



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Canadian Theses Service

Services des thèses canadiennes

Ottawa, Canada
K1A 0N4

CANADIAN THESES

THÈSES CANADIENNES

NOTICE

The quality of this microfiche is heavily dependent upon the quality of the original thesis submitted for microfilming. Every effort has been made to ensure the highest quality of reproduction possible.

If pages are missing, contact the university which granted the degree.

Some pages may have indistinct print especially if the original pages were typed with a poor typewriter ribbon or if the university sent us an inferior photocopy.

Previously copyrighted materials (journal articles, published tests, etc.) are not filmed.

Reproduction in full or in part of this film is governed by the Canadian Copyright Act, R.S.C. 1970, c. C-30.

**THIS DISSERTATION
HAS BEEN MICROFILMED
EXACTLY AS RECEIVED**

AVIS

La qualité de cette microfiche dépend grandement de la qualité de la thèse soumise au microfilmage. Nous avons tout fait pour assurer une qualité supérieure de reproduction.

S'il manque des pages, veuillez communiquer avec l'université qui a conféré le grade.

La qualité d'impression de certaines pages peut laisser à désirer, surtout si les pages originales ont été dactylographiées à l'aide d'un ruban usé ou si l'université nous a fait parvenir une photocopie de qualité inférieure.

Les documents qui font déjà l'objet d'un droit d'auteur (articles de revue, examens publiés, etc.) ne sont pas microfilmés.

La reproduction, même partielle, de ce microfilm est soumise à la Loi canadienne sur le droit d'auteur, SRC 1970, c. C-30.

**LA THÈSE A ÉTÉ
MICROFILMÉE TELLE QUE
NOUS L'AVONS REÇUE**

Canada

CONTRIBUTION A LA RECHERCHE
D'UN MARQUEUR BIOCHIMIQUE DES PORTEURS
DU GENE DE LA FIBROSE KYSTIQUE.

par
Pascale M. Garber
B.Sc. McGill University, 1974

Thèse soumise à l'Ecole des Etudes Supérieures et de la
Recherche en vue de l'obtention de la Maîtrise des Sciences
en Biochimie.

Université d'Ottawa
Ottawa, Ontario

© Pascale M. Garber, Ottawa, Canada, 1986.

Permission has been granted to the National Library of Canada to microfilm this thesis and to lend or sell copies of the film.

The author (copyright owner) has reserved other publication rights, and neither the thesis nor extensive extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her written permission.

L'autorisation a été accordée à la Bibliothèque nationale du Canada de microfilmer cette thèse et de prêter ou de vendre des exemplaires du film.

L'auteur (titulaire du droit d'auteur) se réserve les autres droits de publication; ni la thèse ni de longs extraits de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation écrite.

ISBN 0-315-33314-6



UNIVERSITÉ D'OTTAWA
UNIVERSITY OF OTTAWA

Je dédie ce travail à mes parents

et à mes frères et soeurs: Annick,
Chantal, Richard, Danielle, Thierry,
Patrice, Corinne et Fanny.

REMERCIEMENTS

Je désire remercier en tout premier lieu et d'une façon tout à fait particulière le Dr. H. Heick pour sa direction ainsi que pour la patience dont il a fait preuve à mon égard.

Je remercie aussi le Dr. N. Bégin-Heick pour l'espace de laboratoire ainsi que l'ambiance de travail amical qui y règne, offert pendant les deux ans de travail pratique de cette thèse. Qu'elle soit remerciée aussi pour sa gentillesse et pour son aide pratique pendant les longs mois d'accouchement douloureux de la partie écrite du travail.

Je remercie également le Dr. J. Patrick pour ses suggestions et pour ses commentaires.

J'exprime finalement toute ma gratitude aux personnes, parents d'enfants atteints de fibrose kystique et contrôles, qui ont été donneurs de sang à plus d'une occasion; au personnel de la Clinique de Fibrose Kystique de l'Hôpital pour les Enfants; au personnel de Biochimie de l'hôpital ainsi qu'aux personnels des laboratoires du Dr Bégin-Heick et du Dr. Patrick.

TABLE DES MATIERES

Résumé	1
Introduction, générale	3
Chapitre I: Sécrétion de potassium dans les glandes salivaires de rat	
Introduction	15
Matériels et méthodes	17
Résultats	21
Discussion	26
Chapitre II: Flux de sodium et de potassium dans les globules rouges modifiés	
Introduction	29
Matériels et méthodes	31
Résultats	36
Discussion	50
Bibliographie	54

RESUME

La fibrose kystique, ou mucoviscidose, est une maladie génétique létale. Le défaut biochimique de base n'est pas connu, malgré de nombreux rapports d'anormalités aux niveaux protéique, enzymologique ou du mouvement transmembranaire des électrolytes. Depuis une vingtaine d'années, la recherche d'un ou plusieurs facteurs sériques typiques de la fibrose kystique s'est grandement développée. Cette recherche a été menée particulièrement à des fins diagnostiques en vue d'un dépistage précoce ainsi que du dépistage des porteurs du gène.

Dans un premier temps, nous avons vérifié les conclusions d'une équipe américaine (Bogart et coll., 1982), selon lesquelles le sérum provenant de patients ou de leur parents avait un effet stimulateur très marqué sur la sécrétion de potassium des glandes salivaires de rat. Le processus de sécrétion, de même que la stimulation due au sérum étaient dépendants du calcium. Dans des conditions similaires d'expérimentation, aucune stimulation n'était retrouvée.

D'autre part, nous avons continué un travail entrepris ici (Bjorn, 1982) sur un système étudiant le flux de sodium et de potassium dans les globules rouges provenant de parents de patients atteints de fibrose kystique. La composition en électrolytes des globules rouges était modifiée par traitement à l'acide sulfonique p-chloromercuribenzène (PCMSB) selon un procédé établi par

Garay et Meyer (1979) ou par traitement à la Nystatine selon la méthode de Cass et Dalmark (1979). Dans les deux cas, les globules rouges après déplétion en potassium et surcharge en sodium étaient étudiés dans des conditions où la ré-équilibration en électrolytes pouvait s'effectuer. Les résultats montraient dans certaines conditions une augmentation significative de l'efflux de sodium ou de l'influx de potassium chez les hétérozygotes.

La signification de cette étude sera discutée au niveau de ses valeurs expérimentale et diagnostique et, d'une façon plus générale, en fonction du défaut de base de la fibrose kystique.

INTRODUCTION GENERALE

En 1936, le Suisse G. Fanconi décrivait pour la première fois la fibrose kystique du pancréas congénitale accompagnée de bronchiectasies avec le mérite de réunir les affections pancréatique et pulmonaire de la maladie ainsi que son caractère familial. L'autre terme employé pour décrire le même syndrome, "mucoviscidose", rend compte d'une autre de ses caractéristiques: la viscosité augmentée des sécrétions des muqueuses. Bien que l'étiologie de la fibrose kystique (FK) soit à ce jour totalement inconnue, le tableau clinique fait converger les différents symptômes vers une affection commune aux glandes exocrines. En effet l'épaississement des sécrétions provoque l'obstruction des canaux des différents organes qui les sécrètent. Ainsi l'obstruction des voies bronchio-pulmonaires provoque une insuffisance respiratoire progressive ainsi que des infections pulmonaires à répétition. L'appareil digestif est atteint de la même façon aux niveaux pancréatique, hépatique et intestinal causant un retard pondéral important. Une augmentation des concentrations des électrolytes, en particulier le chlore, le sodium et le potassium, est observée dans l'ensemble des sécrétions.

L'intérêt porté à la FK vient surtout de sa fréquence exceptionnelle pour une maladie génétique létale. Une fréquence de 1 pour 1500-2000 naissances est observée chez les Caucasiens, alors que la maladie n'atteint que 1 par 90

000 nouveaux-nés chez les Noirs Américains et Africains et les Asiatiques (Talamo et coll., 1983). A ce jour, le mode de transmission génétique n'est pas encore résolu. Une étude de 1965 (Danks et coll.) concluait à un mode de transmission autosomal récessif. Schaap et Cohen (1976) proposaient un modèle impliquant deux loci, ils suggéraient que les deux allèles devaient être dominantes simultanément pour que la maladie soit exprimée. L'observation d'une grande hétérogénéité phénotypique (Sing et coll., 1982) de même qu'une étude systématique portant sur plus de 5000 cousins germains de patients (Danks et coll., 1983) supportent fortement ce modèle. Toutefois, une étude récente favorise un mode de transmission génétique autosomal récessif (Romeo, 1984). Le problème du mode de transmission génétique est important non seulement pour le conseil génétique mais aussi et surtout dans l'optique de la discussion des résultats obtenus avec les parents des patients. En effet, s'il s'agit d'un seul locus et d'un gène autosomal récessif les parents sont hétérozygotes obligatoires; on peut espérer, dans le cas d'une mise en évidence du défaut biochimique de base, trouver dans leur cas des valeurs intermédiaires, selon la règle de dosage génique. S'il s'agit par contre de deux loci et la présence nécessaire de deux allèles dominantes selon le modèle de Schaap et Cohen (1976), quatre génotypes sont possibles pour les patients et quatre autres pour leurs parents. Il est bien évident dans ce cas que les prédictions de caractère biochimique concernant les parents

sont très difficiles de même que l'interprétation des résultats obtenus.

Du fait de l'ignorance de la cause biochimique de la pathophysiologie de la FK, la mise au point d'un test de dépistage des patients et de leurs parents asymptomatiques s'avère sinon impossible du moins très difficile. Toutefois, un tel test est essentiel pour un conseil génétique utile et celui-ci est idéal accompagné d'un diagnostic prénatal sur. Comme le diagnostic prénatal n'est un acte médical que lorsqu'une action thérapeutique prénatale ou néonatale peut être menée, la fécondité de la recherche dans ce domaine dépend à la base de la recherche du défaut biochimique primaire qui permettra de mener parallèlement une action diagnostique et une action thérapeutique. C'est pourquoi, dans l'état actuel de nos connaissances, un test de dépistage pour les parents trouve son utilité surtout dans le fait qu'il confirmera que le défaut biochimique primaire se retrouve chez eux malgré l'absence de signe clinique. Ceci pourrait permettre une étude beaucoup plus efficace de ce défaut en laboratoire, évitant en particulier l'utilisation des tissus provenant des patients souvent soumis à un traitement médicamenteux impressionnant pouvant varier d'un endroit à l'autre et d'une époque à l'autre. Il n'est d'ailleurs pas impossible que le manque de consistance des résultats observés dans la littérature ne provienne de ce facteur.

L'atteinte des glandes exocrines a fait diverger la recherche principalement dans deux directions, que ce soit à

des fins diagnostiqués ou de recherche fondamentale: 1) la recherche d'un ou plusieurs facteurs sériques typiques de la FK et ayant une activité biologique spécifique et 2) la recherche d'anormalités au niveau du mouvement transmembranaire des électrolytes. Une relation de cause à effet entre ces deux domaines de recherche n'est pas excluse.

1). FACTEURS SERIQUES

La notion de facteurs sériques typiques de la fibrose kystique, que nous appellerons facteurs FK, et ayant une activité biologique spécifique, naît en 1967 avec les travaux de Spock et coll.. L'intérêt de ces facteurs tient à leur valeur diagnostique et, du fait de leur activité biologique ils peuvent constituer une piste intéressante pour expliquer une partie de la pathophysiologie de la FK.

Spock et coll. (1967) montraient que les explants de trachée de lapin avaient un mouvement ciliaire asymétrique lorsque le milieu de culture contenait du sérum FK. Ils postulaient pour expliquer ces résultats la présence d'un facteur sérique. Le facteur FK dyskénétique était thermolabile et non-dialisable. Lorsque les séra étaient soumis à un tamis moléculaire (Séphadex G200), l'activité dyskénétique se retrouvait dans la fraction des macroglobulines. Les séra des parents, après concentration de la fraction euglobuline, possédaient aussi cette activité. Par la suite l'activité dyskénétique du sérum FK de même que d'autres fluides biologiques (salive, sueur)

était observée soit avec les explants de trachée de lapin soit avec d'autres organismes ou tissus ciliés (revue dans Talamo et coll., 1983). L'association du facteur dyskénétique avec la fraction macroglobuline était confirmée (Bowman, 1969). Les faits que des polypeptides polybasiques (tel que poly LYS) ont un effet dyskénétique (Bowman, 1970), que l'effet dyskénétique du sérum FK est inhibé par la présence d'héparine, molécule polyanionique (Doggett et coll., 1973) laissent penser que le facteur sérique responsable de la dyskénésie est une molécule polybasique. L'analyse en isoelectrofocusing de sérum FK révèle de plus des protéines sériques typiques ayant un pI situé entre 8.5 et 9.0 (Wilson et coll., 1977). Dans le but d'élucider la nature du facteur dyskénétique, certaines études l'associaient avec un fragment du complément C3 (Wilson et Bahin, 1980); d'autres avec l'amylase (Doggett et coll., 1973) sans qu'aucune preuve expérimentale définitive ne tranche cette question. D'autre part, d'autres rapports nient soit la spécificité du sérum FK en trouvant le même effet dyskénétique avec des séra animaux ou humains non FK (Sanderson et Shiegh, 1981), soit l'activité dyskénétique des séra FK elle-même (Tegnet et coll., 1981). Malgré l'apparente inconsistance des résultats, il semble que trop de rapports démontrent un effet du sérum FK pour que l'on puisse nier de façon absolue la présence de facteurs dyskénétiques typiques de la FK. Leur spécificité est assurée par les études parallèles des patients et de leur parents. C'est pourquoi, ces rapports positifs de même que

leur contradictions devraient ensemble répondre à la question, à savoir la raison pour laquelle ils sont actifs dans certaines conditions expérimentales et non dans d'autres.

Du fait du défaut sécrétoire observé dans la FK et à cause du problème de quantification posé par l'étude des facteurs sériques, des paramètres autres que l'observation visuelle d'une altération morphologique ont été examinés. C'est ainsi par exemple que la réabsorption de sodium par les glandes salivaires parotides de rat était inhibée par la présence de salive FK (Mangos et coll., 1967; Mangos et McSherry, 1968), de même par exemple que le transport de nutriments (Brown et coll., 1971), ou la captation d'acides aminés dans le tissu intestinal de rat par le sérum FK (Morin et coll., 1973). L'inhibition de ces différents systèmes de transport provoquée par la présence de sécrétions FK provenant soit des patients soit de leurs parents plaide encore en faveur d'une anomalie causale plutôt que consécutive. Araki et coll. (1975) montraient une réduction du potentiel électrique à travers le tissu jejunal de rat provoquée par le sérum FK, l'effet était retrouvé chez les parents à condition de concentrer leur sérum, laissant entrevoir un défaut quantitatif. Taussig et Gardner (1972) ne retrouvaient aucune différence dans la captation d'alanine ou de glucose par du tissu intestinal de rat, il s'agissait toutefois ici de plasma, l'anticoagulant utilisé étant l'héparine.

L'effet dyskénétique produit par l'ionophore A23187 sur des explants de trachée de lapin (Burke et Buller, 1976; Bogart et coll., 1977; Bogart et coll., 1978) permettait d'émettre l'hypothèse que le sérum FK agissait via une médiation par le calcium. Au moyen de la microscopie optique et à balayage électronique, Czeglédy et Sturgess (1976) montraient que la dyskénésie ciliaire causée par le sérum FK dans des explants de trachée de lapin était précédée par une décharge massive de mucus au niveau de l'épithélium. Une observation similaire était faite sur des explants de trachée de cochon d'Inde (Rudik et coll., 1984). Le modèle proposé pour expliquer l'action dyskénétique du sérum FK impliquerait ainsi l'entrée de calcium qui provoquerait la sécrétion de mucus. C'est l'accumulation de mucus à la surface épithéliale qui entraîne la dyskénésie ciliaire. L'utilisation des glandes salivaires de rat permettait d'établir un système quantitatif pour étudier l'effet des séras FK. L'augmentation de la sécrétion des glycoprotéines était observée (Fleming et Sturgess, 1981). Plus tard, Bogart et coll. (1982) montraient que la sécrétion de potassium était augmentée en présence de sérum FK. Les résultats de cette dernière étude laissent envisager son utilisation dans l'établissement d'un outil diagnostique. Dans la première partie de notre travail, nous avons examiné l'effet du sérum contrôle et FK sur la sécrétion de potassium des glandes salivaires de rat.

2) MOUVEMENTS TRANSMEMBRANAIRES DES ELECTROLYTES

Un autre domaine d'anormalités qui a été largement

étudié est celui des mouvements transmembranaires des électrolytes. En effet un défaut membranaire est une autre alternative pour expliquer les concentrations anormales d'électrolytes observées dans l'ensemble des sécrétions des patients.

Darling et coll. montraient en 1953 une augmentation des concentrations de sodium et de chlore dans la sueur des patients atteints de fibrose kystique. Depuis, de nombreux rapports sont venus confirmer et étayer cette découverte. L'augmentation d'autres électrolytes (potassium, calcium) était observée; de même d'autres sécrétions (salive, suc pancréatique) étaient anormales à cet égard (revue dans Talamo et coll., 1983). Etant donné que le débit et le volume sécrétoires étaient normaux (Di Sant'Agnese et Talamo, 1967; Di Sant'Agnese, 1980), une anomalie au niveau des systèmes de transport membranaire de ces électrolytes était suspectée.

Le choix des globules rouges comme objet d'étude est fondé sur trois raisons: la facilité de leur obtention, la connaissance déjà approfondie que l'on a de leur métabolisme et l'hypothèse selon laquelle on peut s'attendre à y retrouver le défaut biochimique de base, de par la nature génétique de la fibrose kystique. D'autres études ont utilisé les fibroblastes en culture pour les mêmes raisons, bien que leur mise et leur maintien en culture introduisent des variables supplémentaires et encore mal connues.

Les globules rouges possèdent plusieurs routes d'échange sodium/potassium. La première qui a été décrite, la pompe I, est inhibée par l'ouabaine. Jusqu'à présent la stochiométrie de l'échange $\text{Na}^+:\text{K}^+$ est acceptée comme étant de 3:2, et est accompagné de l'hydrolyse d'un ATP (Glynn et Karlsh, 1975). Un autre système de transport a été décrit comme la pompe II ou encore cotransport. Le cotransport accomplit le transfert en parallèle vers l'une ou l'autre direction d'un Na^+ et d'un K^+ . Il est insensible à l'ouabaine mais peut être inhibé par divers agents diurétiques, tels la furosamide ou l'acide éthacrynique (Wiley et Cooper, 1974).

Ces deux systèmes de transport du sodium et du potassium, ainsi que les activités de la Mg^{++} ATPase et de la Ca^{++} ATPase ont été étudiés dans le cas de la fibrose kystique. Une diminution du transport du sodium était observée dans les globules rouges FK (Balfe et coll., 1968). Cette étude mettait aussi en évidence une diminution de l'efflux de sodium insensible à l'ouabaine dans les cellules hétérozygotes. Ces résultats étaient confirmés pour l'élément insensible à l'ouabaine du système de transport du sodium (Lapey et Gardner, 1970; Cole et Dirks, 1972; Grinwalt et Segal, 1978). Par contre, d'autres études (Hadden et coll., 1973; Feig et coll., 1974) les contredisent. Toutefois, ces dernières étaient menées dans des conditions expérimentales totalement différentes. C'est ainsi par exemple que Hadden et coll. (1973) place son étude dans des conditions où la pompe I accomplira plus d'échange

Na:Na que d'échange Na:K (concentration de potassium extrêmement basse). Feig et coll. (1974) surcharge les cellules dans un milieu riche en potassium et examinent les flux à des concentrations en sodium et en potassium pratiquement physiologiques. Dans ces conditions, une différence dans la capacité maximale de la pompe II serait difficilement décelable. En résumé de ces études, une diminution du transport du sodium insensible à l'ouabaine, attribuée par certains à une diminution du fonctionnement du cotransport Na/K dans les globules rouges semble démontrée. Une telle différence était observée pour les hétérozygotes dans une étude (Balfe et coll., 1968).

L'activité Mg⁺⁺ ATPasique dans les globules rouges FK n'était pas différentes des valeurs contrôles (Besley et Patrick, 1969; Horton et coll., 1970; McEvoy et coll., 1974; Katz, 1978). Par contre, dans les globules rouges FK, l'activité de la Ca⁺⁺ ATPase (Horton et coll., 1970), son K^m (McEvoy et coll., 1974), l'activité Ca⁺⁺ ATPasique dépendante du magnésium (Katz, 1978; Miner et coll., 1982), le nombre de pompes Ca⁺⁺ /Mg⁺⁺ (Seymour et Davis, 1984) étaient diminués.

Finalement un ensemble de rapports portant sur des différences de potentiels électriques et le transport du chlore est digne d'intérêt dans l'optique de notre travail. Knowles et coll. (1981), rapportaient une différence de potentiel augmenté à travers l'épithélium nasal des patients FK comparativement aux contrôles. Les mesures prises en

présence d'amiloride, inhibiteur du transport du sodium, révélaiient que la diminution des différences de potentiels observées chez les contrôles était plus importante chez les patients. Ces résultats étaient confirmés et caractérisés (Knowles et coll., 1983a; et 1983b). Ces auteurs concluaient à une diminution de la perméabilité membranaire au chlore secondaire à un défaut au niveau du transport du sodium. Les résultats de Knowles et coll. obtenus avec l'épithélium nasal étaient compatibles avec ceux de Quinton obtenus avec les glandes sudoripares. Par microperfusion des glandes sudoripares disséquées à partir de biopsies cutanées, Quinton (1983) mettait en évidence une augmentation du potentiel électrique (transductal) dans les glandes provenant des patients FK. Les taux de réabsorption du sodium et du chlore étaient tous deux inférieurs dans les tissus FK; une différence plus marquée pour la réabsorption du chlore était toutefois observée (Quinton et Bijman, 1983). Selon Quinton, la diminution de la perméabilité membranaire au chlore dans les épithélia sécrétoires serait le défaut primaire de la fibrose kystique. Récemment, des résultats obtenus avec des cellules en culture dérivées d'épithélium de trachée confirment ceux de Quinton ainsi que son hypothèse concernant le défaut primaire de la fibrose kystique (Widdicomb et coll., 1985).

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons étudié les flux de sodium et de potassium dans les globules rouges provenant de contrôles et d'hétérozygotes FK afin d'établir la possibilité d'un test de dépistage des porteurs

du gène de la fibrose kystique.

CHAPITRE I Sécrétion de potassium

dans les glandes sous-maxillaires de rat.

I.1. INTRODUCTION

Les glandes sous-maxillaires sont des glandes mixtes, tubuloacinaires. Les sécrétions muqueuses et séreuses sont assurées par les acinis et les conduits granulaires. Plusieurs études entreprises in vitro (Schneyer, 1967; Martinez et Quissell, 1976; Martinez et coll., 1976) dressent le tableau suivant: la sécrétion de l'amylase est sous contrôle bêta- et alpha-adrénergique et muscarinique alors que le potassium est secrété via une médiation alpha-adrénergique et cholinergique. La sécrétion nette de potassium est le résultat d'une extrusion passive et d'une re-captation active, cette dernière se réalisant par le biais des Na^+/K^+ ATPases groupés principalement au niveau baso-latéral des acinis. Le processus de la stimulation adrénergique de la sécrétion de potassium est strictement dépendant de la présence de calcium dans le milieu extracellulaire. Les études (Selinger et coll., 1974; Stark et O'Doherty, 1982), utilisant l'ionophore A23187, suggèrent que l'influx du calcium est l'étape intermédiaire et déterminante entre l'action des neurotransmetteurs et la stimulation de la sécrétion de potassium.

L'utilisation des glandes salivaires de rat dans le cadre d'une étude sur la fibrose kystique est justifiée par le fait que la salive est anormale au point de vue des

concentrations des électrolytes chez ces patients. De plus, diverses études (Fleming et Sturgess, 1981; Bogart et coll., 1982) utilisant ce système ont pu mettre en évidence des différences dans l'effet des séra provenant de patients atteints de fibrose kystique ou de leurs parents. La plus probante de ces études est celle de Bogart et coll. (1982) selon laquelle nous avons basé notre procédé expérimental. Un effet stimulateur de sérum provenant de patients FK ou de leurs parents était observé dans les deux cas. Les homozygotes et les hétérozygotes ne pouvaient être distingués. L'intérêt de cette étude réside dans la facilité relative du procédé expérimental de même que dans la position intermédiaires des valeurs obtenues avec les hétérozygotes. Ceci, malgré le manque de différence statistique entre les deux groupes, laissait envisager un affinement méthodologique qui permettrait cette mise en évidence.

I.2. MATERIELS ET METHODES

A. Solutions et produits.

Le milieu Krebs Ringer Bicarbonate (KRB) contient en concentration finale (mM): NaCl (117), KCl (4), MgSO₄ (1.2), NaHCO₃ (25), KH₂PO₄ (1.2), CaCl₂ (2.5).

Le milieu KRB fortifié contient de plus: bêta-hydroxy-butyrat (5), inosine (10), adénine (0.5), glucose (5).

Le pH des solutions KRB est maintenu à 7.4 par gazage avec un mélange CO₂/O₂ (5%/95%).

L'ouabaine est ajoutée extemporanément dans le milieu d'incubation (KRB fortifié) à une concentration finale de 1mM.

La noradrénaline est prépesée et conservée à -20°. Elle est mise en solution extemporanément. De plus l'autoxydation est inhibée par la présence de bisulfite de sodium (1.2mM).

L'ouabaine octahydrate (Strophantine-G), l'adrénaline hydrochloride, l'inosine, le bêta-hydroxybutyrat et la noradrénaline (L-Artérénol bitartrate) proviennent de chez Sigma Chemical Company (St Louis, Mo.). Tous les sels proviennent de chez Fisher Scientific Ltd. (Nepean, Ont.).

B. Sujets de l'étude.

Les contrôles étaient des volontaires des personnels du laboratoire de biochimie de l'Hôpital pour les Enfants de

l'Est de l'Ontario et du département de biochimie de l'Université d'Ottawa (n=5, un sujet de sexe masculin et quatre de sexe féminin, âgés de 29 à 47 ans).

Les sujets hétérozygotes étaient les parents naturels de patients consultants à la clinique de FK de l'hôpital (n=3, un sujet de sexe masculin et deux de sexe féminin, âgés de 32 à 41 ans).

Les sujets homozygotes étaient des patients consultants à la clinique ou hospitalisés (n=10, quatre sujets de sexe féminin et six de sexe masculin, âgés de 7 à 20 ans).

Dans le cas des patients mineurs, un consentement écrit était obtenu des parents. Les sujets adultes donnaient à leur participation un consentement écrit. Ceux qui prenaient des médicaments pouvant affectés la perméabilité membranaire, de même que ceux souffrant d'hypertension étaient écartés de l'étude. L'aspect éthique du projet a été jugé favorablement par le Comité de Recherche de l'Hôpital pour les Enfants.

C. Préparation des sera.

Le sang (10 à 15 ml) est laissé à 4 C pendant trente minutes. Après complétion de la coagulation, le sérum est centrifugé à 12800 g pendant deux minutes (Centrifugeuse Eppendorf 3200, Eppendorf, Gerätebau Netheler Hinz GMBH, RFA), puis séparé en parties aliquotes. Les échantillons sont utilisés le jour même ou conservés à -70 C.

D. Isolation et préparation des glandes salivaires.

Les rattes (Sprague-Dawley, 70 à 90 jours), à jeun depuis la veille au soir, sont tuées par dislocation cervicale. Aussitôt, les glandes sous-maxillaires sont prélevées et gardées dans du milieu KRB à 37 C. Elles sont ensuite disséquées soigneusement pour les débarrasser du tissu conjonctif et des ganglions lymphatiques. Après plusieurs rinçages dans le milieu KRB, les glandes sont coupées en petits morceaux d'environ 1mm³. L'ensemble des morceaux est pré-incubé avec du milieu KRB (environ 1 ml par glande) dans un bain-marie à 37 C, sous agitation et en présence d'un mélange gazeux CO₂/O₂ (5%/95%). Après deux périodes de 10 minutes avec changement de milieu, les morceaux sont divisés également, l'équivalent d'une glande est incubé dans 1ml de KRB fortifié en présence d'ouabaine (1mM) à 37 C sous agitation, en présence ou en absence de sérum ou de noradrénaline.

E. Mesure du potassium.

Après 20min. d'incubation, le milieu est récupéré totalement. Le tissu est lavé plusieurs fois dans du MgCl₂ isotonique (0.11M) puis pesé et homogénéisé dans 2ml de MgCl₂. Le potassium contenu dans le milieu d'incubation et dans l'homogénat est mesuré au photomètre à flamme (Corning 450, Corning Scientific Instrument, Medfield, Massachusetts) en utilisant comme standard interne du LiCl (15mM) et comme standard du KCl (5 et 10mM).

F. Expression des résultats.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de potassium secrété après 20min. d'incubation relativement au potassium contenu dans le tissu avant l'incubation.

Milieu: $K = K_{20} - K_0$

K_{20} = Potassium (Eq.ml⁻¹) après 20min.

K_0 = Potassium (Eq.ml⁻¹) au temps 0.

Tissu: K_H = Potassium (Eq.ml⁻¹) dans l'homogénat après 20min. d'incubation. Le volume de l'homogénat étant 2ml., le potassium total contenu dans le tissu avant l'incubation sera donc: $2.K_H + K$.

$$\%_{20} = \frac{K}{2K_H + K} \times 100$$

I.3. RESULTATS.

Le potassium secrété in vitro par les glandes sous-maxillaires de rat représente après vingt minutes d'incubation 26% en moyenne de potassium total contenu dans le tissu (tableau 1). Le tableau 1 montre que la sécrétion de potassium est très variable d'un jour à l'autre. Par exemple la sécrétion de base pouvait varier de 17.5% (Expérience #1) à 37% (Expérience #7). Une telle variation est aussi observée en présence de sérum. D'autre part, les résultats des expériences faites en dupliqué, c'est à dire le même jour, variaient peu que ce soit pour la sécrétion de base (Tableau 1, expériences # 5, 7 et 8) ou en présence de sérum FK (Expérience 5). A cause de cette variation observée d'un jour à l'autre, nous avons exprimé la sécrétion de potassium obtenue en présence de sérum ou de noradrénaline relativement à la sécrétion de base obtenue le même jour (Tableau 2). L'intégrité fonctionnelle de notre système expérimental est assurée par la stimulation de 50% provoquée par l'addition de 10 μ M de noradrénaline (tableau 2). Contrairement à Bogart et coll. (1982), aucun effet stimulateur du sérum provenant de patients FK ou de leurs parents n'était observé. Le tableau 2 montre en fait que l'addition de sérum (15%, v:v), quelque soit son origine provoque une diminution de la sécrétion de base. L'inhibition observée en présence de sérum contrôle ou FK est significative, avec des valeurs de p inférieures à 0.01 et 0.005 respectivement (tableau 2). L'analyse statistique

du groupe hétérozygote n'a pu être faite en raison de la taille de l'échantillon (n=3), les résultats montrent toutefois la même tendance que les deux autres groupes.

Puisque nos résultats ne concordaient pas avec ceux de Bogart (1982), trois variables pouvant les affecter ont été examinées de façon particulière. En premier lieu, nous avons vérifié que la concentration finale d'ouabaine utilisée était suffisante pour une inhibition totale des pompes Na^+/K^+ ; en effet, dans le cas contraire l'influx de potassium par cette voie masquerait le taux de sécrétion. En présence de 1.5mM d'ouabaine, le pourcentage de potassium excrété était identique à celui observé lorsqu'une concentration de 1mM était utilisée et moitié moins qu'en son absence. Le pH du milieu extratissulaire est primordiale puisqu'il a été démontré que le caractère polybasique des facteurs FK est essentiel à leur activité biologique. Alors que notre étude était en cours, Bogart (communication personnelle) avait ramené la concentration finale de bicarbonate dans les milieux KRB de 25 à 17 mM et maintenu le gazage de la solution contenant les morceaux de glandes salivaires pendant toute l'incubation. Sous ces nouvelles conditions, les mesures du pH avant et après incubation étaient constantes. D'autre part, ces nouvelles conditions ne modifiaient ni la sécrétion de base ni l'absence de stimulation par les séra FK (Tableaux 1 et 2, expériences 5 à 8). Finalement, l'efficacité de la conservation des séra était examinée. Un sérum contrôle et sérum FK étaient utilisés le jour même de la prise de sang, le

lendemain après conservation à 4°C et quinze jours après conservation à -70°C. Les résultats étaient identiques dans les trois cas.

TABLEAU 1

SECRETION DE POTASSIUM PAR LES GLANDES SALIVAIRES
DE RAT.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de potassium
sécrété après 20 minutes d'incubation dans le milieu KRB
fortifié, relativement au potassium intratissulaire total,
tel que décrit dans la section Matériels et Méthodes.

C Sérum contrôle
H Sérum hétérozygote
FK Sérum homozygote
NA Noradrénaline

* Le même sérum a servi pour des expériences en dupliqué.
Dans les calculs statistiques, la moyenne des résultats
des dupliqués est considérée.

TABLEAU 1
SECRETION DE POTASSIUM PAR LES GLANDES SALIVAIRES
DE RAT.

Expérience	Base	Sérum (15%)			NA (10uM)
		C	H	FK	
1	17.5	17.6	-	14.9	29.1
2	24.8	19.4	23.2	20.7	-
		21.0	20.3		
3	24.0	-	-	25.1	37.5
4	27.2	-	17.6	-	-
5	24.9	-	-	21.8	-
				23.0	
				22.3	
6	18.0	15.7	-	14.7	-
				15.2	
7	36.0	-	-	36.0	-
				37.0	
8	24.2	-	-	20.1	37.6
				22.7	
n	11	5	3	10	3
m	26.0	17.8	20.4	22.5	34.7
d.s.	6.27	2.45	2.80	8.67	4.88

TABLEAU 2

EFFET DU SERUM ET DE L'ADRENALINE SUR LA SECRETION
DE POTASSIUM.

Les résultats sont exprimés en pourcentage, relativement à la sécrétion de base observée en absence de sérum ou de noradrénaline. Les symboles utilisés sont les mêmes que pour le tableau 1.

TABLEAU 2
 EFFET DU SERUM ET DE LA NORADRENALINE SUR LA
 SECRETION DE POTASSIUM DE BASE.

Expérience	C	H	FK	NA (10uM)
1	100.6	-	85.1	166.3
2	78.2	93.5	83.5	-
	84.7	81.8		
3	-	-	104.5	156.0
4	-	64.7	-	-
5	-	-	79.8	-
			84.3)*	
			81.7)*	
			74.4	
6	87.2	-	81.7	-
	84.4	-	63.9	
7	-	-	98.6	-
	-	-	103.8	-
8	-	-	85.5	160.0
n	5	3	10	3
m	87.0	80.0	86.7	166.8
s.d.	8.3	14.5	12.5	5.2
p	<0.01	-	<0.005	-

I.4. DISCUSSION

L'étude de la sécrétion de potassium par les glandes salivaires sous-maxillaires de rat et la stimulation potentielle du sérum FK étaient entreprises dans le but d'établir un test diagnostique valide pour la fibrose kystique et les porteurs du gène. L'effet déjà étudié du sérum provenant de patients atteints de fibrose kystique sur le mouvement ciliaire des tissus d'origine épithéliale permet d'inférer un effet stimulateur du sérum sur ces tissus au niveau biochimique. Il est possible que cet effet ait lieu au niveau du transport des électrolytes. Cette inférence est justifiée du fait de l'interdépendance connue du transport des électrolytes, des sécrétions muqueuses et des mouvements ciliaires.

Contrairement à Bogart et coll. (1982), notre étude n'a démontré aucun effet stimulateur du sérum FK sur la sécrétion de potassium par les glandes salivaires de rat. Le fait qu'une lyse tissulaire pendant l'incubation camoufle l'effet potentiel du sérum par un relargage non spécifique du potassium pourrait être une explication possible du manque de concordance de nos résultats. Cette éventualité n'a pas été vérifiée de façon systématique (en mesurant, par exemple, l'activité d'une enzyme intracellulaire dans le milieu d'incubation). Toutefois, deux éléments sont de bonnes indications de l'intégrité physiologique de notre système: la sécrétion d'environ 20% du potassium intracellulaire pendant la période d'incubation en présence d'ouabaine d'une part et la stimulation d'environ de 100% observé en présence

de 10 μ M de noradrénaline d'autre part sont en accord avec d'autres études utilisant ce système (Selinger et coll., 1974; Martinez et coll., 1976; Bogart et coll., 1982). Nos conditions expérimentales sont apparemment identiques. La préparation et le mode de conservation des séra de même que la concentration d'ouabaine ne semblent pas être mis en cause. Le pH est un facteur critique; grâce au soin particulier que nous avons porté à son contrôle pendant l'incubation, il est toutefois peu probable qu'il soit à la source d'erreur et de variation. D'autre part, le petit nombre d'échantillons testés par Bogart et coll. (1982), de même que son incapacité à reproduire ses propres résultats (communication personnelle) permettent de douter de leur validité. L'inhibition de la sécrétion de potassium que nous observons en présence de sérum humain est constante quel que soit le génotype du donneur. L'origine de cette inhibition, statistiquement significative, est difficile à interpréter avec les données dont nous disposons. Toutefois, le rôle essentiel du calcium dans le mécanisme sécrétoire étant connu, une action inhibitrice pourrait être imputée à l'albumine sérique, chélateur du calcium.

Les études précédentes de l'effet du sérum FK utilisant comme tissu-cible les glandes sous-maxillaires de rat présentent des résultats équivoques en ce qui concerne aussi bien la sécrétion de potassium que la sécrétion de mucus. En effet aussi peu que 4% de sérum FK stimule la sécrétion des glycoprotéines des cellules salivaires de rat en suspension,

(Fleming et Sturgess, 1981) mais aucun effet du sérum FK n'est observé dans un système similaire (Quissell et coll., 1983). Dans une autre étude, aucun effet sur le maintient intracellulaire, l'efflux et la captation de potassium dans les cellules de glandes salivaires en suspension n'était observé (Seale et coll., 1980).

Dans ces conditions, il est évident que ce système biologique n'est pas approprié pour l'établissement d'un outil diagnostique ou de dépistage des porteurs du gène FK.

CHAPITRE II:

Flux de sodium et de potassium

dans les globules rouges modifiés.

II.1. Introduction

L'étude des flux de sodium et de potassium dans les globules rouges s'est faite sur des cellules dont les concentrations de ces électrolytes ont été renversées par traitement chimique. Dans un premier temps, l'acide sulfonique p-chloromercuribenzène (PCMB) était utilisé selon le procédé établi par Garrahan et Rega (1967). Le PCMB perméabilise la cellule aux cations en agissant au niveau des groupements thiols des membranes. La perméabilité membranaire est restaurée par traitement à la cystéine. Le résultat du traitement est l'obtention de globules rouges surchargés en sodium et déplétés en potassium. Au point de vue quantitatif, la surcharge/déplétion est dépendante des concentrations relatives de globules rouges et de PCMB, de même que des concentrations de sodium et de potassium dans le milieu de surcharge (Garrahan et Rega, 1967; Sutherland et coll., 1967). Après modification des concentrations intracellulaires en sodium et en potassium, les flux de ces deux cations pouvaient être étudiés en milieu de Ringer. En utilisant cette méthode, Bjorn (1982) trouvait que dans les globules rouges traités au PCMB (0.1mM) l'influx de potassium était supérieur pour les hétérozygotes. Dans le cas où le PCMB était utilisé à une concentration dix fois moindre, aucune différence n'était décelable entre les deux

populations en ce qui concerne l'influx de potassium; par contre l'efflux de sodium était supérieur pour les globules rouges d'hétérozygotes. Ces résultats se rapprochaient de la signification statistique. Dans le but de confirmer ces résultats et d'en accroître la signification statistique, le même protocole expérimental était utilisé.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé un autre agent perméabilisant, la nystatine. La nystatine se lie aux groupements stérol de la membrane permettant une perméabilisation temporaire aux cations (Cass et Dalmark, 1973). Après rescellage des globules rouges, les flux de sodium et de potassium des cellules modifiées pouvaient être mesurés en milieu de Ringer de façon similaire qu'avec le PCMB. L'avantage principal de l'utilisation de la nystatine est la réduction considérable du temps expérimental.

II.2. Matériels et méthodes.

II.2.1 PCMBS

A. Solutions et produits.

La solution de lavage des globules rouges est composée de (mM): NaCl(150), MgCl (1), TRIS(5).

Le milieu de surcharge est identique à la solution de lavage, contenant de plus du PCMBS (0.1mM ou 0.01mM).

Le milieu de rescellage contient dans la solution de lavage initiale du glucose (11mM) et de la L-CYS (4 ou 2mM, selon la concentration de PCMBS utilisée).

Le milieu de Ringer est composé de (mM): NaCl (145), KCL(5), MgCl (1), CaCl (2), TRIS(2.5) et glucosa(10).

Dans tous les cas, le pH de chaque solution est amené à 7.4 avec de l'acide chloridrique.

Le PCMBS (p-chloromercuribenzène sulfate, sel monosodique), la cystéine (L-Cystéine hydrochloride monohydrate), le chlorure de choline proviennent de chez Sigma Chemical Company (St Louis, Mo). Les sels proviennent de chez Fisher Scientific Ltd (Nepean, Ont.)

B. Préparation des globules rouges

B.1. Lavage des globules rouges

Le sang est prélevé sur héparine par ponction veineuse et centrifugé à 600g pendant 10minutes; puis les globules rouges sont lavés trois fois avec la solution de lavage.

B.2. Depletion/réplétion

Après le dernier lavage, les globules rouges sont remis en suspension dans le milieu de surcharge (hématocrite: environ 10%). L'incubation se fait à 4 C pendant 20hres. sous agitation.

B.3. Rescellage.

Après l'incubation en présence de PCMS, la suspension est centrifugée (600g, 10min.). Les globules rouges sont alors remis en suspension dans le milieu de rescellage contenant 2mM de L-CYS, lorsque la concentration de PCMS était 0.1mM, ou 4mM lorsqu'elle était de 0.01mM. Cette étape se fait à 37 C pendant 1hre. sous agitation. Les suspensions sont ensuite centrifugées (600g., 10min., température ambiante)

B.4. Rétablissement de l'équilibre Na⁺/K⁺.

Les globules rouges sont repris dans du milieu Ringer pour donner une hématocrite d'environ 5%. L'incubation se fait à 37 C sous agitation. A chaque heure, des échantillons sont prélevés, les cellules lavées trois fois dans du chlorure de choline. Après le dernier lavage ils sont repris dans un petit volume de chlorure de choline. L'hématocrite est soigneusement mesurée. Les concentrations de sodium et le potassium sont ensuite mesurées au photomètre à flamme Corning 450.

B.5. Expression des résultats.

Les concentrations de sodium et de potassium en

mEq. par litre de suspension sont rapportées en mEq par litre de cellules. Les équations des droites de régression: $[Na^+] = f(t)$ et $[K^+] = f(t)$ sont calculées. Les pentes k des droites résultantes étaient considérées comme étant les mesures des flux de sodium et de potassium. Voir la figure 2 à titre d'exemple. Pour l'analyse statistique des résultats, nous avons utilisé le test de Student.

II.2.2. NYSTATINE

A. Solutions et produits:

La solution de lavage des globules rouges est composée de (mM): NaCl (145), KCl (5), sucrose (27) dans du tampon Tris/HCl (2.5), pH 7.4.

Le milieu de surcharge contient de plus de la Nystatine (0.05 mg/ml).

Le milieu de rescellage se compose de la solution de lavage initiale contenant de l'albumine bovine (0.4 g%).

Le milieu Ringer est composé de (mM): NaCl (145), KCl (5), MgCl₂ (1), CaCl₂ (2), glucose (10) dans un tampon Tris/HCl (2.5), pH 7.4.

La nystatine et l'albumine proviennent de chez Sigma Chemical Company (St Louis, Mo) et les sels de chez Fisher Scientific Ltd (Nepean, Ont.).

B. Préparation des globules rouges

B.1 Lavage des globules rouges

Le sang, prélevé sur héparine par ponction

veineuse, est centrifugé aussitôt que possible à température ambiante (600g, 10 min.); puis les globules rouges sont lavées trois fois avec la solution de lavage conservée sur de la glace.

B.2 Déplétion/réplétion

Après le dernier lavage, les globules rouges sont remis en suspension dans la même solution (hématocrite: environ 10%). Les flasks contenant les suspensions sont gardées sur de la glace, le contenant est soumis à une agitation rotative (Junior Orbit Shaker, 100tpm). La Nystatine diluée extemporanément dans du méthanol est ajoutée aux suspensions goutte à goutte pour donner une concentration finale de 0.05 mg/ml. Après 20 minutes, les suspensions sont centrifugées pendant 10 minutes à 600g.

B.3 Rescellage

Le rescellage des globules rouges est instantané en absence de Nystatine, moyennant quoi les globules rouges sont simplement lavés cinq fois (600g, 5min.) dans la solution initiale ne contenant pas de Nystatine et en présence d'albumine. L'action de l'albumine est facilitée en gardant le milieu de rescellage à 37 C et en le laissant en contact avec les globules rouges avant chaque centrifugation.

B.4 Rétablissement de l'équilibre Na⁺ / K⁺

Cette étape se déroule de la même façon qu'avec le

PCMBs, le chlorure de choline est remplacé par du chlorure de magnésium isotonique (0.11 M).

Les calculs et l'expression des résultats se font de la même manière que dans le cas du PCMBs.

II.2. Résultats

Le traitement des globules rouges au PCMBS modifie les concentrations intracellulaires en cations. Dans nos conditions expérimentales: hémocrite de 10%, milieu d'incubation contenant 150mM de NaCl et pas de potassium, incubation de 20 heures à 4 C, le potassium (cation normalement prédominant dans les cellules) est pratiquement totalement remplacé par le sodium en présence de PCMBS 0.1mM. En effet, dans ces conditions, la concentration résultante en sodium est en moyenne de 100mEq par litre de globules rouges et celle en potassium de 8 mEq par litre de globules rouges (tableau 3). Le traitement au PCMBS dix fois moins concentré modifie les concentrations de sodium et de potassium de façon moins rigoureuses (en moyenne 57 mEq/l et 37 mEq/l respectivement). Ces modifications étaient identiques chez les contrôles et chez les hétérozygotes (tableau 3). L'étude des flux de sodium et de potassium se faisait pendant la phase de rééquilibration de quatre heures en milieu de Ringer. Pendant cette période, l'efflux de sodium était de 2.88 mEq/l/hre après le traitement au PCMBS 0.1 mM. Cette valeur était identique au résultat de Bjorn (1982) et dans le même ordre de grandeur que dans la littérature (Garrahan et Rega, 1967). Par contre, dans le cas de l'efflux de sodium après traitement au PCMBS 0.01mM, nos valeurs étaient inférieures à celles de Bjorn. De même, l'influx de potassium était trois fois inférieures (PCMBS, 0.1mM) et deux fois inférieures (PCMBS, 0.01mM) aux valeurs trouvées par Bjorn (1982).

La comparaison des flux de sodium et de potassium entre les globules rouges contrôles et hétérozygotes ne démontre, en ce qui concerne notre étude, aucune différence significative (tableau 3 et figures 2 et 3). La comparaison du rapport du flux du sodium par le flux du potassium ne montrait non plus aucune différence entre les deux groupes (figures 2 et 3). Mais puisque le but de notre étude était surtout d'apporter une base statistique plus solide aux résultats de l'étude de Bjorn (1982) en augmentant la taille des échantillons, nous avons groupé nos valeurs et les siennes. L'analyse statistique (tableau 4) démontre alors une augmentation significative ($p < 0.05$) de l'influx de potassium lorsque le PCMSB utilisé était de 0.1mM et une augmentation significative de l'efflux de sodium ($p < 0.05$) lorsque le PCMSB était de 0.01 mM.

Toutefois, comme nous le faisons remarquer plus haut, les mesures des flux de sodium et de potassium obtenues pour nos groupes contrôles étaient inférieures à celles effectuées par Bjorn (1982) dans des conditions expérimentales apparemment identiques. Il nous semble que cette observation est critique car son analyse nous indiquera si le groupement des valeurs présenté dans le tableau 4 est justifié. La comparaison statistique des mesures des flux de sodium et de potassium entre les groupes contrôles des deux études était donc entreprise. Le tableau 5 montre que bien que l'efflux de sodium n'est pas différent pour les globules rouges traités au PCMSB, 0.1mM, les

différences observées pour l'influx de potassium dans cette condition, de même que les flux de sodium et de potassium (PCMBs, 0.01mM) sont statistiquement significatives ($p < 0.01$ et $p < 0.001$). Ces différences se retrouvaient au même degré de signification statistique lors de la comparaison des concentrations résultantes de sodium et de potassium (tableau 5).

La longueur du temps expérimental de la préparation des globules rouges avec le PCMBs nous a conduit à rechercher un autre agent perméabilisant. Un antibiotique, la nystatine, a été utilisé à cet effet (Cass et Dallmark, 1973). Le temps de relargage/déplétion était réduit à 30 minutes ce qui permettait l'étude des flux de sodium et de potassium la journée même du prélèvement. Après traitement des globules rouges à la nystatine (0.05 mg/ml) en milieu contenant 150mM de NaCl et pas de potassium, les concentrations intracellulaires de sodium et de potassium étaient en moyenne de 90 et de 8 mEq par litre de globules rouges respectivement. Ces concentrations intracellulaires résultantes au traitement n'étaient pas différentes pour les hétérozygotes (tableau 3). En période de rééquilibration en milieu de Ringer (NaCl, 145mM et KCl, 5mM), le sodium sortait des cellules à un taux de 2.3 mEq/l/hre en moyenne alors que le potassium y entraît à un taux de 1.3mEq/l/hre en moyenne (tableau 3). L'efflux de sodium et l'influx de potassium étaient linéaire en fonction du temps pendant la période de rééquilibration étudiée (figure 1) de façon identique à ce qui est observé pour le PCMBs. L'efflux de

sodium était significativement augmentée ($p < 0.05$) chez les hétérozygotes alors que l'influx de potassium était inchangé (tableau 3 et figure 4). Le rapport du flux du sodium par le flux du potassium était aussi augmentée de façon significative (figure 4).

Puisque les différents traitements subits par les globules rouges modifiaient de façon différente les concentrations intracellulaires en sodium et en potassium, il était important de se rendre compte dans quelle mesure les concentrations intracellulaires influent sur les flux ioniques. Aucune corrélation n'était trouvée entre les concentrations intracellulaires initiales de sodium et de potassium et leur flux respectifs ou entre la concentration intracellulaire de l'un sur le flux de l'autre. Cette absence de corrélation est en accord avec l'étude précédente (Bjorn, 1982). Etant donné que le sodium et le potassium partagent les mêmes systèmes de transport nous avons exprimé nos résultats de façon relative de l'un par rapport à l'autre. La figure 5 est un exemple du changement de la concentration intracellulaire relative de potassium (K_i) en fonction du temps. Cette augmentation est totalement inhibée en présence d'ouabaine. La pente calculée de la droite de régression, que nous appellerons k_{K_i} , nous a servi de variable dans les comparaisons ultérieures. Cette relation est observée pour les globules rouges modifiés soit avec le PCMBs ou avec la nystatine. Les valeurs, K_i et k_{K_i} , obtenues des globules rouges modifiés au PCMBs provenant

d'un même individu étaient examinées. La figure 6 montre qu'une corrélation positive existe entre la concentration intracellulaire relative de potassium au début de la phase de rééquilibration ($K\%$) et son évolution dans le temps (k). En conséquence, le calcul de ces deux variables a été effectué pour les données obtenues pour les globules rouges contrôles et hétérozygotes modifiés au PCMBS. Les coefficients de corrélation obtenus pour les groupes contrôle et hétérozygote sont de 0.84 et de 0.95 respectivement. Les deux droites ne sont pas statistiquement différentes et les deux groupes ne peuvent être distingués l'un de l'autre :

$$\begin{aligned} \text{Contrôles:} \quad k &= 0.03 \times K\% + 0.4 \\ \text{Hétérozygotes:} \quad k &= 0.03 \times K\% + 0.5. \end{aligned}$$

FIGURE 1

FLUX DU SODIUM ET DU POTASSIUM
DANS LES GLOBULES ROUGES MODIFIES (EXEMPLE)

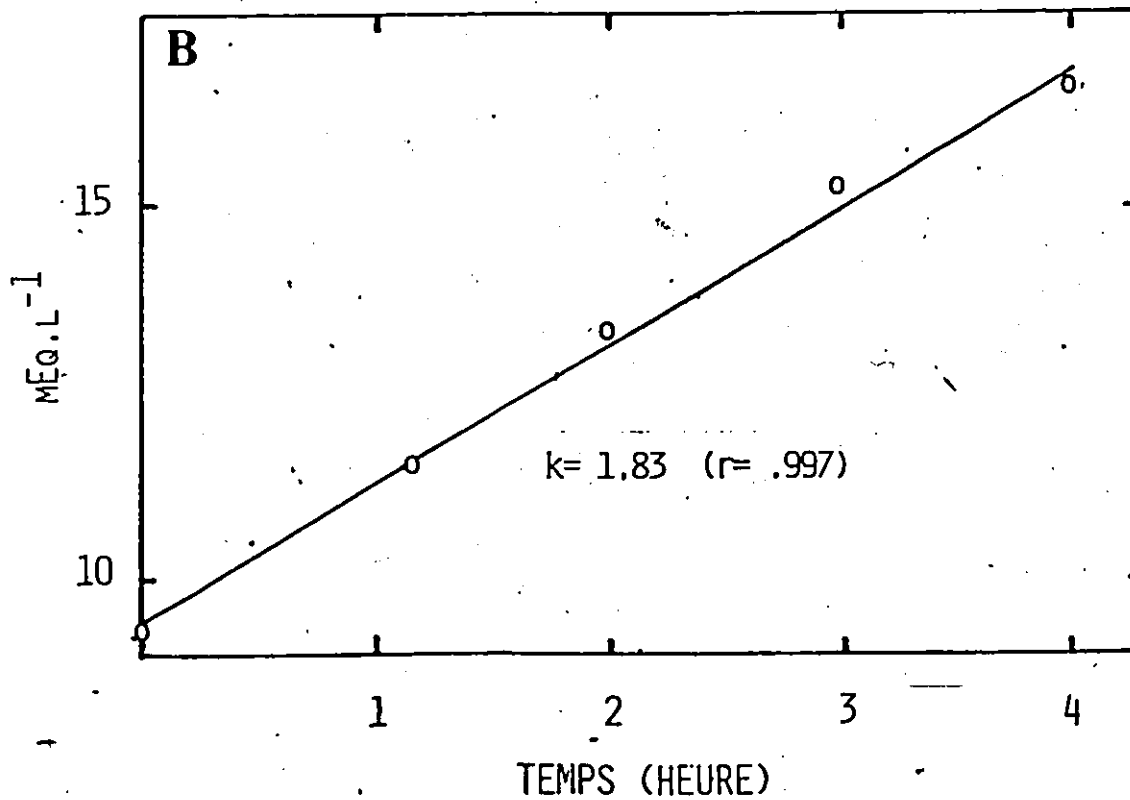
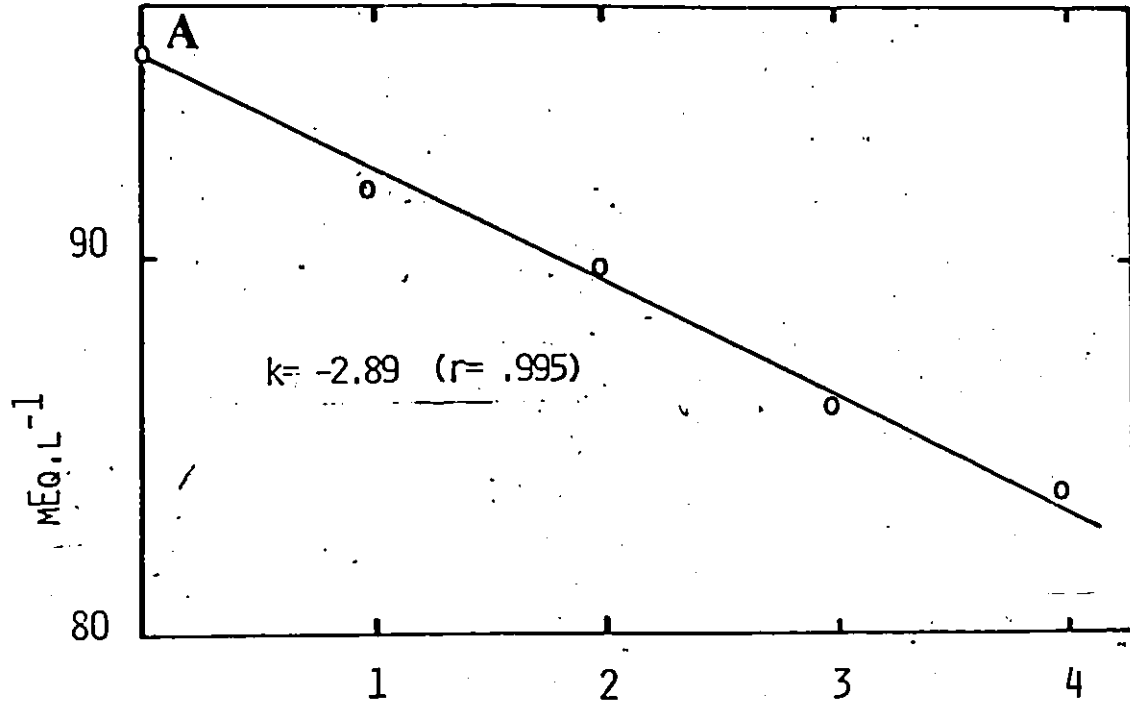
Le temps 0 représente l'état des globules rouges après traitement soit à la nystatine avant l'incubation en milieu de Ringer. Les pentes, k , calculées des droites de régression sont des estimés des constantes de flux total en mEquivalents par litre de cellules par heure (mEq/l/hre).

- A Efflux du sodium.
- B Influx du potassium.

Les résultats présentés ici à titre d'exemple sont obtenus après traitement des globules rouges à la nystatine (0.05 mg/ml). Les flux de sodium et de potassium dans les globules rouges traités au PCMS suivent une cinétique identique.

FIGURE 1

FLUX DU SODIUM ET DU POTASSIUM DANS LES GLOBULES ROUGES
(EXEMPLE).



TEMPS (HEURE)

FIGURE 2

FLUX DU SODIUM ET DU POTASSIUM
DANS LES GLOBULES ROUGES MODIFIES, PCMBS (0.1mM).

Les valeurs individuelles du flux de sodium (k_{Na}), de potassium (k_K) et leur rapport (Na/K) sont représentées pour les groupes contrôle (C) et hétérozygotes (H).

La numérotation indique les échantillons contrôles et hétérozygotes étudiés de façon appariée.

FIGURE 2

FLUX DU SODIUM ET DU POTASSIUM DANS LES GLOBULES ROUGES
 PCMBs (0.1mM).

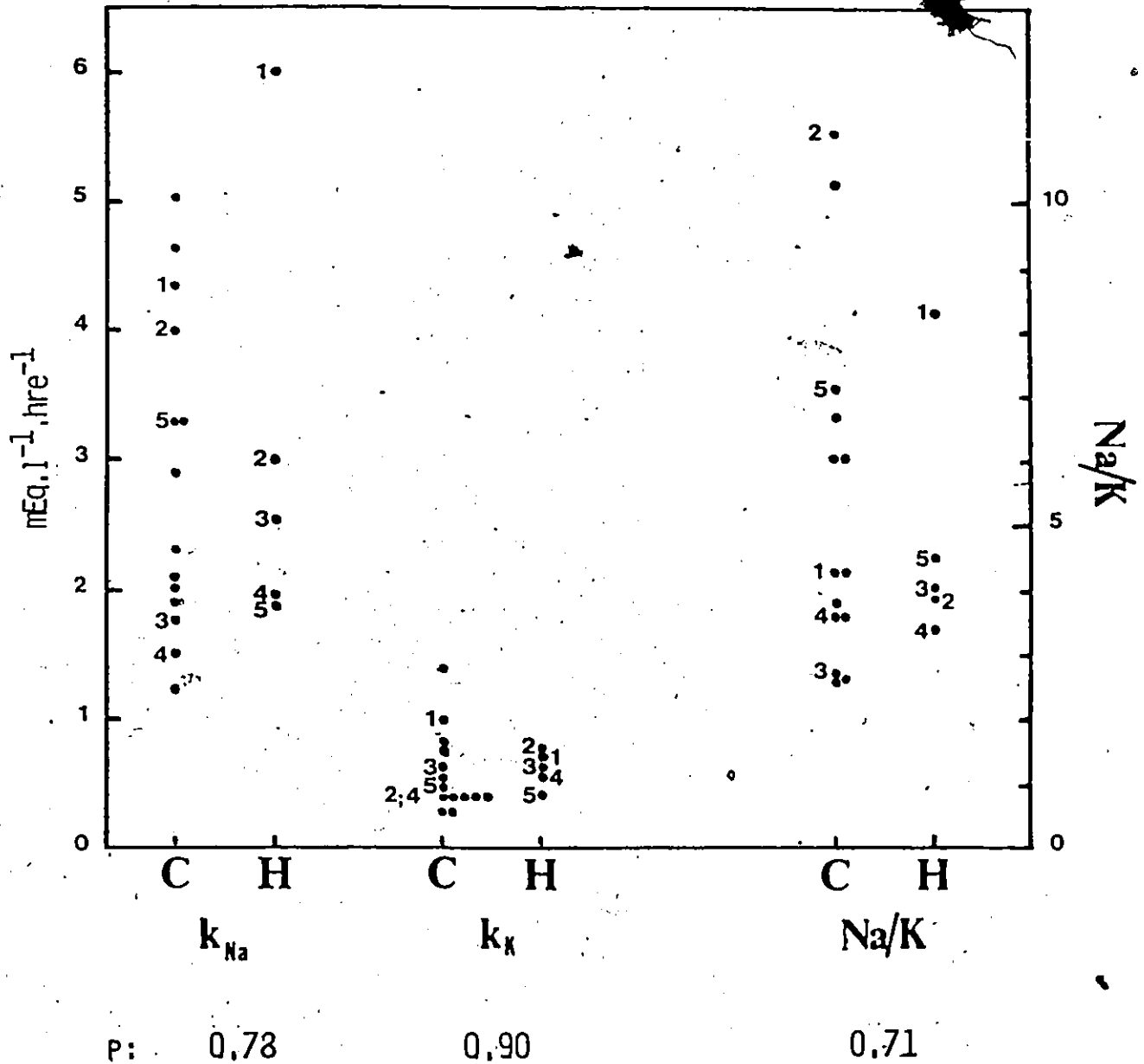


FIGURE 3

FLUX DU SODIUM ET DU POTASSIUM
DANS LES GLOBULES ROUGES MODIFIES, PCMB5 (0.01mM).

Les valeurs individuelles du flux de sodium, de potassium et leur rapport sont représentées pour les groupes contrôles et hétérozygotes.

Les symboles utilisés sont les mêmes que pour la figure 2.

FIGURE 3

FLUX DU SODIUM ET DU POTASSIUM DANS LES GLOBULES ROUGES
 PCMBs (0.01mM).

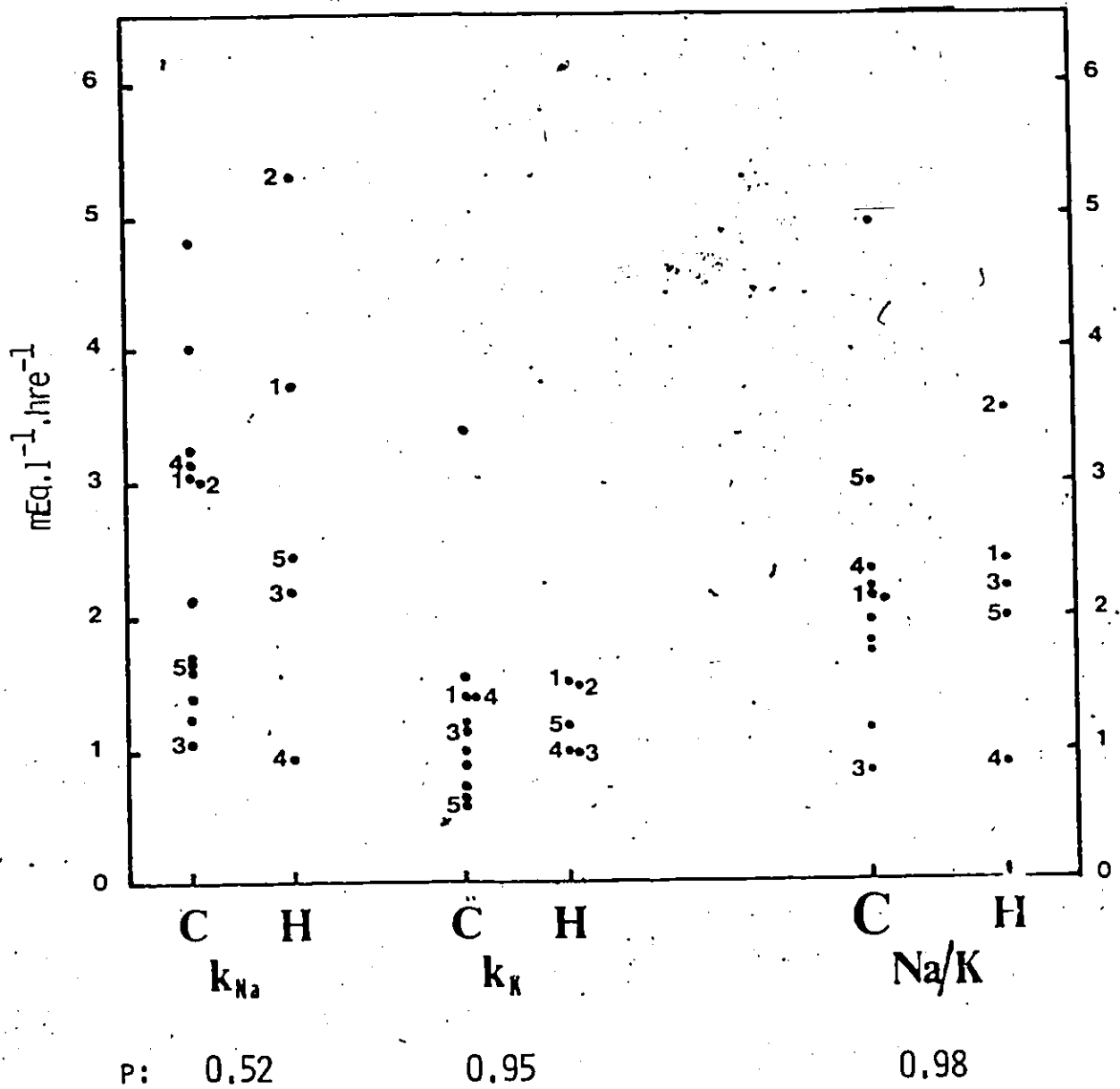


FIGURE 4

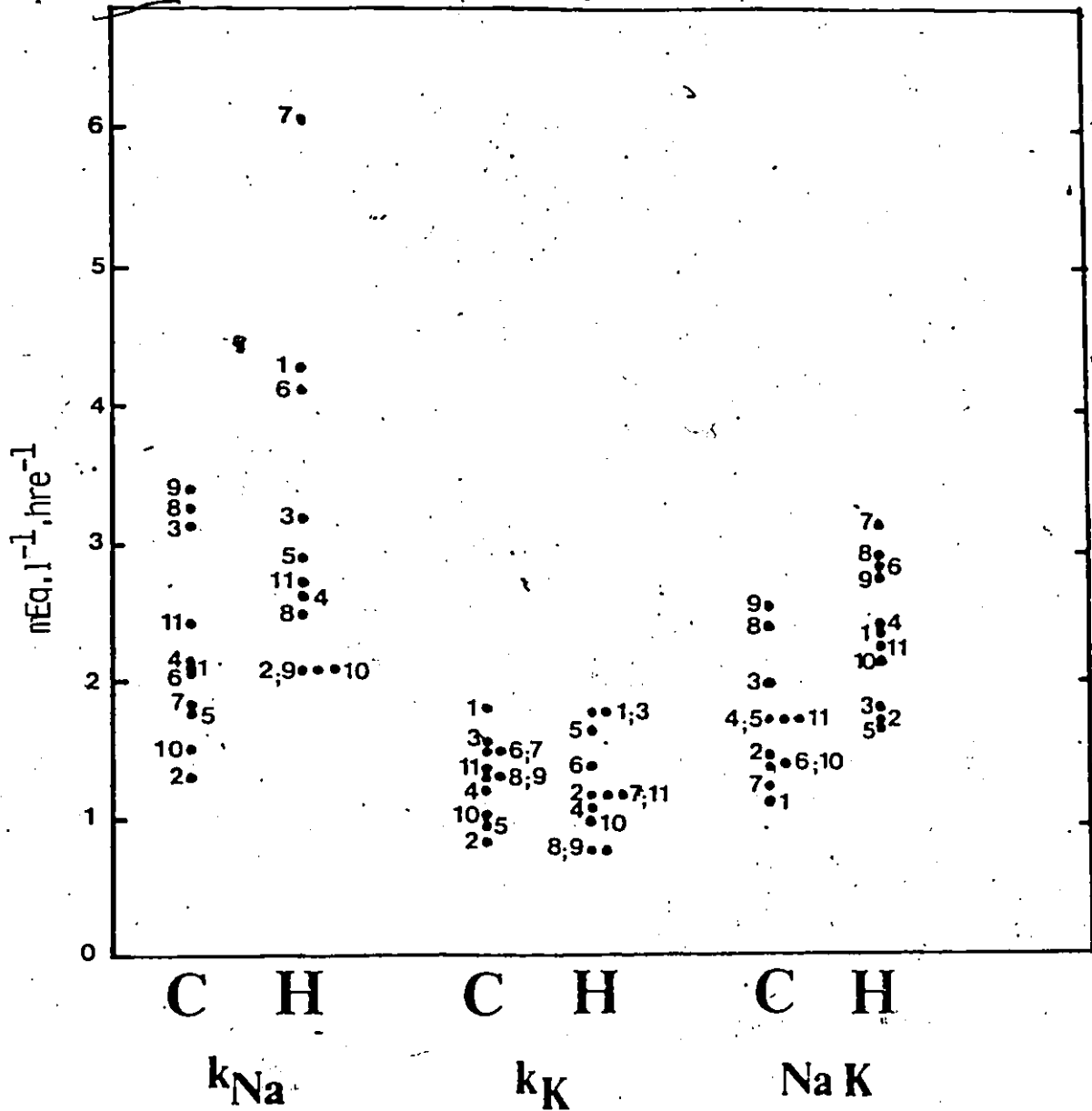
FLUX DU SODIUM ET DU POTASSIUM
DANS LES GLOBULES ROUGES MODIFIES, NYSTATINE (0.05 mg/ml).

Les valeurs individuelles du flux de sodium, de potassium et leur rapport sont représentées pour les groupes contrôles et hétérozygotes.

Les symboles utilisés sont les mêmes que pour la figure 2.

FIGURE 4

FLUX DU SODIUM ET DU POTASSIUM DANS LES GLOBULES ROUGES
 NYSTATINE (0.05mg ml).



p: < 0.05

0.7

< 0.01

TABLEAU 3

FLUX DU SODIUM ET DU POTASSIUM DANS LES GLOBULES ROUGES MODIFIES

Ce tableau résume les résultats présentés dans les figures 2 (PCMBs, 0.1mM), 3 (PCMBs, 0.01mM) et 4 (nystatine, 0.05 mg/ml).

Les moyennes et les déviations standards sont calculées pour les concentrations intracellulaires initiales de sodium ($[Na^+]_i$) et de potassium ($[K^+]_i$) ainsi que pour les mesures de leur flux (k_{Na} et k_K).

L'analyse statistique des groupes contrôle (C) et hétérozygotes (H) a été faite en utilisant le test du t de Student. (N.S.: Non Significatif).

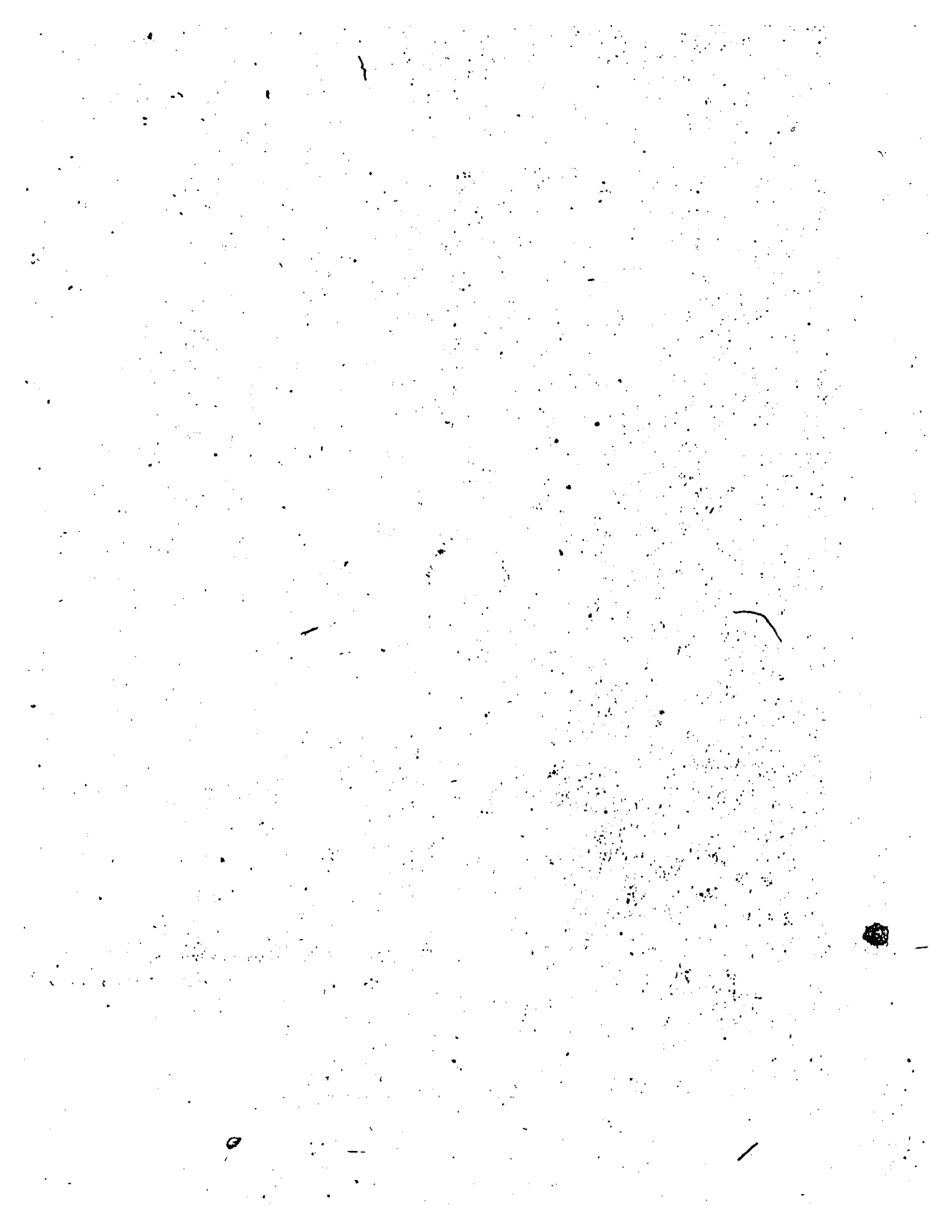


TABLEAU 4

Les valeurs des flux de sodium et de potassium obtenues lors de notre étude (P.G) et de celle de Bjorn, 1982 (S.B) sont comparées individuellement et groupées.

TABLEAU 4

GROUPEMENT DE NOS RESULTATS ET DE CEUX DE BJORN (1982)

		FLUX DU SODIUM (mEq/l/hre)		
		P.G.	S.B.	GROUPES
PCMBS 0.1mM	C	-2.88±1.24 (14)	-2.87±0.99 (8)	-2.88±1.14 (22)
	H	-3.08±1.68 (5) N.S.	-2.97±1.04 (8) N.S.	-3.01±1.26 (13) N.S.
PCMBS 0.01mM	C	-2.46±1.16 (13)	-3.44±0.55 (14)	-2.96±1.01 (27)
	H	-2.92±1.64 (5) N.S.	-3.89±0.90 (14) p<0.2	-3.63±1.17 (19) p<0.05

		FLUX DU POTASSIUM (mEq/l/hre)		
		P.G.	S.B.	GROUPES
PCMBS 0.1mM	C	0.61±0.30 (14)	1.73±0.57 (8)	1.01±0.69 (22)
	H	0.62±0.14 (5) N.S.	2.30±0.81 (8) p<0.2	1.66±1.05 (13) p<0.05
PCMBS 0.01mM	C	1.27±0.78 (11)	2.65±0.64 (14)	1.97±1.02 (25)
	H	1.25±0.25 (5) N.S.	2.93±0.56 (14) N.S.	2.49±0.90 (19) p<0.1

TABLEAU 5

Les valeurs des flux et des concentrations intracellulaires initiales du sodium et du potassium sont comparées pour les groupes contrôle de notre étude (P.G.) et de celle de Bjorn, 1982 (S.B.).

TABLEAU 5

COMPARAISON STATISTIQUE ENTRE
NOS VALEURS ET CEUX DE BJORN (1982)

PCMBS (0.1mM)				
	k_{Na} (mEq/l/hre)	$[Na^+]_i$ (mEq/l)	k_K (mEq/l/hre)	$[K^+]_i$ (mEq/l)
P.G.	-2.88±1.24 (14)	100.3±6.77 (14)	0.61±0.30 (14)	7.90±3.46 (14)
S.B.	-2.87±0.99 (8) N.S.	98.1±9.93 (8) N.S.	1.73±0.57 (8) p<0.001	11.9±2.58 (8) p<0.05
PCMBS (0.01mM)				
P.G.	-2.46±1.16 (13)	56.8±9.17 (13)	1.27±0.78 (11)	36.6±7.36 (11)
S.B.	-3.44±0.55 (14) p<0.01	77.6±11.3 (14) p<0.001	2.65±0.64 (14) p<0.001	22.4±8.62 (14) p<0.001

FIGURE 5

EVOLUTION DE LA CONCENTRATION RELATIVE DE POTASSIUM.

Pour chaque prélèvement, la concentration intracellulaire de potassium est rapportée à la somme des concentrations intracellulaires de sodium et de potassium, les résultats sont exprimés en pourcentage: $\%K = \frac{K}{Na + K} \times 100$

Na + K

Les globules rouges étaient traités à la nystatine (0.05 mg.ml^{-1})

● en absence d'ouabaine.

○ en présence d'ouabaine ($1.4 \mu\text{M}$).

FIGURE 5

CONCENTRATION INTRACELLULAIRE RELATIVE DE POTASSIUM.

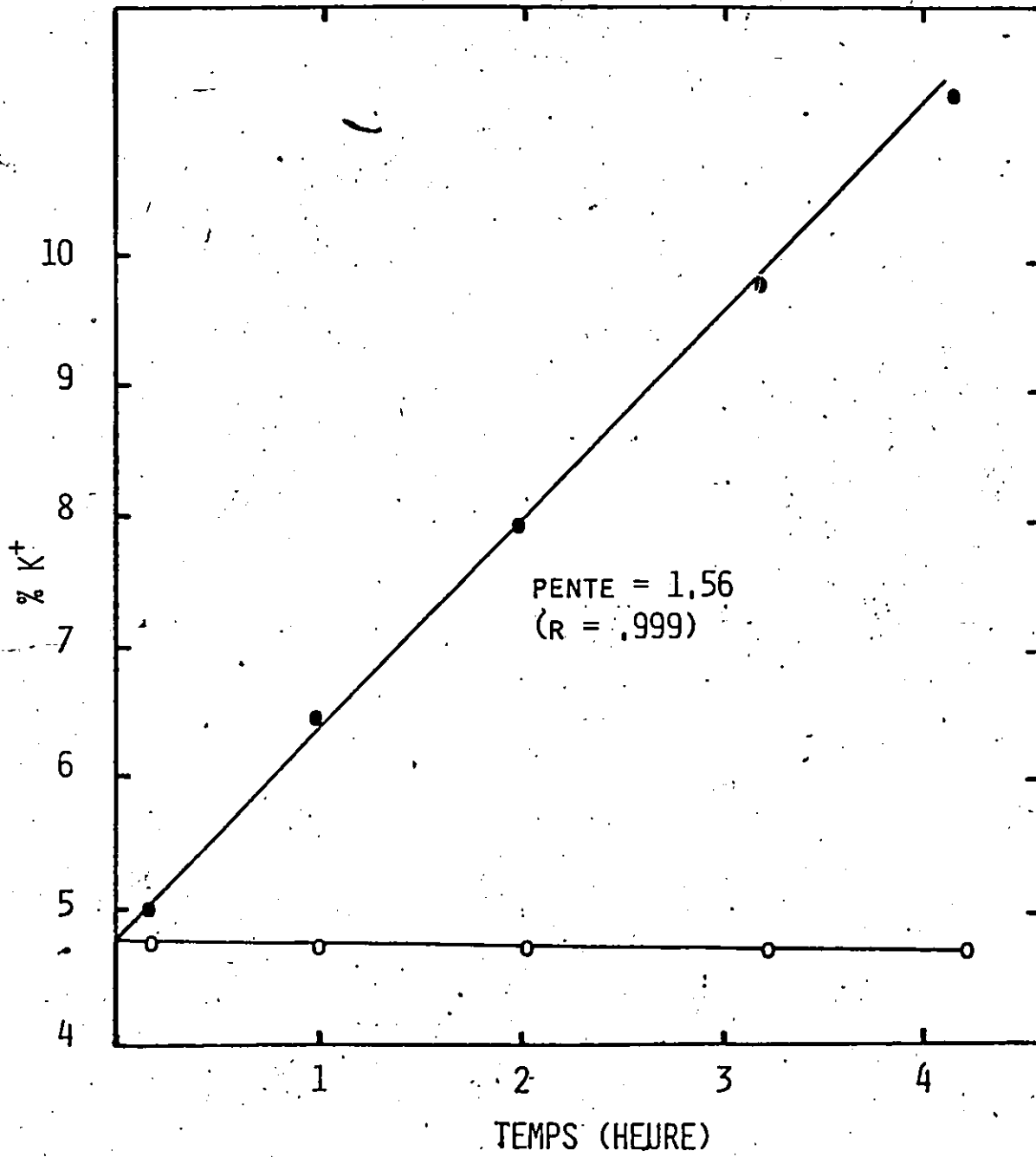


FIGURE 6

RELATION ENTRE LA CONCENTRATION, RELATIVE DE POTASSIUM INITIALE
ET SON EVOLUTION.

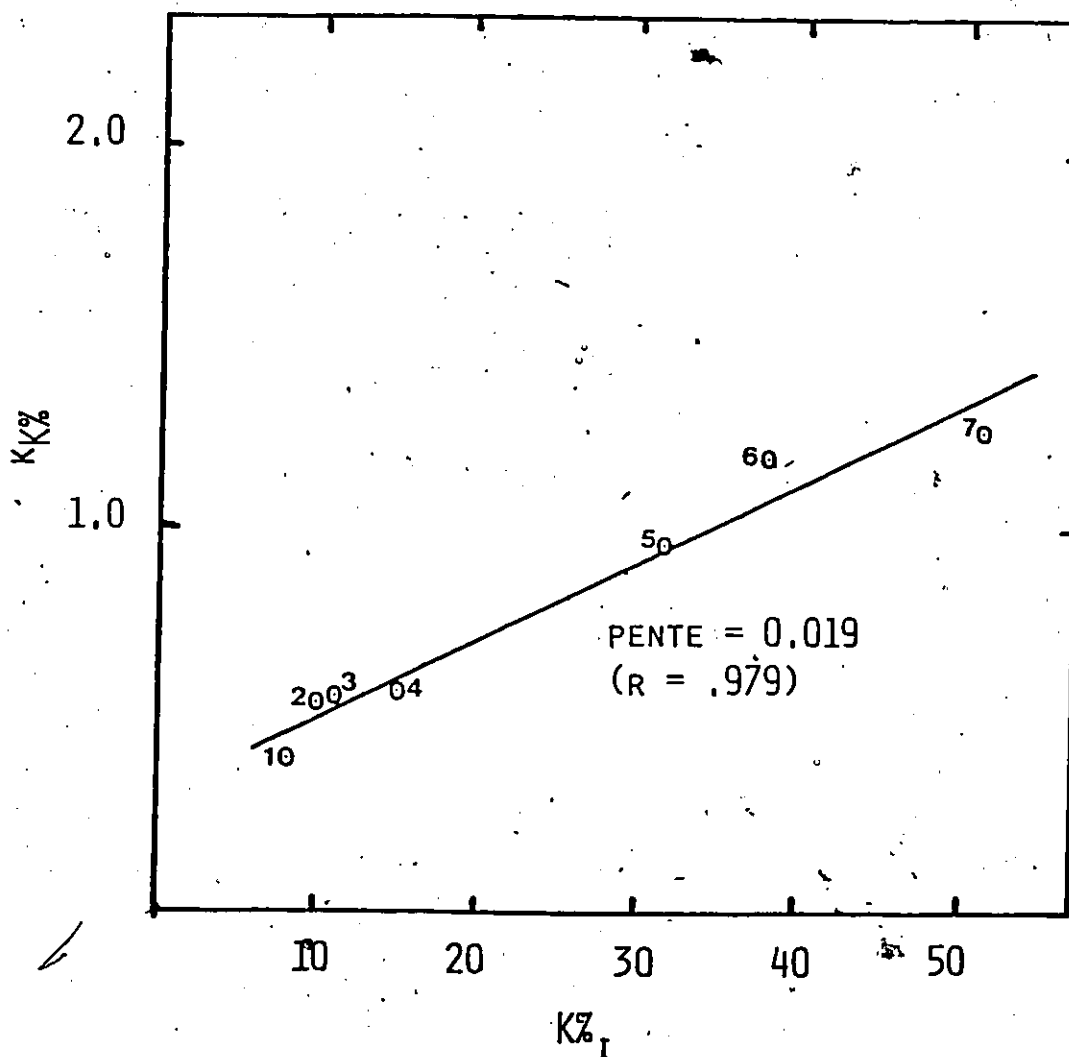
La figure réunit les résultats obtenus à partir des globules
rouges d'un même individu. Les cellules étaient traitées au
PCMS, 0.1 mM (points 1-4) ou 0.01 mM (points 5-7).

k_{K^+} représente la pente calculée de la droite de régression:

$$K^+ = f(\text{temps}).$$

FIGURE 6

RELATION ENTRE LA CONCENTRATION RELATIVE DE POTASSIUM INITIALE ET SON EVOLUTION DANS LE TEMPS.



II.4 DISCUSSION

Les deux agents perméabilisant utilisés dans cette étude, le PCMBs et la nystatine, nous permettaient d'obtenir des globules rouges dans lesquels le cation prédominant est le sodium. Au cours de la phase de ré-équilibration en milieu de Ringer, l'efflux de sodium et l'influx de potassium pouvaient être mesurés.

Les résultats obtenus dans l'étude au PCMBs ne mettait aucune différence significative en évidence entre les groupes contrôle et hétérozygotes. Les différences obtenues dans une étude précédente (Bjorn, 1982) utilisant le même procédé expérimental étaient examinées. Bien qu'au seuil de la signification statistique ces résultats indiquaient une tendance: augmentation de l'influx de potassium lorsque le PCMBs utilisé était de 0.1mM et augmentation de l'efflux de sodium lorsque la concentration de PCMBs était de 0.01mM. Puisque le procédé expérimental était le même ces résultats et les nôtres étaient groupés. Dans ce cas, les différences observées par Bjorn entre les deux groupes étaient hautement significatives. Toutefois, le groupement des valeurs ne semble pas être légitime. En effet en comparant par exemple les groupes contrôles des deux études ni les concentrations initiales des cations ni les flux transmembranaires n'étaient identiques. Ces différences peuvent venir soit de l'échantillonnage soit de différences introduites par les opérateurs lors du procédé expérimental.

Garay et Garrahan (1973) démontraient une relation entre les concentrations intracellulaires initiale de sodium et de

potassium et leurs flux dans les globules rouges modifiés au PCMB. Dans leurs conditions, le flux total de sodium augmentait de façon sigmoïdale en fonction de la concentration intracellulaire initiale de sodium (jusqu'à 70 mEq/l) en présence de potassium intracellulaire élevé. Dans nos conditions expérimentales nous pensions pouvoir observer une telle relation. En effet, l'utilisation de deux concentrations différentes de PCMB nous permettait d'obtenir des concentrations intracellulaires variant de 38 à 110 mEq/l et des concentrations intracellulaires de potassium variant de 3.5 à 50 mEq/l. Toutefois en utilisant ces données aucune relation entre les concentrations intracellulaires et les flux n'était mise en évidence.

La concentration relative de potassium était calculée en pensant pouvoir démontrer les interdépendances connues entre les concentrations intracellulaires du sodium et du potassium et leurs transports. Bien qu'une corrélation positive ait été obtenue entre la concentration relative de potassium intracellulaire et son évolution dans le temps au cours de la phase de ré-équilibration, l'interprétation de cette corrélation est problématique à cause de l'utilisation du rapport de deux variables qui a été faite.

L'utilisation du PCMB dans ce genre d'étude peut être mis en question bien qu'un tel procédé expérimental ait mis en évidence une anomalie du transport du sodium dans le cas de l'hypertension primaire (Garay et coll., 1979). En effet, une lyse cellulaire est observée après traitement au

PCMBs, que sa concentration soit de 0.1mM ou de 0.01 mM. Cette lyse observée dans notre étude et mesurée dans l'étude de Bjorn (1982) est aussi observée au cours de la phase de rééquilibration, ce fait démontre que les cellules restent fragiles malgré le traitement à la cystéine dont le rôle est de resceller les cellules en réagissant avec les molécules de PCMBs. Cette fragilité peut s'expliquer par le fait qu'une quantité non négligeable de PCMBs pénètre jusqu'au cytoplasme et est piégée par les groupes thiol de l'hémoglobine principalement et que cette fraction peut être relarguée ultérieurement (Rothstein et coll., 1974). Quoiqu'il en soit, il est évident qu'une telle fragilité résultera à une perméabilité passive accrue aux ions, il est donc légitime de penser que les flux totaux du sodium et du potassium mesurés dans ces conditions ne sont pas la simple somme de la pompe Na^+/K^+ et du co-transport.

La réserve que l'on doit observer dans l'interprétation des résultats obtenus avec le PCMBs accroit d'autant plus l'intérêt de la nystatine. En effet, en plus de la réduction du temps expérimental, l'usage de la nystatine ne semble pas provoquer de fragilité membranaire. L'absence de lyse significative, bien que non mesurée spécifiquement, est déduite de l'absence d'hémoglobine dans les milieux d'incubation des différentes phases du processus expérimental. Dans ces conditions, l'augmentation significative de l'efflux de sodium observée pour les globules rouges hétérozygotes est plus crédible. Il est toutefois difficile de déduire de ces résultats quel est

l'élément anormal du système de transport ionique. Des travaux antérieurs (Balfe et coll., 1968; Lapey et Gardner, 1970; Cole et Dirks, 1972) démontraient une réduction de transport du sodium insensible à l'ouabaine dans les cellules fibrose kystique. Si le co-transport Na^+/K^+ est anormal et que l'augmentation de l'efflux de sodium observé dans nos conditions expérimentales en résulte, on devrait s'attendre aussi à une réduction de l'influx de potassium. En effet, par ce système, la sortie d'un Na^+ s'accompagne par la sortie d'un K^+ . Il est toutefois possible que le degré de sensibilité de la méthode utilisée soit limitant pour la mesure du changement du potassium intracellulaire en fonction du temps. Cette limitation peut se situer soit au niveau des mesures au photomètre à flamme soit au niveau de la mesure de l'hématocrite. L'augmentation de l'efflux de sodium accompagnée d'aucun changement dans l'échange de potassium peut s'expliquer aussi par le fait que le sodium peut emprunter d'autres routes d'échange tel que le système de co-transport sodium/potassium/chlore décrit dans les globules rouges humains (Wiley et Cooper, 1974). Le modèle décrivant ce système (Kregenow, 1981) implique un échange Na^+ (ou K^+)/ H^+ lié à un échange OH^- (ou HCO_3^-)/ Cl^- . Si tel est le cas, l'augmentation de l'efflux de sodium observée dans nos conditions expérimentales pour les globules rouges hétérozygotes pourrait être secondaire à une anomalie primaire du transport du chlore tel que proposé par Quinton (1983) et par Widdicombe et coll. (1985).

BIBLIOGRAPHIE

ARAKI H., FIELD M., SHWACHMAN H. (1975): A new assay for cystic fibrosis factor effects of sera from patients with cystic fibrosis in the in vitro electrical properties of rat jejunum.

Pediatr. Res. 9: 932-934

BALFE J.W., COLE C., WELT L.G. (1968): Red cell transport defect in patients with cystic fibrosis and their parents.

Science 162: 689

BESLEY G.J.N. et PATRICK A.D. (1969): The effect of cystic fibrosis plasma and saliva on enzyme systems of cell membranes.

Fifth International Cystic Fibrosis Conference. Churchill College, Cambridge Paper no.2

BJORN S. (1982): Sodium transport in chemically modified erythrocytes from normal subjects and carriers of the cystic fibrosis gene.

Thesis (MSc). University of Ottawa

BOGART B.I., CONOD E.J., CONOVER J.H. (1977): The biological activities of cystic fibrosis serum. The effects of cystic fibrosis sera and calcium ionophore A 23187 on rabbit tracheal experiments.

Pediatr. Res. 11: 131-13

BOGART B.I., CONOD E.J., GAERLAN P.F., DENNING C.F., CONOVER J.H. (1979): Biological activities of cystic fibrosis serum. III. Cystic fibrosis serum induced uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by rabbit tracheal explants.

Bioch. Biophys. Res. Commun. 88: 1398-

BOGART B.I., PICARELLI J., GAERLAN P.A., DENNING C.R. (1982): Biological activities of cystic fibrosis serum. IV. Stimulation of the calcium mediated K efflux from rat submandibular gland fragments.

Pediatr. Res. 16: 223-226

BOWMAN B.H., LOCKHART L.H. McCOMBS M.L. (1969): Oyster ciliary inhibition by cystic fibrosis factor.

Science 164: 325-326

BOWMAN B.H., McCOMBS M.L., LOCKHART L.H. (1970): Cystic fibrosis: characterization of the inhibitor to ciliary

action in oyster gills.
Science 167: 871-873

BRESLOW J.L., MCPHERSON J., EPSTEIN J. (1981): Distinguishing homozygous and heterozygous cystic fibrosis fibroblasts from normal cells by differences in sodium transport.
New Engl. J. Med. 304: 1-5

BROWN G.A., OSHIN A., GOODCHILD M.C., ANDERSON C.M. (1971): Inhibition of sugar transport by plasma from cystic fibrosis patients.
Lancet ii: 639-640

CASS A., DALMARK M. (1973): Equilibrium dialysis of ions in Nystatin treated red cells.
Nature (New Biol.) 244: 47-49

COLE C.H. et DIRKS J.H. (1972): Changes in erythrocyte membrane ATPase in patients with cystic fibrosis.
Pediatr. Res. 6: 616-621

CZEGLEDY-NAGY E., STURGESS J.M. (1976): Cystic fibrosis. Effects of serum factors on mucus secretion.
Lab. Invest. 35: 588-592

DAGHER G., GARAY R.P. (1980): A Na^+/K^+ co-transport assay for essential hypertension.
Can. J. Biochem. 58: 1069-1074

DANKS D.M., ALLAN J., ANDERSON B.M. (1965): A genetic study of fibrocystic disease of the pancreas.
Ann. Hum. Genet. 28: 323-340

DANKS D.M., ALLAN J., PHELAN P.D., CHAPMAN C. (1983): Mutations at more than one locus may be involved in cystic fibrosis. Evidence based on first-cousins data and direct counting of cases.
Am. J. Hum. Genet. 35: 838-844

DI SANT'AGNESE P.A. et TALAMO R.C. (1967): Pathogenesis and pathophysiology of cystic fibrosis of the pancreas.
New Eng. J. Med. 277: 1399-1408

DOGGETT R.G., HARRISON G.M., PATRICK T.A. (1973): Cystic fibrosis: in vitro reversal of the ciliostatic character of serum and parotid secretion by heparin.

Nature (New Biol.) 243:250-251

FEIG S.A., SEGAL G.B., KERN K.A., OSHER A.B., SCHWARTZ R.H. (1974): Erythrocyte transport function in cystic fibrosis. *Pediatr. Res.* 8: 594-597

FLEMING N., STURGESS J.M. (1981): Stimulation of glycoprotein secretion in dispersed submandibular gland acini by cystic fibrosis serum. *Experientia* 37: 139-141

GARAY R.P., DAGHER G., PERNOLLET M.-G., DEVYNEK M.-A., MEYER P. (1980): Inherited defect in a Na^+ , K^+ co-transport system in erythrocytes from essential hypertensive patients. *Nature* 284: 281-283

GARAY R.P., ELGHOZI J.L., DAGHER G., MEYER P. (1980): Laboratory distinction between essential and secondary hypertension by measurement of erythrocyte cation fluxes. *New Engl. J. Med.* 302:769-771

GARAY R.P., GARRAHAN P.J. (1973): The interaction of sodium and potassium with the sodium pump in red cells. *J. Physiol.* 231: 297-325

GARAY R.P., MEYER P. (1979): A new test showing abnormal net Na^+ and K^+ fluxes in erythrocytes of essential hypertensive patients. *Lancet* (i): 349-353

GARRAHAN P.J., REGA A.F. (1967): Cation loading of red blood cells. *J. Physiol.* 193: 459-466

GLYNN I.M. et KARLISH S.J.D. (1975): The sodium pump. *Ann. Rev. Physiol.*: 37: 13-55

HADDEN J.W., HAUSEN L.G., SHAPIRO B.L., WARWICK W.J. (1973): Erythrocyte enigmas in cystic fibrosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142: 577-579

HORTON C.R., COLE W.Q., BADER H. (1970): Depressed Ca^{++} transport ATPase in cystic fibrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40: 505-509

KATZ S. (1978): Calcium and sodium transport processes in patients with cystic fibrosis.
Pediatr.Res. 12: 1033-1038

KNOWLES M., GATZY J., BOUCHER R.C. (1983): Relative ion permeability of normal and cystic fibrosis nasal epithelium
J.Clin.Invest. 71:1410-1417

KNOWLES M.R., STUTTS M.J., SPOCK A., FISHER N., GATZY J.T., BOUCHER R.C. (1983): Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium
Science 221: 1067-1070

KREGENOW F.M. (1973): The response of duck erythrocytes to norepinephrine and on elevated extracellular potassium. Volume regulation in isotonic media.
J.Gen.Physiol. 61: 509-527

KREGENOW F.M.(1983): Sodium and potassium transport in erythrocytes.
Ann.Rev.Physiol. 43: 493-505

LAPEY A. et GARDNER J.D. (1970): Abnormal erythrocyte sodium transport in cystic fibrosis.
Pediatr.Res. 4: 478

MANGOS J.A., MCSHERRY N.R. (1968): Studies of the mechanism of inhibition of sodium transport in cystic fibrosis of the pancreas.
Pediatr. Res.: 2: 378-384

MANGOS J.A., MCSHERRY N.R., BENKE P.J. (1967): A sodium transport inhibitory factor in the saliva of patients with cystic fibrosis of the pancreas.
Ped. Res. 1: 436-442

MARTINEZ J.R. et QUISSELL D.O. (1976): Potassium release from the rat submandibular gland in vitro. II. Induction by parasympathomimetic secretagogues.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 199: 518-525

MARTINEZ J.R., QUISSELL D.O., GILES M. (1976): Potassium release from the rat submaxillary gland in vitro. I. Induction by catecholamines.
J.Pharmacol.Exp.Ther. 198: 385-394

McEVOY F.A., DAVIES R.J., GOODCHILD M.C., ANDERSON C.M.
(1974): Erythrocyte membrane properties in cystic fibrosis.
Clin.Chim.Acta 54: 195-204

MINER C., HUALLEM S., SEYMOUR C.A. (1982); Characterization
of the calcium pump in the red cells of patients with cystic
fibrosis.
J.Physiol. 338: 63P-64P

MORIN C.L., DESJEUX J.F., AUTHIER L. (1973): Effect of
saliva and serum from patients with cystic fibrosis on
intestinal uptake of amino acids in rat.
Biomedicine (Express) 19: 133-137

QUINTON P.M. (1983): Chloride impermeability in cystic
fibrosis.
Nature 30: 421-422

QUINTON P.M., BIJMAN J. (1983): Higher bioelectric
potentials due to decreased chloride absorption in the sweat
glands of patients with cystic fibrosis.
New Engl.J.Med. 308:1185-1189

QUISSELL D.O., MCDONALD R.J., BARZEN K.A., DEISHER L.M.
(1983): Effects of serum from normal and cystic fibrosis
subjects on mucin secretion from dispersed rat submandibular
cells.
Pediatr. Res. 17:899-902

ROMEO G. (1984): Cystic fibrosis. A single locus disease.
In: Lawson D. (Ed.): Cystic fibrosis Horizons. ppl55-164

ROTHSTEIN A., KNAUF P.A., CABANTCHIK Z.I., BALSHIN M.
(1974): The location and chemical nature of drug targets
within the human erythrocytes membranes
in Drugs and transport process - Callingham B.A. (ed.), MacMillan

RUDICK V.L., WOOTEN M.W., RUDICK M.J. (1984): Secretory
activity of hamster tracheal explants and isolated tracheal
epithelial cells and the effects of cystic fibrosis serum.
J.Cell.Physiol. 118: 67-78

SANDERSON M.J., SLEIGH M.A. (1981): Serum proteins
agglutinate cilia and modified ciliary coordination
Pediatr. Res. : 219-228

SCHAAP T., COHEN M.M. (1976): A proposed model for the inheritance of cystic fibrosis.
in: Cystic fibrosis: Projections into the future. Mangos J.A., Talamo R.I (eds.) NY Stratton

SCHNEYER L.H. (1967): Exchange of potassium in rat submaxillary gland.
In: Secretory mechanisms of salivary glands. Schneyer L.H. et Schneyer C.A. (Eds). pp32-55

SEALE T.W., FLUX M., RENNERT O.M., QUISSELL D.O., BARZEN K.A., LAFFERTY J.L. (1980): Cystic fibrosis factors: Effect of serum on the secretory response of dispersed rat submandibular cells.
Pediatr.Res. 14: 1398-1402

SELINGER Z., EIMERL S., SAVION N., SCHRAMM M.(1974): A Calcium ionophore A23187 simulating hormone and neurotransmitter action in the rat parotid and pancreas glands.
In: Secretory mechanisms of exocrine glands. Thorn N.A., Petersen O.H. (eds.) Munksgaard, Copenhagen, 1974

SEYMOUR C.A. et DAVIS J.A. (1984): A membrane abnormality in red cells of patients carrying the cystic fibrosis gene.
In: Lawson D. (Ed.): Cystic fibrosis - Horizons. p406

SING C.F., RISSER D.R., HOWATT W.F., ERICKSON R.P. (1982): Phenotypic heterogeneity in cystic fibrosis.
Am.J.Med.Genet. 13:179-195

SPOCK A., HEICK H.M.C., CRESS H., LOGAN W. (1967): Abnormal serum factor in patients with cystic fibrosis of the pancreas.
Pediatr. Res. 1: 173-177

STARK R.J., O'DOHERTY J. (1982): Effect of ionophore A23187 on cytosolic Ca and enzyme secretion.
Am.J.Physiol. 243: C196-C199

SUTHERLAND R.M., ROHSTEIN A., WEED R.I. (1967): Erythrocyte membrane sulfhydryl groups and cation permeability.
J.Cell.Physiol. 69: 185-198

TALAMO R.C., ROSENSTEIN B.J., BERINGER R.W. (1983): Cystic

fibrosis.

In Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S., Goldstein J.L., Brown M.S. (Eds). The metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill. pp:1889-1917

TAUSIG L.M., GARDNER J.D. (1972): Effects of saliva and plasma from cystic fibrosis patients on membrane transport. Lancet ii: 1367-1368

TEGNES H., CEDER O., ROOMARES G.M., KOLLBERG H., TOFEMALM N.G. (1981): Effects of cystic fibrosis serum and cell culture medium on the mucocilliary activity of the respiratory tract. An in vitro study in rabbits. Acta paediatr.Scand. 70: 629-633.

WIDDICOMBE J.H., WELSH M.J., FINKBEINER W.E. (1985): Cystic fibrosis decreases the apical membrane chloride permeability of monolayers cultured from cells of tracheal epithelium. Proc.Natl.Acad.Sci. 82: 6167-6171

WILEY J.S. et COOPER R.A. (1974): A furosemide sensitive cotransport of sodium plus potassium in human red cells. J.Clin.Invest. 53: 745-755

WILSON G.B. et BAHIN V.J. (1980): Synthesis and secretion of cystic fibrosis ciliary dyskinesia substances by purified subpopulations of leukocytes. J.Clin.Invest. 66: 1010-1019

WILSON G.B., MONSHER M.T., FUDENBURG H.H. (1977): Studies on cystic fibrosis using isoelectric focusing. III. Correlation between cystic fibrosis protein and ciliary dyskinesia activity in serum shown by a modified rabbit tracheal bioassay. Pediatr. Res. 11: 143-147