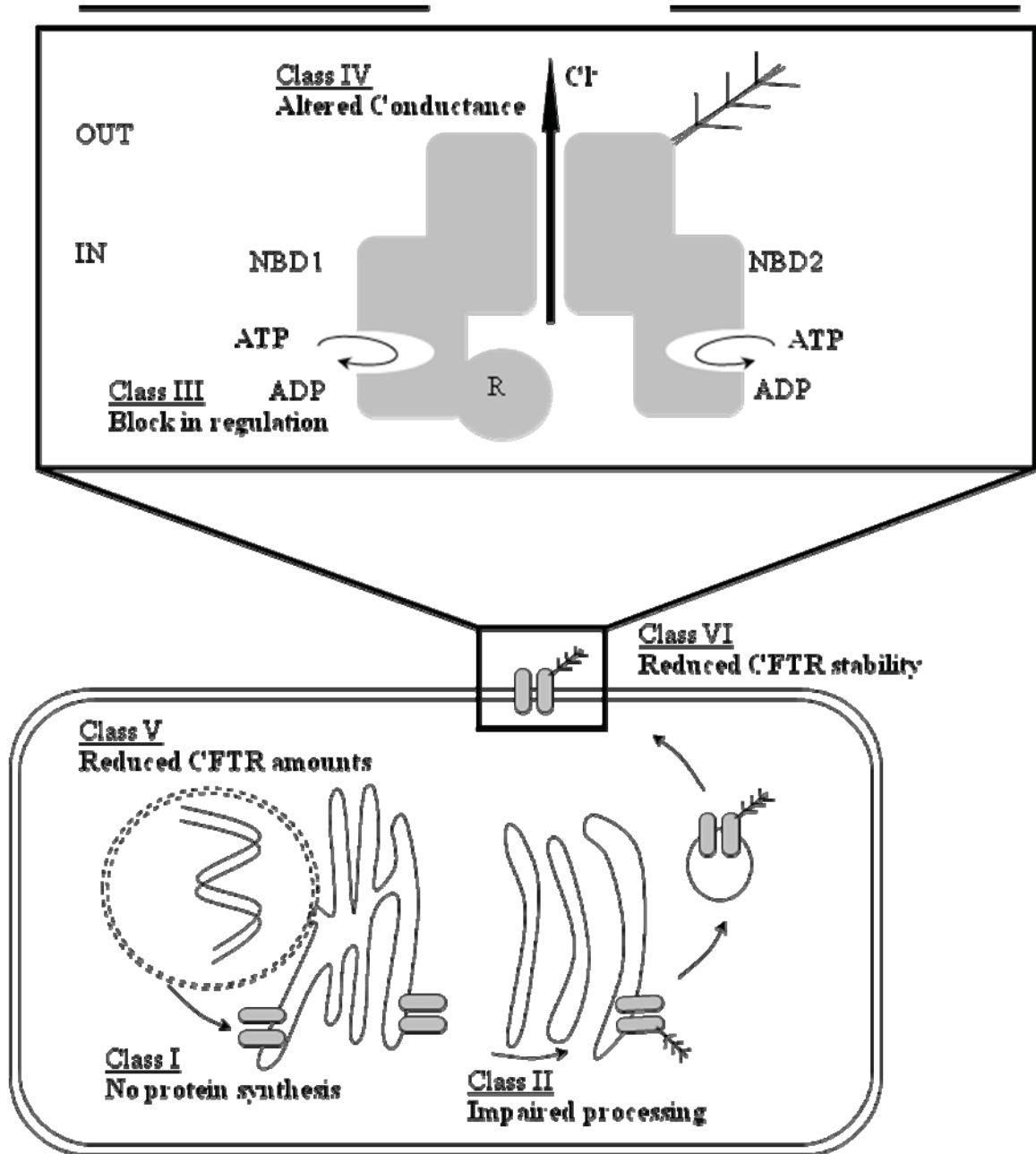


Figure 2

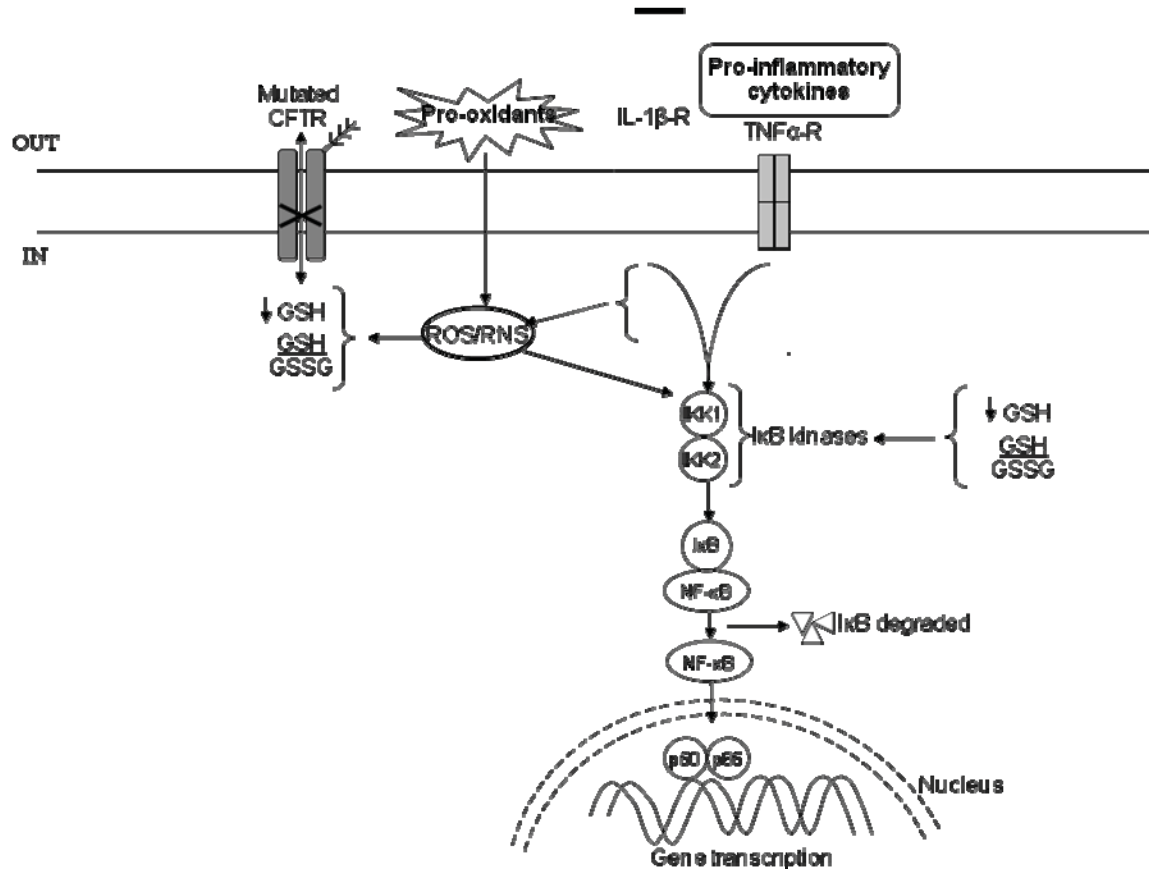


Figure 3

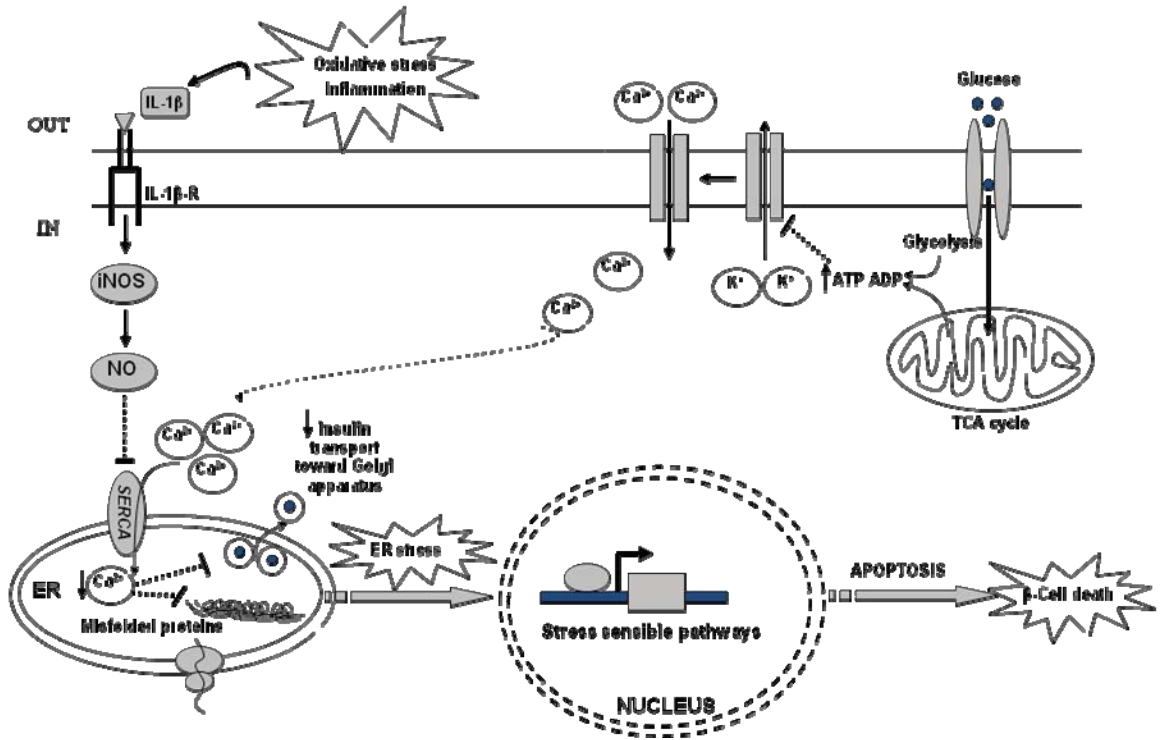
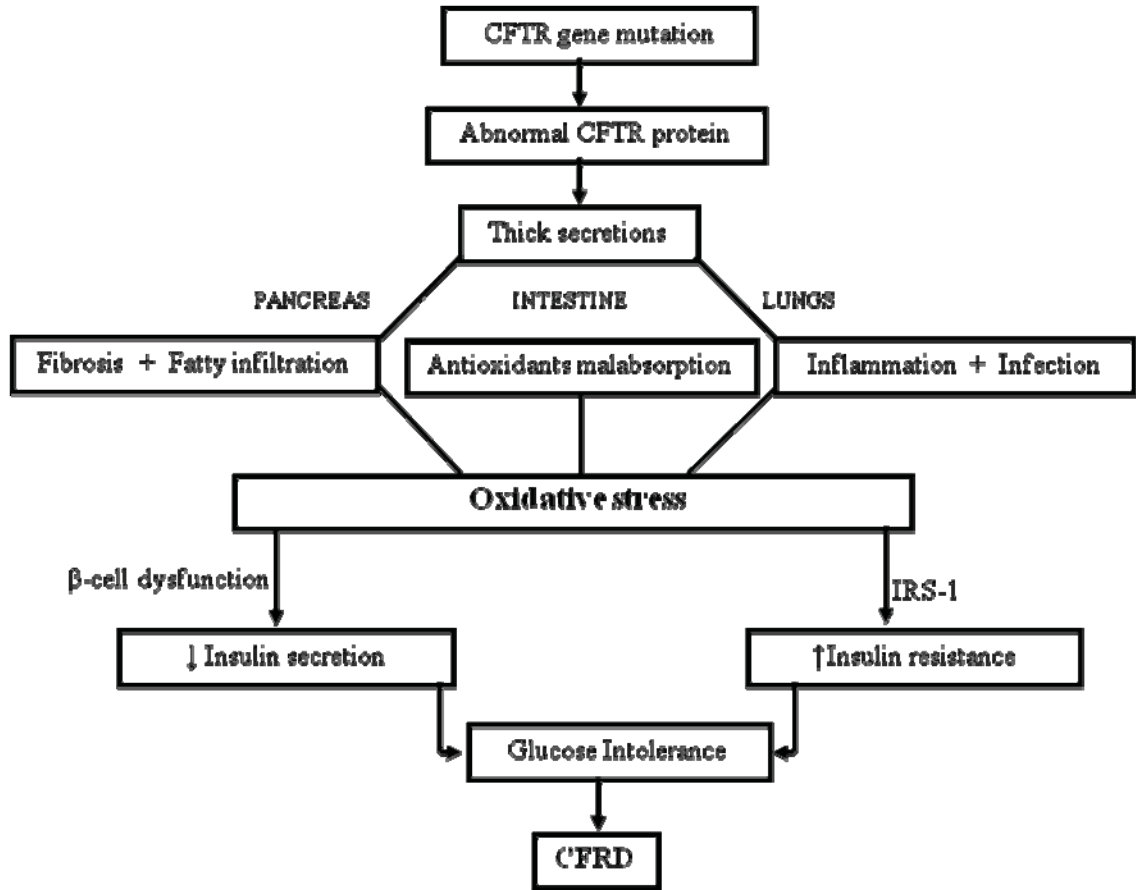


Figure 4



Biomarkers	Breath	Plasma	Urines
ROS/RNS			
H ₂ O ₂	↑ 261 ↑ 262		
NO ₂ ⁻	↔ 278 ↑ 263 ↑ 264		
Lipid peroxidation			
MDA		↑ 147 ↑ 133 ↑ 39 ↑ 34, 35 ↑ 265 ↑ 47 ↑ 40	
Hydroperoxides		↑ 147 ↑ 39 ↑ 40	
F _{2α} -isoprostanes	↑ 166 ↑ 45	↑ 332 ↑ 41	↑ 46
Antioxidants			
GSH		↓ 5 ↓ 255 ↓ 333 ↓ 28 ↓ 48 ↔	
Vitamin E		↓ 41 ↓ 34, 35 ↓ 265 ↓ 136 ↓ 32, 40, 334	
Vitamin C		↓ 41 ↓ 35 ↓ 28	
β-carotene		↓ 33	

5 ARTICLE 3

Article en préparation pour publication dans DIABETES

**IRON ASCORBIC ACID-MEDIATED OXIDATIVE STRESS LEADS TO
ABNORMAL INSULIN SECRETION IN PANCREATIC BETA CELLS**

Thierry Ntimbane,^{1,2} Geneviève Mailhot,^{1,2} Blandine Comte,³ and Emile Levy^{1,2*}

*¹Research Centre, CHU Sainte-Justine and Department of²Nutrition, Université de
Montréal, Montréal, Québec, Canada.*

*³INRA, Centre Clermont-Ferrand - Theix, UMR1019, Unité de Nutrition Humaine, St
Genès Champanelle, France.*

Keywords: Oxidative stress, insulin secretion, cystic fibrosis, diabetes

Corresponding author:

*Dr. Emile Levy

GI-Nutrition Unit

CHU Sainte-Justine

3175 Côte Ste-Catherine

Montreal, Quebec, Canada, H3T 1C5

████████████████████

████████████████████

██

ABSTRACT

Oxidative stress is involved in organs damage during the cystic fibrosis (CF) pathology but the relationship between oxidative stress and the appearance of cystic fibrosis-related diabetes (CFRD) remains unclear. Due to their low expression of many antioxidant enzymes, β -cells are susceptible to oxidative stress and the increased reactive oxygen species (ROS) production associated with the CF condition represents an important risk factor for β -cell dysfunction. We investigated in the current study, the relationship between chemically induced ROS generation and glucose-stimulated insulin secretion under oxidative stress conditions. Chronic exposure of the pancreatic β -cell, β TC-tet, to the prooxidant system iron/ascorbate markedly blunted the insulin secretion process and led to the activation of the inflammatory pathway. This altered mechanism was associated with increased levels of lipid peroxidation markers, decreased antioxidant enzymes activities and decreased cytoplasmic ATP levels. The antioxidant and scavenger compound Trolox prevented the harmful effect of oxidative stress and restored the insulin secretion profile. Taken together, these findings suggest that early treatment of oxidative stress with antioxidant is required to ensure insulin secretion and β -cell function in CF patients.

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is a life-threatening genetic disease (1) that severely affects lungs and the digestive system, resulting in pancreatic insufficiency (2), severe malnutrition (3), steatorrhea (4), pulmonary failure (5) and ultimately death (6). A significant improvement in the life expectancy of these patients has led to an increased concern about the onset of secondary pathologies such as diabetes (7). CF-related diabetes (CFRD) is insidious, affects 20 to 40% of CF patients and is associated with deterioration of lung function, poorer nutritional status and decreased survival compared to non-diabetic CF patients (8). The aetiology of CFRD is poorly understood and its atypical pathophysiology includes several features associated with type I and II diabetes (9). The prevailing consensus is that CFRD results from a severe, although non absolute, insulin deficiency which arises from a primary defect of β -cell (10). Moreover, glucose-intolerant and diabetic CF patients display increased, normal or decreased insulin resistance (11).

CF patients experience an increased oxidative stress burden, which is intimately associated with chronic inflammatory responses (12). Indeed, the increased oxidant production by activated neutrophils and macrophages (13), coupled with a decreased antioxidant defence capacity caused partly by the malabsorption of exogenous liposoluble antioxidants (14), and the impairment in glutathione transport secondary to CFTR channel dysfunction (15), gives rise to an imbalance between pro- and antioxidants, thereby contributing to CF morbidity (16). Oxidative stress is involved in lung tissue destruction and respiratory failure in CF (17) and it is believed that its by-products can reach distant organs and affect

their function (18). Pancreatic β -cells are particularly sensitive to oxidative stress due to the relative weakness of their intracellular antioxidant defence system (19-22). Indeed, oxidative stress is implicated in β -cell dysfunction or death caused by inflammatory processes in type 1 diabetes, whereas it is associated with the impairment of β -cell function in type 2 diabetes (23;24). Since CFRD shares some features with type 1 and 2 diabetes, it can be suspected that oxidative stress affects β -cell function in CF patients with similar parameters like what has been shown in the other types. Most studies investigating the role of oxidative stress in β -cell dysfunction have examined the protective actions of antioxidant agents aiming at reducing the harmful effects (25-27). However, the mechanisms have so far remained obscure. In addition, the investigations were carried out under acute illness (28;29).

In the absence of any experimental animal model developing the CF phenotype with potentially endocrine pancreatic disorders, this study was performed using a β -cell line, namely, the β TC-tet murine pancreatic β -cells. Since limited *in vitro* studies have tackled the mechanisms by which a chronic oxidative stress condition, as it occurs in CF pathology, influences β -cell function, the aims of the present work were to: 1) establish a well-controlled system of exogenous oxidative stress using the reliable β TC-tet cell line; 2) ascertain the role of a long standing oxidative stress in the glucose stimulated insulin secretion mechanism; 3) examine the activity status of noticeable cellular antioxidant

enzymes; and 4) evaluate the oxidative stress-induced inflammatory activation of redox sensible factors.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Culture media and penicillin-streptomycin (PS) were obtained from GIBCO-BRL (Grand Island, NY, USA) whereas horse serum (HS) was purchased to Invitrogen Life Technologies (Burlington, ON, Canada) and foetal bovine serum (FBS) to Flow, (McLean, VA, USA). All chemicals including iron, ascorbate, Trolox, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), 1-methyl-2-vinyl-pyridium trifluoromethane sulfonate, metaphosphoric acid, DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine), oxidized glutathione, thiobarbituric acid were obtained from Sigma (St-Louis, MO, USA). The fluorescent probe CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester) was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Sodium tungstate (Na₂WO₄) was from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Antibodies directed against NF- κ B were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) whereas those against I- κ B from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). All aqueous solutions were prepared with water purified milli-Q-system (Millipore, Montreal, QC, Canada).

Cell culture

β TC-tet murine pancreatic β -cells were kindly provided by Dr P. S. Haddad (Department of pharmacology and membrane protein study group, University of Montreal, Montreal, Canada). In this cell line derived from transgenic mice expressing the SV40T antigen (Tag) under control of the tetracycline gene regulatory system, growth arrest can be induced by shutting off Tag expression in the presence of tetracycline. Cells were cultured at 37°C in a humidified 5%:95% CO₂:air and in high-glucose (4.5 g/l) Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 15% horse serum, 2.5% foetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin until they reached 85% of confluence.

Cell treatment

Once cell cultures reached 85% of confluence, the medium was changed to serum-free DMEM supplemented with 1% PS. β TC-tet cells were incubated with the mixture iron/ascorbate (Fe-Asc 0.2/2 mM), respectively for 2 or 18h, with or without the antioxidant Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,9-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid; 1 mM) which was added to the medium 1h prior the incubation with iron/ascorbate.

MTT reduction assay

The β TC-tet cell metabolism and viability were examined with the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] colorimetric assay as previously described (30). The absorbance measured at 535 nm is directly proportional to viable cell

number. Viability was calculated as the percentage of the absorbance of treated relatively to untreated cultures. Viability of untreated cells was considered as 100%.

Determination of ROS in β TC-tet cells

Levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) were measured by confocal microscopy using the fluorescent probe CM-H₂DCFDA as previously described(26). After treatment with prooxidants and/or antioxidants, β TC-tet cells were loaded with CM-H₂DCFDA (5 μ M) for 30 min at 37°C, followed by three washing with PBS. Fluorescence images were obtained at excitation and emission wavelengths of 485 and 535 nm respectively with a LSM 510 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA). Individual cells from randomly selected microscopic fields were outlined using the Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) and the fluorescence intensity determined.

Measurement of ATP levels

Cellular ATP contents were measured using an ADP/ATP bioluminescent assay kit (BioAssay Systems). Briefly, β TC-tet cells were seeded onto a 96-well microplate, incubated for 18h with iron/ascorbate in the presence or absence of 1mM Trolox and then lysed to release ATP and ADP. The first phase of the assay consists in the luciferase-catalyzed reaction of cellular ATP and D-luciferin, which produced a luminescent signal. Then, ADP was converted into ATP through an enzyme reaction and the newly formed ATP reacts with D-luciferin. The second light intensity represented the total ADP and ATP

content; ADP levels were obtained by subtraction. The calculated ATP/ADP ratio was normalized to the total protein contents of the wells.

Measurement of GSH-to-GSSG ratio

The ratio of reduced glutathione to glutathione disulfide (GSH/GSSG) was determined after exposure to iron/ascorbate in the presence or absence of Trolox using the Bioxytech GSH/GSSG-412 kit (OxisResearch, Portland, OR, USA). β TC-tet cells were washed twice with ice-cold PBS and harvested in 5% meta-phosphoric acid followed by a centrifugation at 6500 x g, 4°C for 5 min. The resulting supernatants were divided into two aliquots: one for the measurement of total glutathione (GSH+GSSG), immediately stored at -80°C, and the other for the GSSG assessment, stored at -80°C after being mixed with thiol scavenging 1-methyl-2-vinyl-pyridium trifluoromethane sulfonate. After addition of the chromogen DTNB, absorbance was recorded at 412 nm to measure total glutathione concentration whereas GSSG levels were determined using a calibration curve.

Antioxidant enzyme activities

The activity of the antioxidant enzymes: superoxide dismutase (Mn-SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) were measured in β TC-tet cell homogenates after treatment with iron/ascorbate either pre-incubated or not with Trolox. Briefly, the specific substrate for each enzyme was added to the cell homogenates and the rate of its disappearance was then measured by spectrophotometry. Cytosolic and mitochondrial SOD activities were determined as described by McCord *et al.* (31). The assay for the CAT

activity was adapted from the protocol reported by Jiang *et al.* (32) with measurement of xylenol orange oxidation at 560 nm in the presence of ferrous ions upon addition of H₂O₂ (10 mM) to the cell homogenates. For the GPx activity, cell homogenates were added to a PBS buffer containing 10 mM GSH, 0.1 U of glutathione reductase and 2 mM NADPH with H₂O₂ (1.5%) to initiate the reaction. Absorbance was then monitored at 340 nm for 5 min.

Insulin secretion assay

All experiments were performed in static incubation. Briefly, β TC-tet cells (passage 26-28) were seeded in 12-well plates at a density of 2.5×10^5 cells/well. Upon reaching 60-85% confluence, cells were exposed to iron/ascorbate and/or Trolox for 18h in the culture medium and then pre-incubated at 37°C for 1h in a Krebs-Ringer buffer (10 mM HEPES, 25 mM NaHCO₃, 2 mM NaH₂PO₄, 118 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1mM MgSO₄, 0.1% fatty acid free BSA, pH 7.4) containing no glucose. To assess insulin secretion, the buffer was removed and replaced by a Krebs buffer containing 0.5 mM IBMX and either 4, 6, 10, 16 mM glucose (for insulin stimulation), or 2 mM glucose plus 50 mM K⁺ (non-fuel secretagogue) (buffer adjusted to 50 mM KCl and 73 mM NaCl). After a 2h-incubation, media were collected, centrifuged for 3 min at 4°C, 3,000 x g to remove cell debris and stored at -80°C until further analysis. Insulin release into the medium was determined by radioimmunoassay (RIA) as described below. Cellular insulin content was measured in cells exposed to 4 (basal secretion) and 16 mM glucose for 2h. Briefly, intracellular insulin was extracted overnight at 4°C in 0.2 mM HCl-75% ethanol.

These samples were briefly sonicated and centrifuged at 30,000 x g for 5 min before measurement of insulin by RIA in the supernatant (# RI-13 K, Linco Research, St-Charles, MO, USA). Measurements were performed on samples diluted between 100 and 300 times according to the manufacturer's instructions. All insulin concentrations are expressed per mg of proteins.

Quantitation of markers of lipid peroxidation

MDA determination

The amount of free malondialdehyde (MDA) generated during incubation with iron/ascorbate and/or Trolox was determined by HPLC as described previously (33). Proteins were first precipitated with a 10% sodium tungstate solution. The protein free supernatants were then reacted with an equivalent volume of 0.5% (wt/vol) thiobarbituric acid solution (TBA) at 95°C for 1h. After cooling to room temperature, the pink chromogene [(TBA) 2-MDA] was extracted with 1-butanol and dried down with nitrogen at 37°C. The dry extract was resuspended in KH₂PO₄/methanol (70:30; pH 7.0) before MDA determination by HPLC with fluorescence detection.

HNE-protein adducts determination

Quantification of HNE bound to proteins (HNE-P) in cell homogenates was assessed as previously described (16) with slight modifications. Analysis was performed using a Hewlett Packard 6890 Series GC System version A.02.14 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with HP-5 capillary column (50m x 0.2mm x 0.33µm) coupled to a

Mass Spectrometer (Agilent Technologies Mass Selective Detector 5973 Network). Only the fragmented ions m/z 257, 258 and 268 were measured while the MS source and quadrupole were set at 300°C-176°C respectively.

Fatty acid analysis

Cellular fatty acids were assayed by a method established in plasma samples and commonly used in our laboratory (34). Briefly, the 18h-cell homogenates were subjected to direct trans-esterification and then injected into a gas chromatograph (model HP 5880, Hewlett-Packard, Rockville, MD) using a fused silica capillary column (60m x 0.2mm x 0.2 μ m) with SP-2331.

Western blot analysis

Cells were homogenized and adequately prepared for Western blotting as described previously (35) with slight modifications. Nitrocellulose membranes were incubated in 1% defatted milk containing primary antibodies directed against NF- κ B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and I- κ B (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). The relative amount of primary antibody was detected with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody in 0.5% milk. NF- κ B and I- κ B were quantitated using an HP Scanjet scanner equipped with a transparency adapter and the UN-SCAN-IT gel 6.1 software.

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. To assess the differences between means, Student *t* test or one-way Anova followed by Tukey's post hoc tests were performed. A *p* value $<$ 0.05 was considered significant.

RESULTS

Effect of iron/ascorbate on β TC-tet cell viability

Cell viability and metabolism were assessed by the MTT assay following a 18h- incubation with iron/ascorbate and/or Trolox in serum-free medium. As shown in **Figure 1**, the exposure of β TC-tet cells to iron/ascorbate and/or Trolox did not significantly affect cell viability. Similar data were observed when viability was evaluated with the Trypan blue exclusion test (data not shown).

Iron/ascorbate-induced ROS production in β TC-tet cells

To confirm that iron/ascorbate leads to ROS production in β TC-tet cells, the probe CM-H₂DCFDA was used. This molecule which freely enters the cell, is esterified by esterases into its metabolite, 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH), which react with ROS to produce the fluorescent component 2',7'-dichlorofluorescein (DCF). Fluorescence intensity in β TC-tet cells that were previously exposed to iron/ascorbate and/or Trolox for 18h was quantitated. Our results show that the prooxidant mixture elicited a significant increase in ROS levels

whereas the addition of Trolox neutralized this production as exemplified by the decrease in fluorescence intensity to levels comparable to controls (**Fig. 2**).

Time course of lipid peroxidation in β TC-tet cells

Experiments were subsequently carried out to examine the effects of iron/ascorbate on lipid peroxidation following the exposure for 2 and 18h, periods of time considered as acute and chronic conditions, respectively. Lipid peroxidation markers as determined by the intracellular MDA and HNE-P levels showed a significant increase following iron/ascorbate administration at both times of exposure (**Fig. 3**). The combination of Trolox and iron/ascorbate normalized the production of both MDA and HNE-P levels in comparison with control values.

Iron/ascorbate and fatty acid composition in β TC-tet cells

As lipid peroxidation by-products were modulated by the treatment with iron/ascorbate, we verified whether these productions were associated with changes in cellular fatty acid composition. In agreement with the lipid peroxidation results, differences in fatty acid composition were detected in cell homogenates incubated for 18h in the presence of iron/ascorbate. Overall, polyunsaturated fatty acid (PUFA) levels showed a decreasing trend in β TC-tet cells exposed to iron/ascorbate; but only concentrations of arachidonic acid (20:4 ω 6) were significantly reduced when compared to those in controls and cells treated with iron/ascorbate and Trolox (**Fig. 4**). When calculated the essential fatty acid

deficiency index with the ratio of eicosatrienoic acid (20:3 ω 9) to arachidonic acid, this was not modified by the oxidative effects of iron/ascorbate (data not shown). The ratio of cholesterol to phospholipids, a commonly used index for membrane fluidity did also not show significant differences between control and iron/ascorbate-treated cells (data not shown). Taken together, these data indicate that iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation affects preferentially arachidonic acid content in β TC-tet cells.

Modulation of endogenous antioxidant defences in β TC-tet cells by iron/ascorbate

To determine whether the oxidative effects of iron/ascorbate were associated with consequences on the cell antioxidant system, we measured changes in some of its major components. Alterations in the endogenous antioxidant defence occur in β TC-tet cells upon iron/ascorbate administration for 18h as evidenced with changes in glutathione levels (GSH and GSSG) as well as in enzymatic activities of Mn-SOD and CAT. As illustrated in **Figure 5**, we observed a significant increase in the GSH/GSSG ratio in response to iron/ascorbate along with a significant decrease in both activities of Mn-SOD and CAT. The co-administration of Trolox restored CAT activity to control levels but failed to restore the Mn-SOD activity back to the control value and GSH/GSSG ratio remained high. No significant changes were noticed towards the cytosolic SOD and GPx activities, suggesting that these enzymes were less affected (data not shown).

Impact of iron/ascorbate on insulin secretion in β TC-tet cells

As the β TC-tet cell is a known model of insulin release in response in a dose-dependent manner, to physiological concentrations of glucose, we first assessed glucose-induced insulin secretion following a 2h-incubation in the presence or absence of iron/ascorbate. In control cells, insulin secretion was dose-dependently increased when raising the glucose concentrations from physiological fasting level (4 mM) to 20 mM glucose as external stimuli (**Fig. 6A**). Although addition of iron/ascorbate resulted in a significant increase in insulin secretion at 4 and 6 mM glucose the response was blunted for increased glucose concentrations. Longer exposure (18h) did raise the insulin secretion measured with 4 mM glucose but did not influence the response to glucose stimulation (**Fig. 6B**). The addition of iron/ascorbate did not affect the response to low concentration of glucose (4-6 mM) but markedly blunted the response to higher concentrations of glucose.

We then focused on insulin secretion in response to 4 and 16 mM of glucose, two concentrations where we observed very different responses for the effects of iron/ascorbate in relation with the time of exposure. The use of Trolox alone or in conjunction with iron/ascorbate, completely normalized insulin secretion, regardless of the time of incubation (**Fig.7 A&B**). These data were further confirmed with measurements of the intracellular insulin contents. When insulin secretion is expressed as the percentage of insulin content secreted, short-term iron/ascorbate treatment still significantly increased with 4 mM glucose (**Fig 7C**). The percentages of insulin content released upon stimulation

with 16 mM glucose remained indistinguishable from stimulated by 4 mM glucose at both lengths of exposure (**Fig.7 C&D**).

The effects of iron/ascorbate treatment on insulin release through mechanisms independent from glucose stimulation were also evaluated. Insulin secretion was similar between control and iron/ascorbate-treated cells after the addition of 50 mM KCl, which bypasses the ATP-sensitive channels to stimulate insulin secretion (data not shown). A rise in the ATP/ADP ratio is a key cellular event that precedes glucose-stimulated insulin secretion. We therefore evaluated changes in ADP and ATP concentrations following the administration of iron/ascorbate and found that ATP/ADP ratio was significantly decreased after a 18h-incubation with iron/ascorbate (**Fig. 8**). These results showed that the ATP/ADP ratio is sensitive to oxidative stress and can at least partly explain the negative effects of iron/ascorbate on the glucose-stimulated insulin secretion process.

Iron/ascorbate-induced NF- κ B activation following ROS production

In order to verify whether iron/ascorbate could modulate inflammation pathways, degradation of the inhibitory protein inhibitor- κ B α (I- κ B α) and activation of the transcription factor NF- κ B α were analysed after long term exposure. Following the incubation with iron/ascorbate (18h), the expression of the 37-kDa protein I- κ B α was evaluated in β TC-tet cell homogenates. As shown in **Figure 9**, iron/ascorbate induced a decrease in the amounts of I- κ B α , which could account for its degradation and the release of NF- κ B in the cytosol. The degradation of I- κ B α and release of NF- κ B were both

inhibited by the presence of Trolox, showing that the pro-oxidant mixture iron/ascorbate, can activate this transcription factor. Therefore, long-term incubation of β TC-tet cells with iron/ascorbate activates NF- κ B, which could ultimately lead to the transcription of genes involved in inflammation protein synthesis.

DISCUSSION

The CF pathology represents a chronic and sustained inflammatory condition, especially in lungs, in which increased oxidative stress events are believed to cause respiratory failure (12;17). Most studies have evidenced the role of oxidative stress in the rise of diabetic complications (36) whereas others have demonstrated the involvement of oxidative stress in β -cell dysfunction during the early phases of diabetes (23;24). A feature of pancreatic β -cells is their low expression and activity of the major enzymes involved in antioxidant defence mechanisms, which render them susceptible to the harmful effect of oxidative stress (22). The relationship between increased oxidative stress occurring in lungs and the appearance of CFRD in CF patients is not fully established and this still remains a matter of hypotheses. Moreover, without any animal models of CF with the CFRD characteristics observed in human, extrapolations can be made, at least for some mechanisms on the hypothetical impacts of oxidative stress on the pathophysiology of CFRD from data obtained with cellular models of β -cells.

The main objective of our study was to examine how pancreatic β -cells relatively behave in the oxidative stress conditions. We used the iron/ascorbate mixture as the pro-oxidant

system since this iron-catalyzed model of oxidative stress is known to generate hydroxyl radicals (HO^\bullet) from hydrogen peroxide (H_2O_2) in presence of ferrous ions (37). Our data show that incubation of β TC-tet cells with iron/ascorbate resulted in a significant accumulation of intracellular ROS, especially H_2O_2 , confirming that this compound is one of the most produced in our pro-oxidant model. As mentioned above, iron molecules allow HO^\bullet formation, which in turn, initiates the lipid peroxidation process in most cells (38). In this study, we confirmed the high susceptibility of β -cells to oxidative stress. As shown by our results, the incubation of β TC-tet cells with iron/ascorbate resulted in increased lipid peroxidation in a time-dependant manner. Moreover, the co-administration of the antioxidant and lipid peroxide scavenger Trolox, with iron/ascorbate inhibited the iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation evaluated with MDA and HNE-proteins productions. The occurrence of lipid peroxidation was accompanied with a decrease in most polyunsaturated fatty acid content but arachidonic acid levels were the most affected by the process. This point out that this long fatty acid is a good candidate for the evaluation of lipid peroxidation extent in biological systems (39) but also confirming the relevance of the chosen markers of lipid peroxidation as this fatty acid is the main source of the MDA and HNE aldehydes through peroxidation.

Endogenous antioxidant enzymes such as SOD and CAT are essential to limit the production of oxidative molecules in oxidative stress conditions (27). It is now well established that β -cells contain low levels of SOD, which helps remove superoxide anions and CAT involved in the elimination of peroxides (40). Our results show a decrease in

CAT and Mn-SOD upon long term incubation with iron/ascorbate. The addition of Trolox prevented the drop in CAT activity but showed no effect on SOD activity. This is consistent with the fact that Trolox, in our study, showed the ability to enter the cell and reduce intracellular H_2O_2 accumulation when co-administrated with iron/ascorbate. However, it is possible that the pro-oxidant system generates superoxide radicals that overcome the mitochondrial SOD mechanism. Changes in the glutathione system were expected and confirmed with an increase in GSH levels and a significant increase in the GSH/-GSSG ratio, suggesting that an upregulation in GSH levels occurs in β TC-tet cells in order to ensure viability despite oxidative stress. This *in vitro* oxidative stress system promotes changes in the endogenous antioxidants to neutralize, or at least, attenuate the iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation in β TC-tet cells.

Oxidative stress is known to affect the insulin secretion mechanism in β -cells directly by damaging the cell structure (20;41) or indirectly by altering some steps of this process (25;26). Briefly, the glucose-stimulated insulin secretion process relies on 3 parameters: 1) glucose metabolism; 2) ATP production; and 3) Ca^{2+} mobilization (42-44). Upon glucose metabolism, increased cytosolic ATP/ADP ratio will lead to closure of K_{ATP} channels (45;46), opening of voltage-dependent Ca^{2+} channels and insulin exocytosis (43). It has been demonstrated that HO^\bullet and H_2O_2 can affect insulin secretion through specific inhibitions of key enzymes of glucose metabolism (47;48), a decreased production of ATP (49), and altered Ca^{2+} homeostasis (50;51). However, it has also been shown that oxidative stress can alter insulin secretion only beyond fasting glucose levels since it seems to

increase insulin release within glucose levels near to basal values (49). This effect of oxidative stress on insulin secretion is explained by a surprising accumulation of calcium in the cytosol as a consequence of diminished Ca^{2+} pumping into the endoplasmic reticulum associated with a decrease in cytosolic ATP (52). In control condition, insulin secretion is dose dependently increased by concentrations of glucose ranging from those observed in fasting normal glycemia (4 mM), high post-prandial (10 mM) or uncontrolled diabetic conditions. In the condition of an acute oxidative stress induced by iron/ascorbate, the effect of glucose is raised: at 4 mM, the insulin secretion reached values similar to those observed with 10 mM glucose, with an absence of response to glucose. With longer time of incubation (18h), the insulin response to glucose was maintained without significant effects of iron/ascorbate at low glucose concentrations (4-6 mM). However, with higher glucose concentrations the insulin response was blunted. Nevertheless, the results observed with Trolox (**Fig 7B**) showing a normalization of the insulin secretion profile strongly suggest that most probably in the early phases of β -cell dysfunction, antioxidant can be beneficial to maintain insulin responsiveness. Data relative to the proportion of insulin content (**Fig 7C&D**) demonstrated that insulin synthesis was not affected by iron/ascorbate and only the insulin secretion mechanism was altered. This observation was further confirmed by the decreased ATP/ADP ratio upon iron/ascorbate treatment whereas insulin secretion was unchanged in control and iron/ascorbate-treated cells after the addition of 50 mM KCl. Therefore in these conditions, cellular ATP/ADP ratio is sensitive to oxidative stress and

may explain the negative influence of iron/ascorbate on glucose-stimulated insulin secretion.

Oxidative stress has been associated to inflammatory gene expression in both type 1 and 2 diabetes (53). Consequently, we analysed whether iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation could modulate inflammation pathways in β TC-tet. Since NF- κ B is a master stress-sensitive transcription factor involved in inflammatory response, its activation by various stimuli including oxidative stress will lead to the degradation of its inhibitory protein I κ B (54). Treatment with iron/ascorbate induced the degradation of cytosolic I κ B with the ensuing activation of NF- κ B, but the presence of the antioxidant Trolox inhibited the activation of NF- κ B, thereby confirming that this transcription factor is subject to redox regulation. Therefore, it is believed that long-term exposure of β -cells to chronic oxidative stress will activate NF- κ B, which could ultimately lead to the transcription of genes involved in pro-inflammatory protein synthesis.

Data from the current study can be analyzed in the context of CF and CFRD since our β TC-tet cell line can be representative of pancreatic cells in CF patients. We can then propose that results obtained after 2h of incubation with iron/ascorbate could simulate an acute oxidative stress condition where β -cells are not able to respond to a glucose challenge; a situation that may occur during acute inflammation and/or infection in CF or eventually in the first steps preceding CFRD. This could even explain the temporary phase of glucose intolerance occurring in CF patients during acute lungs infection period than can be

normalized later (55). The function of β -cells during early CFRD is most probably closer to what we observed with the longer incubation with iron/ascorbate (18h) showing that prolonged oxidative stress induced an inadequate β -cell response and insulin secretion to glycemic changes. The data obtained with Trolox suggest that antioxidant treatment in the early phases of glucose intolerance could be beneficial to restore β -cell function and delay CFRD appearance. Finally, our results on inflammation suggest that these factors can contribute to the installation of chronic oxidative stress events, fibrosis and more β -cell dysfunction during the development of CFRD. However, we have to keep in mind that finding *in vitro* conditions mimicking what is most probably occurring in CFRD is extremely difficult as long term incubations of β -cells are so far, not possible.

In summary, our data confirm the harmful effects of oxidative stress in β -cell function with some discrepancy between acute (2h) and long term (18h) effects. The poor antioxidant equipment of β -cells render them more vulnerable to oxidative stress events, even those occurring in distant sites as seen in the CF pathology. The iron/ascorbate pro-oxidant system we used in this study is a good system of exogenous oxidative stress for *in vitro* studies since it was for some parameters, controlled by the antioxidant Trolox. However, *in vivo* studies are needed to understand the mechanisms by which oxidative stress affect the β -cell and to identify the potential targets for antioxidant therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

The present work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP#82714) and Canadian Cystic Fibrosis Foundation.

REFERENCES

1. Krauth, C, Jalilvand, N, Welte, T, Busse, R: Cystic fibrosis: cost of illness and considerations for the economic evaluation of potential therapies
2. Pharmacoeconomics 21:1001-1024, 2003.
2. Durie, PR: Pancreatic aspects of cystic fibrosis and other inherited causes of pancreatic dysfunction. *Med Clin North Am* 84:609-20, 2000.
3. Wood, LG, Gibson, PG, Garg, ML: Circulating markers to assess nutritional therapy in cystic fibrosis. *Clin Chim Acta* 353:13-29, 2005.
4. Peretti, N, Marcil, V, Drouin, E, Levy, E: Mechanisms of lipid malabsorption in Cystic Fibrosis: the impact of essential fatty acids deficiency. *Nutr Metab (Lond)* 2:11, 2005.
5. Hayes D Jr. Obstructive sleep apnea syndrome: a potential cause of lower airway obstruction in cystic fibrosis. *Sleep Med* 7(1):73-75, 2006.
6. Ntimbane, T, Comte, B, Mailhot, G, Berthiaume, Y, Poitout, V, Prentki, M, Rabasa-Lhoret, R, Levy, E: Cystic Fibrosis-Related Diabetes: From CFTR Dysfunction to Oxidative Stress. *Clin Biochem Rev* 30:153-177, 2009.

7. Fischman, D, Nookala, VK: Cystic fibrosis-related diabetes mellitus: etiology, evaluation, and management. *Endocr Pract* 14:1169-1179, 2008.
8. Mohan, K, Miller, H, Dyce, P, Grainger, R, Hughes, R, Vora, J, Ledson, M, Walshaw, M: Mechanisms of glucose intolerance in cystic fibrosis. *Diabet Med* 26:582-588, 2009.
9. Tofe, S, Moreno, JC, Maiz, L, Alonso, M, Escobar, H, Barrio, R: Insulin-secretion abnormalities and clinical deterioration related to impaired glucose tolerance in cystic fibrosis. *Eur J Endocrinol* 152:241-247, 2005.
10. Preumont, V, Hermans, MP, Lebecque, P, Buyschaert, M: Glucose homeostasis and genotype-phenotype interplay in cystic fibrosis patients with CFTR gene deltaF508 mutation. *Diabetes Care* 30:1187-1192, 2007.
11. Moran, A: Abnormal glucose tolerance in CF--when should we offer diabetes treatment? *Pediatr Diabetes* 10:159-161, 2009.
12. Rottner, M, Freyssinet, JM, Martinez, MC: Mechanisms of the noxious inflammatory cycle in cystic fibrosis. *Respir Res* 10:23, 2009.

13. Ciofu, O, Riis, B, Pressler, T, Poulsen, HE, Hoiby, N: Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2276-2282, 2005.
14. Lancellotti, L, D'Orazio, C, Mastella, G, Mazzi, G, Lippi, U: Deficiency of vitamins E and A in cystic fibrosis is independent of pancreatic function and current enzyme and vitamin supplementation. *Eur J Pediatr* 155:281-285, 1996.
15. Kogan, I, Ramjeesingh, M, Li, C, Kidd, JF, Wang, Y, Leslie, EM, Cole, SP, Bear, CE: CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J* 22:1981-1989, 2003.
16. Ntimbane, T, Krishnamoorthy, P, Huot, C, Legault, L, Jacob, SV, Brunet, S, Levy, E, Gueraud, F, Lands, LC, Comte, B: Oxidative stress and cystic fibrosis-related diabetes: a pilot study in children. *J Cyst Fibros* 7:373-384, 2008.
17. Rahman, I, MacNee, W: Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* 16:534-554, 2000.
18. Casini, A, Ceni, E, Salzano, R, Biondi, P, Parola, M, Galli, A, Foschi, M, Caligiuri, A, Pinzani, M, Surrenti, C: Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid

- peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 25:361-367, 1997.
19. Evans, JL, Goldfine, ID, Maddux, BA, Grodsky, GM: Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599-622, 2002.
 20. Robertson, RP, Harmon, J, Tran, PO, Tanaka, Y, Takahashi, H: Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52:581-587, 2003.
 21. Tiedge, M, Lortz, S, Drinkgern, J, Lenzen, S: Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 46:1733-1742, 1997.
 22. Gurgul, E, Lortz, S, Tiedge, M, Jorns, A, Lenzen, S: Mitochondrial catalase overexpression protects insulin-producing cells against toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. *Diabetes* 53:2271-2280, 2004.
 23. Donath, MY, Storling, J, Maedler, K, Mandrup-Poulsen, T: Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes. *J Mol Med* 81:455-470, 2003.

24. Mandrup-Poulsen, T: Apoptotic signal transduction pathways in diabetes. *Biochem Pharmacol* 66:1433-1440, 2003.
25. Leloup, C, Tourrel-Cuzin, C, Magnan, C, Karaca, M, Castel, J, Carneiro, L, Colombani, AL, Ktorza, A, Casteilla, L, Penicaud, L: Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58:673-681, 2009.
26. Pi, J, Bai, Y, Zhang, Q, Wong, V, Floering, LM, Daniel, K, Reece, JM, Deeney, JT, Andersen, ME, Corkey, BE, Collins, S: Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 56:1783-1791, 2007.
27. Gier, B, Krippeit-Drews, P, Sheiko, T, guilar-Bryan, L, Bryan, J, Dufer, M, Drews, G: Suppression of KATP channel activity protects murine pancreatic beta cells against oxidative stress. *J Clin Invest* 119:3246-3256, 2009.
28. Poitout, V, Tanaka, Y, Reach, G, Robertson, RP: [Oxidative stress, insulin secretion, and insulin resistance]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*75-86, 2001.
29. Moore, PC, Ugas, MA, Hagman, DK, Parazzoli, SD, Poitout, V: Evidence against the involvement of oxidative stress in fatty acid inhibition of insulin secretion. *Diabetes* 53:2610-2616, 2004.

30. Janjic, D, Wollheim, CB: Islet cell metabolism is reflected by the MTT (tetrazolium) colorimetric assay. *Diabetologia* 35:482-485, 1992.
31. McCord, JM, Fridovich, I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244:6049-6055, 1969.
32. Jiang, ZY, Woollard, AC, Wolff, SP: Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 26:853-856, 1991.
33. Bernotti, S, Seidman, E, Sinnett, D, Brunet, S, Dionne, S, Delvin, E, Levy, E: Inflammatory reaction without endogenous antioxidant response in Caco-2 cells exposed to iron/ascorbate-mediated lipid peroxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285:G898-G906, 2003.
34. Spahis, S, Vanasse, M, Belanger, SA, Ghadirian, P, Grenier, E, Levy, E: Lipid profile, fatty acid composition and pro- and anti-oxidant status in pediatric patients with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79:47-53, 2008.
35. Precourt, LP, Seidman, E, Delvin, E, Amre, D, Deslandres, C, Dominguez, M, Sinnett, D, Levy, E: Comparative expression analysis reveals differences in the

- regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1628-1637, 2009.
36. Brown, WV: Microvascular complications of diabetes mellitus: renal protection accompanies cardiovascular protection. *Am J Cardiol* 102:10L-13L, 2008.
37. Valko, M, Morris, H, Cronin, MT: Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12:1161-1208, 2005.
38. Halliwell, B, Whiteman, M: Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142:231-255, 2004.
39. Morrow, JD, Roberts, LJ: The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* 36:1-21, 1997.
40. Itoh, K, Tong, KI, Yamamoto, M: Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36:1208-1213, 2004.

41. Lortz, S, Tiedge, M: Sequential inactivation of reactive oxygen species by combined overexpression of SOD isoforms and catalase in insulin-producing cells. *Free Radic Biol Med* 34:683-688, 2003.
42. Henquin, JC: Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49:1751-1760, 2000.
43. Wollheim, CB, Maechler, P: Beta-cell mitochondria and insulin secretion: messenger role of nucleotides and metabolites. *Diabetes* 51 Suppl 1:S37-S42, 2002.
44. Maechler, P, Wollheim, CB: Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* 414:807-812, 2001.
45. Ronner, P, Naumann, CM, Friel, E: Effects of glucose and amino acids on free ADP in betaHC9 insulin-secreting cells. *Diabetes* 50:291-300, 2001.
46. Tsuboi, T, Lippiat, JD, Ashcroft, FM, Rutter, GA: ATP-dependent interaction of the cytosolic domains of the inwardly rectifying K⁺ channel Kir6.2 revealed by fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:76-81, 2004.
47. Lenzen, S: Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* 36:343-347, 2008.

48. Morgan, MJ, Lehmann, M, Schwarzlander, M, Baxter, CJ, Sienkiewicz-Porzucek, A, Williams, TC, Schauer, N, Fernie, AR, Fricker, MD, Ratcliffe, RG, Sweetlove, LJ, Finkemeier, I: Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. *Plant Physiol* 147:101-114, 2008.
49. Maechler, P, Jornot, L, Wollheim, CB: Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 274:27905-27913, 1999.
50. Avshalumov, MV, Rice, ME: Activation of ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11729-11734, 2003.
51. Brookes, PS, Yoon, Y, Robotham, JL, Anders, MW, Sheu, SS: Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:C817-C833, 2004.
52. Criddle, DN, Gerasimenko, JV, Baumgartner, HK, Jaffar, M, Voronina, S, Sutton, R, Petersen, OH, Gerasimenko, OV: Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ* 14:1285-1294, 2007.

53. Kaneto, H, Katakami, N, Kawamori, D, Miyatsuka, T, Sakamoto, K, Matsuoka, TA, Matsuhisa, M, Yamasaki, Y: Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxid Redox Signal* 9:355-366, 2007.

54. Baeuerle, PA, Henkel, T: Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12:141-179, 1994.

55. Costa, M, Potvin, S, Berthiaume, Y, Gauthier, L, Jeanneret, A, Lavoie, A, Levesque, R, Chiasson, J, Rabasa-Lhoret, R: Diabetes: a major co-morbidity of cystic fibrosis. *Diabetes Metab* 31:221-232, 2005.

LEGENDS OF THE FIGURES:**Figure 1.** Cell viability upon iron/ascorbate exposure.

β TC-tet cells were incubated with 0.2 mM iron and 2 mM ascorbate (Fe) and/or 1mM Trolox (Trolox) for 18h. Non-treated cells served as controls (CTR). After a 2h-incubation in the MTT solution, the MTT product Formazan was colorimetrically measured at 535 nm. Data represent means \pm SEM of 3 independent experiments performed in triplicate on different cell preparations.

Figure 2. ROS production in β TC-tet cells.

After a 18h-treatment with 0.2 mM iron and 2 mM ascorbate (Fe) and/or 1 mM Trolox (Trolox), cells were incubated in the presence of the fluorescent probe CM-H2DCFDA for 45 min at 37°C. Untreated cells served as controls (CTR). Fluorescence intensity was quantitated and expressed as arbitrary unit. Results represent the means \pm SEM of 25 to 41 cells selected randomly in 6 to 7 microscopic fields. ANOVA: $p < 0.001$ followed by Tukey post hoc test #: $p < 0.0001$ vs CTR.

Figure 3. Lipid peroxidation markers in β TC-tet cells.

After a 2h (**A,C**) or a 18h (**B, D**) treatment with 0.2 mM iron and 2 mM ascorbate (Fe) and/or 1 mM Trolox (Trolox), cells were collected and assessed for malondialdehyde

(MDA) and 4-hydroxynonenal bound to proteins (HNE-P) cell contents as described in the MATERIALS AND METHODS section. Untreated cells served as controls (CTR). Data represent means \pm SEM of 3 separate experiments. #: $p < 0.001$; £: $p < 0.0001$ vs CTR using ANOVA and Tukey post hoc tests.

Figure 4. Arachidonate levels in β TC-tet cells.

After a 18h-treatment with 0.2 mM iron and 2 mM ascorbate (Fe) with or without 1 mM Trolox (Trolox), cells were collected and fatty acids assayed by gas liquid chromatography after direct trans-esterification. Untreated cells served as controls (CTR). Results are means \pm SEM of 3 separate experiments and expressed as μ M/mg of cellular total protein content. *: $p < 0.05$ vs CTR using ANOVA followed by Tukey post hoc tests.

Figure 5. Endogenous antioxidant status in β TC-tet cells.

(A) The GSH-to-GSSG ratio, (B) the activity of mitochondrial superoxide dismutase (Mn-SOD) and (C) Catalase (CAT) were measured following a 18h-incubation with iron/ascorbate (Fe) in the absence or presence of Trolox (Fe/Trolox) as described in the MATERIALS AND METHODS section. Untreated cells served as controls (CTR). Data represented means \pm SEM of 3 separate experiments. *: $p < 0.05$ vs CTR; #: $p < 0.001$ vs CTR using ANOVA followed by Tukey post-tests.

Figure 6. Glucose-stimulated insulin secretion in β TC-tet cells.

After a 2 (A) or 18h (B)-incubation with iron/ascorbate (Fe), insulin secretion in response to 4, 6, 10, 16 or 20 mM glucose was measured as described in the MATERIALS AND METHODS section. Control cells (CTR) represent untreated cells. Results presented are means \pm SEM of triplicate coming from 3 separate experiments. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ vs CTR using unpaired Student *t* tests.

Figure 7. Effect of iron/ascorbate on glucose-stimulated insulin secretion and intracellular insulin content.

β TC-tet cells were incubated in various conditions without any agent at 4 and 16 mM glucose followed by the addition of iron/ascorbate (Fe) or Trolox (Trolox) and both agents. The insulin secretion profile after 2h (A) or 18h (B) incubation is illustrated for 3 independent experiments, $n = 6$ per group. Intracellular insulin contents were measured in the same conditions after cell incubations for 2 (C) or 18h (D). Intracellular insulin levels were determined according to the MATERIALS AND METHODS section and levels of secreted insulin were analysed in relation with the intracellular insulin contents. Results are means \pm SE from 3 separate experiments, $n = 3$ per group. #: $p < 0.0001$ vs 4 mM glucose; @: $p < 0.01$ or ***: $p < 0.001$ vs (4 mM glucose + Fe); \$: $p < 0.01$ or £: $p < 0.0001$ vs (16 mM glucose + Fe) using ANOVA followed by Tukey post hoc tests.

Figure 8. ATP-to-ADP ratio in β TC-tet cells.

Intracellular levels of ATP and ATP were assessed in β TC-tet cells as described in MATERIALS AND METHODS. Cells were incubated for 18h with 0.2 mM iron and 2 mM ascorbate (Fe) with or without 1mM Trolox (Trolox). Untreated cells served as controls. Results are means \pm SEM, n = 6 wells per group. **: p < 0.01 vs CTR using ANOVA followed by Tukey post hoc tests.

Figure 9. I κ B degradation and NF- κ B activation in β TC-tet cells.

After a 18h-treatment with 0.2 mM iron and 2 mM ascorbate (Fe) with or without 1mM Trolox (Trolox), cells were collected and lysed in protein extraction buffer. Untreated cells served as controls (CTR). Fifty μ g of protein were applied on a SDS-PAGE and immunoblotted as described in MATERIALS AND METHODS. The ratio NF- κ B to I κ B was calculated. Results represent means \pm SEM of 3 separate experiments. **: p < 0.01 vs CTR using ANOVA and Tukey post hoc tests.

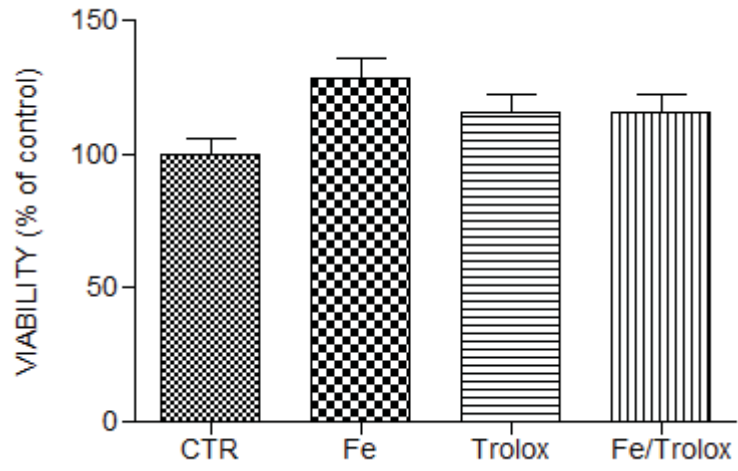
FIGURE 1

FIGURE 2

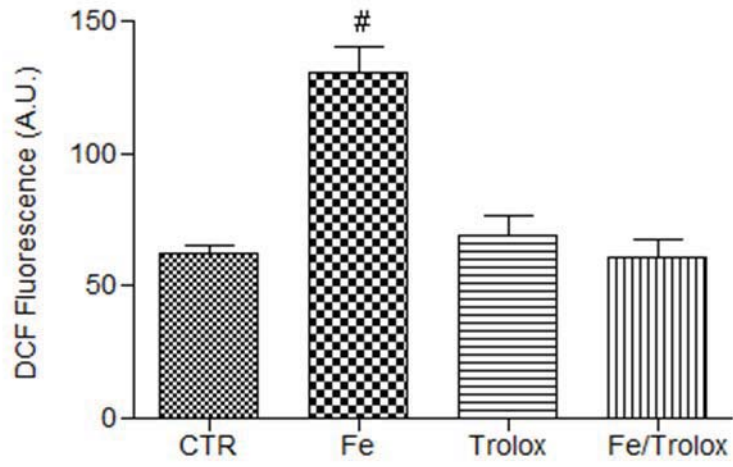


FIGURE 3

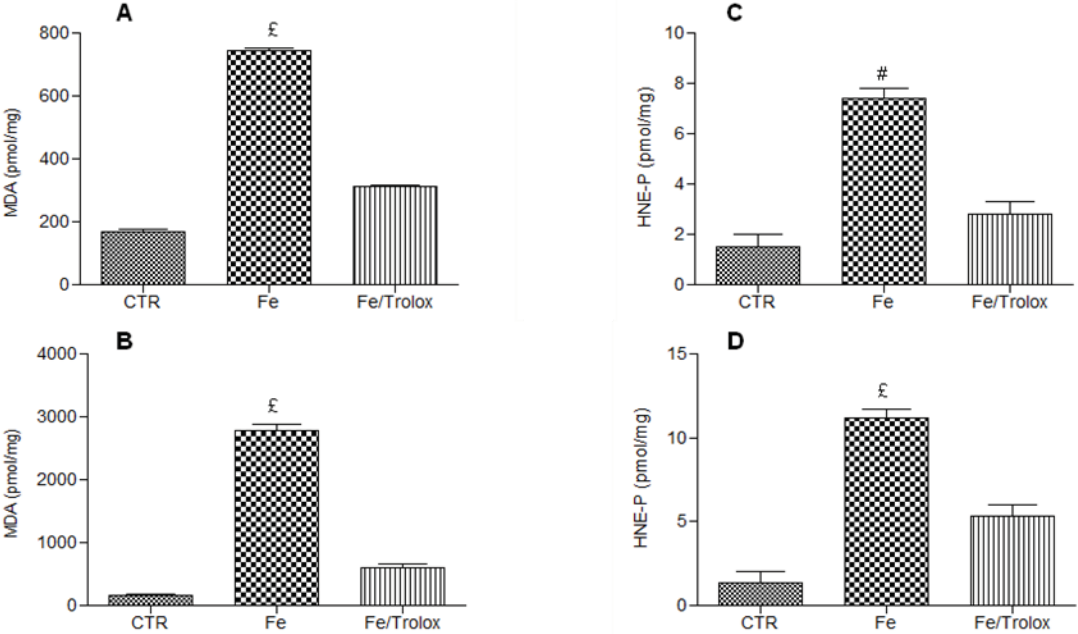


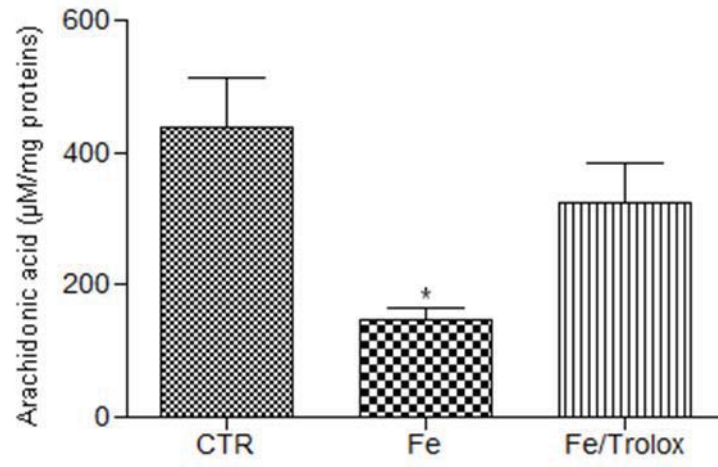
FIGURE 4

FIGURE 5

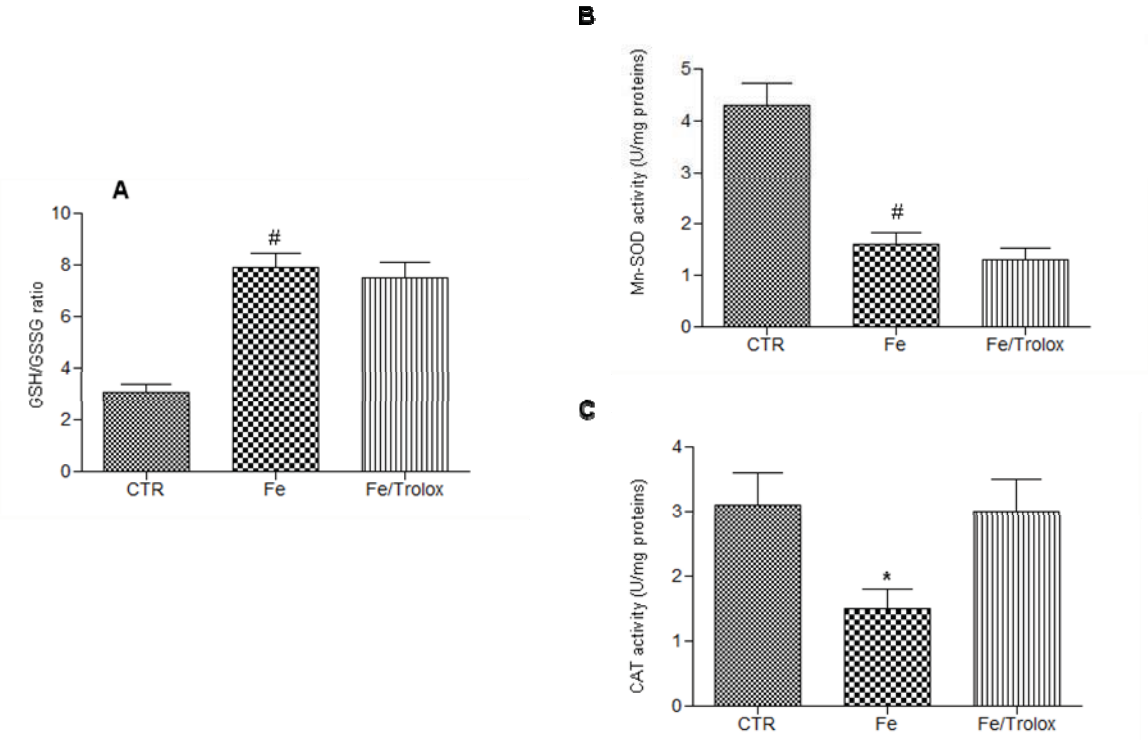


FIGURE 6

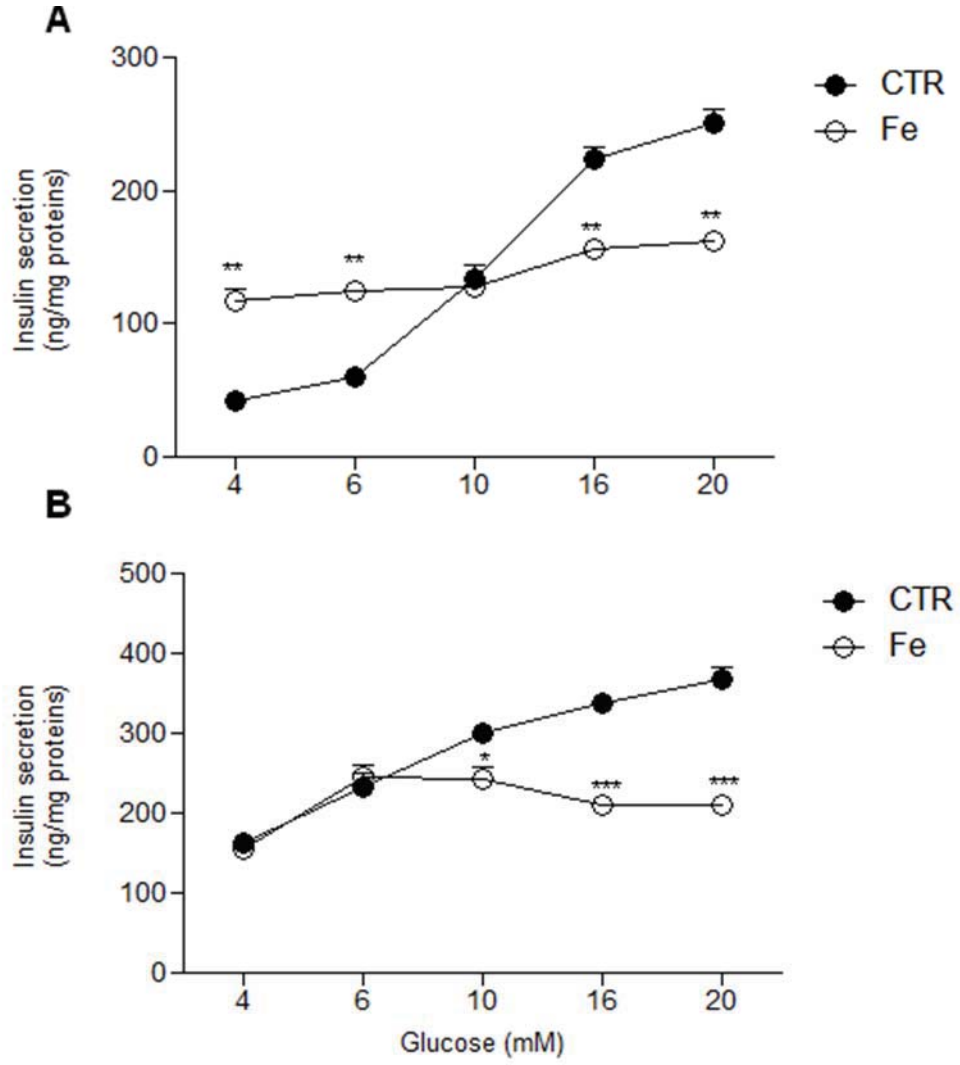


FIGURE 7

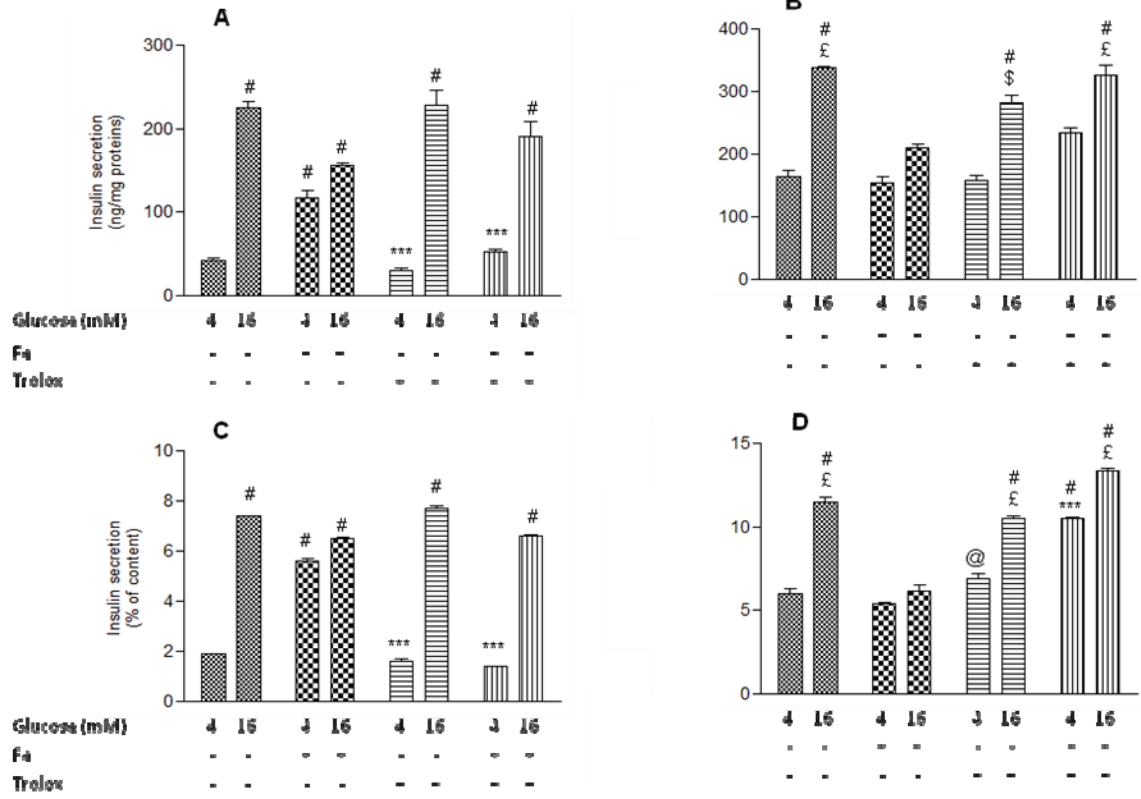


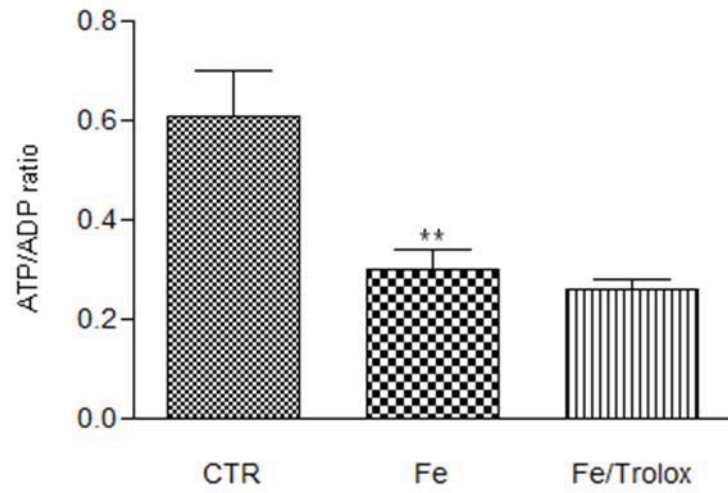
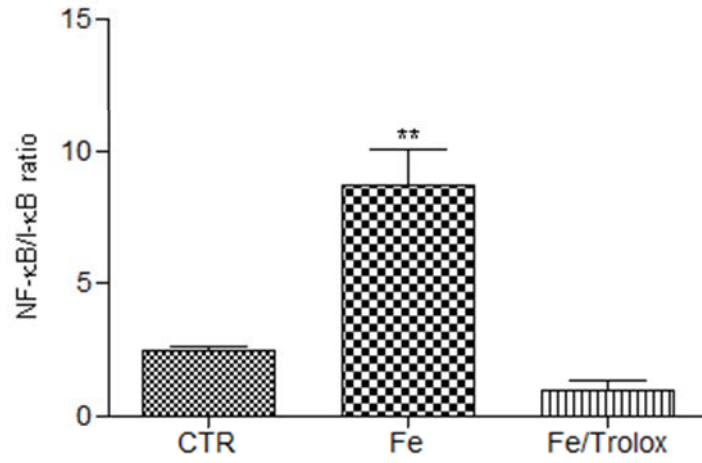
FIGURE 8

FIGURE 9



6 DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La compréhension de la physiopathologie de la FK a connu un grand essor au cours des dernières décennies qui s'est traduit par une augmentation significative de l'espérance de vie des patients. Malgré une atteinte multi-organes, la physiopathologie de la FK repose grandement sur la manifestation d'évènements inflammatoires et oxydants qui contribuent à la progression de la maladie et favorisent le développement de complications. L'association entre l'inflammation et le stress oxydant dans l'apparition du CFRD est fortement suggérée, cependant la cinétique, le mode d'action de ces deux composantes, les mécanismes et leur synergie potentielle restent encore mal connus. Nous avons donc considéré le stress oxydant en relation avec l'inflammation au cours de la FK afin de clarifier son rôle et leur possible interaction dans le développement du CFRD.

L'implication du stress oxydant dans la survenue et l'aggravation des complications de la FK a largement été étudiée au cours de la réponse immunitaire, participant à la destruction du tissu pulmonaire qui est initiée par l'inflammation suite à l'infection bactérienne des voies respiratoires [445]. De manière générale, le processus inflammatoire semble s'établir selon la séquence d'évènements suivants : 1) la viscosité du mucus bronchique empêche l'élimination des bactéries inhalées [446]; 2) le dysfonctionnement du canal du CFTR augmente la teneur en Cl^- , responsable de l'inactivation des peptides antibactériens (β -défensines et cathélicidines) présents dans les voies respiratoires [71]; et 3) la prolifération bactérienne qui s'en suit induit une activation des cellules immunitaires afin de combattre l'infection [447] mais qui finit par déclencher l'inflammation. La réponse

inflammatoire constitue un moyen central de protection contre l'action des bactéries, et le début du processus se caractérise d'abord par un équilibre naturel entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires stimulent les défenses immunitaires dans le but de combattre les bactéries par différents moyens impliquant la production de RONS et d'enzymes protéolytiques [128, 129, 289]. Les cytokines anti-inflammatoires permettent quant à elles de limiter les effets délétères de l'inflammation en induisant l'apoptose des cellules immunitaires activées [448]. De manière générale, un déséquilibre au niveau de la balance entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires, en faveur des premières, favorise l'installation d'un stress oxydant.

L'implication directe du stress oxydant dans la maladie pulmonaire durant la FK a largement été démontrée [292] avec la diminution des niveaux de glutathion dans les fluides bronchiques [292, 438]. Le glutathion est un élément important dans l'atténuation des effets néfastes des RONS et la régénération des principales vitamines antioxydantes (l'ascorbate et l' α -tocophérol) [293] dont l'absorption est diminuée au cours de la FK [267]. Ce déficit en glutathion augmente le stress oxydant avec par exemple l'oxydation des protéines et la peroxydation lipidique [449]. Une peroxydation lipidique chronique a été démontrée par l'augmentation des niveaux de HNE et d'isoprostanes dans l'air expiré [309, 332, 436] et les lavages broncho-alvéolaires [310, 335] de patients; des molécules connues pour inhiber la synthèse de glutathion [306], stimuler l'inflammation [305] et inhiber l'activation de Nrf2 dont le rôle est important dans la réponse antioxydante [307]. Une

augmentation de la concentration d'H₂O₂ intracellulaire dans les cellules épithéliales fraîchement isolées de trachées des souris *Cfir*^{-/-} a été également récemment rapportée [450]. Enfin, une production élevée de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et IL-8) a été décrite dans le poumon [451] et la présence de plusieurs molécules pro-inflammatoires comme les prostaglandines, les thromboxanes et les leukotriènes a également été démontrée dans l'air expiré [452] et des lavages broncho-alvéolaires [453] de patients FK. La production chronique de telles molécules pro-inflammatoires est au cœur de l'activation de la cascade de signalisation cellulaire impliquée dans l'exagération de l'inflammation, l'augmentation du stress oxydant et ultimement l'apoptose [142].

6.1 STRESS OXYDANT ET CFRD

La manière dont le stress oxydant influence le développement du CFRD demeure encore mal documentée dans la physiopathologie de la FK. Cependant, la mise en évidence et l'importance de la manifestation d'un stress oxydant chronique, tel qu'établi au niveau pulmonaire, laisse suggérer un potentiel lien entre les évènements oxydatifs et la destruction des cellules β. De plus, il a été démontré que la survenue du CFRD est fortement associée à une détérioration de la fonction pulmonaire [23] qui est une conséquence directe du stress oxydant sur le tissu pulmonaire [454]. Par ailleurs, l'administration de traitements à base d'antioxydants améliore la fonction pulmonaire chez les patients FK [434] tout comme le traitement du CFRD améliore la fonction pulmonaire

[388]. Chez les patients diabétiques (type 1 et 2), la condition d'hyperglycémie engendre très souvent une détérioration de la fonction pulmonaire qui peut être restaurée par la prise d'antioxydants [455-457]. Puisque les produits dérivés du stress oxydant sont capables d'atteindre des organes distants du lieu de production et affecter leur fonctionnement [458], il est donc possible que certains sous-produits du stress oxydant émanant des poumons puissent atteindre le pancréas endocrine et exercer des effets néfastes

Par ailleurs, il a été démontré que la réponse inflammatoire anormale dans la FK n'est pas nécessairement associée à l'infection bactérienne [270, 271] puisqu'elle peut être présente chez des nourrissons sans infection patente [19]. Le dysfonctionnement du CFTR causé par la présence d'une mutation sévère comme celle du $\Delta F508$ [272] est associé à une amplification des processus inflammatoires [459, 460], même en absence de bactéries.

D'autre part, chez le patient FK et malgré l'absence de corrélation génotype-phénotype clairement établie dans la maladie, l'homozygotie pour la mutation $\Delta F508$ est fortement associée à l'insuffisance pancréatique et à l'apparition de fibrose pancréatique [18, 37-39]. L'insuffisance pancréatique étant étroitement associée à la survenue du CFRD [41, 461, 462], il semblerait que l'extension de la fibrose pancréatique exocrine jusqu'aux cellules endocrines soit associée à la perte progressive des cellules insulaires [463] et à l'apparition des troubles du métabolisme du glucose [396, 407, 464].

Afin de mieux comprendre la relation existant entre le stress oxydant et la survenue du CFRD durant le développement de la FK, le premier volet de nos travaux a consisté à évaluer le rôle du stress oxydant dans les étapes précoces de l'altération du métabolisme du glucose. Il est important de garder à l'esprit qu'une des difficultés essentielles pour répondre à cette question est l'absence de modèle animal approprié. En effet, parmi les modèles animaux disponibles pour étudier la FK, des modèles murins exclusivement, certains miment la pathologie respiratoire mais aucun ne semble présenter d'atteinte pancréatique endocrine similaire à la pathologie humaine observée dans le CFRD. Notre étude a donc été réalisée chez des enfants atteints de FK, impliquant bien évidemment des limites importantes tant en terme de nature qu'en terme de volume d'échantillons biologiques disponibles. Nous avons tout d'abord étudié la présence d'anomalies du métabolisme du glucose et leur corrélation avec les niveaux de marqueurs du stress oxydant, puis nous avons évalué si le changement de la tolérance au glucose était associé à une détérioration de la fonction pulmonaire. La présence d'un stress oxydant étant désormais bien établie dans la FK (poumon) mais aussi dans le diabète (hyperglycémie), nous avons examiné l'état redox et les marqueurs du stress oxydant durant la phase d'intolérance au glucose dans une population pédiatrique atteinte de FK. La mesure des niveaux de glutathion (oxydé et réduit) a été retenue comme un élément clé de la défense antioxydante puisque, comme nous l'avons mentionné auparavant, son déficit est capable d'engendrer des changements dans les niveaux des autres antioxydants et d'induire des dommages oxydants au niveau cellulaire [465, 466]. De plus, nous avons choisi d'évaluer le stress oxydant au niveau

sanguin par la quantification des adduits HNE-protéines pour les raisons suivantes : (i) leur demi-vie et leur stabilité sont supérieures à celles des RONS qui leur ont donné naissance; (ii) leur accumulation cellulaire dépend de la susceptibilité de l'organisme à dégrader les protéines modifiées [467]; et (iii) ils représentent un biomarqueur fiable du stress oxydant [468-470]. En tant que modulateur des voies de transduction du signal, régulateur des facteurs de transcription et inhibiteur de l'activité des protéines [468], le HNE pourrait jouer un rôle dans le développement de la FK et être impliqué dans le développement du CFRD.

Les résultats de notre étude ont confirmé la présence de troubles dans le métabolisme du glucose au sein de la population FK pédiatrique tel que rapporté dans les études de cohorte impliquant des sujets âgés de plus de 10 ans [471]. La mutation $\Delta F508$ était certes la plus répandue dans notre population, mais aucune association n'a été établie entre l'homozygotie $\Delta F508$ et l'altération du métabolisme du glucose comme l'ont suggéré certaines études [461, 462]. L'association entre le CFRD, l'insuffisance pancréatique [464] et la présence de la mutation $\Delta F508$ [37, 410, 462] n'a pas été confirmée dans notre étude, probablement du fait du faible nombre de patients présentant le diabète. De plus, les troubles du métabolisme du glucose n'étaient pas associés à une détérioration des fonctions pulmonaires contrairement aux données de la littérature [407]. Il a pourtant été montré qu'une glycémie élevée pouvait affecter la fonction pulmonaire en favorisant la croissance bactérienne, en altérant la réponse des cellules immunitaires et/ou exagérant la réponse

inflammatoire suite à l'infection bactérienne [472]. La détection précoce des troubles dans le métabolisme glucidique chez nos patients FK pourrait expliquer leurs fonctions pulmonaires ne sont pas encore affectées.

L'évaluation du stress oxydant par les adduits HNE-protéines a montré une augmentation du niveau de ce marqueur avec l'altération de la tolérance glucidique (Figure 2, Article #1). De plus, les patients présentant une intolérance glucidique et ayant reçu une intervention nutritionnelle ont vu leurs niveaux d'adduits HNE-protéines diminuer avec un retour à la normale de la tolérance au glucose. Par contre, les taux d'adduits HNE-protéines sont augmentés chez les patients devenus diabétiques (Table 4, Article #1). Cette observation vient appuyer l'existence d'un lien entre l'hyperglycémie et le stress oxydant dans la FK. En effet, la corrélation observée entre la glycémie et les niveaux d'adduits suggèrent que 16% de l'augmentation du niveau de glucose plasmatique est associé à une augmentation des niveaux de HNE-protéines sanguins et donc du stress oxydant. Comme nous l'avons présenté au début de ce document, le stress oxydant est un phénomène complexe capable d'affecter de nombreuses biomolécules avec des cinétiques différentes. Il est donc raisonnable de penser qu'avec l'utilisation d'autres marqueurs ou avec des évaluations plus fréquentes, on serait en mesure de mettre en évidence des changements dans les niveaux de stress oxydant précédant ceux du métabolisme du glucose dans la FK. Néanmoins, de telles démarches peuvent poser des problèmes et des limitations majeurs dans le cadre d'investigations chez l'Homme. Des études animales ont montré qu'une

administration exogène de HNE pouvait altérer la sécrétion d'insuline induite par le glucose [473]. Il est probable que l'augmentation du HNE ait affecté la fonction des cellules β des patients ayant participé à l'étude mais pas suffisamment pour induire une insulino-pénie franche. Il est également intéressant de noter que l'augmentation des niveaux de HNE-protéines survient de manière concomitante à la diminution des niveaux plasmatiques d'acides gras polyinsaturés n-6, particulièrement l'acide arachidonique (14%), confirmant la peroxydation lipidique suite au stress oxydant (évalué par le HNE, issu de la peroxydation des AGPI n-6) et l'implication de ce dernier dans la diminution de la sensibilité à l'insuline.

Parallèlement à l'augmentation des niveaux de HNE-protéines, nous avons observé une tendance à élévation des niveaux de GSH dans les érythrocytes avec l'apparition du CFRD (Table 3, Article #1). Une augmentation similaire du contenu lymphocytaire en GSH a été montrée chez des patients FK en présence d'infections pulmonaires [474]. Par conséquent, on peut dire que la production de GSH est accrue dans ces cellules en réponse à l'inflammation chronique et à l'augmentation du stress oxydant, deux composantes inter-reliées qui participent certainement à l'apparition et au maintien de l'altération de la tolérance au glucose durant la FK. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la synthèse de GSH n'est pas affectée, mais c'est plutôt sa distribution tissulaire qui a été trouvée perturbée par la présence d'une protéine du CFTR non fonctionnelle [475]. Nos résultats montrent que l'élimination urinaire du HNE évaluée par son principal métabolite,

le DHN-MA [315], est diminuée avec l'intolérance au glucose. Des études réalisées chez l'animal ont quant à elles montré une augmentation des niveaux de DHN-MA en présence de stress oxydant [476]. La diminution des niveaux urinaires de DHN-MA dans notre étude pourrait être associée à une mauvaise distribution inter-organes du GSH du fait de la présence d'une protéine dysfonctionnelle du CFTR au sein d'organes fortement exposés au stress oxydant. À la lumière de ces résultats, il est donc possible que l'augmentation du stress oxydant perturbe la fonction pancréatique, surtout la sécrétion de l'insuline, en causant une hyperglycémie responsable de la formation d'adduits HNE-protéines et de l'augmentation de l'inflammation durant la FK. La faible disponibilité et un déséquilibre dans la distribution inter-organes du GSH peut réduire sa conjugaison avec le HNE pour former, via la voie des mercapturates, le DHN-MA. Il est alors possible d'envisager que le HNE puisse se lier majoritairement aux protéines pour former des adduits avec des conséquences fonctionnelles associées au développement du CFRD.

En conclusion, le premier volet de notre étude chez des enfants confirme l'importance du test de tolérance au glucose dans la détection des anomalies de tolérance au glucose chez les patients atteints de FK. De plus, cette étude démontre un lien direct entre la glycémie et le stress oxydant durant la FK. Le HNE constitue un excellent biomarqueur du stress oxydant et les niveaux sanguins de HNE-protéines sont modulés par la tolérance au glucose chez les patients FK. La tendance à l'augmentation du glutathion dans les érythrocytes témoigne de son importance dans la lutte contre les dommages du stress oxydant afin de maintenir un équilibre redox optimal. Une mauvaise distribution du

glutathion causée par le mauvais fonctionnement de la protéine du CFTR pourrait favoriser la formation d'adduits HNE-protéines et réduire l'excrétion urinaire de DHN-MA. Des études de cohorte orientées vers l'analyse de l'impact de l'intervention nutritionnelle envers la progression du CFRD demeurent nécessaires.

6.2 STRESS OXYDANT ET SÉCRÉTION D'INSULINE

Le deuxième volet de nos travaux a consisté à clarifier notre compréhension des mécanismes impliquant le stress oxydant dans l'altération de la sécrétion d'insuline au niveau de la cellule pancréatique β . La sécrétion d'insuline est un processus physiologique qui repose sur l'accomplissement des étapes suivantes : 1) l'entrée du glucose dans la cellule; 2) le métabolisme du glucose via la voie de la glycolyse; 3) une augmentation du ratio ATP/ADP cytosolique; 4) la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants; 5) l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants; et 6) l'exocytose des granules d'insuline au niveau du RE [370-372]. Au cours de ces processus, les mécanismes d'ouverture et de fermeture des canaux sont influencés par l'état redox intracellulaire, notamment les concentrations de GSH et de NAD(P)H, puisque leur diminution perturbe la sécrétion de l'insuline [477, 478]. De manière générale, on pense que le stress oxydant affecte la sécrétion d'insuline en endommageant directement les lipides et protéines membranaires ainsi que la structure de l'ADN au sein de la cellule β [479] ou en induisant indirectement une baisse de la synthèse des nucléotides essentiels (NAD(P)H et ATP) dont

les concentrations régulent l'activité des canaux ioniques [375]. Des études réalisées *in vitro* montrent que le stress oxydant influence la sécrétion de l'insuline en interférant avec les flux calciques intracellulaires [480]. L'usage de vitamine E et de N-acétyl-cystéine (NAC) comme thérapie antioxydante dans les diabètes de type 1 et 2 ayant montré des effets bénéfiques dans la sécrétion de l'insuline [443], il devient clair que le maintien de l'équilibre de la balance oxydants/antioxydants est crucial pour un fonctionnement optimal de la cellule β .

Nous avons donc étudié l'impact du stress oxydant comme facteur clé de la sécrétion de l'insuline. Étant donné l'absence d'un modèle animal présentant un phénotype d'atteinte pancréatique endocrine associé à la fibrose kystique similaire à ce qui est observé chez l'Homme, nous avons travaillé sur un modèle murin de cellules pancréatiques β , les cellules β TC-tet. Ces cellules sont dérivées de souris transgéniques exprimant l'antigène SV40T (Tag) sous le contrôle des gènes régulés par la tétracycline (leur croissance pouvant être stoppée en réprimant le Tag en présence de tétracycline) [481]. Les cellules β TC-tet consistent en une lignée de cellules tumorales capables de répondre à la grande majorité de stimuli physiologiques impliqués dans la sécrétion d'insuline [481]. Ces cellules sont également reconnues pour maintenir une grande capacité de sécrétion d'insuline même en présence de faibles concentrations de glucose [444]. Nos conditions expérimentales représentent des conditions de challenge oxydant plus ou moins long, qui consistent à soumettre les cellules à une charge oxydante puis à évaluer les conséquences cellulaires

telles que la sécrétion d'insuline, l'oxydation des macromolécules cellulaires. Elles constituent ainsi un bon moyen d'évaluer les capacités d'adaptation, les défenses antioxydantes et leurs limites. Au-delà de l'artifice expérimental, il est important de considérer que ces expériences permettent de simuler certaines situations physiologiques puisque les cellules pancréatiques sont susceptibles d'être soumises à un stress oxydant intense avec de fortes augmentations de RONS. Le système pro-oxydant que nous avons choisi pour engendrer le stress oxydant est celui du mélange (fer-ascorbate). Comme mentionné plus haut dans ce document (sections 1.2.3.3.6 et 1.2.6.1), les métaux de transition tels que le fer sont connus pour jouer un rôle de catalyseur dans le processus d'oxydation des macromolécules biologiques, comme les protéines, l'ADN et les lipides [482]. Dans le cas des lipides, leur oxydation est induite par la formation d' HO^\bullet via la décomposition d' H_2O_2 (réaction de Fenton), qui réagit ensuite avec les AGPI afin d'initier la peroxydation lipidique [483] avec une cascade de réactions (Figure 20). En vertu de son faible potentiel redox, l'ascorbate réduit facilement le fer en lui cédant un électron, permettant ainsi la régénération du système [484, 485]. Divers travaux ont d'ailleurs souligné l'importance de la combinaison entre l'ascorbate et différents métaux dans l'oxydation des AGPI [234, 486] et dans la dégradation des composantes alimentaires [487]. Ce modèle de challenge oxydant (fer-ascorbate) a été utilisé dans plusieurs études réalisées au laboratoire particulièrement le cadre d'investigations sur les cellules intestinales [483, 488].

6.2.1 Stress oxydant, peroxydation lipidique et sécrétion d'insuline

Après vérification et validation du challenge oxydant au niveau des cellules β TC-tet, nos résultats ont mis en évidence que l'exposition de la cellule β au complexe (fer-ascorbate): 1) induit un processus de peroxydation lipidique; 2) augmente la sécrétion basale d'insuline; 3) diminue la réponse de la sécrétion d'insuline induite par le glucose; et 4) n'affecte que légèrement la synthèse *de novo* de l'insuline.

La présence du mélange (fer-ascorbate) dans le milieu de culture a entraîné une peroxydation lipidique marquée dans les cellules β TC-tet, fort probablement par l'oxydation des AGPI membranaires de la série n-6, avec une forte incidence sur l'acide arachidonique. Cette peroxydation est parallèle à une augmentation des niveaux d'adduits HNE-protéines et de MDA (Figure 3, Article #3), deux marqueurs reconnus dans la mesure du stress oxydant [311, 483] et associés à la peroxydation des acides gras n-6. La mesure de la stimulation de la sécrétion de l'insuline par le glucose, avec une gamme de concentrations allant d'une valeur de glycémie basale à jeun (4 mM) à un niveau supra-physiologique (20 mM), a permis de montrer que le mélange oxydant augmente la réponse sécrétoire des cellules β TC-tet en présence de concentrations de glucose basale. Par contre, on assiste à une altération du profil de sécrétion de l'insuline avec l'augmentation de la concentration de glucose (Figure 6, Article #3). De plus, l'analyse du contenu cellulaire en insuline a permis de montrer que le fer-ascorbate affecte uniquement le processus de

sécrétion et non la synthèse de l'hormone par les cellules β TC-tet (Figure 7, Article #3). Dans cette étude, l'augmentation des niveaux des marqueurs de la peroxydation lipidique et la déplétion en acides gras ont pu être réduits par le traitement des cellules avec le Trolox, un puissant antioxydant et analogue de la vitamine E. La présence du Trolox a également permis de neutraliser les effets néfastes du fer-ascorbate sur la sécrétion d'insuline, permettant aux cellules β TC-tet une réponse sécrétoire proportionnelle à la concentration de glucose dans le milieu. Nous avons donc pu établir que le mélange oxydant influence la sécrétion de l'insuline par les cellules β , très probablement par une accumulation intracellulaire d' H_2O_2 et la production d' HO^\bullet qui vont initier la peroxydation lipidique. Le Trolox, bien que dérivé de la vitamine E, n'est pas liposoluble. C'est un antioxydant hydrosoluble qui franchit très peu la membrane plasmique et qui par conséquent, exerce son activité de piègeur des RONS produits localement, principalement au niveau extracellulaire. Nos résultats montrent qu'il diminue significativement la production extracellulaire de RONS en limitant l'initiation de la peroxydation lipidique (Figure 3, Article #3). Cependant, l'utilisation d'une sonde intracellulaire sensible aux RONS montre que le Trolox inhibe également la production intracellulaire d' H_2O_2 , probablement en limitant son passage au niveau de la membrane plasmique (Figure 2, Article #3). Le traitement antioxydant à base de vitamine E a souvent été suggéré dans le diabète afin de réduire les événements oxydatifs associés à cette condition. Par son caractère lipophile, la vitamine E agit efficacement pour inhiber la production intracellulaire de RONS. Cependant, le Trolox nous démontre qu'en agissant de manière extracellulaire, il est capable non seulement de réduire la peroxydation lipidique membranaire mais de limiter

également la diffusion des RONS à travers la membrane cellulaire. La co-administration de Trolox et de vitamine E pourrait représenter une avenue thérapeutique dans la lutte contre les effets néfastes du stress oxydant. Cet aspect sera d'ailleurs discuté dans le dernier chapitre des perspectives de ce travail.

Dans la cellule β , la mitochondrie joue un rôle important dans la génération des signaux qui régulent le couplage du métabolisme du glucose et la sécrétion d'insuline [489, 490]. La synthèse mitochondriale d'ATP est un processus requis pour l'exocytose des granules d'insuline, mais ce processus est à l'origine d'une importante fuite d'électrons au sein de la chaîne respiratoire, fuite qui est fortement associée à la production de RONS [491]. La cellule β ayant une défense antioxydante relativement faible [492], elle doit en permanence ajuster ses défenses antioxydantes endogènes relativement au niveau des RONS puisqu'une augmentation chronique de ces derniers endommage l'ADN mitochondrial dans la pathologie du diabète de type 2 [377, 493]. De manière générale, la cellule β tente de se protéger contre les dommages du stress oxydant en activant des facteurs de transcription sensibles à l'état redox, notamment Nrf2, qui vont induire la synthèse des principales enzymes antioxydantes [252, 494]. Il est donc important de garder à l'esprit que la cellule β contrôle la sécrétion d'insuline induite par le glucose en assurant un équilibre optimal entre la production de RONS (endogène) et l'ajustement de la défense antioxydante à travers l'activation des voies de signalisation sensibles à l'état redox [494]. Cette production contrôlée de RONS est nécessaire pour le signal d'exocytose des granules

d'insuline puisqu'une augmentation de la synthèse d'enzymes antioxydantes, en réponse à une production incontrôlée de RONS, inhibe le processus [246].

L'impact des processus oxydants dans les mécanismes associés à la sécrétion de l'insuline dépend de la nature du stress oxydant (endogène ou exogène) et de son intensité (aiguë ou chronique). Il a été montré, par exemple, qu'un stress oxydant chronique comme c'est souvent le cas dans le cadre du diabète (types 1 et 2), va induire des dysfonctionnements dans la cellule β par l'inhibition de certains facteurs de transcription tels que Pdx-1 et MafA, impliqués dans la synthèse, la maturation et la sécrétion de l'insuline [359, 361]. Par ailleurs, des travaux réalisés *in vitro* sur la cellule β ont montré que le stress oxydant affecte différemment la sécrétion d'insuline dépendamment de la concentration en glucose présente dans le milieu. Dans des conditions de glycémie basse ou à jeun (2-5 mM), certaines molécules oxydantes comme l' H_2O_2 agissent comme seconds messagers [495, 496] dans le fonctionnement des canaux K_{ATP} [497] et calciques [498, 499]. En effet, il a été montré qu'une production transitoire d' H_2O_2 induit l'ouverture non sélective de canaux calciques au niveau de la cellule β , favorise l'entrée de calcium et active la sécrétion d'insuline [500, 501]. Dans les mêmes conditions, une production prolongée d' H_2O_2 va plutôt induire l'ouverture des canaux K_{ATP} , favoriser la sortie de potassium et inhiber la sécrétion d'insuline [502]. Au-delà des concentrations basales en glucose, le stress oxydant altère la sécrétion d'insuline en perturbant les flux calciques [480], particulièrement par l'inhibition de l'efflux de calcium de la mitochondrie vers le

cytosol via le transporteur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [503] dont l'activité régule la durée et l'intensité de la sécrétion d'insuline [504]. Il a par ailleurs été montré qu'une accumulation intracellulaire de calcium était associée à une augmentation de production d'espèces oxydantes [505]. De plus, l'inhibition de plusieurs enzymes clé du métabolisme énergétique (ex : aconitase et adénine-nucléotide translocase) par le stress oxydant a été établit depuis longtemps, réduisant ainsi la production de molécules d'ATP [506, 507]. Enfin, la diminution des niveaux d'ATP cytosolique altère le fonctionnement de la pompe sarco/endoplasmique présente dans le RE, indispensable à l'exocytose des granules d'insuline [508]. Nous avons regardé l'impact du stress oxydant sur la sécrétion d'insuline en incubant les cellules pendant 2h (stress aiguë) et 18h (stress chronique) avec le mélange fer-ascorbate. Au regard des autres études de la littérature, nos travaux semblent les premiers avec des temps d'incubation de 18h. Ils montrent qu'un stress oxydant chronique altère la sécrétion d'insuline dans des cellules $\beta\text{TC-tet}$ en diminuant la synthèse d'ATP (Figure 9, Article #3).

6.2.2 Stress oxydant, réponse antioxydante et inflammation

La deuxième étape de cette partie du travail a consisté à vérifier l'influence du stress oxydant sur les réponses antioxydantes et inflammatoires des cellules $\beta\text{TC-tet}$. Une surproduction de RONS dans des conditions de challenge oxydant et d'inflammation est associée à un profond dysfonctionnement de la cellule β [509] et à l'initiation de mécanismes de réponse au stress tels que l'apoptose [510]. Dans ces conditions, la capacité

antioxydante de la cellule β même si elle peut être considérée comme relativement faible, s'avère essentielle, non seulement pour le maintien du statut redox intracellulaire, mais aussi pour le maintien d'une sécrétion optimale d'insuline. L'étude de la relation entre la fonction de la cellule β et le stress oxydant α , à ce jour, porté particulièrement sur l'action de molécules pro-oxydantes sur la sécrétion d'insuline avec des temps d'incubation relativement courts [511, 512]. La modulation des mécanismes de défenses antioxydantes des cellules β suite à une incubation prolongée en présence d'agents pro-oxydants, a été très peu étudiée. Cependant, cette information et la compréhension des phénomènes impliqués sont d'autant plus pertinents dans le contexte du développement de maladies chroniques associées au stress oxydant dont fait partie la FK. Étant donné que, suite au challenge oxydant tant après 2h que 18h d'incubation, la production de RONS a clairement été établie dans les cellules β TC-tet avec une peroxydation lipidique, nous avons évalué l'effet du fer-ascorbate sur les mécanismes de défenses antioxydantes endogènes, l'état du statut redox et sur certains facteurs impliqués dans la génération de l'inflammation sur le long terme.

Dans cette étude, nous avons démontré que l'incubation des cellules β TC-tet en présence d'un mélange oxydant (fer-ascorbate) induit : 1) une augmentation du ratio GSH/GSSG; 2) une diminution des activités de la SOD mitochondriale et de la catalase; 3) aucun changement dans l'activité de la glutathion peroxydase; et 4) une augmentation de l'expression protéique de NF- κ B de manière proportionnelle à la diminution de celle de

I κ B. Nous avons choisi le ratio GSH/GSSG pour évaluer les effets du fer-ascorbate sur le statut redox cellulaire puisque, comme nous l'avons bien présenté précédemment, le glutathion est au centre de plusieurs mécanismes importants impliqués dans la défense antioxydante; ce ratio est d'ailleurs souvent utilisé comme un indicateur du statut redox cellulaire [229, 440]. Nous pensons que l'augmentation du ratio GSH/GSSG (Figure 5A, Article #3) constitue un moyen de réponse et d'adaptation de la cellule β TC-tet vis-à-vis du stress oxydant généré par le fer-ascorbate, la cellule augmentant la synthèse de glutathion réduit afin de préserver son statut redox intracellulaire.

Dans la cellule β comme dans un grand nombre d'autres types cellulaires, la réponse inflammatoire et le stress oxydant sont contrôlés à travers la régulation d'un facteur de transcription central, NF- κ B. Dans ce processus, l'activation du complexe I κ B kinase (I κ K) par différents stimuli conduit à la phosphorylation d'I κ B (inhibiteur cytoplasmique de NF- κ B), causant sa dissociation de NF- κ B et sa dégradation. La perte d'I κ B permet une translocation de NF- κ B (hétérodimère p50/p65) au noyau, facilitant la transcription de protéines pro-inflammatoires [513, 514]. Nous avons donc testé l'expression protéique du facteur I κ B dans les cellules β TC-tet dans le contexte du challenge avec le mélange (fer-ascorbate). Nos résultats démontrent que ce système pro-oxydant est capable de diminuer l'expression protéique d'I κ B, permettant ainsi la libération de NF- κ B (Figure 9, Article #3) et facilitant sa translocation au noyau où il va pouvoir induire la transcription de gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , IL-6 et IL-8.

En résumé, le deuxième volet de cette étude a permis de confirmer la forte susceptibilité de la cellule β vis-à-vis du stress oxydant et de mieux comprendre de quelle façon les RONS modulent la sécrétion de l'insuline. Cette étude montre clairement que la production de RONS représente un processus nécessaire à la sécrétion de l'insuline induite par le glucose. Bien que les cellules β soient considérées comme des cellules disposant de défenses antioxydantes limitées, l'efficacité de ces systèmes a néanmoins certaines capacités pour contenir l'oxydation de ses constituants face à une augmentation d'espèces réactives. Au-delà, les dommages oxydants augmentent alors de façon importante et témoignent que les défenses antioxydantes sont dépassées. De plus, un lien entre homéostasie redox et inflammation n'est pas à exclure dans le contexte du fonctionnement de la cellule β . Nos travaux sur les cellules β TC-tet nous ont permis de conclure qu'un stress oxydant chronique affecte premièrement le fonctionnement de la cellule β par une dégradation de ses AGPI, surtout ceux de la série n-6, via le processus de peroxydation lipidique. Deuxièmement, nous avons révélé que si le stress oxydant favorise la sécrétion de l'insuline pour des concentrations basales de glucose, la cellule β devient incapable de maintenir une sécrétion d'insuline en présence de stress oxydant soutenu et en réponse à des concentrations croissantes en glucose. Finalement, il semble que le stress oxydant altère la défense antioxydante endogène avec un impact sur le statut redox qui se traduit par une activation de la réponse inflammatoire. Dans nos conditions expérimentales, le stress oxydant a affecté l'activité de la CAT et de la SOD mitochondriale, sans effet majeur sur la glutathion peroxydase, probablement du fait d'une augmentation de la synthèse du GSH par les cellules β TC-tet.

Les expériences de challenge oxydant mettent donc en évidence une fragilité des cellules β lorsqu'elles sont placées dans une situation de stress à long terme. Durant la FK, la vulnérabilité des cellules β face au stress oxydant semble accrue à cause des anomalies redox induites par l'absence et/ou le dysfonctionnement du canal CFTR. L'on peut donc supposer que les cellules ayant un CFTR non fonctionnel subiront plus facilement les effets néfastes des ROS en présence du stress oxydant.

En conclusion, nos études ont permis de préciser l'importance du stress oxydant sur les étapes précoces de l'altération de la tolérance glucidique au cours de la FK, mais aussi d'investiguer les causes probables du dysfonctionnement de la cellule β en présence d'un challenge oxydant. Tel que montré dans d'autres contextes cellulaires, selon sa nature et son intensité, le stress oxydant peut affecter l'intégrité de molécules cellulaires telles que les lipides polyinsaturés ou certaines protéines avec des conséquences fonctionnelles et/ou activer certaines voies de signalisation dont celle du NF- κ B sensibles à l'état redox, avec de façon globale, des effets sur la sécrétion de l'insuline par la cellule β . Ce type cellulaire dispose de défenses antioxydantes limitées dont l'efficacité pour contenir l'oxydation de ses constituants peut être dépassée face à un stress oxydant qui s'établit de manière permanente. Nos travaux suggèrent ainsi qu'il peut exister dans le contexte de la FK avec une inflammation et un stress oxydant chroniques, une dérégulation de la cellule β s'exerçant à plusieurs niveaux pouvant conduire au développement du CFRD. De plus, au-

delà de ces effets qui ont été montrés sur les cellules pulmonaires et maintenant pancréatiques, ces processus pourraient affecter de façon similaire d'autres types cellulaires exprimant la protéine du CFTR.

Nos résultats suggèrent que la modulation du stress oxydant dans la prise en charge thérapeutique du CFRD devrait favoriser les apports en antioxydants exogènes afin de limiter des processus d'oxydation jouant un rôle dans la progression de la maladie. Des études sur des cellules β provenant de modèles animaux de la FK, bien qu'imparfaites, devraient permettre d'élucider plus précisément les mécanismes de la sécrétion de l'insuline durant la maladie. Elles demeurent un outil incontournable dans la compréhension de l'impact d'un stress oxydant chronique sur la fonction pancréatique endocrine en général et la survenue du CFRD en particulier.

7 PERSPECTIVES

L'étude des anomalies cellulaires liées au défaut de CFTR a permis au cours des deux dernières décennies, de relier cette protéine à de nombreuses fonctions cellulaires. En effet, ce canal anionique régulateur de l'activité d'autres transporteurs est représenté au carrefour de modules fonctionnels tels que les transports ioniques, l'inflammation, la défense antimicrobienne, la synthèse et la sécrétion de mucus, etc. Plusieurs travaux soutiennent l'hypothèse selon laquelle le CFTR serait un acteur important de l'homéostasie redox [515-517] . Et comme nous venons de le voir à travers notre travail, un lien entre inflammation et homéostasie redox n'est pas à exclure dans le contexte du fonctionnement de la cellule β . Cependant, à ce jour, de nombreuses questions restent posées pour comprendre comment l'absence d'un canal anionique de la membrane plasmique peut compromettre l'équilibre redox cellulaire, en influant sur des paramètres comme le niveau de GSH cellulaire, la sécrétion d'insuline et la production nette de RNOS tels que l' H_2O_2 et la formation d'adduits HNE-protéines. Néanmoins, nos résultats suggèrent que la modulation du stress oxydant pourrait faire partir de l'approche thérapeutique du CFRD. La diminution du glutathion et le stress oxydant bien identifié au niveau pulmonaire chez les patients atteints de FK ont d'ailleurs déjà conduit à différents essais thérapeutiques basés sur l'utilisation d'antioxydants dans la pathologie pulmonaire.

Bilan des essais thérapeutiques avec des traitements antioxydants dans la FK

Principalement, deux types de supplémentations ont été effectués avec des administrations par voie orale ou en aérosol. Des essais thérapeutiques visant à augmenter la concentration cellulaire de glutathion par supplémentation orale de GSH, ou de précurseurs du GSH tels que le NAC et le lactosérum ont été menés dans le cadre de plusieurs études sur des patients atteints de FK [518-520]. Elles ont montrées que le lactosérum est capable d'augmenter le niveau de GSH lymphocytaire et que le NAC a une certaine capacité à réduire la production d'IL-8 ainsi que le nombre de neutrophiles dans les expectorations des patients. Ces effets n'ont cependant pas été associés à une amélioration significative de la fonction pulmonaire.

Par ailleurs, l'administration par aérosol de Nacystelyn (NAL), un antioxydant thiolé, n'a pas démontré d'effets bénéfiques sur la fonction pulmonaire mais une amélioration de la viscoélasticité du mucus et une diminution des infections [521, 522]. Le GSH administré par aérosol a donné des résultats encourageants sur la fonction pulmonaire, la prise de poids, la réponse immunitaire et la diminution de la charge bactérienne [523-526]. Cependant, ce type de traitement ne semble pas avoir d'effets sur les marqueurs de stress oxydant.

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont révélé l'existence d'un stress oxydant augmenté au cours des changements de tolérance au glucose durant la FK. Ils soulignent par conséquent l'intérêt potentiel de traitements antioxydants adaptés afin de pouvoir prévenir le développement du CFRD. Depuis plusieurs années, des approches thérapeutiques antioxydantes ont été utilisées et développées pour des pathologies pulmonaires telles que l'asthme, les maladies pulmonaires obstructives chroniques, le syndrome de détresse respiratoire mais aussi un peu dans le cadre de la maladie pulmonaire de la FK tel que mentionné précédemment, maladies où le stress oxydant est fortement impliqué dans la pathogenèse. Certaines de ces avancées thérapeutiques pourraient être envisagées dans l'atteinte pancréatique de la FK, en particulier celles visant à (i) stimuler l'expression des systèmes antioxydants, (ii) rétablir l'équilibre redox cellulaire à l'aide d'antioxydants, et/ou (iii) limiter la peroxydation lipidique.

1 - Stimuler l'expression d'enzymes antioxydantes : Nrf2 est un des facteurs de transcription sensible à l'état redox qui active la transcription de nombreux gènes d'enzymes antioxydantes en se fixant sur la/les séquence(s) ARE (Antioxidant Responsive Element) au niveau de leur région promotrice. L'activation de Nrf2 pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante; d'autant plus qu'il existe actuellement un activateur pharmacologique de Nrf2 en cours d'évaluation : le CDDO-Im [527, 528]

2 - Rétablir l'équilibre redox cellulaire à l'aide d'antioxydants : l'utilisation d'enzymes mimétiques ouvre des perspectives intéressantes. Ceci est particulièrement pertinent dans le contexte d'un système cellulaire où les capacités antioxydantes sont relativement basses. L'étude du fonctionnement des sites catalytiques d'enzymes antioxydantes a conduit au développement de petites molécules organiques possédant des propriétés catalytiques similaires, molécules appelées enzymes mimétiques. Trois séries de superoxyde dismutase mimétiques ont été développées : les ligands macrocycliques, les metallo-porphyrine et les salens. Un exemple de ligands macrocycliques est le SOD-M40403, un tampon d' $O_2^{\bullet-}$ [529], est actuellement évalué dans plusieurs essais cliniques de phase I et II. Les mimétiques de type métallo-porphyrines possèdent une activité SOD et catalase et montrent une capacité tampon pour l' $O_2^{\bullet-}$ [530] le H_2O_2 [531], l' $ONOO^-$ [532] et les lipides peroxydés [533]. Ces molécules se sont révélées efficaces contre le stress et l'inflammation dans plusieurs modèles animaux de maladies humaines [517]. Enfin, les salens possèdent une activité tampon pour l' $O_2^{\bullet-}$, l' H_2O_2 [534] et l' $ONOO^-$ [535] et ont montré des propriétés protectrices contre le stress oxydant dans plusieurs modèles animaux de maladies humaines [517]. Il existe des glutathion peroxydase mimétiques dont la plus étudiée est l'Ebselen qui est actuellement en essai clinique de phase II et a également fait la preuve d'efficacité dans plusieurs modèles animaux de maladies humaines [536].

De plus, étant donné que la mitochondrie peut potentiellement être un lieu important de production de ROS, un certain nombre d'antioxydants cationiques lipophiles (antioxydants couplés à des cations lipophiles comme le triphenylphosphonium) ont été développés afin

d'être dirigés dans la mitochondrie : la SOD-40403 (MitoSOD), l'Ebselen (MitoPrx), le TEMPOL (MitoTEMPOL), l'ubiquinone (MitoQ), la vitamine E (MitoE) et l'acide lipoïque (MitoLip) [537] MitoQ est d'ailleurs actuellement en phase II d'essais cliniques pour la maladie de Parkinson et l'hépatite C.

3 - Limiter spécifiquement la peroxydation lipidique. L' α -tocophérol, un antioxydant naturel relativement efficace contre la peroxydation des lipides membranaires a été considéré depuis longtemps. Cependant, du fait de sa faible vitesse de réaction avec les ROS et de sa faible capacité à être recyclé par les systèmes endogènes, d'importantes doses sont nécessaires pour qu'il produise un effet antioxydant. De plus, la plupart des patients atteints de FK étant carencés en vitamine E, très probablement en raison de la malabsorption associée aux dysfonctionnements hépatiques, intestinaux et pancréatiques, la supplémentation est déjà courante et aucun effet majeur sur la fonction pulmonaire ou pancréatique n'a été rapporté à ce jour. Nos résultats avec le Trolox suggèrent que la combinaison de molécules pourrait avoir un intérêt. Par ailleurs, une série de composés, les 4,6-di-tert-butyl-2,3-dihydro-5-benzofuranols, ont été développés pour palier aux limitations cliniques de l' α -tocophérol [538]. Des études *in vitro* ont montré que ces composés inhibent la peroxydation lipidique de manière plus efficace que la vitamine E. Le BO-653 est d'ailleurs actuellement en phase d'essai préclinique pour des patients souffrant de maladie pulmonaire obstructive chronique.

Il existe donc une série d'avenues d'explorations pour (i) une meilleure compréhension des mécanismes associés au stress oxydant, au dysfonctionnement pancréatique et au développement du CFRD dans la FK et (ii) une meilleure prise en charge thérapeutique du CFRD.

8 RÉFÉRENCES

- [1] Dupuis A., Hamilton D., Cole D.E., Corey M. Cystic fibrosis birth rates in Canada: a decreasing trend since the onset of genetic testing. *J Pediatr* ;**147**:312-5;2005.
- [2] Laberge A.M., Michaud J., Richter A., Lemoyre E., Lambert M., Brais B. et al. Population history and its impact on medical genetics in Quebec. *Clin Genet* ;**68**:287-301;2005.
- [3] Andersen D.H. Therapy and prognosis of fibrocystic disease of the pancreas. *Pediatrics* ;**3**:406-17;1949.
- [4] Sant'Agnese P., Darling R.C., Perara G.A., Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas. *AMA Am J Dis Child* ;**86**:618-9;1953.
- [5] Quinton P.M. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* ;**301**:421-2;1983.
- [6] Tsui L.C., Buchwald M., Barker D., Braman J.C., Knowlton R., Schumm J.W. et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science* ;**230**:1054-7;1985.
- [7] Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* ;**245**:1059-65;1989.
- [8] Riordan J.R., Rommens J.M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* ;**245**:1066-73;1989.
- [9] Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* ;**245**:1073-80;1989.
- [10] Hyde S.C., Emley P., Hartshorn M.J., Mimmack M.M., Gileadi U., Pearce S.R. et al. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* ;**346**:362-5;1990.
- [11] Pilewski J.M., Frizzell R.A. Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* ;**79**:S215-S255;1999.

- [12] Steward M.C., Ishiguro H., Case R.M. Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annu Rev Physiol* ;**67**:377-409;2005.
- [13] Kopelman H., Durie P., Gaskin K., Weizman Z., Forstner G. Pancreatic fluid secretion and protein hyperconcentration in cystic fibrosis. *N Engl J Med* ;**312**:329-34;1985.
- [14] Gillespie J. I., Hedley C., Greenwell J.R., Argent B.E. Chloride-bicarbonate exchange in isolated rat pancreatic acini. *Q J Exp Physiol* ;**74**:883-95;1989.
- [15] Gray M.A., Plant S., Argent B.E. cAMP-regulated whole cell chloride currents in pancreatic duct cells. *Am J Physiol* ;**264**:C591-C602;1993.
- [16] Gaskin K.J., Durie P.R., Corey M., Weir P., Forstner G.G. Evidence for a primary defect of pancreatic HCO₃-secretion in cystic fibrosis. *Pediatr Res* ;**16**:554-7;1982.
- [17] Dray X., Zinzindohoue F., Cuillerier E., Cugnenc P.H., Barbier J.P., Marteau P. [Acute pancreatitis revealing cystic fibrosis in an adult]. *Gastroenterol Clin Biol* ;**23**:974-7;1999.
- [18] Durie P.R. Pancreatic aspects of cystic fibrosis and other inherited causes of pancreatic dysfunction. *Med Clin North Am* ;**84**:609-20;2000.
- [19] Munck A. [Digestive symptoms in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* ;**10 Suppl 2**:333s-7s;2003.
- [20] Kopelman H., Corey M., Gaskin K., Durie P., Weizman Z., Forstner G. Impaired chloride secretion, as well as bicarbonate secretion, underlies the fluid secretory defect in the cystic fibrosis pancreas. *Gastroenterology* ;**95**:349-55;1988.
- [21] Atlas A.B., Orenstein S.R., Orenstein D.M. Pancreatitis in young children with cystic fibrosis. *J Pediatr* ;**120**:756-9;1992.
- [22] Dray X., Hubert D., Munck A., Moreau J., Marteau P. [Digestive complications in adults with cystic fibrosis]. *Gastroenterol Clin Biol* ;**29**:1279-85;2005.
- [23] Costa M., Potvin S., Berthiaume Y., Gauthier L., Jeanneret A., Lavoie A. et al. Diabetes: a major co-morbidity of cystic fibrosis. *Diabetes Metab* ;**31**:221-32;2005.

- [24] Gregory P. C. Gastrointestinal pH, motility/transit and permeability in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* ;**23**:513-23;1996.
- [25] Cox K.L., Isenberg J.N., Amment M.E. Gastric acid hypersecretion in cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* ;**1**:559-65;1982.
- [26] Dowsett J. An overview of nutritional issues for the adult with cystic fibrosis. *Nutrition* ;**16**:566-70;2000.
- [27] Ionescu A.A., Nixon L.S., Luzio S., Lewis-Jenkins V., Evans W.D., Stone M.D. et al. Pulmonary function, body composition, and protein catabolism in adults with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* ;**165**:495-500;2002.
- [28] Schoni M.H., Casaulta-Aebischer C. Nutrition and lung function in cystic fibrosis patients: review. *Clin Nutr* ;**19**:79-85;2000.
- [29] Stalvey M.S., Flotte T.R. Endocrine parameters of cystic fibrosis: Back to basics. *J Cell Biochem* ;**108**:353-61;2009.
- [30] Vankeerberghen A., Cuppens H., Cassiman J.J. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* ;**1**:13-29;2002.
- [31] Bienvenu T. [Cystic fibrosis: relationship between genotype and phenotype]. *Arch Pediatr* ;**10 Suppl 2**:318s-24s;2003.
- [32] Zielenski J., Tsui L.C. Cystic fibrosis: genotypic and phenotypic variations. *Annu Rev Genet* ;**29**:777-807;1995.
- [33] Haardt M., Benharouga M., Lechardeur D., Kartner N., Lukacs G.L. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* ;**274**:21873-7;1999.
- [34] Benharouga M., Haardt M., Kartner N., Lukacs G.L. COOH-terminal truncations promote proteasome-dependent degradation of mature cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from post-Golgi compartments. *J Cell Biol* ;**153**:957-70;2001.

- [35] Sharma M., Pam pinella F., Ne mes C., Benharouga M., So J., Du K. et al. Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol* ;**164**:923-33;2004.
- [36] Tsui L.C., Durie P. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Hosp Pract (Minneap)* ;**32**:115-9, 134, passim;1997.
- [37] Kerem E., Corey M., Kerem B.S., Rommens J., Markiewicz D., Levison H. et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). *N Engl J Med* ;**323**:1517-22;1990.
- [38] Johansen H.K., Nir M., Hoiby N., Koch C., Schwartz M . Severity of cystic fibrosis in patients homozygous and heterozygous for delta F508 mutation. *Lancet* ;**337**:631-4;1991.
- [39] Borgo G., Mastella G., Gasparini P., Zorzanello A., Doro R., Pignatti P.F. Pancreatic function and gene deletion F508 in cystic fibrosis. *J Med Genet* ;**27**:665-9;1990.
- [40] Kristidis P., Bozon D., Corey M., Markiewicz D., Rommens J., Tsui L.C. et al. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* ;**50**:1178-84;1992.
- [41] Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. *N Engl J Med* ;**329**:1308-13;1993.
- [42] Hubert D., Bienvenu T., Smazes-Dufeu N., Fajac I., Lacronique J., Matran R. et al. Genotype-phenotype relationships in a cohort of adult cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* ;**9**:2207-14;1996.
- [43] Loubieres Y., Grenet D., Simon-Bouy B., Medioni J., Landais P., Ferec C. et al. Association between genetically determined pancreatic status and lung disease in adult cystic fibrosis patients. *Chest* ;**121**:73-80;2002.
- [44] Merlo C.A., Boyle M.P. Modifier genes in cystic fibrosis lung disease. *J Lab Clin Med* ;**141**:237-41;2003.
- [45] Mekus F., Ballmann M., Bronsveld I., Bijman J., Vezeze H., Tummler B. Categories of deltaF508 homozygous cystic fibrosis twin and sibling pairs with distinct phenotypic characteristics. *Twin Res* ;**3**:277-93;2000.

- [46] Lester L.A., Kraut J., Lloyd-Still J., Karrison T., Mott C., Billstrand C. et al. Delta F508 genotype does not predict disease severity in an ethnically diverse cystic fibrosis population. *Pediatrics* ;**93**:114-8;1994.
- [47] Bronsveld I., Mekus F., Bijman J., Ballmann M., de Jonge H.R., Laabs U. et al. Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings. *J Clin Invest* ;**108**:1705-15;2001.
- [48] Aron Y., Polla B.S., Bienvenu T., Dall'ava J., Dusser D., Hubert D. HLA class II polymorphism in cystic fibrosis. A possible modifier of pulmonary phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* ;**159**:1464-8;1999.
- [49] Grasemann H., Knauer N., Buscher R., Hubner K., Drazen J.M., Ratjen F. Airway nitric oxide levels in cystic fibrosis patients are related to a polymorphism in the neuronal nitric oxide synthase gene. *Am J Respir Crit Care Med* ;**162**:2172-6;2000.
- [50] Doring G., Krogh-Johansen H., Weidinger S., Hoiby N. Allotypes of alpha 1-antitrypsin in patients with cystic fibrosis, homozygous and heterozygous for deltaF508. *Pediatr Pulmonol* ;**18**:3-7;1994.
- [51] Sliker M.G., Sanders E.A., Rijkers G.T., Ruven H.J., van der Ent C.K. Disease modifying genes in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* ;**4 Suppl 2**:7-13;2005.
- [52] Garred P., Pressler T., Madsen H.O., Frederiksen B., Svejgaard A., Hoiby N. et al. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest* ;**104**:431-7;1999.
- [53] Turner M.W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* ;**40**:423-9;2003.
- [54] Mahadeva R., Westerbeek R.C., Perry D.J., Lovegrove J.U., Whitehouse D.B., Carroll N.R. et al. Alpha1-antitrypsin deficiency alleles and the Taq-I G->A allele in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* ;**11**:873-9;1998.
- [55] Zielenski J., Corey M., Rozmahel R., Markiewicz D., Aznarez I., Casals T. et al. Detection of a cystic fibrosis modifier locus for meconium ileus on human chromosome 19q13. *Nat Genet* ;**22**:128-9;1999.

- [56] Fichou Y., Genin E., Le M.C., Audreze t M.P., Scotet V., F errec C. Estimating the age of CFTR mutations predominantly found in Brittany (Western France). *J Cyst Fibros* ;**7**:168-73;2008.
- [57] Hamosh A., Fitzsimmons S.C., Macek M., Jr., Knowles M.R., Rosenstein B.J., Cutting G.R. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *J Pediatr* ;**132**:255-9;1998.
- [58] Yamashiro Y., Shimizu T., Oguchi S., Shioya T., Nagata S., Ohtsuka Y. The estimated incidence of cystic fibrosis in Japan. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* ;**24**:544-7;1997.
- [59] Anderson C.M., Allan J., Johansen P. G. Comments on the possible existence and nature of a heterozygote advantage in cystic fibrosis. *Bibl Paediatr* ;**86**:381-7;1967.
- [60] Rodman D.M., Zamudio S. The cystic fibrosis heterozygote--advantage in surviving cholera? *Med Hypotheses* ;**36**:253-8;1991.
- [61] Gabriel S.E., Brimman K.N., Koller B.H., Boucher R.C., Stutts M.J. Cystic fibrosis heterozygote resistance to cholera toxin in the cystic fibrosis mouse model. *Science* ;**266**:107-9;1994.
- [62] Goldstein J.L., Sahi J., Bhuvana M., Layden T.J., Rao M.C. Escherichia coli heat-stable enterotoxin-mediated colonic Cl⁻ secretion is absent in cystic fibrosis. *Gastroenterology* ;**107**:950-6;1994.
- [63] Hogenauer C., Santa Ana C.A., Porter J.L., Millard M., Gelfand A., Rosenblatt R.L. et al. Active intestinal chloride secretion in human carriers of cystic fibrosis mutations: an evaluation of the hypothesis that heterozygotes have subnormal active intestinal chloride secretion. *Am J Hum Genet* ;**67**:1422-7;2000.
- [64] Lukacs G.L., Mohamed A., Kartner N., Chang X.B., Riordan J.R., Grinstein S. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J* ;**13**:6076-86;1994.
- [65] Ward C.L., Kopito R. R. Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem* ;**269**:25710-8;1994.

- [66] Kopito R.R. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev* ;**79**:S167-S173;1999.
- [67] Chang X.B., Hou Y.X., Jensen T.J., Riordan J.R. Mapping of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane topology by glycosylation site insertion. *J Biol Chem* ;**269**:18572-5;1994.
- [68] Scanlin T.F., Glick M.C. Terminal glycosylation in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* ;**1455**:241-53;1999.
- [69] Chen E.Y., Bartlett M.C., Clarke D.M. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator has an altered structure when its maturation is inhibited. *Biochemistry* ;**39**:3797-803;2000.
- [70] Scanlin T.F., Glick M.C. Glycosylation and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Respir Res* ;**2**:276-9;2001.
- [71] Sheppard D.N., Welsh M.J. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev* ;**79**:S23-S45;1999.
- [72] Li M., McCann J.D., Anderson M.P., Clancy J.P., Liedtke C.M., Nairn A.C. et al. Regulation of chloride channels by protein kinase C in normal and cystic fibrosis airway epithelia. *Science* ;**244**:1353-6;1989.
- [73] Hanrahan J.W., Wioland M.A. Revisiting cystic fibrosis transmembrane conductance regulator structure and function. *Proc Am Thorac Soc* ;**1**:17-21;2004
- [74] Anderson M.P., Gregory R.J., Thompson S., Souza D.W., Paul S., Mulligan R.C. et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* ;**253**:202-5;1991.
- [75] Riordan J.R. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol* ;**67**:701-18;2005.
- [76] Tabcharani J.A., Chang X.B., Riordan J.R., Hanrahan J.W. Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* ;**352**:628-31;1991.
- [77] Berger H.A., Travis S.M., Welsh M.J. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by specific protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* ;**268**:2037-47;1993.

- [78] Jia Y., Mathews C.J., Hanrahan J.W. Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J Biol Chem* ;**272**:4978-84;1997.
- [79] Cheung J.C., Kim C.P., Pasyk S., Bear C.E. Molecular basis for the ATPase activity of CFTR. *Arch Biochem Biophys* ;**476**:95-100;2008.
- [80] Baker J.M., Hudson R.P., Kanelis V., Choy W.Y., Thibodeau P.H., Thomas P.J. et al. CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices. *Nat Struct Mol Biol* ;**14**:738-45;2007.
- [81] Li H., Cai Z., Chen J.H., Ju M., Xu Z., Sheppard D.N. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel: a versatile engine for transepithelial ion transport. *Sheng Li Xue Bao* ;**59**:416-30;2007.
- [82] Collins F.S. Cystic fibrosis: molecular biology and the therapeutic implications. *Science* ;**256**:774-9;1992.
- [83] Zielenski J., Rozmahel R., Bozon D., Kerem B., Grzelczak Z., Riordan J.R. et al. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* ;**10**:214-28;1991
- [84] Akabas M.H., Cheung M., Guinamard R. Probing the structural and functional domains of the CFTR chloride channel. *J Bioenerg Biomembr* ;**29**:453-63;1997.
- [85] Cheung M., Akabas M.H. Locating the anion-selectivity filter of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) chloride channel. *J Gen Physiol* ;**109**:289-99;1997.
- [86] Tabcharani J.A., Rommens J.M., Hou Y.X., Chang X. B., Tsui L.C., Riordan J.R. et al. Multi-ion pore behaviour in the CFTR chloride channel. *Nature* ;**366**:79-82;1993.
- [87] Linsdell P., Tabcharani J.A., Rommens J.M., Hou Y.X., Chang X.B., Tsui L.C. et al. Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions. *J Gen Physiol* ;**110**:355-64;1997.
- [88] Quinton P.M. The neglected ion: HCO₃⁻. *Nat Med* ;**7**:292-3;2001.

- [89] Kogan I., Ramjee Singh M., Li C., Kidd J.F., Wang Y., Leslie E.M. et al. CFTR directly mediates nucleotide-regulated glutathione flux. *EMBO J* ;**22**:1981-9;2003.
- [90] Linsdell P., Hanrahan J.W. . Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* ;**275**:C323-C326;1998.
- [91] Gao L., Kim K.J., Yankaskas J.R., Forman H.J. Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia. *Am J Physiol* ;**277**:L113-L118;1999.
- [92] Jentsch T.J., Stein V., Weinreich F., Zdebik A.A. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* ;**82**:503-68;2002.
- [93] Bear C.E., Duguay F., Naismith A.L., Kartner N., Hanrahan J.W., Riordan J.R. Cl⁻ channel activity in *Xenopus* oocytes expressing the cystic fibrosis gene. *J Biol Chem* ;**266**:19142-5;1991.
- [94] Schwiebert E.M., Benos D.J., Egan M.E., Stutts M.J., Guggino W.B. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev* ;**79**:S145-S166;1999.
- [95] Loussouarn G., Demolombe S., Mohammedi-Panah R., Escande D., Baro I. Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K⁺ currents. *Am J Physiol* ;**271**:C1565-C1573;1996.
- [96] Lee M.G., Choi J.Y., Luo X., Strickland E., Thomas P.J., Muallem S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal Cl⁻. *J Biol Chem* ;**274**:14670-7;1999.
- [97] Lee M.G., Wigley W.C., Zeng W., Noel L.E., Marino C.R., Thomas P.J. et al. Regulation of Cl⁻. *J Biol Chem* ;**274**:3414-21;1999.
- [98] Choi J.Y., Muallem D., Kiselyov K., Lee M.G., Thomas P.J., Muallem S. Aberrant CFTR-dependent. *Nature* ;**410**:94-7;2001.
- [99] Sollner T., Whiteheart S.W., Brunner M., Erdjument-Bromage H., Geromanos S., Tempst P. et al. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* ;**362**:318-24;1993.
- [100] Naren A.P., Quick M.W., Collawn J.F., Nelson D.J., Kirk K.L. Syntaxin 1A inhibits CFTR chloride channels by means of domain-specific protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;**95**:10972-7;1998.

- [101] Naren A.P., Cormet-Boyaka E., Fu J., Villain M., Blalock J.E., Quick M.W. et al. CFTR chloride channel regulation by an interdomain interaction. *Science* ;**286**:544-8;1999.
- [102] Ganeshan R., Di A., Nelson D.J., Quick M.W., Kirk K.L. The interaction between syntaxin 1A and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels is mechanistically distinct from syntaxin 1A-SNARE interactions. *J Biol Chem* ;**278**:2876-85;2003.
- [103] Thelin W.R., Chen Y., Gentsch M., Kreda S.M., Sallee J.L., Scarlett C.O. et al. Direct interaction with filamins modulates the stability and plasma membrane expression of CFTR. *J Clin Invest* ;**117**:364-74;2007.
- [104] Wang S., Raab R.W., Schatz P. J., Guggino W.B., Li M. Peptide binding consensus of the NHE-RF-PDZ1 domain matches the C-terminal sequence of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *FEBS Lett* ;**427**:103-8;1998.
- [105] Short D.B., Trotter K.W., Reczek D., Kreda S.M., Bretscher A., Boucher R.C. et al. An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem* ;**273**:19797-801;1998.
- [106] Cheng J., Moyer B.D., Milewski M., Loffing J., Ikeda M., Mickle J.E. et al. A Golgi-associated PDZ domain protein modulates cystic fibrosis transmembrane regulator plasma membrane expression. *J Biol Chem* ;**277**:3520-9;2002.
- [107] Moyer B.D., Duhaim M., Shaw C., Denton J., Reynolds D., Karlson K.H. et al. The PDZ-interacting domain of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is required for functional expression in the apical plasma membrane. *J Biol Chem* ;**275**:27069-74;2000.
- [108] Haardt M., Benharouga M., Lechardeur D., Kartner N., Lukacs G.L. C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation. *J Biol Chem* ;**274**:21873-7;1999.
- [109] Hegedus T., Sessler T., Scott R., Thelin W., Bakos E., Varadi A. et al. C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its interaction with PDZ proteins. *Biochem Biophys Res Commun* ;**302**:454-61;2003.

- [110] Cheng J., Wang H., Guggino W.B. Modulation of mature cystic fibrosis transmembrane regulator protein by the PDZ domain protein CAL. *J Biol Chem* ;**279**:1892-8;2004.
- [111] Li C., Naren A.P. Macromolecular complexes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its interacting partners. *Pharmacol Ther* ;**108**:208-23;2005.
- [112] Barasch J., Kiss B., Prince A., Saiman L., Gruenert D., Al-Awqati Q. Defective acidification of intracellular organelles in cystic fibrosis. *Nature* ;**352**:70-3;1991.
- [113] Elgavish A. High intracellular pH in CFPAC: a pancreas cell line from a patient with cystic fibrosis is lowered by retrovirus-mediated CFTR gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* ;**180**:342-8;1991.
- [114] Di A., Brown M.E., Deriy L.V., Li C., Szeto F.L., Chen Y. et al. CFTR regulates phagosome acidification in macrophages and alters bactericidal activity. *Nat Cell Biol* ;**8**:933-44;2006.
- [115] Jarry T.M., Cheung A.L. Staphylococcus aureus escapes more efficiently from the phagosome of a cystic fibrosis bronchial epithelial cell line than from its normal counterpart. *Infect Immun* ;**74**:2568-77;2006.
- [116] Kong F., Young L., Chen Y., Ran H., Meyers M., Joseph P. et al. Pseudomonas aeruginosa pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. *Cell Microbiol* ;**8**:1121-33;2006.
- [117] Jaffe A., Bush A. Cystic fibrosis: review of the decade. *Monaldi Arch Chest Dis* ;**56**:240-7;2001.
- [118] Linsdell P. Thiocyanate as a probe of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel pore. *Can J Physiol Pharmacol* ;**79**:573-9;2001.
- [119] Fragoso M.A., Fernandez V., Forteza R., Randell S.H., Salathe M., Conner G.E. Transcellular thiocyanate transport by human airway epithelia. *J Physiol* ;**561**:183-94;2004

- [120] Gerson C., Sabater J., Scuri M., Torbati A., Coffey R., Abraham J.W. et al. The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* ;**22**:665-71;2000.
- [121] Vandivier R.W., Richens T.R., Horstmann S.A., deCathelineau A.M., Ghosh M., Reynolds S.D. et al. Dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits phagocytosis of apoptotic cells with proinflammatory consequences. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* ;**297**:L677-L686;2009.
- [122] Jouret F., Devuyst O. CFTR and defective endocytosis: new insights in the renal phenotype of cystic fibrosis. *Pflugers Arch* ;**457**:1227-36;2009.
- [123] Bertrand C.A., Frizzell R.A. The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* ;**285**:C1-18;2003.
- [124] Proesmans M., Vermeylen F., De Boeck K. What's new in cystic fibrosis? From treating symptoms to correction of the basic defect. *Eur J Pediatr* ;**167**:839-49;2008.
- [125] Taccetti G., Campana S., Festini F., Mascherini M., Doring G. Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* ;**26**:458-61;2005.
- [126] Krivan H.C., Ginsburg V., Roberts D.D. *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliosylceramide (asialo GM1) and gangliosylceramide (asialo GM2). *Arch Biochem Biophys* ;**260**:493-6;1988.
- [127] Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M., Schwab U., Cekici A., Meyer K.C. et al. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* ;**109**:317-25;2002.
- [128] Balough K., McCubbin M., Weinberger M., Smits W., Ahrens R., Fick R. The relationship between infection and inflammation in the early stages of lung disease from cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* ;**20**:63-70;1995.
- [129] Konstan M.W., Hilliard K.A., Norvell T.M., Berger M. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* ;**150**:448-54;1994.

- [130] Conese M, Copreni E. Di Gioia S, De Renaldi P, Fumarulo R. Neutrophil recruitment and airway epithelial cell involvement in chronic cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros* 2(3): 129-135. 2003.
- [131] Ollero M., Brouillard F., Edelman A. Cystic fibrosis enters the proteomics scene: new answers to old questions. *Proteomics* ;6:4084-99;2006.
- [132] Sies H., Casden E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* ;311:617-31;1985.
- [133] Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* ;69:965-8;1991.
- [134] Halliwell B., Grootveld M. The measurement of free radical reactions in humans. Some thoughts for future experimentation. *FEBS Lett* ;213:9-14;1987.
- [135] Roberts L.J., Morrow J.D. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* ;28:505-13;2000.
- [136] Morel Y., Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* ;342 Pt 3:481-96;1999.
- [137] Urtasun R., Conde de la Rosa L., Nieto N. Oxidative and nitrosative stress and fibrogenic response. *Clin Liver Dis* ;12:769-90;2008.
- [138] Leung P.S., Chan Y.C. Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. *Antioxid Redox Signal* ;11:135-65;2009.
- [139] Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* ;39:44-84;2007.
- [140] Masella R., Di B.R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* ;16:577-86;2005.
- [141] Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* ;31:261-72;1999.

- [142] Stocker R., Keaney J.F., Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* ;**84**:1381-478;2004.
- [143] Babior B.M., Woodman R.C. Chronic granulomatous disease. *Semin Hematol* ;**27**:247-59;1990.
- [144] Fridovich I. Super oxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* ;**264**:7761-4;1989.
- [145] Maly F.E. The B lymphocyte: a newly recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. *Free Radic Res Commun* ;**8**:143-8;1990.
- [146] Babbs C.F., Cregor M.D., Turek J. J., Badylak S.F. Endothelial superoxide production in buffer perfused rat lungs, demonstrated by a new histochemical technique. *Lab Invest* ;**65**:484-96;1991.
- [147] Murrell G.A., Francis M.J., Bromley L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* ;**265**:659-65;1990.
- [148] Kehrer J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* ;**149**:43-50;2000.
- [149] Liochev S.I. The mechanism of "Fenton-like" reactions and their importance for biological systems. A biologist's view. *Met Ions Biol Syst* ;**36**:1-39;1999.
- [150] Kakhlon O., Cabantchik Z.I. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). *Free Radic Biol Med* ;**33**:1037-46;2002.
- [151] Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* ;**284**:805-8;1999.
- [152] Halliwell B., Gutteridge J.M. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* ;**307**:108-12;1992.
- [153] Fam S.S., Morrow J.D. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review. *Curr Med Chem* ;**10**:1723-40;2003.
- [154] Stocker R., Keaney J.F., Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* ;**84**:1381-478;2004.

- [155] Moncada S., Higgs E.A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* ;**21**:361-74;1991.
- [156] Rush J.W., Denniss S.G., Graham D.A. Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. *Can J Appl Physiol* ;**30**:442-74;2005.
- [157] Jeremy J.Y., Yim A.P., Wan S., Angelini G.D. Oxidative stress, nitric oxide, and vascular disease. *J Card Surg* ;**17**:324-7;2002.
- [158] Beckman K.B., Ames B.N. The free radical theory of aging mutations. *Physiol Rev* ;**78**:547-81;1998.
- [159] Kirsch M., Korth H.G., Sustmann R., de G.H. The pathobiochemistry of nitrogen dioxide. *Biol Chem* ;**383**:389-99;2002.
- [160] Hochscheid R., Schuchmann U., Kotte E., Kranz S., Heinrichs S., Muller B. NO₂-induced acute and chronic lung injury cause imbalance of glutathione metabolism in type II pneumocytes. *Med Sci Monit* ;**11**:BR273-BR279;2005.
- [161] Jayaraman S., Gantz D.L., Gursky O. Effects of oxidation on the structure and stability of human low-density lipoprotein. *Biochemistry* ;**46**:5790-7;2007.
- [162] Byun J., Mueller D.M., Fabjan J. S., Heinecke J.W. Nitrogen dioxide radical generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-nitrite system promotes lipid peroxidation of low density lipoprotein. *FEBS Lett* ;**455**:243-6;1999.
- [163] Bartesaghi S., Valez V., Trujillo M., Peluffo G., Romero N., Zhang H. et al. Mechanistic studies of peroxynitrite-mediated tyrosine nitration in membranes using the hydrophobic probe N-t-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester. *Biochemistry* ;**45**:6813-25;2006.
- [164] Vissers M.C., Stern A., Kuypers F., van den B.J., Winterbourn C.C. Membrane changes associated with lysis of red blood cells by hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* ;**16**:703-12;1994.
- [165] Winterbourn C.C. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of the oxidant to hypochlorite. *Biochim Biophys Acta* ;**840**:204-10;1985.

- [166] Pattison D.I., Davies M.J. Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds. *Chem Res Toxicol* ;**14**:1453-64;2001.
- [167] Jezek P., Plecita-Hlavata L. Mitochondrial reticulum network dynamics in relation to oxidative stress, redox regulation, and hypoxia. *Int J Biochem Cell Biol* ;**41**:1790-804;2009.
- [168] Lambert A.J., Brand M.D. Reactive oxygen species production by mitochondria. *Methods Mol Biol* ;**554**:165-81;2009.
- [169] Freeman B.A., Crapo J.D. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem* ;**256**:10986-92;1981.
- [170] Murphy E., Bers D., Rizzuto R. Mitochondria: from basic biology to cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* ;**46**:765-6;2009.
- [171] Korshunov S.S., Skulachev V.P., Starikov A.A. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* ;**416**:15-8;1997.
- [172] Sohal R.S., Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* ;**273**:59-63;1996.
- [173] Wallace D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* ;**283**:1482-8;1999.
- [174] Turrens J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* ;**552**:335-44;2003.
- [175] Chance B., Sies H., Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* ;**59**:527-605;1979.
- [176] Naqui A., Chance B. Enhanced superoxide dismutase activity of pulsed cytochrome oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* ;**136**:433-7;1986.
- [177] Griendling K.K., Sorescu D., Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* ;**86**:494-501;2000.
- [178] Lambeth J.D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Radic Biol Med* ;**43**:332-47;2007.

- [179] Lambeth J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* ;**4**:181-9;2004.
- [180] Banfi B., Molnar G., Maturana A., St eger K., Hegedus B., De maurex N. et al. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* ;**276**:37594-601;2001.
- [181] Ambasta R.K., Kumar P., Griendling K.K., Schmidt H.H., Busse R., Brandes R.P. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem* ;**279**:45935-41;2004.
- [182] Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* ;**33**:774-97;2002.
- [183] Pacher P., Nivorozhkin A., Szabo C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol Rev* ;**58**:87-114;2006.
- [184] Spiekermann S., Landmesser U., Dikalov S., Brecht M., Gammertz G., Tatge H. et al. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* ;**107**:1383-9;2003.
- [185] Guthikonda S., Sinkey C., Barenz T., Haynes W.G. Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation* ;**107**:416-21;2003.
- [186] Cardillo C., Kilcoyne C.M., Cannon R.O., III, Quyyum i A.A., Panza J.A. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* ;**30**:57-63;1997.
- [187] Farquharson C.A., Butler R., Hill A., Belch J.J., Struthers A.D. Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation* ;**106**:221-6;2002.
- [188] Fahn S., Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* ;**32**:804-12;1992.
- [189] Cai H., Harrison D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* ;**87**:840-4;2000.

- [190] Forstermann U., Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* ;**113**:1708-14;2006.
- [191] Landmesser U., Dikalov S., Price S.R., McCann L., Fukai T., Holland S.M. et al. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* ;**111**:1201-9;2003.
- [192] Mueller C.F., Widder J.D., McNally J.S., McCann L., Jones D.P., Harrison D.G. The role of the multidrug resistance protein-1 in modulation of endothelial cell oxidative stress. *Circ Res* ;**97**:637-44;2005.
- [193] Wassmann S., Wassmann K., Nickenig G. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* ;**44**:381-6;2004.
- [194] Hunt N.H., Stocker R. Oxidative stress and the redox status of malaria-infected erythrocytes. *Blood Cells* ;**16**:499-526;1990.
- [195] Plantin-Carrenard E., Bernard M., Derappe C., Bringuier A., Vadrot N., Feldmann G. et al. Differential responses of proliferative and non-proliferative leukemia cells to oxidative stress. *Free Radic Res* ;**39**:1-13;2005.
- [196] Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* ;**33**:337-49;2002.
- [197] Petersen S.V., Oury T.D., Valnickova Z., Thogersen I.B., Hojrup P., Crapo J.D. et al. The dual nature of human extracellular superoxide dismutase: one sequence and two structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;**100**:13875-80;2003.
- [198] White C.W., Ghezzi P., McMahon S., Dinarello C.A., Repine J.E. Cytokines increase rat lung antioxidant enzymes during exposure to hyperoxia. *J Appl Physiol* ;**66**:1003-7;1989.
- [199] Tsan M.F., White J.E., Treanor C., Shaffer J.B. Molecular basis for tumor necrosis factor-induced increase in pulmonary superoxide dismutase activities. *Am J Physiol* ;**259**:L506-L512;1990.
- [200] Jornot L., Junod A.F. Response of human endothelial cell antioxidant enzymes to hyperoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* ;**6**:107-15;1992.

- [201] Pietarinen -Runtti P., Raivio K.O., Saksela M., Asikainen T.M., Kinnula V.L. Antioxidant enzyme regulation and resistance to oxidants of human bronchial epithelial cells cultured under hyperoxic conditions. *Am J Respir Cell Mol Biol* ;**19**:286-92;1998.
- [202] Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* ;**27**:951-65;1999.
- [203] Ho Y.S., Magneat J.L., Bronson R.T., Cao J., Gargano M., Sugawara M. et al. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* ;**272**:16644-51;1997.
- [204] Chu F.F., Esworthy R.S., Ho Y.S., Bernheimer M., Swiderek K., Elliott R.W. Expression and chromosomal mapping of mouse Gpx2 gene encoding the gastrointestinal form of glutathione peroxidase, GPX-GI. *Biomed Environ Sci* ;**10**:156-62;1997.
- [205] Wingler K., Muller C., Schmehl K., Florian S., Brigelius-Flohe R. Gastrointestinal glutathione peroxidase prevents transport of lipid hydroperoxides in CaCo-2 cells. *Gastroenterology* ;**119**:420-30;2000.
- [206] Esworthy R.S., Mann J.R., Sam M., Chu F.F. Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from gamma-irradiation damage. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* ;**279**:G426-G436;2000.
- [207] Esworthy R.S., Aranda R., Martin M.G., Doroshov J.H., Binder S.W., Chu F.F. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* ;**281**:G848-G855;2001.
- [208] Chu F.F., Esworthy R.S., Chu P.G., Longmate J.A., Huycke M.M., Wilczynski S. et al. Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer Res* ;**64**:962-8;2004.
- [209] Esworthy R.S., Binder S.W., Doroshov J.H., Chu F.F. Microflora trigger colitis in mice deficient in selenium-dependent glutathione peroxidase and induce Gpx2 gene expression. *Biol Chem* ;**384**:597-607;2003.
- [210] Maiorino M., Thomas J.P., Girotti A.W., Ursini F. Reactivity of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase with membrane and lipoprotein lipid hydroperoxides. *Free Radic Res Commun* ;**12-13 Pt 1**:131-5;1991.

- [211] Sattler W., Maiorino M., Stocker R. Reduction of HDL- and LDL-associated cholesterylester and phospholipid hydroperoxides by phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and Ebselen (PZ 51). *Arch Biochem Biophys* ;**309**:214-21;1994.
- [212] Roveri A., Casasco A., Maiorino M., Dallan P., Calligaro A., Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *J Biol Chem* ;**267**:6142-6;1992.
- [213] Roveri A., Maiorino M., Ursini F. Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* ;**233**:202-12;1994.
- [214] Pfeifer H., Conrad M., Roethlischein D., Kyriakopoulos A., Brielmüller M., Bornkamm G.W. et al. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J* ;**15**:1236-8;2001.
- [215] Imai H., Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* ;**34**:145-69;2003.
- [216] Sakamoto H., Imai H., Nakagawa Y. Involvement of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the modulation of prostaglandin D2 synthesis. *J Biol Chem* ;**275**:40028-35;2000.
- [217] Nomura K., Imai H., Koumura T., Nakagawa Y. Involvement of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as an antiapoptotic factor. *Biol Signals Recept* ;**10**:81-92;2001.
- [218] Conrad M., Moreno S.G., Sinowatz F., Ursini F., Kolle S., Roveri A. et al. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol* ;**25**:7637-44;2005.
- [219] Imai H., Nakagawa Y. [Novel function of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase as antiapoptotic factor]. *Seikagaku* ;**72**:1344-8;2000.

- [220] Chae H.Z., Kim H.J., Kang S.W., Rhee S.G. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract* ;**45**:101-12;1999.
- [221] Spyrou G., Enmark E., Miranda-Vizuet A., Gustafsson J. Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* ;**272**:2936-41;1997.
- [222] Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* ;**264**:13963-6;1989.
- [223] May J.M., Cobb C.E., Mendiratta S., Hill K. E., Burk R.F. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by thioredoxin reductase. *J Biol Chem* ;**273**:23039-45;1998.
- [224] Ballatori N., Krance S.M., Noinboom S., Shi S., Tieu K., Hammond C.L. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* ;**390**:191-214;2009.
- [225] Gate L., Paul J., Ba G.N., Tew K. D., Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother* ;**53**:169-80;1999.
- [226] DeLeve L.D., Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* ;**52**:287-305;1991.
- [227] Fang Y.Z., Yang S., Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* ;**18**:872-9;2002.
- [228] Lei X.G. In vivo antioxidant role of glutathione peroxidase: evidence from knockout mice. *Methods Enzymol* ;**347**:213-25;2002.
- [229] Schafer F.Q., Buettner G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* ;**30**:1191-212;2001.
- [230] Miller L.T., Watson W.H., Kirlin W.G., Ziegler T.R., Jones D.P. Oxidation of the glutathione/glutathione disulfide redox state is induced by cysteine deficiency in human colon carcinoma HT29 cells. *J Nutr* ;**132**:2303-6;2002.
- [231] Frei B., England L., Ames B.N. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;**86**:6377-81;1989.

- [232] Sharma M.K., Buettner G.R. Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: an ESR study. *Free Radic Biol Med* ;**14**:649-53;1993.
- [233] Frei B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am J Clin Nutr* ;**54**:1113S-8S;1991.
- [234] Carr A., Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* ;**13**:1007-24;1999.
- [235] Squadrito G.L., Cueto R., Splenser A.E., Valavanidis A., Zhang H., Uppu R.M. et al. Reaction of uric acid with peroxynitrite and implications for the mechanism of neuroprotection by uric acid. *Arch Biochem Biophys* ;**376**:333-7;2000.
- [236] Neuzil J., Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J Biol Chem* ;**269**:16712-9;1994.
- [237] Dennery P.A., McDonagh A.F., Spitz D.R., Rodgers P.A., Stevenson D.K. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic Biol Med* ;**19**:395-404;1995.
- [238] Jiang Q., Ames B.N. Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *FASEB J* ;**17**:816-22;2003.
- [239] Hensley K., Benaksas E.J., Bolli R., Comp P., Grammas P., Hamdheydari L. New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxyethylhydrochroman metabolites in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* ;**36**:1-15;2004.
- [240] Crane F.L., Bottger M. Plasma membrane redox systems. *Protoplasma* ;**217**:1-2;2001.
- [241] Forsmark-Andree P., Dallner G., Ernster L. Endogenous ubiquinol prevents protein modification accompanying lipid peroxidation in beef heart submitochondrial particles. *Free Radic Biol Med* ;**19**:749-57;1995.
- [242] Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C., Chapelle J.P. [Oxidative stress]. *Rev Med Liege* ;**62**:628-38;2007.
- [243] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* ;**82**:47-95;2002.

- [244] Barouki R., Morel Y. [Biological targets of oxidative stress]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu* ;65-73;2001.
- [245] Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M. R. Cell signaling and the glutathione redox system. *Biochem Pharmacol* ;64:1057-64;2002.
- [246] Forman H.J., Fukuto J.M., Torres M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol* ;287:C246-C256;2004.
- [247] Cooper C.E., Patel R.P., Brookes P. S., Darley-Usmar V.M. Nanotransducers in cellular redox signaling: modification of thiols by reactive oxygen and nitrogen species. *Trends Biochem Sci* ;27:489-92;2002.
- [248] Barford D. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. *Curr Opin Struct Biol* ;14:679-86;2004.
- [249] Ullrich V., Namgaladze D., Frein D. Superoxide as inhibitor of calcineurin and mediator of redox regulation. *Toxicol Lett* ;139:107-10;2003.
- [250] Sumbayev V.V., Yasinska I.M. Regulation of MAP kinase-dependent apoptotic pathway: implication of reactive oxygen and nitrogen species. *Arch Biochem Biophys* ;436:406-12;2005.
- [251] Gomez-Lazaro M., Galindo M.F., Concannon C.G., Segura M.F., Fernandez-Gomez F.J., Llecha N. et al. 6-Hydroxydopamine activates the mitochondrial apoptosis pathway through p38 MAPK-mediated, p53-independent activation of Bax and PUMA. *J Neurochem* ;104:1599-612;2008.
- [252] Itoh K., Tong K.I., Yamamoto M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* ;36:1208-13;2004.
- [253] Kobayashi M., Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv Enzyme Regul* ;46:113-40;2006.
- [254] Karin M., Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* ;18:621-63;2000.

- [255] Rahman I., Marwick J., Kirkham P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF-kappaB and pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* ;**68**:1255-67;2004.
- [256] Scheidereit C. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* ;**25**:6685-705;2006.
- [257] Yamamoto Y., Gaynor R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* ;**107**:135-42;2001.
- [258] Uchida K., Shiraishi M., Naito Y., Torii Y., Nakamura Y., Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem* ;**274**:2234-42;1999.
- [259] Kunsch C., Medford R. M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* ;**85**:753-66;1999.
- [260] Pritts T., Hungness E., Wang Q., Robb B., Hershko D., Hasselgren P.O. Mucosal and enterocyte IL-6 production during sepsis and endotoxemia--role of transcription factors and regulation by the stress response. *Am J Surg* ;**183**:372-83;2002.
- [261] Shaulian E., Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* ;**4**:E131-E136;2002.
- [262] Michalik L., Wahli W. Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair. *J Clin Invest* ;**116**:598-606;2006.
- [263] Desvergne B., Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* ;**20**:649-88;1999.
- [264] Delerive P., Fruchart J.C., Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* ;**169**:453-9;2001.
- [265] Staels B., Koenig W., Habib A., Merval R., Lebret M., Torra I.P. et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* ;**393**:790-3;1998.

- [266] Ricote M., Li A.C., Willson T.M., Kelly C.J., Glass C.K. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* ;**391**:79-82;1998.
- [267] Wood L.G., Gibson P.G., Garg M.L. Circulating markers to assess nutritional therapy in cystic fibrosis. *Clin Chim Acta* ;**353**:13-29;2005.
- [268] Schroeder T.H., Lee M.M., Yacono P.W., Cannon C.L., Gerceker A.A., Golan D.E. et al. CFTR is a pattern recognition molecule that extracts Pseudomonas aeruginosa LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;**99**:6907-12;2002.
- [269] Cannon C.L., Kowalski M.P., Stopak K.S., Pier G.B. Pseudomonas aeruginosa-induced apoptosis is defective in respiratory epithelial cells expressing mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Am J Respir Cell Mol Biol* ;**29**:188-97;2003.
- [270] Courtney J.M., Dunbar K.E., McDowell A., Moore J.E., Warke T.J., Stevenson M. et al. Clinical outcome of Burkholderia cepacia complex infection in cystic fibrosis adults. *J Cyst Fibros* ;**3**:93-8;2004.
- [271] Cantin A. Cystic fibrosis lung inflammation: early, sustained, and severe. *Am J Respir Crit Care Med* ;**151**:939-41;1995.
- [272] Khan T.Z., Wagener J.S., Bost T., Martinez J., Accurso F.J., Riches D.W. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* ;**151**:1075-82;1995.
- [273] Tabary O., Zahm J.M., Hinnrasky J., Couetil J.P., Cornillet P., Guenounou M. et al. Selective up-regulation of chemokine IL-8 expression in cystic fibrosis bronchial gland cells in vivo and in vitro. *Am J Pathol* ;**153**:921-30;1998.
- [274] Bonfield T.L., Panuska J.R., Konstantin M.W., Hilliard K.A., Hilliard J.B., Ghnaim H. et al. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* ;**152**:2111-8;1995.
- [275] Adcock I.M., Caramori G., Chung K.F. New targets for drug development in asthma. *Lancet* ;**372**:1073-87;2008.
- [276] Perez-Echarri N., Perez-Matute P., Marcos-Gomez B., Bana M.J., Marti A., Martinez J.A. et al. Differential inflammatory status in rats susceptible or resistant

- to diet-induced obesity: effects of EPA ethyl ester treatment. *Eur J Nutr* ;**47**:380-6;2008.
- [277] Romieu I., Garcia-Esteban R., Sunyer J., Rios C., Caraz-Zubeldia M., Velasco S.R. et al. The effect of supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids on markers of oxidative stress in elderly exposed to PM(2.5). *Environ Health Perspect* ;**116**:1237-42;2008.
- [278] Kang J.X., Weylandt K.H. Modulation of inflammatory cytokines by omega-3 Fatty acids. *Subcell Biochem* ;**49**:133-43;2008.
- [279] Levy E., Lepage G., Bendayan M., Ronco N., Thibault L., Galeano N. et al. Relationship of decreased hepatic lipase activity and lipoprotein abnormalities to essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis patients. *J Lipid Res* ;**30**:1197-209;1989.
- [280] Pencharz P.B., Durie P.R. Nutritional management of cystic fibrosis. *Annu Rev Nutr* ;**13**:111-36;1993.
- [281] Coste T.C., Arm and M., Lebacqz J., Lebecque P., Wallemacq P., Leal T. An overview of monitoring and supplementation of omega 3 fatty acids in cystic fibrosis. *Clin Biochem* ;**40**:511-20;2007.
- [282] Freedman S.D., Blanco P.G., Zaman M.M., Shea J.C., Ollero M., Hopper I.K. et al. Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N Engl J Med* ;**350**:560-9;2004.
- [283] Murakami M., Kudo I., Inoue K. Molecular nature of phospholipases A2 involved in prostaglandin I2 synthesis in human umbilical vein endothelial cells. Possible participation of cytosolic and extracellular type II phospholipases A2. *J Biol Chem* ;**268**:839-44;1993.
- [284] Strandvik B., Svensson E., Seyberth H.W. Prostanoid biosynthesis in patients with cystic fibrosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* ;**55**:419-25;1996.
- [285] Chase H.P., Dupont J. Abnormal levels of prostaglandins and fatty acids in blood of children with cystic fibrosis. *Lancet* ;**2**:236-8;1978.
- [286] Rigas B., Korenberg J.R., Merrill W.W., Levine L. Prostaglandins E2 and E2 alpha are elevated in saliva of cystic fibrosis patients. *Am J Gastroenterol* ;**84**:1408-12;1989.
- [287] Carpagnano G.E., Barnes P.J., Geddes D.M., Hodson M.E., Kharitonov S.A. Increased leukotriene B4 and interleukin-6 in exhaled breath condensate in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* ;**167**:1109-12;2003.

- [288] Greally P., Hussein M.J., Cook A.J., Sampson A.P., Piper P.J., Price J.F. Sputum tumour necrosis factor-alpha and leukotriene concentrations in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* ;**68**:389-92;1993.
- [289] Konstan MW B.M. Current understanding of the inflammatory process in cystic fibrosis: onset and etiology. *Pediatr Pulmonol* **24**, 137-142. 1997.
- [290] Harper T.B., Chase H.P., Henson J., Henson P.M. Essential fatty acid deficiency in the rabbit as a model of nutritional impairment in cystic fibrosis. In vitro and in vivo effects on lung defense mechanisms. *Am Rev Respir Dis* ;**126**:540-7;1982.
- [291] Roum J.H., Buhl R., McElvaney N.G., Borok Z., Crystal R.G. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* ;**75**:2419-24;1993.
- [292] Hudson V.M. Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. *Free Radic Biol Med* ;**30**:1440-61;2001.
- [293] Thanislass J., Raveendran M., Devaraj H. Buthionine sulfoximine-induced glutathione depletion. Its effect on antioxidants, lipid peroxidation and calcium homeostasis in the lung. *Biochem Pharmacol* ;**50**:229-34;1995.
- [294] Chapple I.L. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *J Clin Periodontol* ;**24**:287-96;1997.
- [295] Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* ;**11**:81-128;1991.
- [296] Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* ;**42**:318-43;2003.
- [297] Aldini G., le-Donne I., Vistoli G., Maffei F.R., Carini M. Covalent modification of actin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE): LC-ESI-MS/MS evidence for Cys374 Michael adduction. *J Mass Spectrom* ;**40**:946-54;2005.
- [298] Cracowski J.L. Isoprostanes as a tool to investigate oxidative stress in scleroderma spectrum disorders--advantages and limitations. *Rheumatology (Oxford)* ;**45**:922-3;2006.

- [299] Michel F., Bonnefont-Rousselot D., Mas E., Draï J., Therond P. [Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects]. *Ann Biol Clin (Paris)* ;**66**:605-20;2008.
- [300] Carini M., Aldini G., Facino R.M. Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins. *Mass Spectrom Rev* ;**23**:281-305;2004.
- [301] Rahman I., Tomasi A. 2nd International Meeting on Free Radicals in Health and Disease. The role of oxidants and antioxidants in the regulation of chronic diseases, may 8-12, 2002, Istanbul, Turkey. *Free Radic Res* ;**37**:349-54;2003.
- [302] Bouhafis R.K., Samuelson A., Jarstrand C. Lipid peroxidation of lung surfactant due to reactive oxygen species released from phagocytes stimulated by bacteria from children with cystic fibrosis. *Free Radic Res* ;**37**:909-17;2003.
- [303] Fayon M., Chiron R., Abely M. [Measurement of pulmonary inflammation in cystic fibrosis]. *Rev Mal Respir* ;**25**:705-24;2008.
- [304] Gardner H.W., Hamberg M. Oxygenation of (3Z)-nonenal to (2E)-4-hydroxy-2-nonenal in the broad bean (*Vicia faba* L.). *J Biol Chem* ;**268**:6971-7;1993.
- [305] Poli G. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol Aspects Med* ;**21**:49-98;2000.
- [306] Parola M., Robino G., Dianzani M.U. 4-hydroxy-2,3-alkenals as molecular mediators of oxidative stress in the pathogenesis of liver fibrosis (review). *Int J Mol Med* ;**4**:425-32;1999.
- [307] Zhang H., Forman H.J. Signaling pathways involved in phase II gene induction by alpha, beta-unsaturated aldehydes. *Toxicol Ind Health* ;**25**:269-78;2009.
- [308] Kumagai T., Kawamoto Y., Nakamura Y., Hatayama I., Satoh K., Osawa T. et al. 4-hydroxy-2-nonenal, the end product of lipid peroxidation, is a specific inducer of cyclooxygenase-2 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* ;**273**:437-41;2000.
- [309] Rahman I., van Schadewijk A.A., Crowther A.J., Hiemstra P.S., Stolk J., MacNee W. et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* ;**166**:490-5;2002.

- [310] Gaggar A., Li Y., Weathington N., Winkler M., Kong M., Jackson P. et al. Matrix metalloprotease-9 dysregulation in lower airway secretions of cystic fibrosis patients. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* ;**293**:L96-L104;2007.
- [311] Ntimbane T., Krishnamoorthy P., Huot C., Legault L., Jacob S.V., Brunet S. et al. Oxidative stress and cystic fibrosis-related diabetes: a pilot study in children. *J Cyst Fibros* ;**7**:373-84;2008.
- [312] Siems W., Grune T. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med* ;**24**:167-75;2003.
- [313] Laurent A., Perdu-Durand E., Alary J., Debrauwer L., Cravedi J.P. Metabolism of 4-hydroxynonenal, a cytotoxic product of lipid peroxidation, in rat precision-cut liver slices. *Toxicol Lett* ;**114**:203-14;2000.
- [314] Srivastava S., Dixit B.L., Cai J., Sharma S., Hurst H.E., Bhatnagar A. et al. Metabolism of lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal (HNE) in rat erythrocytes: role of aldose reductase. *Free Radic Biol Med* ;**29**:642-51;2000.
- [315] Alary J., Gueraud F., Cravedi J.P. Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways. *Mol Aspects Med* ;**24**:177-87;2003.
- [316] Okada K., Wangpoengtrakul C., Osawa T., Toyokuni S., Tanaka K., Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. Identification of proteasomes as target molecules. *J Biol Chem* ;**274**:23787-93;1999.
- [317] Hecker M., Ullrich V. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis. *J Biol Chem* ;**264**:141-50;1989.
- [318] Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci* ;**48**:301-9;1991.
- [319] Portal B.C., Richard M.J., Faure H.S., Hadjian A.J., Favier A.E. Altered antioxidant status and increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* ;**61**:843-7;1995.
- [320] Lepage G., Champagne J., Ronco N., Lamarre A., Osberg I., Sokol R.J. et al. Supplementation with carotenoids corrects increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr* ;**64**:87-93;1996.

- [321] Dominguez C., Gartner S., Linan S., Cobos N., Moreno A. Enhanced oxidative damage in cystic fibrosis patients. *Biofactors* ;**8**:149-53;1998.
- [322] Brown R.K., Kelly F.J. Role of free radicals in the pathogenesis of cystic fibrosis. *Thorax* ;**49**:738-42;1994.
- [323] Wood L.G., Fitzgerald D.A., Gibson P.G., Cooper D. M., Collins C.E., Garg M.L. Oxidative stress in cystic fibrosis: dietary and metabolic factors. *J Am Coll Nutr* ;**20**:157-65;2001.
- [324] Back E.I., Frindt C., Nohr D., Frank J., Ziebach R., Stern M. et al. Antioxidant deficiency in cystic fibrosis: when is the right time to take action? *Am J Clin Nutr* ;**80**:374-84;2004.
- [325] Ciabattini G., Davi G., Collura M., Iapichino L., Pardo F., Ganci A. et al. In vivo lipid peroxidation and platelet activation in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* ;**162**:1195-201;2000.
- [326] Morrow J.D., Hill K.E., Burk R.F., Nammour T.M., Badr K.F., Roberts L.J. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;**87**:9383-7;1990.
- [327] Morrow J.D., Roberts L.J. The isoprostanes: unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog Lipid Res* ;**36**:1-21;1997.
- [328] Durand T., Cracowski J.L., Berdeaux O. [Isoprostanes, biomarkers of lipid peroxidation in humans. Part 1. Nomenclature and synthesis]. *Pathol Biol (Paris)* ;**53**:349-55;2005.
- [329] Visioli F., Caruso D., Galli C., Viappiani S., Galli G., Sala A. Olive oils rich in natural catecholic phenols decrease isoprostane excretion in humans. *Biochem Biophys Res Commun* ;**278**:797-9;2000.
- [330] Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* ;**142**:231-55;2004.
- [331] Cracowski J.L., Durand T., Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* ;**23**:360-6;2002.

- [332] Montuschi P., Barnes P.J., Roberts L.J. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* ;**18**:1791-800;2004.
- [333] Minuz P., Fava C., Lechi A. Lipid peroxidation, isoprostanes and vascular damage. *Pharmacol Rep* ;**58 Suppl**:57-68;2006.
- [334] Paredi P., Kharitonov S.A., Barnes P.J. Analysis of expired air for oxidation products. *Am J Respir Crit Care Med* ;**166**:S31-S37;2002.
- [335] Wood L.G., Fitzgerald D.A., Lee A.K., Garg M.L. Improved antioxidant and fatty acid status of patients with cystic fibrosis after antioxidant supplementation is linked to improved lung function. *Am J Clin Nutr* ;**77**:150-9;2003.
- [336] Basu S. Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free Radic Res* ;**38**:105-22;2004.
- [337] Montuschi P., Kharitonov S.A., Ciabattoni G., Corradi M., van R.L., Geddes D.M. et al. Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis. *Thorax* ;**55**:205-9;2000.
- [338] Montuschi P., Barnes P.J. Analysis of exhaled breath condensate for monitoring airway inflammation. *Trends Pharmacol Sci* ;**23**:232-7;2002.
- [339] Joy A.P., Cowley E.A. 8-iso-PGE₂ stimulates anion efflux from airway epithelial cells via the EP4 prostanoid receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* ;**38**:143-52;2008.
- [340] Seto V., Hirota C., Hirota S., Janssen L.J. E-Ring Isoprostanes Stimulate a Cl⁻ Conductance in Airway Epithelium via Prostaglandin E₂-Selective Prostanoid Receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* ;**38**:88-94;2008.
- [341] Levine R.L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* ;**32**:790-6;2002.
- [342] le-Donne I., Giustarini D., Colombo R., Rossi R., Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* ;**9**:169-76;2003.
- [343] le-Donne I., Scaloni A., Giustarini D., Cavarra E., Teill G., Lungarella G. et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* ;**24**:55-99;2005.

- [344] Winterbourn C.C., Bonham M.J., Buss H., bu-Zidan F.M., Windsor J.A. Elevated protein carbonyls as plasma markers of oxidative stress in acute pancreatitis. *Pancreatology* ;**3**:375-82;2003.
- [345] Griffiths H.R., Moller L., Bartosz G., Bast A., Bertoni-F reddari C., Collins A. et al. Biomarkers. *Mol Aspects Med* ;**23**:101-208;200.2
- [346] Collins A.R., Cadet J., Moller L., Poulsen H.E., Vina J. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch Biochem Biophys* ;**423**:57-65;2004.
- [347] Leitinger N. The role of phospholipid oxidation products in inflammatory and autoimmune diseases: evidence from animal models and in humans. *Subcell Biochem* ;**49**:325-50;2008.
- [348] Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable beta-cell. *Biochem Soc Trans* ;**36**:343-7;2008.
- [349] Reddy V.P., Zhu X., Perry G., Smith M.A. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* ;**16**:763-74;2009.
- [350] Davi G., Falco A., Patrono C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal* ;**7**:256-68;2005.
- [351] Lodovici M., Bigagli E., Bardin G., Rotella C.M. Lipoperoxidation and antioxidant capacity in patients with poorly controlled type 2 diabetes. *Toxicol Ind Health* ;**25**:337-41;2009.
- [352] Fasset R.G., Coombes J.S. Astaxanthin, oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease. *Future Cardiol* ;**5**:333-42;2009.
- [353] Ali T.K., Matragoon S., Pillai B. A., Liou G.I., El-Remessy A.B. Peroxynitrite mediates retinal neurodegeneration by inhibiting nerve growth factor survival signaling in experimental and human diabetes. *Diabetes* ;**57**:889-98;2008.
- [354] Niedowicz D.M., Daleke D.L. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys* ;**43**:289-330;2005.
- [355] Bonnefont-Rousselot D., Beaudoux J.L., Therond P., Peynet J., Legerand A., Delattre J. [Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts]. *Ann Pharm Fr* ;**62**:147-57;2004.

- [356] Kawahito S., Kitahata H., Oshita S. Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J Gastroenterol* ;**15**:4137-42;2009.
- [357] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* ;**414**:813-20;2000.
- [358] Rolo A.P., Palmeira C.M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* ;**212**:167-78;2006.
- [359] Robertson R.P. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* ;**279**:42351-4;2004.
- [360] Thornalley P.J. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. *Int Rev Neurobiol* ;**50**:37-57;2002.
- [361] Robertson R.P., Harmon J., Tran P.O., Tanaka Y., Takahashi H. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* ;**52**:581-7;2003.
- [362] Tan A.L., Forbes J.M., Cooper M.E. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* ;**27**:130-43;2007.
- [363] Grossin N., Wautier M.P., Wautier J.L. Red blood cell adhesion in diabetes mellitus is mediated by advanced glycation end product receptor and is modulated by nitric oxide. *Biorheology* ;**46**:63-72;2009.
- [364] Gopalakrishna R., Jaken S. Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* ;**28**:1349-61;2000.
- [365] Portilla D., Mordhorst M., Bertland W., Morrison A.R. Protein kinase C modulates phospholipase C and increases arachidonic acid release in bradykinin stimulated MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun* ;**153**:454-62;1988.
- [366] Inoguchi T., Li P., Umeda F., Yu H.Y., Kakimoto M., Imamura M. et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* ;**49**:1939-45;2000.

- [367] Greene D.A., Sirtori A.A., Stevens M.J., Feldman E.L., Lattimer S.A. Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes Care* ;**15**:1902-25;1992.
- [368] Kaneto H., Matsuoka T.A., Nakatani Y., Kawamori D., Miyatsuka T., Matsuhisa M. et al. Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *J Mol Med* ;**83**:429-39;2005.
- [369] Kaneto H., Katakami N., Kawamori D., Miyatsuka T., Sakamoto K., Matsuoka T.A. et al. Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxid Redox Signal* ;**9**:355-66;2007.
- [370] Henquin J.C. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* ;**49**:1751-60;2000.
- [371] Wollheim C.B., Maechler P. Beta-cell mitochondria and insulin secretion : messenger role of nucleotides and metabolites. *Diabetes* ;**51 Suppl 1**:S37-S42;2002.
- [372] Maechler P., Wollheim C.B. Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* ;**414**:807-12;2001.
- [373] Wiederkehr A., Wollheim C.B. Minireview: implication of mitochondria in insulin secretion and action. *Endocrinology* ;**147**:2643-9;2006.
- [374] Lowell B.B., Shulman G.I. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* ;**307**:384-7;2005.
- [375] Gier B., Krippeit-Drews P., Sheiko T., Guillar-Bryan L., Bryan J., Dufer M. et al. Suppression of KATP channel activity protects murine pancreatic beta cells against oxidative stress. *J Clin Invest* ;**119**:3246-56;2009.
- [376] Evans J.L., Maddux B.A., Goldfine I.D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* ;**7**:1040-52;2005.
- [377] Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* ;**52**:1-8;2003.

- [378] Nishikawa T., Kukidome D., Sonoda K., Fujisawa K., Matsuhisa T., Motoshima H. et al. Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract* ;**77 Suppl 1**:S161-S164;2007.
- [379] Avogaro A., de Kreutzenberg S.V., Fadini G.P. Oxidative stress and vascular disease in diabetes: is the dichotomization of insulin signaling still valid? *Free Radic Biol Med* ;**44**:1209-15;2008.
- [380] Aguirre V., Werner E.D., Giraud J., Lee Y.H., Shoelson S.E., White M.F. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* ;**277**:1531-7;2002.
- [381] Sun X.J., Liu F. Phosphorylation of IRS proteins Yin-Yang regulation of insulin signaling. *Vitam Horm* ;**80**:351-87;2009.
- [382] Haase H., Maret W. Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *Biometals* ;**18**:333-8;2005.
- [383] Bourdeau A., Dube N., Tremblay M.L. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Curr Opin Cell Biol* ;**17**:203-9;2005.
- [384] Mahadev K., Zilbering A., Zhu L., Goldstein B.J. Insulin-stimulated hydrogen peroxide reversibly inhibits protein-tyrosine phosphatase 1b in vivo and enhances the early insulin action cascade. *J Biol Chem* ;**276**:21938-42;2001.
- [385] Malamas M.S., Sredy J., McCaleb M., Gunawan I., Mihan B., Sullivan D. Antihyperglycemic activity of new 1,2,4-oxadiazolidine-3,5-diones. *Eur J Med Chem* ;**36**:31-42;2001.
- [386] Tao J., Malbon C.C., Wang H.Y. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation and inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in vivo. *J Biol Chem* ;**276**:29520-5;2001.
- [387] Fischman D., Nookala V.K. Cystic fibrosis-related diabetes mellitus: etiology, evaluation, and management. *Endocr Pract* ;**14**:1169-79;2008.
- [388] Zirbes J., Milla C.E. Cystic fibrosis related diabetes. *Paediatr Respir Rev* ;**10**:118-23;2009.

- [389] Lanng S. Glucose intolerance in cystic fibrosis patients. *Paediatr Respir Rev* ;**2**:253-9;2001.
- [390] Atkinson M.A., Gianani R. The pancreas in human type 1 diabetes: providing new answers to age-old questions. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* ;**16**:279-85;2009.
- [391] Robert J.J., Grasset E., de M.M., Chevenne D., Deschamps I., Boitard C. et al. [Research of factors for glucose intolerance in mucoviscidosis]. *Arch Fr Pediatr* ;**49**:17-22;1992
- [392] Lanng S., Thorsteinsson B., Roder M. E., Orskov C., Holst J.J., Nerup J. et al. Pancreas and gut hormone responses to oral glucose and intravenous glucagon in cystic fibrosis patients with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Acta Endocrinol (Copenh)* ;**128**:207-14;1993.
- [393] Surampudi P.N., John-Kalarickal J., Fonseca V.A. Emerging concepts in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Mt Sinai J Med* ;**76**:216-26;2009.
- [394] Sterescu A.E., Rhodes B., Jackson R., Dupuis A., Hanna A., Wilson D.C. et al. Natural History of Glucose Intolerance in Patients with Cystic Fibrosis: Ten-Year Prospective Observation Program. *J Pediatr* ;2009.
- [395] Moran A., Dunitz J., Nathan B., Saeed A., Holme B., Thomas W. Cystic fibrosis-related diabetes: current trends in prevalence, incidence, and mortality. *Diabetes Care* ;**32**:1626-31;2009.
- [396] Moran A. Abnormal glucose tolerance in CF--when should we offer diabetes treatment? *Pediatr Diabetes* ;**10**:159-61;2009.
- [397] Tofe S., Moreno J.C., Maiz L., Alonso M., Escobar H., Barrio R. Insulin-secretion abnormalities and clinical deterioration related to impaired glucose tolerance in cystic fibrosis. *Eur J Endocrinol* ;**152**:241-7;2005.
- [398] Mosnier-Pudar H. [Question 4. What diagnostic and therapeutic strategies in glucose metabolism disorders in the course of cystic fibrosis? Diabetes and cystic fibrosis: physiopathology and diagnostic criteria for glucose metabolism disorders]. *Arch Pediatr* ;**10 Suppl 3**:462s-8s;2003.
- [399] Mackie A.D., Thornton S.J., Edenborough F.P. Cystic fibrosis-related diabetes. *Diabet Med* ;**20**:425-36;2003.

- [400] Hardin D.S. A review of the management of two common clinical problems found in patients with cystic fibrosis: cystic fibrosis-related diabetes and poor growth. *Horm Res* ;**68 Suppl 5**:113-6;2007.
- [401] Brennan A.L., Geddes D.M., Gyi K.M., Baker E.H. Clinical importance of cystic fibrosis-related diabetes. *J Cyst Fibros* ;**3**:209-22;2004.
- [402] Marshall B.C., Butler S.M., Stoddard M., Moran A.M., Liou T.G., Morgan W .J. Epidemiology of cystic fibrosis-related diabetes. *J Pediatr* ;**146**:681-7;2005.
- [403] Rosenecker J., Eichler I., Kuhn L., Harms H.K., von der H.H. Genetic determination of diabetes mellitus in patients with cystic fibrosis. Multicenter Cystic Fibrosis Study Group. *J Pediatr* ;**127**:441-3;1995.
- [404] Culler F.L., McKean L.P., Buchanan C.N., Caplan D.B., Meacham L.R. Glipizide treatment of patients with cystic fibrosis and impaired glucose tolerance. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* ;**18**:375-8;1994.
- [405] Mittendorfer B. Insulin resistance: sex matters. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* ;**8**:367-72;2005.
- [406] de Valk H.W., van der Graaf E.A. Cystic fibrosis-related diabetes in adults: where can we go from here? *Rev Diabet Stud* ;**4**:6-12;2007.
- [407] Milla C.E., Warwick W.J., Moran A. Trends in pulmonary function in patients with cystic fibrosis correlate with the degree of glucose intolerance at baseline. *Am J Respir Crit Care Med* ;**162**:891-5;2000.
- [408] Finkelstein S.M., Wielinski C.L., Elliott G.R., Warwick W.J., Barbosa J., Wu S.C. et al. Diabetes mellitus associated with cystic fibrosis. *J Pediatr* ;**112**:373-7;1988.
- [409] Rodman H.M., Doershuk C.F., Roland J.M. The interaction of 2 diseases: diabetes mellitus and cystic fibrosis. *Medicine (Baltimore)* ;**65**:389-97;1986.
- [410] Lannig S., Thorsteinsson B., Lund-Andersen C., Nerup J., Schiøtz P.O., Koch C. Diabetes mellitus in Danish cystic fibrosis patients: prevalence and late diabetic complications. *Acta Paediatr* ;**83**:72-7;1994.
- [411] Sullivan M. M., Dennin g C.R. Diabetic microangiopathy in patients with cystic fibrosis. *Pediatrics* ;**84**:642-7;1989.

- [412] Dodge J.A., Morrison G. Diabetes mellitus in cystic fibrosis: a review. *J R Soc Med* ;**85 Suppl 19**:25-8;1992.
- [413] Lannig S., Hansen A., Thorsteinsson B., Nerup J., Koch C. Glucose tolerance in patients with cystic fibrosis: five year prospective study. *BMJ* ;**311**:655-9;1995.
- [414] Moran A. Cystic fibrosis-related diabetes: an approach to diagnosis and management. *Pediatr Diabetes* **1**, 41-48. 2000.
- [415] Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* ;**26 Suppl 1**:S5-20;2003.
- [416] Trezise A.E., Buchwald M. In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* ;**353**:434-7;1991.
- [417] Strong T.V., Boehm K., Collins F.S. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA in the human gastrointestinal tract by in situ hybridization. *J Clin Invest* ;**93**:347-54;1994.
- [418] Rolon M.A., Benali K., Munck A., Navarro J., Clement A., Tubiana-Rufi N. et al. Cystic fibrosis-related diabetes mellitus: clinical impact of prediabetes and effects of insulin therapy. *Acta Paediatr* ;**90**:860-7;2001.
- [419] Polychronakos C. Early onset diabetes mellitus. Tip or iceberg? *Pediatr Diabetes* ;**5**:171-3;2004.
- [420] Boom A., Lybaert P., Pollet J.F., Jacobs P., Jijakli H., Golstein P.E. et al. Expression and localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the rat endocrine pancreas. *Endocrine* ;**32**:197-205;2007.
- [421] Moran A., Pyzdrowski K.L., Weinreb J., Kahn B.B., Smith S.A., Adams K.S. et al. Insulin sensitivity in cystic fibrosis. *Diabetes* ;**43**:1020-6;1994.
- [422] Hardin D.S., Moran A. Diabetes mellitus in cystic fibrosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* ;**28**:787-800;1999.
- [423] Moran A., Milla C. Abnormal glucose tolerance in cystic fibrosis: why should patients be screened? *J Pediatr* ;**142**:97-9;2003.

- [424] Leaf A., Weber P.C. Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. *N Engl J Med* ;**318**:549-57;1988.
- [425] Goodnight S.H., Jr., Harris W.S., Connor W.E., Illingworth D.R. Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia, and thrombosis. *Arteriosclerosis* ;**2**:87-113;1982.
- [426] Armstrong D.S., Grimwood K., Carzino R., Carlin J.B., Olinsky A., Phelan P.D. Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ* ;**310**:1571-2;1995.
- [427] Czako L., Hegyi P., Rakonczay Z., Jr., Wittmann T., Otsuki M. Interactions between the endocrine and exocrine pancreas and their clinical relevance. *Pancreatology* ;**9**:351-9;2009.
- [428] Raia V., Maiuri L., de R.G., de V.B., Vacca L., Conte R. et al. Evidence of chronic inflammation in morphologically normal small intestine of cystic fibrosis patients. *Pediatr Res* ;**47**:344-50;2000.
- [429] Moran A., Hardin D., Rodman D., Allen H.F., Beall R.J., Borowitz D. et al. Diagnosis, screening and management of cystic fibrosis related diabetes mellitus: a consensus conference report. *Diabetes Res Clin Pract* ;**45**:61-73;1999.
- [430] Mohan K., Miller H., Burhan H., Ledson M.J., Walshaw M.J. Management of cystic fibrosis related diabetes : a survey of UK cystic fibrosis centers. *Pediatr Pulmonol* ;**43**:642-7;2008.
- [431] Wilson D.C., Kalnins D., Stewart C., Hamilton N., Hanna A.K., Durie P.R. et al. Challenges in the dietary treatment of cystic fibrosis related diabetes mellitus. *Clin Nutr* ;**19**:87-93;2000.
- [432] Moran A., Pekow P., Grover P., Zorn M., Slovis B., Pilewski J. et al. Insulin therapy to improve BMI in cystic fibrosis-related diabetes without fasting hyperglycemia: results of the cystic fibrosis related diabetes therapy trial. *Diabetes Care* ;**32**:1783-8;2009.
- [433] Kentrup H., Bongers H., Spengler M., Kusenbach G., Skopnik H. Efficacy and safety of acarbose in patients with cystic fibrosis and impaired glucose tolerance. *Eur J Pediatr* ;**158**:455-9;1999.
- [434] Cantin A.M., White T.B., Cross C. E., Forman H.J., Sokol R.J., Borowitz D. Antioxidants in cystic fibrosis. Conclusions from the CF antioxidant workshop,

- Bethesda, Maryland, November 11-12, 2003. *Free Radic Biol Med* ;**42**:15-31;2007.
- [435] Lagrange-Puget M., Durieu I., Ecochard R., Abbas-Chorfa F., Draï J., Steghens J.P. et al. Longitudinal study of oxidative status in 312 cystic fibrosis patients in stable state and during bronchial exacerbation. *Pediatr Pulmonol* ;**38**:43-9;2004.
- [436] Carpagnano G.E., Barnes P.J., Francis J., Wilson N., Bush A., Kharitonov S.A. Breath condensate pH in children with cystic fibrosis and asthma: a new noninvasive marker of airway inflammation? *Chest* ;**125**:2005-10;2004.
- [437] Wang S., Yue H., Derin R.B., Guggino W.B., Li M. Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell* ;**103**:169-79;2000.
- [438] Hudson V.M. New insights into the pathogenesis of cystic fibrosis: pivotal role of glutathione system dysfunction and implications for the therapy. *Treat Respir Med* ;**3**:353-63;2004.
- [439] Rosenblat M., Coleman R., Aviram M. Increased macrophage glutathione content reduces cell-mediated oxidation of LDL and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* ;**163**:17-28;2002.
- [440] Jones D.P. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* ;**295**:C849-C868;2008.
- [441] Schwarzer C., Fu Z., Fischer H., Machen T.E. Redox-independent activation of NF-kappaB by *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin in a cystic fibrosis airway epithelial cell line. *J Biol Chem* ;**283**:27144-53;2008.
- [442] Paranjape S.M., Zeitlin P.L. Atypical cystic fibrosis and CFTR-related diseases. *Clin Rev Allergy Immunol* ;**35**:116-23;2008.
- [443] Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A., Grodsky G.M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* ;**23**:599-622;2002.
- [444] Efrat S. Cell therapy approaches for the treatment of diabetes. *Curr Opin Investig Drugs* ;**2**:639-42;2001.

- [445] Starkey M., Hickman J.H., Ma L., Zhang N., De L.S., Hinz A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol* ;**191**:3492-503;2009.
- [446] George A.M., Jones P .M., Middleton P.G. Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. *FEMS Microbiol Lett* ;**300**:153-64;2009.
- [447] Goldman M.J., Anderson G.M., Stolzenberg E.D., Kari U.P., Zasloff M., Wilson J.M. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* ;**88**:553-60;1997.
- [448] Henson P.M. Resolution of inflammation. A perspective. *Chest* ;**99**:2S-6S;1991.
- [449] Aviram M., Dornfeld L., Kaplan M ., Coleman R., Gaitini D., Nitecki S. et al. Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs Exp Clin Res* ;**28**:49-62;2002.
- [450] Trudel S., Kelly M., Fritsch J., Nguyen-Khoa T., Therond P., Couturier M. et al. Peroxiredoxin 6 fails to limit phospholipid peroxidation in lung from Cfr-knockout mice subjected to oxidative challenge. *PLoS One* ;**4**:e6075;2009.
- [451] Elizur A., Cannon C.L ., Ferkol T.W . Airway inflammation in cystic fibrosis. *Chest* ;**133**:489-95;2008.
- [452] Nichols D., Chmiel J., Berger M. Chronic inflammation in the cystic fibrosis lung: alterations in inter- and intracellular signaling. *Clin Rev Allergy Immunol* ;**34**:146-62;2008.
- [453] Chmiel J.F., Konstan M.W . Inflammation and anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis. *Clin Chest Med* ;**28**:331-46;2007.
- [454] Rahman I., MacNee W . Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J* ;**16**:534-54;2000.
- [455] Davis W.A., Knuiman M., Kendall P., Grange V., Davis T.M. Glycemic exposure is associated with reduced pulmonary function in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Diabetes Care* ;**27**:752-7;2004.
- [456] Honiden S., Gong M.N. Diabetes, insulin, and development of acute lung injury. *Crit Care Med* ;**37**:2455-64;2009.

- [457] Tiengo A., Fadini G.P., Avogaro A. The metabolic syndrome, diabetes and lung dysfunction. *Diabetes Metab* ;**34**:447-54;2008.
- [458] Casini A., Ceni E., Salzano R., Biondi P., Parola M., Galli A. et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* ;**25**:361-7;1997.
- [459] Ratjen F. Changes in strategies for optimal antibacterial therapy in cystic fibrosis. *Int J Antimicrob Agents* ;**17**:93-6;2001.
- [460] Ratjen F.A. Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. *Respir Care* ;**54**:595-605;2009.
- [461] Solomon M.P., Wilson D.C., Corey M., Kalnins D., Zielenski J., Tsui L.C. et al. Glucose intolerance in children with cystic fibrosis. *J Pediatr* ;**142**:128-32;2003.
- [462] Cucinotta D., De L.F., Scoglio R., Lombardo F., Sferlazzas C., Di B.A. et al. Factors affecting diabetes mellitus onset in cystic fibrosis: evidence from a 10-year follow-up study. *Acta Paediatr* ;**88**:389-93;1999.
- [463] Lohr M., Goertchen P., Nizze H., Gould N.S., Gould V.E., Oberholzer M. et al. Cystic fibrosis associated islet changes may provide a basis for diabetes. An immunocytochemical and morphometrical study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* ;**414**:179-85;1989.
- [464] Moran A., Diem P., Klein D.J., Levitt M.D., Robertson R.P. Pancreatic endocrine function in cystic fibrosis. *J Pediatr* ;**118**:715-23;1991.
- [465] Freeman M.L., Huntley S.A., Meredith M.J., Senisterra G.A., Lepock J. Destabilization and denaturation of cellular protein by glutathione depletion. *Cell Stress Chaperones* ;**2**:191-8;1997.
- [466] Freeman M.L., Borrelli M.J., Meredith M.J., Lepock J.R. On the path to the heat shock response: destabilization and formation of partially folded protein intermediates, a consequence of protein thiol modification. *Free Radic Biol Med* ;**26**:737-45;1999.
- [467] Naars-Eiden A., Higgins L., Hertzel A.V., Kappahn R.J., Ferrington D.A., Bernlohr D.A. Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-

- hydroxynonenal in vitro and in vivo. Evidence for a role in antioxidant biology. *J Biol Chem* ;**277**:50693-702;2002.
- [468] Zarkovic N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med* ;**24**:281-91;2003.
- [469] Veronneau M., Comte B., Des R. C. Quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of 4-hydroxynonenal bound to thiol proteins in ischemic/reperfused rat hearts. *Free Radic Biol Med* ;**33**:1380-8;2002.
- [470] Benderdour M., Charron G., Comte B., Ayoub R., Beaudry D., Foisy S. et al. Decreased cardiac mitochondrial NADP⁺-isocitrate dehydrogenase activity and expression: a marker of oxidative stress in hypertrophy development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* ;**287**:H2122-H2131;2004.
- [471] Lombardi F., Raia V., Spagnuolo M.I., Nugnes R., Valerio G., Ciccarelli G. et al. Diabetes in an infant with cystic fibrosis. *Pediatr Diabetes* ;**5**:199-201;2004.
- [472] Brennan A.L., Gyi K.M., Wood D.M., Johnson J., Holliman R., Baines D.L. et al. Airway glucose concentrations and effect on growth of respiratory pathogens in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* ;**6**:101-9;2007.
- [473] Miwa I., Ichimura N., Sugiura M., Hamada Y., Taniguchi S. Inhibition of glucose-induced insulin secretion by 4-hydroxy-2-nonenal and other lipid peroxidation products. *Endocrinology* ;**141**:2767-72;2000.
- [474] Lands L.C., Grey V., Sountas A. A., Kramer V.G., McKenna D. Lymphocyte glutathione levels in children with cystic fibrosis. *Chest* ;**116**:201-5;1999.
- [475] Hull J., Vervaart P., Grimwood K., Phelan P. Pulmonary oxidative stress response in young children with cystic fibrosis. *Thorax* ;**52**:557-60;1997.
- [476] Peiro G., Alary J., Cravedi J.P., Rathahao E., Steghens J.P., Gueraud F. Dihydroxynonene mercapturic acid, a urinary metabolite of 4-hydroxynonenal, as a biomarker of lipid peroxidation. *Biofactors* ;**24**:89-96;2005.
- [477] Ammon H.P., Wahli M.A. The impact of thiols for insulin secretion. *Exp Clin Endocrinol* ;**93**:136-42;1989.
- [478] Littman E.D., Opara E.C., Akwari O.E. Glutathione-mediated preservation and enhancement of isolated perfused islet function. *J Surg Res* ;**59**:694-8;1995.

- [479] Asayama K., English D., Slonim A.E., Burr I.M. Chemiluminescence as an index of drug-induced free radical production in pancreatic islets. *Diabetes* ;**33**:160-3;1984.
- [480] Krippeit-Drews P., Kramer C., Welker S., Lang F., Ammon H.P., Drews G. Interference of H₂O₂ with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol* ;**514 (Pt 2)**:471-81;1999.
- [481] Efrat S. Development of engineered pancreatic beta-cell lines for cell therapy of diabetes. *Adv Drug Deliv Rev* ;**33**:45-52;1998.
- [482] Welch K.D., Davis T.Z., Van Eden M.E., Aust S.D. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med* ;**32**:577-83;2002.
- [483] Courtois F., Suc I., Garofalo C., Ledoux M., Seidman E., Levy E. Iron-ascorbate alters the efficiency of Caco-2 cells to assimilate and secrete lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* ;**279**:G12-G19;2000.
- [484] Brasitus T.A., Davidson N.O., Schachter D. Variations in dietary triacylglycerol saturation alter the lipid composition and fluidity of rat intestinal plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* ;**812**:460-72;1985.
- [485] Bachowski G.J., Thomas J.P., Girotti A.W. Ascorbate-enhanced lipid peroxidation in photooxidized cell membranes: cholesterol product analysis as a probe of reaction mechanism. *Lipids* ;**23**:580-6;1988.
- [486] Miller D.M., Aust S.D. Studies of ascorbate-dependent, iron-catalyzed lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* ;**271**:113-9;1989.
- [487] Kubow S. Routes of formation and toxic consequences of lipid oxidation products in foods. *Free Radic Biol Med* ;**12**:63-81;1992.
- [488] Precourt L.P., Seidman E., Delvin E., Amre D., Deslandres C., Dominguez M. et al. Comparative expression analysis reveals differences in the regulation of intestinal paraoxonase family members. *Int J Biochem Cell Biol* ;**41**:1628-37;2009.
- [489] Maechler P. Mitochondria as the conductor of metabolic signals for insulin exocytosis in pancreatic beta-cells. *Cell Mol Life Sci* ;**59**:1803-18;2002.

- [490] Matschinsky F.M. Regulation of pancreatic beta-cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes* ;**51 Suppl 3**:S394-S404;2002.
- [491] Fridlyand L .E., Philipson L.H. Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic beta- cells? *Diabetes* ;**53**:1942-8;2004.
- [492] Gurgul E., Lortz S., Tiedge M., Jorns A., Lenzen S. Mitochondrial catalase overexpression protects insulin-producing cells against toxicity of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines. *Diabetes* ;**53**:2271-80;2004.
- [493] Tiedge M., Lortz S., Drinkgern J., Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* ;**46**:1733-42;1997.
- [494] Pi J., Qu W., Reece J.M., Kumagai Y., Waalkes M.P. Transcription factor Nrf2 activation by inorganic arsenic in cultured keratinocytes: involvement of hydrogen peroxide. *Exp Cell Res* ;**290**:234-45;2003.
- [495] Rhee S.G. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* ;**312**:1882-3;2006.
- [496] Goldstein B.J., Mahadev K., Wu X. Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* ;**54**:311-21;2005.
- [497] Archer S.L., Wu X.C., Thebaud B., Moudgil R., Hashimoto K., Michelakis E.D. O₂ sensing in the human ductus arteriosus: redox-sensitive K⁺ channels are regulated by mitochondria-derived hydrogen peroxide. *Biol Chem* ;**385**:205-16;2004.
- [498] Kraft R., Grimm C., Grösse K., Hoffmann A., Sauerbruch S., Kettenmann H. et al. Hydrogen peroxide and ADP-ribose induce TRPM2-mediated calcium influx and cation currents in microglia. *Am J Physiol Cell Physiol* ;**286**:C129-C137;2004.
- [499] Krippeit-Drews P., Haberland C., Fingerle J., Drews G., Lang F. Effects of H₂O₂ on membrane potential and [Ca²⁺]_i of cultured arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* ;**209**:139-45;1995.

- [500] Herson P.S., Lee K., Pinnock R.D., Hughes J., Ashford M.L. Hydrogen peroxide induces intracellular calcium overload by activation of a non-selective cation channel in an insulin-secreting cell line. *J Biol Chem* ;**274**:833-41;1999.
- [501] Ishii M., Shimizu S., Hara Y., Hagiwara T., Miyazaki A., Mori Y. et al. Intracellular-produced hydroxyl radical mediates H₂O₂-induced Ca²⁺ influx and cell death in rat beta-cell line RIN-5F. *Cell Calcium* ;**39**:487-94;2006.
- [502] Avshalumov M.V., Rice M.E. Activation of ATP-sensitive K⁺ (K(ATP)) channels by H₂O₂ underlies glutamate-dependent inhibition of striatal dopamine release. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;**100**:11729-34;2003.
- [503] Jornot L., Maechler P., Wollheim C.B., Junod A.F. Reactive oxygen metabolites increase mitochondrial calcium in endothelial cells: implication of the Ca²⁺/Na⁺ exchanger. *J Cell Sci* ;**112 (Pt 7)**:1013-22;1999.
- [504] Lee B., Miles P.D., Vargas L., Luan P., Glasco S., Kushnareva Y. et al. Inhibition of mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ exchanger increases mitochondrial metabolism and potentiates glucose-stimulated insulin secretion in rat pancreatic islets. *Diabetes* ;**52**:965-73;2003.
- [505] Starkov A.A., Polster B.M., Fiskum G. Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax. *J Neurochem* ;**83**:220-8;2002.
- [506] Yan L.J., Levine R.L., Sohal R.S. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;**94**:11168-72;1997.
- [507] Yan L.J., Sohal R.S. Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;**95**:12896-901;1998.
- [508] Maechler P., Jornot L., Wollheim C.B. Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* ;**274**:27905-13;1999.
- [509] Maestre I., Jordan J., Calvo S., Reig J.A., Cena V., Soria B. et al. Mitochondrial dysfunction is involved in apoptosis induced by serum withdrawal and fatty acids in the beta-cell line INS-1. *Endocrinology* ;**144**:335-45;2003.
- [510] Fleury C., Mignotte B., Vayssiere J.L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* ;**84**:131-41;2002.

- [511] Pi J., Bai Y., Zhang Q., Wong V., Floering L.M., Daniel K. et al. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* ;**56**:1783-91;2007.
- [512] Leloup C., Tourrel-Cuzin C., Magnan C., Karaca M., Castel J., Carneiro L. et al. Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* ;**58**:673-81;2009.
- [513] Liou H.C., Baltimore D. Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol* ;**5**:477-87;1993.
- [514] Baeuerle P.A., Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* ;**12**:141-79;1994.
- [515] Velsor L.W., van H.A., Day B.J. Antioxidant imbalance in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* ;**281**:L31-L38;2001.
- [516] Velsor L.W., Kariya C., Kachadourian R., Day B.J. Mitochondrial oxidative stress in the lungs of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein mutant mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* ;**35**:579-86;2006.
- [517] Day B.J. Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics. *Drug Discov Today* ;**9**:557-66;2004.
- [518] Witschi A., Reddy S., Stofer B., Lauterburg B.H. The systemic availability of oral glutathione. *Eur J Clin Pharmacol* ;**43**:667-9;1992.
- [519] Grey V., Mohammed S.R., Smountas A.A., Bahlool R., Lands L.C. Improved glutathione status in young adult patients with cystic fibrosis supplemented with whey protein. *J Cyst Fibros* ;**2**:195-8;2003.
- [520] Tirouvanziam R., Conrad C.K., Bottiglieri T., Herzenberg L.A., Moss R.B., Herzenberg L.A. High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;**103**:4628-33;2006.
- [521] Vanderbist F., Wery B., Baran D., Van G.B., Schoutens A., Moes A.J. Deposition of nalcystelyn from a dry powder inhaler in healthy volunteers and cystic fibrosis patients. *Drug Dev Ind Pharm* ;**27**:205-12;2001.

- [522] App E.M., Baran D., Dab I., Malfroot A., Coffiner M., Vanderbist F. et al. Dose-finding and 24-h monitoring for efficacy and safety of aerosolized Nacystelyn in cystic fibrosis. *Eur Respir J*; **19**:294-302;2002.
- [523] Griese M., Ramackers J., Krasselt A., Starosta V., Van K.S., Fischer R. et al. Improvement of alveolar glutathione and lung function but not oxidative state in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*; **169**:822-8;2004.
- [524] Hartl D., Starosta V., Maier K., Beck-Speier I., Reibhan C., Becker B.F. et al. Inhaled glutathione decreases PGE2 and increases lymphocytes in cystic fibrosis lungs. *Free Radic Biol Med*; **39**:463-72;2005.
- [525] Bishop C., Hudson V.M., Hilton S.C., Wilde C. A pilot study of the effect of inhaled buffered reduced glutathione on the clinical status of patients with cystic fibrosis. *Chest*; **127**:308-17;2005.
- [526] Visca A., Bishop C.T., Hilton S.C., Hudson V.M. Improvement in clinical markers in CF patients using a reduced glutathione regimen: an uncontrolled, observational study. *J Cyst Fibros*; **7**:433-6;2008.
- [527] Thimmulappa R.K., Scollick C., Traore K., Yates M., Trush M.A., Liby K.T. et al. Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolide. *Biochem Biophys Res Commun*; **351**:883-9;2006.
- [528] Sussan T.E., Rangasamy T., Blake D.J., Malhotra D., El-Haddad H., Bedja D. et al. Targeting Nrf2 with the triterpene noid CDDO-imidazolide attenuates cigarette smoke-induced emphysema and cardiac dysfunction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **106**:250-5;2009
- [529] Salvemini D., Wang Z.Q., Zweier J.L., Samouilov A., Macarthur H., Misko T.P. et al. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science*; **286**:304-6;1999.
- [530] Pasternack R.F., Skowronek W.R., Jr. Catalysis of the disproportionation of superoxide by metalloporphyrins. *J Inorg Biochem*; **11**:261-7;1979.
- [531] Day B.J., Fridovich I., Crapo J.D. Manganic porphyrins possess catalase activity and protect endothelial cells against hydrogen peroxide-mediated injury. *Arch Biochem Biophys*; **347**:256-62;1997.

- [532] Szabo C., Day B.J., Salzman A.L. Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett* ;**381**:82-6;1996.
- [533] Day B.J., Batinić-Haberle I., Crapo J.D. Metalloporphyrins are potent inhibitors of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* ;**26**:730-6;1999.
- [534] Doctrow S.R., Huffman K., Marcus C. B., Musleh W., Bruce A., Baudry M. et al. Salen-manganese complexes: combined superoxide dismutase/catalase mimics with broad pharmacological efficacy. *Adv Pharmacol* ;**38**:247-69;1997.
- [535] Sharpe M.A., Olsson R., Stewart V.C., Clark J.B. Oxidation of nitric oxide by oxomanganese-salen complexes: a new mechanism for cellular protection by superoxide dismutase/catalase mimetics. *Biochem J* ;**366**:97-107;2002
- [536] Sies H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med* ;**14**:313-23;1993.
- [537] Smith R.A., Adlam V.J., Blaikie F.H., Manas A.R., Porteous C.M., James A.M. et al. Mitochondria-targeted antioxidants in the treatment of disease. *Ann N Y Acad Sci* ;**1147**:105-11;2008.
- [538] Tamura K., Kato Y., Ishikawa A., Kato Y., Hi-mori M., Yoshida M. et al. Design and synthesis of 4,6-di-tert-butyl-2,3-dihydro-5-benzofuranols as a novel series of antiatherogenic antioxidants. *J Med Chem* ;**46**:3083-93;2003.