



HAL
open science

**MESURES RÉPÉTÉES DE LA PERMÉABILITÉ
CAPILLARO-ALVÉOLAIRE A UNE
MACROMOLÉCULE AU COURS DE MODÈLES DE
LÉSION PULMONAIRE INFLAMMATOIRE CHEZ
LE CHIEN**

Raphael Briot

► **To cite this version:**

Raphael Briot. MESURES RÉPÉTÉES DE LA PERMÉABILITÉ CAPILLARO-ALVÉOLAIRE A UNE MACROMOLÉCULE AU COURS DE MODÈLES DE LÉSION PULMONAIRE INFLAMMATOIRE CHEZ LE CHIEN. Physiologie [q-bio.TO]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2005. Français. NNT: . tel-00184981

HAL Id: tel-00184981

<https://theses.hal.science/tel-00184981>

Submitted on 4 Nov 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

présentée par
Raphaël BRIOT

pour obtenir le titre de
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
GRENOBLE I**

**Ecole Doctorale Ingénierie pour la Santé,
la Cognition et l'Environnement**

Spécialité : Modèles et Instruments en Médecine et Biologie

MESURES RÉPÉTÉES DE LA PERMÉABILITÉ CAPILLARO-ALVÉOLAIRE A UNE MACROMOLÉCULE AU COURS DE MODÈLES DE LÉSION PULMONAIRE INFLAMMATOIRE CHEZ LE CHIEN

Application à des essais thérapeutiques

Date de soutenance : 21 Juin 2005

Composition du Jury :

Mr. Le Professeur J.P. VIALE	Rapporteur
Mr. Le Professeur J. HAMACHER	Rapporteur
Mr. Le Professeur P. BACONNIER	Examineur
Mr. Le Professeur M. ZELTER	Examineur
Mr. Le Professeur J.F. PAYEN	Examineur
Mr. Le Docteur F. GRIMBERT	Directeur de thèse

Thèse préparée au laboratoire TIMC-PRETA, UMR CNRS 5525, Faculté de Médecine de
Grenoble, 38700 LA TRONCHE

Je dédie cette thèse :

A mes parents dont les valeurs inspirent aujourd'hui mes choix

A l'entourage familial dont l'aide fut précieuse

Aux amis qui m'ont encouragé

A Catherine,

Ninon, Cyrielle et Ronan

qui m'ont supporté jusqu'au bout ...

Je remercie

Messieurs les Professeurs J. HAMACHER et J.P. VIALE, qui m'ont fait l'honneur de juger et rapporter ce travail.

Monsieur le Professeur J.F. PAYEN qui sait insuffler au sein du Département d'Anesthésie-Réanimation du CHU de Grenoble, le goût de la recherche et la curiosité scientifique.

Monsieur le Professeur P. BACONNIER pour m'avoir fait découvrir dès le DEA la richesse des échanges pluridisciplinaires, et pour la bonne humeur qui règne dans son équipe.

M. le Professeur M. ZELTER qui m'a fait l'honneur de s'intéresser à ce travail.

Monsieur le Docteur F. GRIMBERT, qui a dirigé ce travail avec patience et qui a essayé de m'apprendre la rigueur et l'opiniâtreté scientifique. Ces années passées à ces côtés auront été très riches autant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Madame le Docteur G. Benchetrit de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir fait bénéficier de l'ambiance chaleureuse qu'elle sait y faire régner.

Je remercie Messieurs les Docteurs J.L. MARTIEL et Y. LAVAUT qui m'ont aidé à débroussailler quelques situations, pour moi, mathématiquement épineuses.

Je remercie mes collègues les Docteurs D. ANGLADE et S. BAYAT, pour avoir fait la trace avant moi et pour leur amicale coopération.

Je remercie tout particulièrement Madame A. BROUTA pour sa gentillesse et son soutien pendant ce travail et pour l'affection qu'elle porte aux animaux.

Sommaire

I – INTRODUCTION	7
I.1 Définition du SDRA	8
I.2 Epidémiologie du SDRA	9
I.3 La barrière capillaro-alvéolaire	10
I.4 La filtration transcapillaire liquidienne	15
I.5 La clairance liquidienne alvéolaire	17
I.6 Mesure des flux liquidiens pulmonaires	19
I.6.1 Mesure des forces de l'équilibre de Starling	19
I.6.2 Quantification de la filtration liquidienne transcapillaire	23
I.6.3 Quantification de la clairance liquidienne alvéolaire et pleurale	23
I.6.4 Quantification de l'accumulation d'eau extra-pulmonaire (œdème)	24
I. 7 L'accumulation de protéines alvéolaires conditionne l'évolution du SDRA	27
I.8 La perméabilité de la barrière capillaro-alvéolaire aux protéines	29
I.8.1 Le transport transcapillaire des protéines à l'état normal	29
I.8.2 La filtration des protéines au cours de l'inflammation	30
I.8.3 La clairance alvéolaire des protéines	32
I.9 Modélisation du transport des protéines à travers membrane semi-perméable	34
I.10 Mesure du transport des protéines	37
I.10.1 Mesures des paramètres de la perméabilité endothéliale aux protéines	37
I.10.2 Mesures de la perméabilité épithéliale aux protéines	39
I.10.3 Mesures globales de l'accumulation tissulaire des protéines	40
I.11 Choix de la méthode de mesure	44
I.12 Choix du modèle animal	45
I.13 Choix du modèle de lésion aiguë du poumon	45
I.14 Choix des thérapeutiques testées	46
I.15 Objectifs de l'étude	50

II – MATÉRIELS ET MÉTHODES	51
II.1 Préparation expérimentale	52
II.2 Dispositif de lavage broncho alvéolaire	52
II.2.1 Dispositif d'étanchéité	53
II.2.2 Le circuit de lavage broncho alvéolaire	53
II.2.3 Détail d'un cycle de lavage broncho alvéolaire	55
II.3 Protocole expérimental	56
II.3.1 Procédure commune à tous les sujets	56
II.3.2 Déclenchement de la lésion inflammatoire	56
II.3.3 Administration des thérapeutiques testées	57
II.3.4 Répartition des sujets dans les différents groupes	59
II.4 Traitement des échantillons	60
II.5 Acquisition des signaux	60
II.6 Variables mesurées	60
II.7 Modèle mathématique	61
II.7.1 Modélisation des échanges liquidiens permettant de calculer le volume du segment pulmonaire lavé	61
II.7.2 Modélisation du transport transmembranaire du traceur plasmatique	63
II.8 Analyses statistiques	66
III – RÉSULTATS	67
III.1 Résultats de l'étude sur le modèle de lésion par l'acide oléique et les essais thérapeutiques par terbutaline	68
III.1.1 Stabilité de la concentration de FITC-dextran plasmatique	68
III.1.2 Evolution du volume du segment pulmonaire lavé ($V_{l,n}$)	69
III.1.3 Entrée de FITC-dextran dans le compartiment alvéolaire lavé	71
III.1.4 Détermination du coefficient K_{PS} de perméabilité au FITC-dextran	73
III.1.5 Evolution des paramètres hémodynamiques	75
III.1.6 Evolution des paramètres biologiques	79
III.2 Résultats partiels et préliminaires de l'étude sur le modèle lésionnel à l'endotoxine et les essais thérapeutiques par rolipram et salmeterol	80
III.2.1 Entrée de FITC-dextran dans le compartiment alvéolaire lavé	80
III.2.2 Détermination du coefficient K_{PS} de perméabilité au FITC-dextran	82
III.2.3 Evolution des paramètres hémodynamiques	83

IV – DISCUSSION	85
IV.1 Discussion de la technique de LBA dans le modèle de lésion à l'acide oléique	86
IV.1.1 Suivi de la cinétique de la lésion	86
IV.1.2 Sensibilité de la technique	88
IV.1.3 Améliorations apportées à la technique de LBA	89
IV.1.4 Précisions des mesures de perméabilité au FITC-dextran	90
IV.1.5 Limites de la technique de LBA	92
IV.1.6 Applications possibles de la technique de LBA	97
IV.2 Discussion des effets de la terbutaline sur la lésion à l'acide oléique	97
IV.2.1 Discussion de l'absence d'effets de la terbutaline précoce	97
IV.2.2 Discussion de l'aggravation de perméabilité par la terbutaline tardive	99
IV.2.3 Effets sur la perméabilité d'une augmentation de pression capillaire	100
IV.2.3 Effets sur la perméabilité d'une augmentation de pression capillaire	100
IV.3 Effets des béta-agonistes sur la redistribution du flux sanguin pulmonaire	104
IV.3.1 La redistribution protectrice du flux sanguin pulmonaire	104
IV.3.2 Les effets des béta-agonistes varient selon le moment et selon le type de lésion	106
IV.4 Conséquences sur l'utilisation potentielle des béta2-agonistes	107
IV.5 Discussion du modèle de lésion à l'endotoxine	108
IV.6 Discussion du traitement par rolipram et salmeterol	109
V – CONCLUSIONS	111
VI- Références bibliographiques	115

I - INTRODUCTION

Le Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë (SDRA) est une pathologie du poumon qui affecte fréquemment les patients de réanimation et qui est caractérisée par une lésion inflammation aiguë de la barrière alvéolo-capillaire et un œdème alvéolaire dit "lésionnel", entraînant une insuffisance respiratoire aiguë.

I.1 Définition du SDRA

Depuis sa première description en 1967, différentes définitions du syndrome ont été proposées donnant des informations parfois contradictoires sur la mortalité et la morbidité entraînées par ce syndrome.

Beaucoup de maladies peuvent entraîner un SDRA qui représente l'évolution finale d'une variété d'agressions, directes (contusion pulmonaire, inhalation du contenu gastrique, pneumonie, substances toxiques comme le chlore ou la fumée) ou indirectes (sepsis, polytraumatisme, transfusion importante, circulation extra-corporelle, embolie graisseuse). Sur le plan clinique, le SDRA est caractérisé par une altération de la mécanique respiratoire et des anomalies des échanges gazeux, et son évolution peut être soit la guérison soit la progression vers la fibrose pulmonaire. Dans la majorité des cas, la mortalité est liée aux complications septiques (152).

Du fait d'une définition peu spécifique, avec des critères d'inclusion de patients hétérogènes, la comparaison des résultats des différentes études a été longtemps très difficile. Un Lung Injury Score *LIS* proposé par Murray en 1988 (141) a longtemps été utilisé. Il évaluait la sévérité de la lésion pulmonaire, au moyen d'un score qui considérait le degré de l'hypoxémie, le niveau de pression positive de fin d'expiration (PEEP), les anomalies radiologiques et la compliance pulmonaire. Cependant le LIS n'est pas prédictif de la mortalité, et il n'élimine pas l'œdème cardiogénique.

Depuis 1994, la conférence de consensus américano-européenne sur le SDRA (AECC) (16) a fourni une définition révisée du syndrome afin de clarifier et d'uniformiser la définition du SDRA et de la lésion aiguë pulmonaire (*Acute Lung Injury* - ALI). La différence entre ALI et SDRA (deux entités cliniques de la même maladie) se fait selon des critères d'oxygénation artérielle. Si le rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ est inférieur à 300 on parle d'ALI. Si ce rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ diminue (< 200) objectivant une moins bonne PaO_2 pour un même apport d'oxygène, on parle alors de SDRA. Par ailleurs l'œdème cardiogénique est défini selon les critères suivants : une pression artérielle pulmonaire d'occlusion (Papo)

≥ 18 mmHg et des signes patents d'hypertension de l'oreillette gauche. Enfin des critères radiologiques simplifiés complètent cette définition.

Malgré tout cette définition présente encore des imprécisions sur la cause du syndrome, et le type de prise en charge respiratoire des patients.

I.2 Epidémiologie du SDRA

La plupart des études épidémiologiques ont été faites avant la définition de l'AECC, les rendant discutables. L'incidence réelle du SDRA reste donc difficile à établir. La dernière étude d'incidence européenne (ALIVE) a été réalisée dans 78 services de réanimation de 10 pays européens. 7,1% des patients admis dans les services de réanimation pour une durée supérieure à 4 heures présentaient un ALI : parmi eux, 55 % a rapidement évolué vers un SDRA (31).

Malgré l'hétérogénéité des données de la littérature, la mortalité reste élevée (autour de 50%) depuis de nombreuses années. Dans l'étude ALIVE la mortalité du SDRA et de l'ALI étaient respectivement de 57,9 et 32,7 %.

En dehors d'une optimisation des stratégies de ventilation, les traitements du SDRA ont peu progressé depuis sa définition en 1967 (5, 30, 203).

Il semble essentiel de pouvoir bénéficier de marqueurs de gravité pulmonaire et d'indices pronostiques afin de tester les différentes thérapeutiques et d'améliorer la connaissance physiopathologique du syndrome.

I.3 La barrière capillaro-alvéolaire

L'élévation de la perméabilité de la microcirculation pulmonaire est un signe essentiel de lésion aiguë du poumon.

Les alvéoles pulmonaires sont des structures de taille variables selon l'espèce. Leur diamètre est de l'ordre de 225 μm chez l'homme et de 93 μm chez le chien. La barrière entre l'air et le milieu sanguin a une épaisseur de 0,1 à 0,2 μm (61). Histologiquement elle est composée de 3 couches : l'épithélium alvéolaire, l'endothélium vasculaire, et le tissu conjonctif interstitiel qui s'interpose entre les deux (*Fig. 1*). L'épithélium alvéolaire et l'endothélium capillaire sont formés par une couche monocellulaire continue plus ou moins étanche, régulant les échanges d'eau et de soluté entre les trois compartiments : le plasma, le liquide interstitiel, et le liquide alvéolaire.

La lumière alvéolaire est bordée d'un épithélium composé de deux types de cellules (205). Les cellules alvéolaires épithéliales de type I, qui sont des cellules différenciées de grande taille et qui recouvrent 90% de la surface alvéolaire, et les cellules alvéolaires épithéliales de type II. Ces dernières sont des cellules cuboïdales de petite taille qui ont la capacité de se diviser et de se différencier en cellules de type I et qui interviennent dans la régénération de l'épithélium alvéolaire après une lésion (*Fig. 2*). Les cellules alvéolaires épithéliales de type II synthétisent et sécrètent les phospholipides du surfactant (*Fig. 3*) et interviennent dans d'autres fonctions telles que la réaction inflammatoire et immunitaire. Leur rôle est notamment prépondérant dans la réparation de l'épithélium alvéolaire après une lésion pulmonaire. Après une telle lésion, les cellules de types II s'étalent, migrent, et prolifèrent stimulés par des facteurs de croissance notamment du Keratinocyte Growth Factor (46). Favoriser la ré-épithélialisation précoce de l'alvéole pour limiter la fibrose est un des buts des nouvelles thérapies stimulant les cellules épithéliales de type II par les facteurs de croissance (82, 125). Enfin ces cellules semblent jouer un rôle majeur dans la réabsorption liquidienne à la phase de résolution de l'œdème alvéolaire (125).

Ces cellules épithéliales de type II sont, de part leurs propriétés mitotiques, plus faciles à étudier *in vitro* que les cellules de type I différenciées. Beaucoup des propriétés intrinsèques de l'épithélium alvéolaire ont donc été déduites de ces études sur cellules épithéliales de type II, sans que l'on sache s'il est réellement possible d'en transposer les conclusions sur l'ensemble de l'épithélium alvéolaire, majoritairement recouvert de cellules de type I (125, 131).

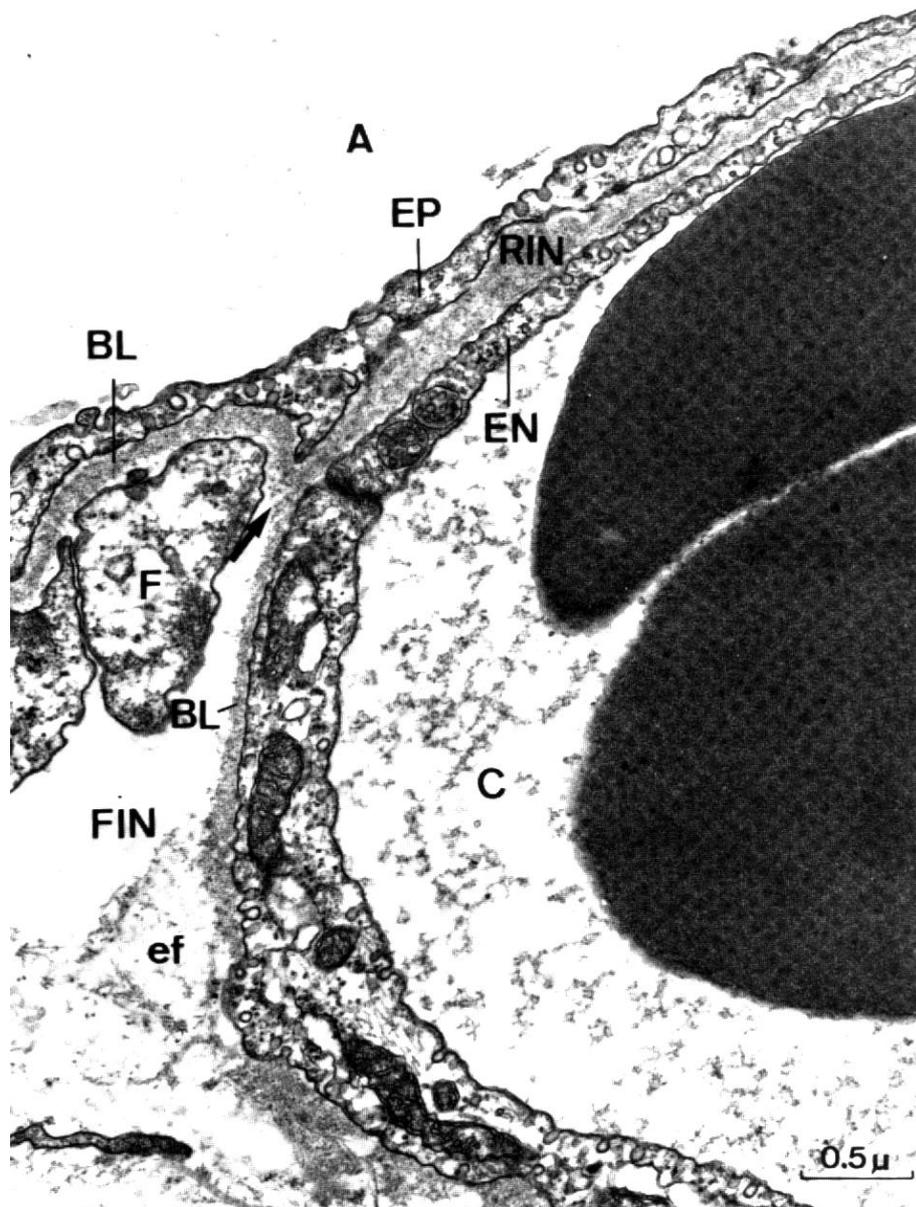


Figure 1 : Vue de la barrière capillaro-alvéolaire en microscopie électronique ($\times 24000$).

A : lumière alvéolaire ; **C** : lumière capillaire ;

→ : zone de transition entre l'interstitium libre (**FIN**), et l'interstitium (**RIN**) délimitée par l'épithélium alvéolaire (**EP**) d'une part, et l'endothélium capillaire (**EN**) d'autre part ;

F : fibroblaste; **ef** : fibre élastique. D'après Weibel et Bachofen (205) avec permission.

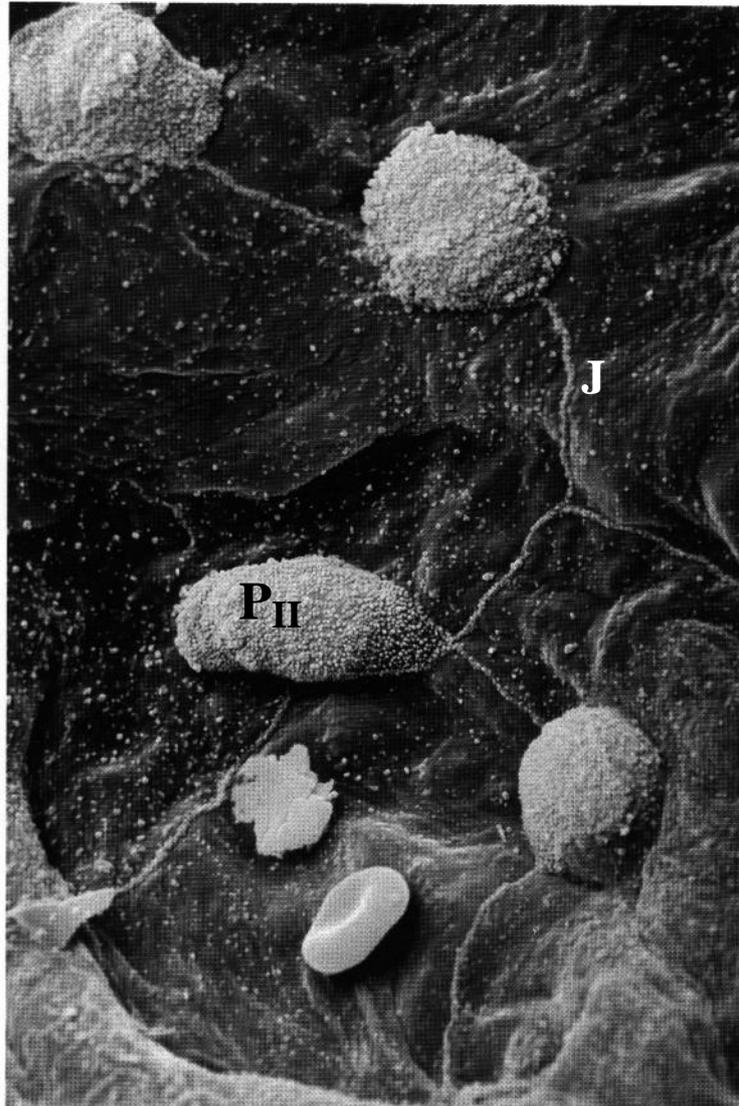


Figure 2 : Vue de la surface alvéolaire en microscopie électronique à balayage.
P_{II} : cellule épithéliale alvéolaire type II; **J**: jonction serrée entre cellule épithéliale alvéolaire type I.
D'après Allegra et coll. (2) avec permission.

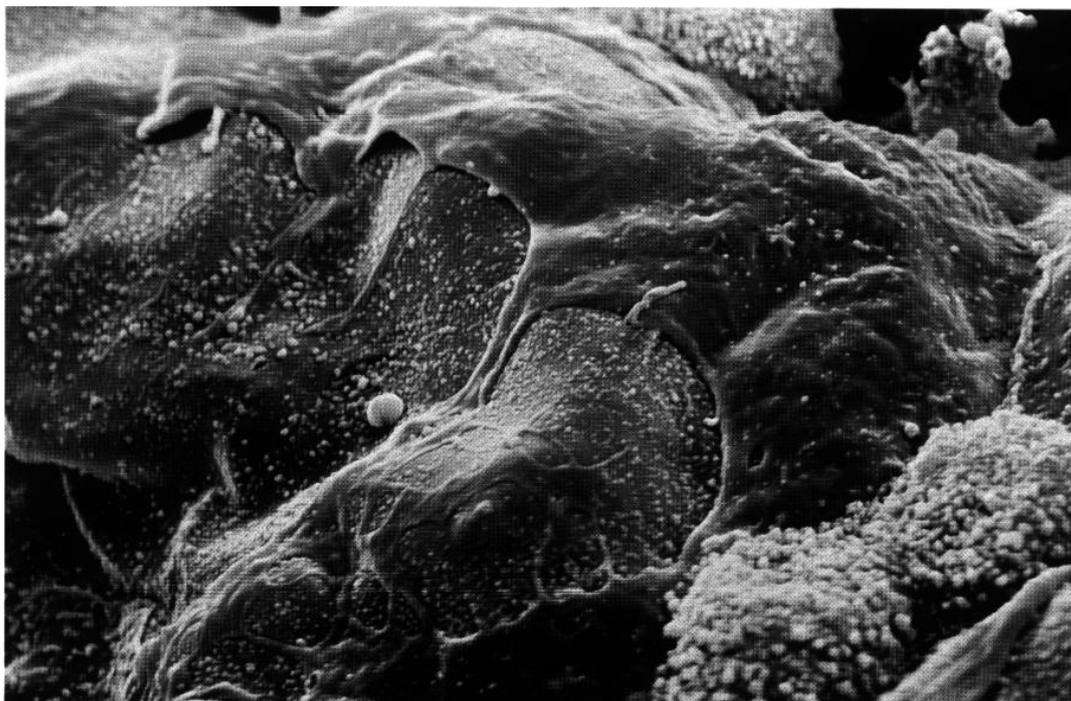


Figure 3 : Vue de la surface de l'épithélium alvéolaire partiellement couvert d'une couche de surfactant, en microscopie électronique à balayage ($\times 3240$) d'après Allegra et coll. (2) Avec permission.

Une particularité importante de l'épithélium alvéolaire est la présence de jonctions intercellulaires serrées très étanches qui réalisent près de 90% de l'étanchéité totale de la barrière capillaro-alvéolaire aux fluides et aux solutés (191).

En effet au niveau de l'endothélium capillaire, l'étanchéité est moins importante. La paroi des capillaires est constituée de cellules endothéliales amincies dont les jonctions intercellulaires sont beaucoup plus perméable qu'au niveau épithélial, permettant la filtration d'eau et de solutés de petite taille. Entre les membranes basales de l'endothélium capillaire et de l'épithélium alvéolaire, il existe un interstitium composé d'une matrice extracellulaire contenant des fibres protéiques (collagène, réticuline, et élastine), des protéoglycanes, diverses glycoprotéines telles que la lamiline et la fibronectine, et des fibroblastes. Ces derniers ont un rôle important puisque, au cours de l'inflammation pulmonaire, ils vont pouvoir migrer de l'interstitium vers l'alvéole et être source de fibrose (37).

Cet espace interstitiel entre capillaire et alvéole est pratiquement virtuel quand les deux membranes sont accolées au niveau des septa inter-alvéolaires. Cet espace devient plus important autour des axes broncho-vasculaires. Les fluides et solutés qui pénètrent dans cet espace interstitiel sont drainés par le réseau des canaux lymphatiques pulmonaires puis, pour la plus grande partie, dans le canal thoracique et le tronc lymphatique droit. Ces derniers rejoignent la circulation veineuse systémique au niveau du cou Une partie des liquides interstitiels est drainée par la plèvre médiastinale (180).

Un œdème interstitiel se constitue quand il se crée un déséquilibre entre la filtration liquidienne transcapillaire et son évacuation par le système lymphatique.

I.4 La filtration transcapillaire et capillaro-alvéolaire de liquide

L'endothélium des capillaires pulmonaires représente une membrane semi-perméable plus étanche aux solutés qu'à l'eau qui passe relativement librement. Le débit net de filtration liquidienne (J_v) du capillaire vers l'interstitium dépend d'une part de la surface totale d'échange et d'autre part de l'équilibre des forces hydrostatiques et oncotiques qui commandent les échanges d'eau de part et d'autre de la paroi capillaire.

Cette équilibre des forces est formalisé par l'équation de Starling :

$$J_v = K_{f,c} [(P_c - P_i) - \sigma (\Pi_c - \Pi_i)]$$

où J_v représente le flux liquidien transcapillaire, et $K_{f,c}$ le coefficient de filtration. P_c est la pression capillaire pulmonaire, P_i la pression du liquide interstitiel. σ est le coefficient de réflexion de la membrane au soluté concerné (par exemple l'albumine). Une paroi capillaire totalement imperméable au soluté aurait un coefficient σ égal à 1. Une paroi capillaire laissant filtrer librement le soluté aurait un coefficient σ égal à 0. Intervient également l'équilibre entre les pressions osmotiques des protéines (oncotiques) du plasma (Π_c) et les pressions oncotiques de l'interstitium (Π_i) existantes dans les septa alvéolaires et les espaces périvasculaires autour des capillaires extra-alvéolaires.

Il résulte des forces décrites dans l'équation de Starling, un débit de filtration de liquide permanent des capillaires vers le tissu interstitiel. Plusieurs mécanismes de sécurité préviennent la formation de l'œdème pulmonaire. Ces mécanismes sont : 1- le système lymphatique qui évacue continuellement le liquide filtrant au travers de la barrière endothéliale ; 2- la forte étanchéité de l'épithélium alvéolaire au liquide et aux solutés ; 3- la pression hydrostatique de l'interstitium péricapillaire qui s'élève quand la filtration liquidienne augmente, et 4- le gradient de pression oncotique entre le capillaire et l'interstitium. Ce gradient de pression oncotique s'élargit par diminution du Π_i dans l'œdème cardiogénique (*i.e.* par augmentation de pression capillaire) du fait d'une dilution des protéines interstitielles par le liquide d'œdème. Ce gradient de pression oncotique diminue par contre lorsque la perméabilité capillaire augmente (baisse du σ) et que les protéines plasmatiques passent plus librement dans l'interstitium. Des études récentes (93, 139) ont montré le rôle important de l'élévation de la pression hydrostatique dans l'interstitium qui est peu compliant en raison de la mise sous tension de protéoglycans chondroïtine-sulfate rigidifiant sa structure.

Le passage d'eau dans l'alvéole pulmonaire (*i.e.* la formation de l'œdème alvéolaire) est la conséquence d'un déséquilibre entre le débit de filtration et la clairance liquidienne

pulmonaire. Le liquide s'accumule d'abord dans l'interstitium, particulièrement dans le tissu conjonctif péribronchique. Les protéoglycanes chondroïtine-sulfate représentant un facteur de sécurité tissulaire, peuvent se fragmenter, sous l'effet initial du stress de mécanique comme dans les oedèmes hydrostatiques, ou lors des oedèmes lésionnels par l'action d'enzymes protéolytiques (métalloprotéinases) activées lors de l'inflammation pulmonaire. Une fois cette fragmentation initiée, l'action des métalloprotéinases s'accroît (y compris dans l'œdème hydrostatique) conduisant à un œdème sévère et une inondation alvéolaire.

Dans les oedèmes lésionnels comme le SDRA, il y a souvent une destruction concomitante des cellules alvéolaires épithéliales conduisant à une dénudation de l'épithélium favorisant l'inondation alvéolaire (7).

Une fois l'alvéole partiellement remplie de liquide, l'augmentation de tension de surface à l'interface liquidienne (accrue par la baisse du surfactant) accroît rapidement le passage d'eau vers l'intérieur de l'alvéole (148).

Cette situation correspond à une élévation de l'eau extravasculaire pulmonaire de 50%, mesurée expérimentalement par la méthode gravimétrique (181). Cette situation coïncide cliniquement avec l'apparition d'une insuffisance respiratoire aiguë.

I.5. La clairance liquidienne épithéliale alvéolaire

Jusque dans les années 1980, on pensait que la résolution de l'œdème était essentiellement soumise aux forces de Starling (hydrostatiques et oncotiques). Les études sur cultures cellulaires réalisées ces dix dernières années à partir de cellules alvéolaires épithéliales de type II ont permis d'améliorer la compréhension des mécanismes de réabsorption du liquide alvéolaire aidant à la résolution de l'œdème pulmonaire. On sait maintenant le rôle crucial du transport actif de sodium (Na^+), l'eau suivant le sodium au travers de l'épithélium alvéolaire.

Le sodium est capté au pôle apical des cellules épithéliales à travers des canaux sodiques spécifiques (*Epithelial Na^+ Channels* : ENaC), puis ce sodium est excrété activement vers l'interstitium par la pompe Na/K-ATPase situé au pôle basal des cellules épithéliales.

La pompe Na/K-ATPase maintient un gradient de Na^+ et de K^+ de part et d'autre de la membrane cellulaire en pompant le Na^+ vers l'extérieur de la cellule (et le K^+ vers l'intérieur) grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Leur existence et l'importance de leur rôle ont été mis en évidence par des expériences de blocage spécifique par l'ouabaine (70).

Ces canaux ENaC ont été expérimentalement mis en évidence par des expériences de blocage par l'amiloride qui est un diurétique épargneur potassique bloquant les canaux sodiques (99).

Les canaux ENaC ont été mis en évidence initialement dans les cellules épithéliales alvéolaires de type II. Mais on sait qu'il sont aussi exprimés par les cellules de type I (représentant plus de 90% de la surface de l'épithélium alvéolaire) bien que leur mise en évidence pose plus de problème car les cellules de type I sont des cellules différenciées dont la mise en culture est malaisée. Les canaux ENaC sont aussi présents dans les cellules ciliées de l'épithélium des bronchioles qui afficheraient une capacité de transport du sodium à peu près 10 fois supérieure à celle des cellules alvéolaires de type II.

L'eau suit passivement le transfert actif de sodium en passant au travers de canaux transmembranaires particuliers appelés aquaporines. Une dizaine d'aquaporines (AQP) différentes ont été identifiées chez les mammifères. Dans l'épithélium pulmonaire, l'AQP 5 semble avoir une importance toute particulière (125).

L'activité des canaux ENaC est, sur le poumon normal, stimulée par les gluco et minéralo-corticoïdes, certains facteurs de croissance comme le Keratinocyte Growth Factor (82), la dopamine (effet propre dopaminergique) et les protéases sériques (125).

Cette réabsorption liquidienne peut être altérée par le Facteur Atrial Natriurétique, l'hypoxie, certains médicaments anesthésiques (comme les agents volatils halogénés, ou la lidocaïne), ou encore les radicaux libres comme l'ion superoxyde relargué par les neutrophiles et les macrophages au cours de l'inflammation ou dans les lésions d'ischémie reperfusion. L'ion superoxyde, associé à l'oxyde nitrique (NO), forme du peroxyde nitrique lequel inactive le surfactant et diminue l'activité des canaux ENaC.

En cas d'œdème pulmonaire, la clairance liquidienne peut être améliorée mécaniquement par la ventilation assistée notamment par l'addition d'une pression positive de fin d'expiration (PEEP). Surtout, l'expression et l'activité des canaux ENaC sont augmentées par les cathécholamines β -agonistes comme l'adrénaline (β_1 et β_2 agoniste), la terbutaline ou le salmeterol (β_2 mimétiques)(20, 33, 96, 111, 167-169), médicaments que nous avons utilisés, dans notre étude, pour essayer de diminuer l'altération de perméabilité de la barrière capillaro-alvéolaire.

L'eau ainsi réabsorbée vers le secteur interstitiel rejoint la lymphe puis la circulation systémique.

L'eau accumulée au cours d'un œdème pulmonaire s'accumule aussi dans l'espace pleural, et ceci aussi bien dans les œdèmes de perméabilité (212) que dans les œdèmes hydrostatiques (28). Cette suffusion pleurale représente un peu plus de 20% du liquide qui s'accumule au cours de l'œdème. La plèvre et son réseau de lymphatiques pariétaux jouent du coup un rôle important dans la clairance liquidienne à la phase aiguë de l'œdème pulmonaire.

I.6 Mesure des flux liquidiens pulmonaires

I.6.1 Mesure des forces de l'équilibre de Starling

a) La pression hydrostatique capillaire (Pcap)

La Pression de l'artère pulmonaire après occlusion (Papo), obtenue par le gonflement du ballonnet distal d'un cathéter artériel pulmonaire (sonde de Swan-Ganz), sous-estime la pression de la microcirculation pulmonaire (pression capillaire) en raison de la résistance des veinules pulmonaires qui peut représenter un pourcentage important des résistances vasculaires totales de la circulation pulmonaire dans le SDRA. Les mesures directes par micro-ponction d'un capillaire sous-pleural sont possibles mais les valeurs obtenues ne sont pas très représentatives de la situation du poumon profond. La pression capillaire (Pcap) peut-être approchée par des techniques indirectes sur des préparations pulmonaires *ex vivo*. Elle est égale à la pression veineuse pulmonaire ajustée de manière à obtenir un état isogravimétrique du poumon isolé (absence de gain de poids de la préparation, signifiant une absence d'accumulation d'eau et donc un arrêt de la filtration capillaire) pour une pression artérielle pulmonaire donnée. Les études correspondantes ont permis d'estimer le pourcentage des résistances veineuses pulmonaires à 40% des résistances totales. La pression capillaire peut donc être *in vivo* grossièrement approximée par l'équation de Gaar (66)

$$P_{cap} = P_{apo} + 0,4 \cdot (PAP_{moyenne} - P_{apo})$$

Un état isogravimétrique est plus compliqué à obtenir dans le cas d'une perméabilité élevée de la barrière capillaro-alvéolaire. Les mesures de pression capillaire les plus fiables sont celles obtenues par l'occlusion simultanée des veines et artères pulmonaires correspondants à un même territoire dans un poumon isolé ; techniques difficilement utilisables *in vivo*.

Une étude précise de la chute de pression artérielle, au moment du gonflement du ballonnet de la sonde de Swan-Ganz, permet de lui ajuster deux exponentielles. Celles-ci permettent d'utiliser un modèle d'interprétation de la circulation pulmonaire sous la forme de 2 résistances (artérielle et veineuse) séparées par une capacitance (le compartiment capillaire). La première exponentielle correspond à la vidange du compartiment artériel au travers de la résistance artériolaire, la deuxième exponentielle correspondant à la vidange du compartiment capillaire au travers de la résistance veineuse. En extrapolant la deuxième exponentielle au temps t_0 de l'occlusion du ballonnet, on peut, par le calcul, estimer *in vivo* la valeur de la pression capillaire à l'instant de l'occlusion (*Fig. 4*) (84) (75).

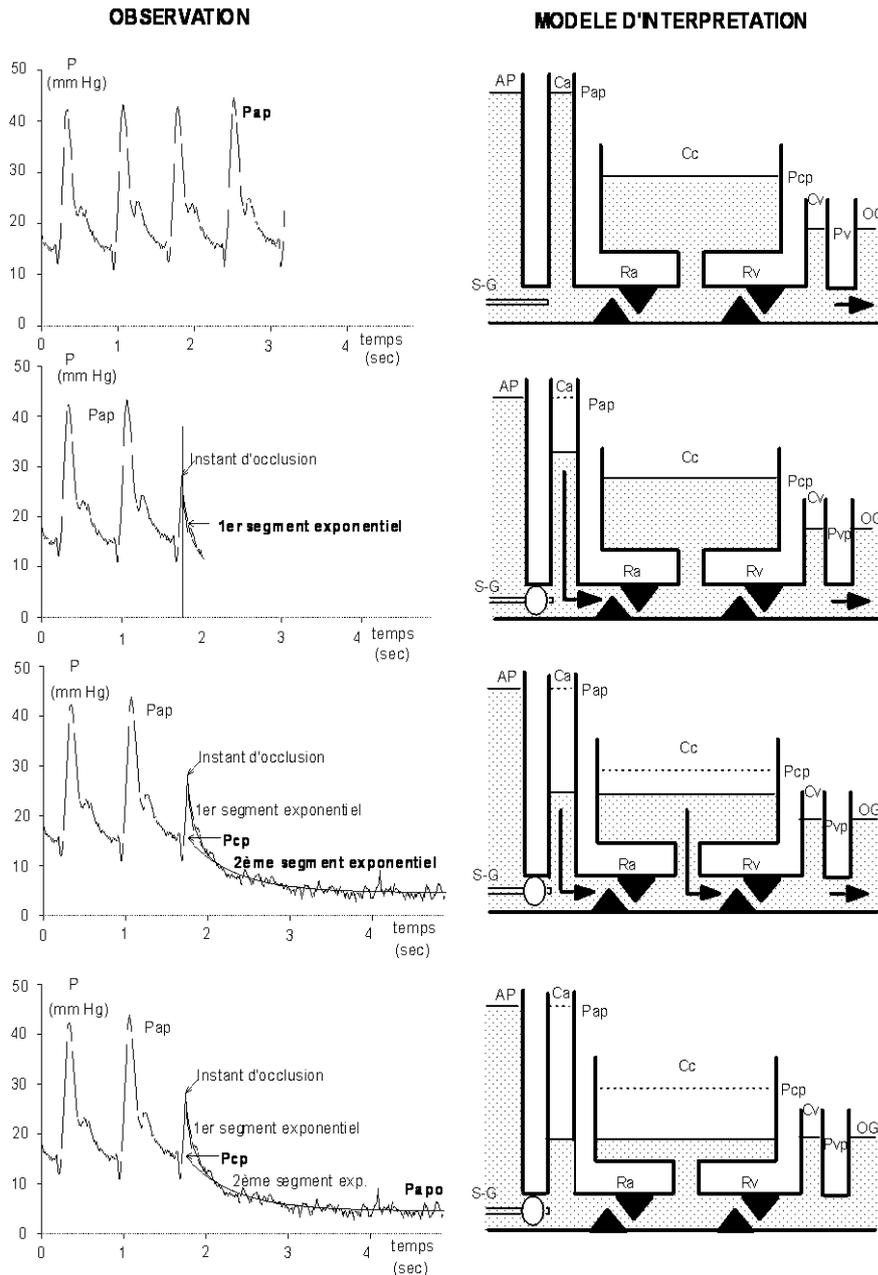


Figure 4 : Mesure de la pression capillaire d'après Grimbert & col. (75) avec permission.

Modèle : AP : Artère pulmonaire ; S-G : cathéter de Swan-Ganz ; Ca : compartiment artériel pulmonaire ; Pap : pression artérielle pulmonaire ; Ra : résistance artérielle pulmonaire ; Cc : compartiment capillaire ; Pcp : pression capillaire pulmonaire ; Rv : résistance veineuse pulmonaire ; Cv : compartiment veineux pulmonaire ; Pvp : pression veineuse pulmonaire OG : pression de l'oreillette gauche.

Tracé : Le tracé de la pression artérielle pulmonaire est interrompu par l'occlusion liée au gonflement du ballonnet du cathéter de Swan-Ganz. Le modèle est bicompartimental; les résistances à la sortie des deux compartiments sont proches, leurs capacités nettement différentes. La courbe de pression postérieure à l'occlusion décroît selon un profil bi-exponentiel. Le 1^{er} segment exponentiel de forte pente correspond à la vidange du compartiment artériel de faible volume. Le 2^{ème} segment exponentiel de pente plus douce correspond à la vidange à la fois du compartiment capillaire de grand volume et du compartiment artériel. La formalisation mathématique de cette double vidange selon un modèle bi-compartimental permet de calculer la pression capillaire pulmonaire.

b) La pression liquidienne interstitielle

Elle ne peut guère s'apprécier que sur des préparations expérimentales *ex vivo* par des techniques de microponction. Dans les conditions physiologiques, cette pression interstitielle est inférieure à la pression atmosphérique (-10 cmH₂O) (138) mais elle augmente très rapidement pour devenir un des facteurs de sauvegarde limitant la filtration de liquide dans l'espace interstitiel (139).

c) Les pressions colloïdes osmotiques plasmatique et interstitielle

La pression oncotique du plasma peut être mesurée directement dans le sang grâce à des osmomètres membranaires commercialisés. Elle est égale à 27,5 mmHg chez l'homme.

La pression oncotique de l'interstitium est le plus souvent évaluée expérimentalement en mesurant le taux de protéines dans la lymphe préganglionnaire dont la composition est supposée similaire à celle du milieu interstitiel. On peut l'évaluer de manière moins invasive en mesurant, par détection externe, l'accumulation extravasculaire d'une protéine radio-marquée. Cela nécessite l'utilisation d'un 2^{ème} marqueur spécifique du milieu vasculaire pour soustraire du comptage le signal lié au compartiment sanguin. Les résultats obtenus avec ce type de mesure sont bien corrélés avec ceux obtenus par les techniques de canulation lymphatique (71).

d) Le coefficient de filtration liquidien $K_{f,c}$

Sur une préparation de poumon isolé dont les lymphatiques ont été préalablement ligaturés, le $K_{f,c}$ est obtenu (à perméabilité constante) en mesurant l'augmentation de filtration liquidienne (*i.e.* prise de poids de la préparation) après une augmentation de pression capillaire. Le $K_{f,c}$ s'exprime en ml/min/mmHg/100g de poumon.

Les 3 premières minutes de prise de poids du poumon après l'augmentation de pression capillaire sont liées à l'augmentation du diamètre des vaisseaux et ne doivent donc pas être comptabilisées (phase de prise de poids rapide). La gain de poids secondaire (plus lent) correspond davantage à la filtration capillaire (*Fig. 5*). En extrapolant le gain de poids lent au temps t_o d'élévation de la pression capillaire, soit par sa pente (modèle linéaire), soit par une biexponentielle (modèle non linéaire), on en déduit le coefficient de filtration $K_{f,c}$ à t_o .

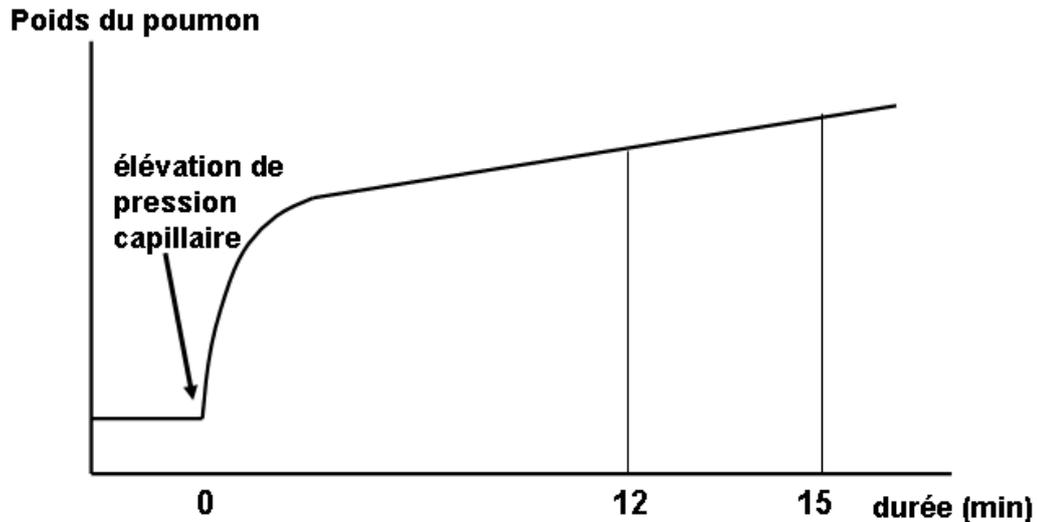


Figure 5 : Mesure du coefficient de filtration liquidien capillaire $K_{f,c}$ grâce au poids du poumon (voir texte).

Certains auteurs ont également proposé une évaluation du coefficient de filtration capillaire $K_{f,c}$ par la mesure de la concentration de l'hématocrite du perfusé après augmentation de la pression capillaire.

Le coefficient de filtration $K_{f,c}$ est le produit de la conductance hydraulique endothéliale (L_p) et de la surface endothéliale (S) efficace pour la filtration. $K_{f,c}$ est donc proportionnel à la surface d'échange perfusée dans le poumon et peut varier significativement si la surface vasculaire est recrutée ou dérecrutée, même si le rapport des forces de Starling reste constant (193). Or comme la surface d'échange efficace (S) est difficile à apprécier, la conductance hydraulique (L_p) n'est souvent pas identifiable et la plupart des études se contentent de mesurer le $K_{f,c}$ (148).

e) Le coefficient de réflexion des protéines (σ)

Les techniques de mesure du coefficient σ sont développées plus loin (paragraphe I.10 p.37) dans la section consacrée aux flux transmembranaire de macromolécules.

I.6.2 Quantification de la filtration liquidienne transcapillaire

Dans les préparations pulmonaires *ex vivo* le débit liquidien net transcapillaire (J_v) est mesuré par pesée continue de la préparation.

Sur un poumon isolé (*i.e.* lymphatiques ligaturés), bien que les pressions artérielles et veineuses soient contrôlées expérimentalement, les lésions microvasculaires d'ischémie-reperfusion, dues au temps de préparation, entraînent des résistances vasculaires et une perméabilité plus élevée. Ces préparations sont rarement stables au-delà de quelques heures.

Dans les préparations expérimentales *in vivo*, le débit lymphatique pulmonaire est collecté par canulation de la lymphe pré-ganglionnaire intra-thoracique (77) ou par canulation de la lymphe post-ganglionnaire extra-thoracique (180). Si le débit lymphatique pulmonaire est collecté sans contamination systémique, à l'état normal le débit liquidien (J_v) est correctement approché par le débit lymphatique (J_{lymph}). En cas d'accumulation d'eau alvéolaire (formation d'œdème) la mesure du débit lymphatique sous-estime la filtration capillaire.

I.6.3 Quantification de la clairance liquidienne alvéolaire et pleurale

Une solution incluant un marqueur de dilution macromoléculaire est en général instillée jusqu'à saturation dans un lobe pulmonaire. La concentration progressive du marqueur macromoléculaire est le reflet du flux liquidien quittant l'alvéole vers le milieu interstitiel. En effectuant des échantillonnages réguliers par aspiration trachéale, et en supposant négligeable la fuite du traceur macromoléculaire pendant l'intervalle de temps considéré, on peut calculer un flux liquidien quittant l'alvéole pulmonaire par unité de temps (124). La concentration du traceur peut aussi être évaluée par comptage radioactif externe au moyen d'une gamma-caméra (9, 13).

La clairance liquidienne de la plèvre peut être calculée selon le même principe en injectant dans la cavité pleurale du liquide additionné d'un traceur macromoléculaire radioactif dont on mesure la concentration (153).

Sur poumon isolé (lymphatiques ligaturés) pesé en continu, la variation de poids reflète les échanges liquidien entre l'interstitium et le perfusé.

Sur poumon intact (lymphatiques préservés et canulés) la mesure du débit lymphatique permet d'évaluer le débit liquidien interstitiel.

I.6.4 Quantification de l'accumulation extra-vasculaire d'eau pulmonaire (œdème)

L'eau s'accumulant dans le poumon (*i.e.* la formation d'œdème) est la résultante des débits liquidiens entrant (filtration capillaire) et sortant (clairance alvéolaire).

- La mesure gravimétrique du rapport poids humide sur poids sec exsanguiné est la technique de référence pour connaître la quantité d'eau accumulée dans un poumon prélevé en fin d'expérience. Elle nécessite la mesure et la soustraction du volume d'eau lié au sang contenu dans le poumon au moment de son prélèvement. Pour cela il est nécessaire de doser l'hémoglobine sanguine, puis de mesurer par dessiccation et pesée d'un prélèvement sanguin, la quantité d'eau liée au sang. Le taux d'hémoglobine est ensuite mesuré dans le surnageant d'un fragment de poumon broyé, ce qui permet de connaître dans l'eau pulmonaire totale, la fraction d'eau liée au sang à soustraire pour calculer l'Eau Extra Vasculaire (EEV). Les résultats sont souvent exprimés en Eau Extra Vasculaire par unité de poids de poumon sec exsanguiné (181).

- *In vivo* l'eau pulmonaire peut-être évaluée par la technique de double dilution, en général celle d'un bolus de vert d'Indocyanine froid ($< 10^{\circ}\text{C}$). Le colorant vert d'Indocyanine se fixe sur les protéines plasmatiques et constitue un traceur sanguin non diffusible. Le bolus thermique constitue le traceur diffusible. Le recueil se fait en général grâce à un cathéter fémoral comportant une thermistance et une fibre optique. Un système commercialisé et utilisable en clinique humaine (système COLD ; Pulsion Medical Systems) permet la mesure spectrophotométrique intravasculaire du vert d'Indocyanine sans échantillonnage (69, 92). Le bolus thermique s'équilibre avec l'eau extra-vasculaire du poumon et sera détecté plus tardivement par le cathéter fémoral. La différence de temps de transit pulmonaire entre les deux indicateurs (diffusible et non diffusible), multipliée par le débit cardiaque obtenu d'après les courbes de dilution, fournit une estimation de l'eau extra vasculaire, appelée ETLV (Extravascular Thermal Lung Volume). Elle est exprimée en $\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$. Cette mesure est bien corrélée avec les mesures gravimétriques mais elle sous estime l'œdème (60) notamment en cas d'inhomogénéité de perfusion (comme c'est le cas dans le SDRA ou dans l'embolie pulmonaire (143)). De plus, elle varie en fonction du débit cardiaque et de la pression positive de fin d'expiration (PEEP) (34, 74).

Les techniques d'imagerie permettent une estimation non invasive de l'eau pulmonaire.

- La radiographie pulmonaire est souvent en décalage avec le début de l'œdème et surtout elle permet difficilement de faire le diagnostic différentiel entre œdème lésionnel et œdème hydrostatique (187).
- La tomодensitométrie (scanner X) (67) permet de mieux juger de la répartition de l'œdème. En revanche il ne permet pas non plus d'en distinguer le mécanisme lésionnel ou cardiogénique.
- L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) permet d'évaluer l'eau pulmonaire grâce à la mesure du temps de relaxation des protons excités par un champ magnétique mais nécessite de soustraire du signal l'eau contenue dans les vaisseaux pulmonaire (35).
- La Tomographie par Emission de Positons (PET scan) permet la mesure de la concentration d'une molécule marquée avec un émetteur de positons (en général de l'eau marquée à l'O¹⁵) qui s'équilibre avec l'eau de l'organisme. L'inhalation de CO marqué (C¹¹), qui se fixe sur l'hémoglobine, permet de mesurer spécifiquement l'eau intra-vasculaire qui soustraite à l'eau totale mesurée sur la région d'intérêt pulmonaire concernée, permet d'estimer l'eau extra vasculaire. Cependant la résolution spatiale de cette méthode est faible ; de plus cette technique sous estime l'eau extravasculaire notamment en cas de vascularisation pulmonaire inhomogène comme c'est le cas dans le SDRA. Enfin peu de structures sont équipés d'un PET scan (171).
- La Bioimpédance thoracique est une technique qui utilise un courant électrique alternatif faible généré entre deux électrodes thoraciques pour mesurer la résistance du thorax au passage de ce courant. L'impédance thoracique est inversement proportionnelle à la quantité d'eau accumulée dans le poumon. Cette technique, bien que peu invasive, manque de précision. Elle est en effet influencée par le poids, la position, les variations de volume respiratoire et le volume des perfusions. Elle ne permet pas de faire la différence entre une augmentation d'eau pulmonaire et une diminution de volume du poumon ; ni entre une augmentation du sang pulmonaire et une augmentation de l'eau pulmonaire (38, 59).

En définitive la seule mesure de l'eau pulmonaire est peu informative. Elle ne permet pas d'étudier le mécanisme qui a conduit à la formation de l'œdème pulmonaire et nécessite au minimum d'être couplée avec une mesure de la pression capillaire (Pcap) tout en sachant qu'une Pcap élevée peut coexister avec un œdème lésionnel (dit "de perméabilité"). La mesure de l'accumulation d'eau est par ailleurs un reflet tardif des phénomènes physiopathologiques mis en œuvre et permet mal l'évaluation de l'efficacité des thérapeutiques (13).

I.7 L'accumulation de protéines alvéolaires conditionne l'évolution du SDRA

L'augmentation de perméabilité de la barrière capillaro-alvéolaire aux macromolécules plasmatiques est un marqueur précoce de la lésion inflammatoire aiguë des poumons. Son suivi au cours du développement d'un SDRA pourrait permettre un diagnostic précoce de cette affection et une évaluation de l'efficacité des thérapeutiques proposées (182). En effet le passage massif des protéines plasmatiques dans le secteur alvéolaire, et l'accumulation de protéines qui participe à la phase fibro-proliférative tardive, semblent actuellement une des clés du pronostic de ces patients (41). La plupart des patients atteints de SDRA survivent au delà de la première semaine, grâce à l'évolution des techniques de réanimation, notamment de la ventilation assistée. Cependant la survie à plus long terme, ainsi que l'importance des séquelles, dépendent beaucoup de la phase secondaire de la maladie qui peut évoluer soit vers la résolution complète de la lésion pulmonaire, soit vers la fibrose sévère (129). La physiopathologie classique de l'atteinte pulmonaire inflammatoire est décrite en trois phases : exudative, fibroproliférative et fibrotique (129). Ce déroulement quasi linéaire de la lésion est cependant remis en question, et de nouvelles théories évoquent une évolution en parallèle (plutôt qu'en série) de la phase exudative et des mécanismes de réparation pulmonaire (122), (37). De fait, un œdème interstitiel et un début de fibrogénèse (transcription accrue de RNA messenger augmentant la synthèse de collagène) sont observés simultanément sur des biopsies pulmonaires réalisées deux heures après la modeste inflammation pulmonaire provoquée par la circulation extra-corporelle chez des patients opérés pour chirurgie coronaire (49).

Les membranes hyalines se formant dans le poumon au cours de l'évolution du SDRA sont essentiellement constituées de protéines plasmatiques condensées telles que albumine, fibrinogène, ou immunoglobulines. Ces membranes hyalines prédisposent à la fibrose alvéolaire. Ceci confirme le lien étroit entre l'augmentation de perméabilité aux protéines plasmatiques de la barrière capillaro-alvéolaire et la fibrose pulmonaire (65).

Les protéines du plasma qui inondent les alvéoles incluent des facteurs procoagulants comme le facteur VIIa qui en s'associant au Facteur Tissulaire forment un complexe initiant localement la cascade de la coagulation (208), (97).

Cette activité procoagulante augmente parallèlement à la concentration alvéolaire des protéines, comme cela a été montré dans le liquide de lavages broncho-alvéolaires (LBA) réalisés chez des patients atteints de SDRA (64), (97).

L'accumulation pulmonaire de fibrinogène marqué au Tc-99^m administré par voie intraveineuse chez des malades porteurs de SDRA, plaide pour un rôle important, dans la fibrino-formation intra-alvéolaire, du fibrinogène plasmatique ayant franchi la barrière capillaro-alvéolaire (157). Cette accumulation de fibrine dans l'alvéole est renforcée par une diminution de l'activité fibrinolytique naturelle au cours du SDRA. Cette baisse de la fibrinolyse est liée à la fuite plasmatique et à la synthèse *in situ* d'antiplasmines et d'activateurs de l'inhibition du plasminogène (plasminogen activator inhibitor) (97).

La corrélation, entre les altérations de la perméabilité capillaro-alvéolaire aux protéines et le processus fibrotique, a été confirmée dans des études cliniques. Les concentrations de protéines totales et de procollagène III ont été mesurées dans le liquide de LBA de 117 patients victimes de SDRA. Les patients décédés avaient des concentrations de protéines 2,6 fois supérieures et des concentrations de procollagène III 3,8 fois supérieures à celles des patients qui ont survécu (41).

Cette corrélation ne se limite pas à la phase aiguë du SDRA. En effet des phases exudative et fibrotique peuvent coexister même à la phase tardive du SDRA (8). En effet les produits de dégradation de la fibrine, l'activation du transforming growth factor β , et l'apoptose des cellules épithéliales alvéolaires peuvent augmenter, à la phase tardive de la maladie, la perméabilité microvasculaire pulmonaire (37), (97). Cette amplification de la réponse inflammatoire peut expliquer que, dans une autre étude clinique chez des patients porteurs d'un SDRA, seuls les patients qui ont survécu ont présenté des taux décroissants de protéines totales et d'albumine dans des prélèvements répétés de LBA (130).

Si une forte concentration de protéines dans le LBA est prédictive d'un taux plus élevé de fibrose secondaire, toute thérapeutique visant à diminuer l'accumulation des protéines plasmatiques dans l'alvéole peut être potentiellement bénéfique.

Une telle perspective doit être prise en compte dans le contexte particulier du traitement du SDRA. En effet, en dehors des avancées récentes en matière de stratégies de ventilation assistée, trente ans d'études cliniques (incluant les essais de divers médicaments anti-inflammatoires) n'ont pas fait baisser la mortalité du SDRA en dessous de 50% (127).

I.8 La perméabilité de la barrière capillaro-alvéolaire aux protéines

I.8.1 Le transport endothélial de protéines à l'état normal

L'endothélium capillaire sépare le compartiment sanguin de l'interstitium. Cet endothélium est d'une étanchéité relative et laisse, y compris en situation normale, filtrer un peu d'eau et de solutés plasmatiques.

Les protéines du plasma comme l'albumine passent très peu à travers la barrière endothéliale à l'état normal. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la filtration physiologique à travers l'endothélium vasculaire. Le modèle classique représente l'endothélium comme un tamis comportant des pores de formes et de calibres variables (pores cylindriques ou fentes carrées avec un diamètre variant de 4 à 30 nm) supposés être présent dans les jonctions cellulaires entre les cellules endothéliales. Ce modèle de perméabilité paracellulaire qui a servi de point de départ pour évaluer la perméabilité est controversé : le débit d'eau calculé ne correspond pas toujours au débit mesuré et le transport de macromolécules n'est pas toujours couplé au transport liquidien comme le voudrait un modèle à large pores. Enfin aucun pore correspondant à ce modèle n'a jamais été observé en microscopie électronique à la surface de l'endothélium (133) !

Des études récentes ont réhabilité un mécanisme alternatif, celui du transport par transcytose des protéines de part et d'autre de l'endothélium. Les protéines sont incluses dans des vésicules intracellulaires qui les transportent de l'interface sanguine à l'interface interstitielle de l'endothélium. Les protéines incluses dans ces vésicules peuvent être présentes soit parce qu'elles sont contenues dans le liquide internalisé par ces vésicules (transport vésiculaire en phase liquidienne), soit parce qu'elles se sont fixées spécifiquement sur des récepteurs propres. Ce transport spécifique (transcytose médiée par des récepteurs) est saturable et sujet à compétition par des molécules non marquées. Pour l'albumine, ont été mises en évidence des molécules spécifiques, les Albumin Binding Protéines (ABPs) qui semblent jouer un rôle important dans son transport spécifique de part et d'autre de l'endothélium capillaire pulmonaire (131, 133).

Les vésicules intracytoplasmiques peuvent confluer entre elles en formant des grappes, plus ou moins organisées en larges vacuoles, pouvant parfois conduire à la constitution de véritables canalicules transcellulaires reliant le pôle plasmatique au pôle interstitiel de la cellule. Il est probable que ces canalicules (ou organelles vésiculo-vacuolaires) fonctionnent à la façon des "pores" précédemment évoqués. Le nombre de ces vésicules et leur taux d'agrégation en vacuoles et en canalicules augmentent considérablement au cours

de l'inflammation, sous l'influence du facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) (195). Cette formation accrue d'organelles vésiculo-vacuolaires au cours de l'inflammation pourrait expliquer, en partie tout au moins, l'accroissement de perméabilité de l'endothélium aux protéines du plasma (53). Cependant les tenants du modèle classique (passage des protéines par voie paracellulaire) font valoir que le transport transcapillaire de l'albumine persiste lorsque la transcytose est inhibée par un abaissement de température ou un blocage pharmacologique (162).

I.8.2 La filtration des protéines au cours de l'inflammation

La majeure partie du flux de protéines franchissant la barrière capillaro-alvéolaire est due à la rupture de continuité et d'étanchéité de l'endothélium et à la formation d'interstices entre les cellules.

La forme des cellules (et donc l'étanchéité de l'endothélium) est en équilibre entre les forces contractiles de la cellule (forces centripètes) et les forces d'adhésion des cellules entre elles et à la matrice de l'endothélium. Ces forces sont intimement liées entre elles via le cytosquelette de la cellule qui est un réseau complexe de microfilaments d'actine et de microtubules qui peut modifier la forme de la cellule et transmettre des signaux (comme l'influx de calcium) à l'intérieur mais aussi entre les cellules (131).

L'influx de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire (soit par entrée directe, soit par relarguage du pool mitochondrial) est le signal clé de l'inflammation. Ce pic de Ca^{2+} entraîne tension à l'intérieur de la cellule. Cette tension est générée par la réaction actine-myosine induite par la phosphorylation des chaînes légères de myosine (par la Myosine Light Chain Kinase ou MLCK) et par la polymérisation de l'actine. Il y se produit en parallèle une désunion des jonctions cellulaires qui, associée à la déformation des cellules, aboutit à la formation d'interstices entre les cellules. Une fois ces interstices inter-cellulaires formés, l'eau et les protéines pénètrent dans l'interstitium puis dans l'alvéole.

Les enzymes protéolytiques (métalloprotéinases) activées lors de l'inflammation pulmonaire et de la mise sous tension de l'interstitium fragmentent les protéoglycanes chondroïtine-sulfate (CS-PG) qui assuraient la cohésion mécanique de l'interstitium. Ces métalloprotéinases fragmentent aussi l'assise matricielle de l'endothélium représenté par les protéoglycanes héparane-sulfate (HS-PG) ce qui accroît la déformation des cellules endothéliales et donc la perméabilité de la barrière capillaro-alvéolaire (139).

Une autre voie d'action du pic de calcium intra-cellulaire est l'augmentation du monoxyde d'azote (NO) à l'intérieur de la cellule qui, à son tour, stimule la synthèse de guanethidine

monophosphate cyclique (GMPc) via la protéine G kinase. Le NO et le GMPc agissent en aval de l'influx de Ca^{2+} pour augmenter la perméabilité (133). Cette action sur la perméabilité endothéliale du NO est à différencier de ses effets hémodynamiques de vasodilatation des cellules musculaires lisses.

Le mécanisme d'action NO/GMPc augmentant la perméabilité endothéliale n'est pas entièrement connu et n'atteint pas directement les forces contractiles intracellulaires (les actions connues du NO/GMPc sur les forces contractiles entraînent plutôt un relâchement). Le NO et le GMPc agiraient sur les protéines d'adhésion des jonctions cellulaires et peut-être sur les péricytes entourant les vaisseaux dont le relâchement augmenterait la perméabilité endothéliale.

Plus vraisemblablement le mode d'action de la voie NO/GMPc est en rapport avec la diminution de la concentration d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire. Le GMPc accélère la dégradation de l'AMPc par les phosphodiesterases (133).

Il existe un rapport certain entre le taux d'AMPc intra-cellulaire et la perméabilité de l'endothélium microvasculaire. L'élévation du taux d'AMPc réduit l'augmentation de perméabilité au cours de l'inflammation (mais montre peu d'effet sur la perméabilité basale d'un vaisseau intact). L'AMPc ne diminue pas le pic de Ca^{2+} intracellulaire initiant le début de la réaction inflammatoire. Son action, pour diminuer l'altération de perméabilité, se situe en aval de ce pic de Ca^{2+} et comporte deux mécanismes : 1 - une diminution de la tension intracellulaire par baisse des interactions actine-myosine en diminuant la phosphorylation des chaînes légères de myosine par les Myosine Light Chain Kinases (MLCK) ; 2 – une augmentation du nombre des jonctions inter-cellulaires (1, 185).

Le taux d'AMPc intracellulaire peut-être accru en augmentant la synthèse d'AMPc par stimulation de l'adénylate cyclase. C'est le mode d'action des médicaments β 2-agonistes, raison pour laquelle ces agents ont été testés dans notre étude. La destruction de l'AMPc par les phosphodiesterases peut également être inhibée par des médicaments inhibiteurs de phosphodiesterase comme le Rolipram (inhibant la phosphodiesterase IV) et qui a été, lui aussi, testé dans notre étude (45).

Le phénomène de formation des interstices intercellulaires est un phénomène réversible. Cioffi & col. (40) ont montré qu'une inflammation provoquée par la thrombine sur cellules endothéliales capillaires pulmonaires entraînait la formation d'interstices en dix minutes, interstices qui se comblaient spontanément par relaxation cellulaire en 30 à 60 minutes (*Fig. 6*). Cette cinétique est bien sûr variable selon le modèle de lésion et la gravité de

l'atteinte ; la lésion d'importantes surfaces endothéliales, avec nécroses cellulaires étendues provoquées par exemple par des agressions directes du lit capillaire, entraînent des augmentations prolongées de perméabilité.

I.8.3 La clairance alvéolaire des protéines.

L'élimination des protéines ayant réussi à pénétrer dans l'alvéole est un point important de la guérison du SDRA.

A l'état normal la clairance des protéines alvéolaires met en jeu les mêmes mécanismes de transcytose que la filtration endothéliale physiologique. Quand les concentrations de protéines alvéolaires sont faibles (i.e. concentration d'albumine $< 0,5$ g / 100 ml) la clairance de l'albumine, mais aussi d'autres protéines étudiées comme l'immunoglobuline G (IgG) l'hormone de croissance humaine (hGH) ou le vaso intestinal peptide (VIP), est essentiellement due à des mécanismes spécifiques (transcytose médiée par des récepteurs). Ce transport actif est saturable et peut être inhibé par le froid et divers agents pharmacologiques qui affectent l'endocytose.

Lors de fortes concentrations de protéines alvéolaires (concentration d'albumine > 5 g / 100 ml) comme on peut en voir dans l'œdème inflammatoire du SDRA, la clairance des protéines par la transcytose est débordée et l'élimination des protéines se fait essentiellement par passage entre les cellules épithéliales disjointes. Cette élimination passive par voie paracellulaire est directement proportionnelle à la concentration et à la taille des protéines alvéolaires (88, 105).

A l'état normal, la clairance alvéolaire de l'albumine est proche de 1% / heure (19). Ce transport pourrait être, en cas d'inflammation, augmenté d'un facteur 5 à 15 (63). Une telle élimination suppose, bien sûr, une récupération satisfaisante de l'intégrité et de l'étanchéité de l'endothélium capillaire afin que le flux de protéines entrant dans l'alvéole par la même ou d'autres voies paracellulaires n'excède pas les capacités d'élimination de l'alvéole.

Le nettoyage à plus long terme des protéines insolubles accumulées dans l'alvéole au cours du SDRA, met en jeu d'autres mécanismes comme la phagocytose par les macrophages alvéolaires, la dégradation *in situ* et l'élimination par l'escalator muco-ciliaire (88).

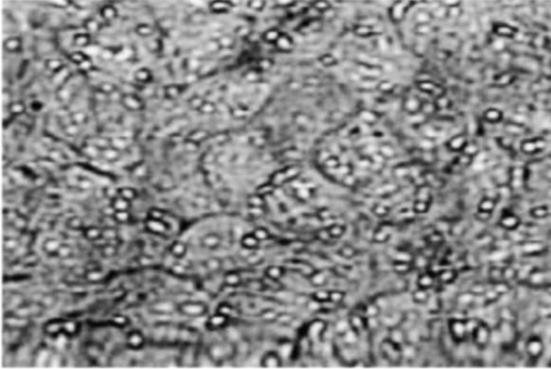
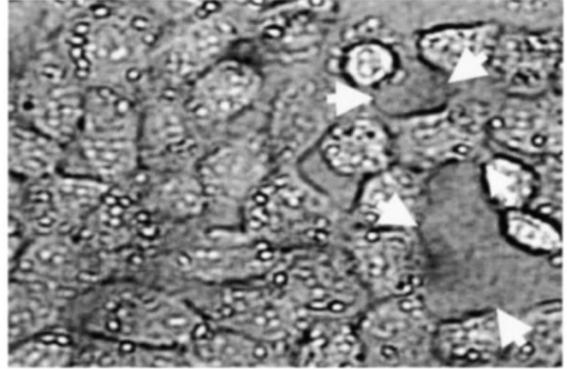
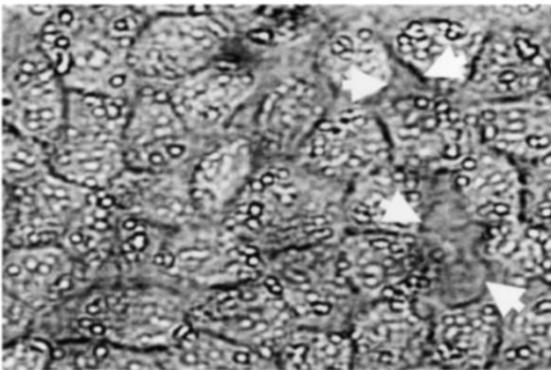
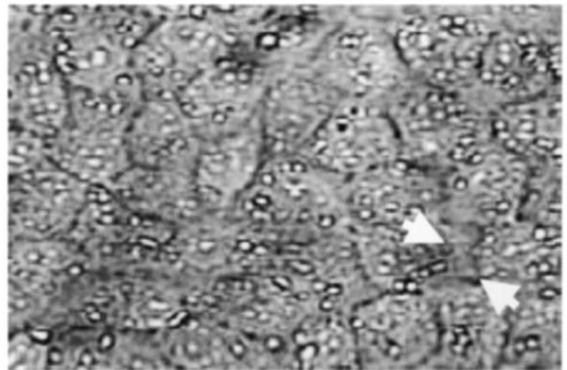
A**B****C****D**

Figure 6 : Sur des cultures de cellules endothéliales capillaires pulmonaires normales (**A**) l'application de 100 U/ml de thrombine provoque une lésion inflammatoire qui entraîne, dès la 10^{ème} minute, la formation de larges interstices (flèches blanches) (**B**). Ces interstices se referment au bout de 30 min. (**C**) à 60 min. (**D**). D'après Cioffi et col. (40), avec permission.

I.9 Modélisation du transport des protéines à travers une membrane semi-perméable

Le transport de solutés macromoléculaires à travers une membrane semi-perméable a été décrit dès 1958 par Kedem and Katchalsky (104) par un modèle linéaire. Une partie du flux de protéines est lié à l'équilibration des concentrations de part et d'autre de la membrane semi-perméable (transport diffusif), l'autre partie du flux est liée au passage d'eau qui emmène avec lui des protéines (transport convectif).

$$J_s = \underbrace{J_v \cdot (1 - \sigma) \cdot C_p}_{\text{transport convectif}} + \underbrace{PS \cdot (C_p - C_a)}_{\text{transport diffusif}}$$

J_s est le débit massique (masse / unité de temps) de soluté (protéines). J_v est le débit de filtration de l'eau (volume / unité de temps). C_p et C_a sont les concentrations de protéines dans le plasma sanguin et dans l'alvéole. PS est le produit perméabilité-surface (volume / unité de temps) qui décrit les propriétés diffusives de la membrane semi-perméable.

σ (sans dimension) est le coefficient de réflexion aux protéines. $\sigma = 1$ quand la barrière est totalement imperméable aux protéines, et $\sigma = 0$ quand la barrière n'offre aucune résistance au flux protéique.

Ce modèle a été repris de façon non linéaire par Patlak (149) et transformé par Granger et Taylor (73) dans l'équation suivante :

$$J_s = \underbrace{[J_v \cdot (1 - \sigma) \cdot C_p]}_{\text{transport convectif}} + \underbrace{[(C_p - C_a) \cdot PS \cdot Pe / (e^{Pe} - 1)]}_{\text{transport diffusif}} \quad (1)$$

Pe est le nombre de Peclet modifié (sans dimension) qui représente le rapport entre le flux convectif et le flux diffusif du soluté au travers du même pore.

$$Pe = ((1 - \sigma) \cdot J_v) / PS$$

Le nombre de Peclet avait été décrit initialement en 1984 par Curry (47) comme le rapport de la vitesse du soluté imposée par le débit de filtration de l'eau ($V_{s.imp}$) c'est à dire la convection, à la vitesse de diffusion libre du soluté ($V_{s.diff}$) ; soit

$$Pe = (V_{s.imp}) / (V_{s.diff})$$

avec $V_{s.imp} = \chi \cdot V_w$, où V_w est la vitesse de l'eau, et χ est un coefficient reliant la vitesse du soluté à celle du liquide. Si un soluté est de petite taille par rapport aux dimensions du pore, il sera transporté à une vitesse très proche de l'eau, et χ sera très proche de 1.

La première partie de l'équation (1) : $[J_v \cdot (1 - \sigma) \cdot C_p]$ représente la convection tandis que la deuxième partie de l'équation (1) $[(C_p - C_i) \cdot PS \cdot Pe / (e^{Pe} - 1)]$ décrit la part diffusive du flux de soluté.

Il est intéressant de noter que quand la filtration liquidienne (J_v) augmente (*i.e.* en cas de formation d'œdème) le nombre de Peclet modifié (Pe) augmente, ce qui fait tendre la part diffusive du transport vers zéro (161).

En situation d'œdème, on peut donc approximer l'équation (1) par :

$$J_s = J_v \cdot (1 - \sigma) \cdot C_p \quad (2)$$

Pour suivre la régulation du flux capillaro-alvéolaire de protéines le coefficient de réflexion σ est un facteur important à déterminer. Cependant, en situation d'œdème, on remarque d'après l'équation (2) que le débit d'eau (J_v) commande le débit convectif des protéines au moins autant que σ . Or J_v dépend lui du coefficient de filtration liquidien (K_{fc}) (cf. supra équation de Starling, 1.4 p.15), lui même dépendant de la surface de filtration S . Ces paramètres J_v et K_{fc} sont, tout comme le produit perméabilité-surface PS de la partie diffusive de l'équation (1), perturbés par une variation de la surface de filtration, par exemple le dérecrutement capillaire lié à une lésion pulmonaire (148).

Cette modélisation est applicable directement à la filtration de liquide et de protéines au travers de la paroi capillaire (endothélium). Elle doit cependant être appliquée avec plus de prudence à l'ensemble de la barrière capillaro-alvéolaire en raison de la présence de 2 membranes disposées en série, la paroi capillaire et la paroi alvéolaire (épithélium), et en raison du drainage lymphatique de l'interstitium qui est interposé entre les deux membranes (*Fig. 7*).

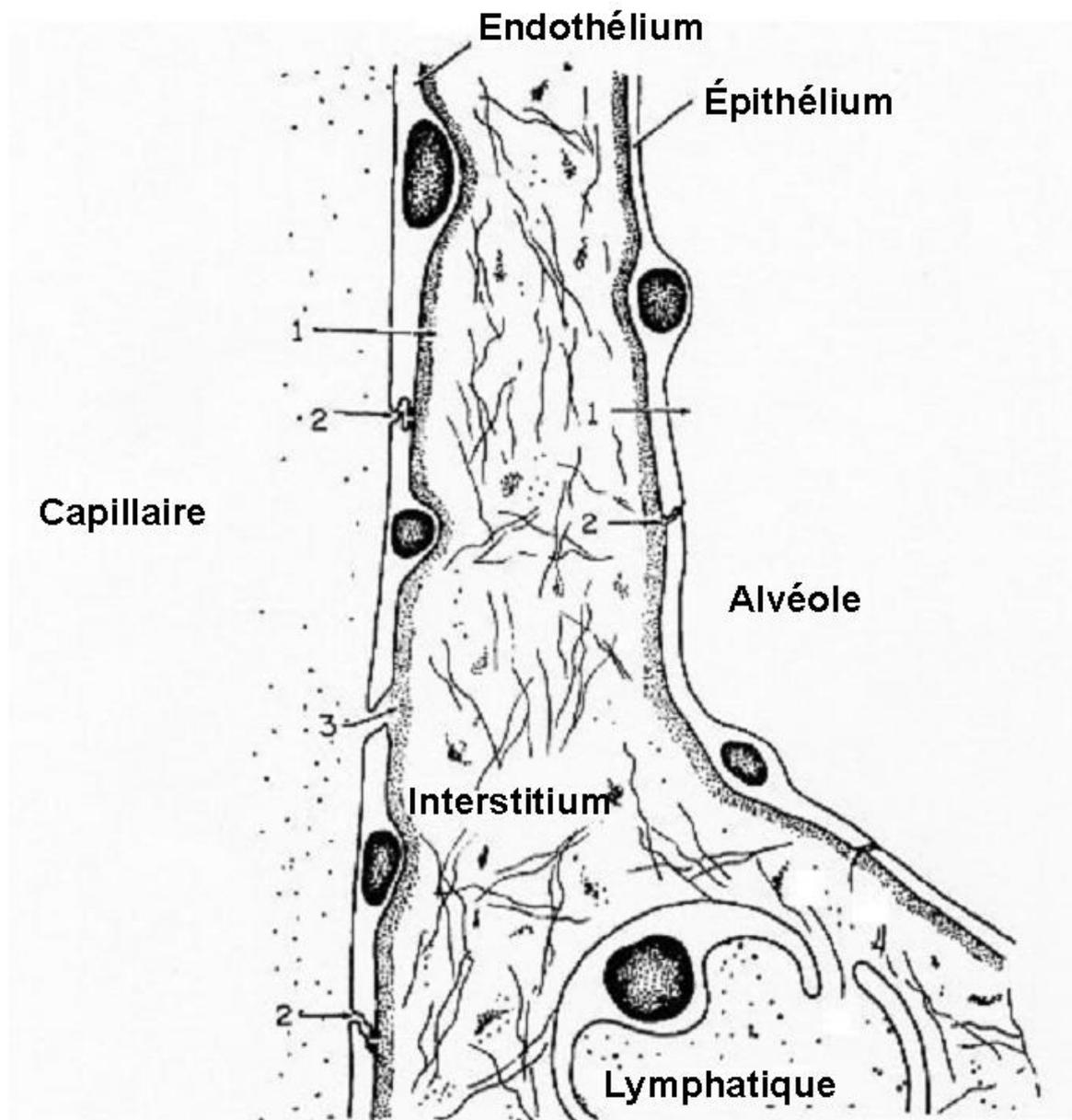


Figure 7 :Représentation schématique de la filtration d'eau et de protéines à travers la barrière capillaro-alvéolaire. D'après Staub (181). Trois sortes de passages peuvent co-exister : 1) Passage transcellulaire (endocytose) 2) Passage paracellulaire à travers les jonctions serrées 3) Passage paracellulaire à travers des interstices plus larges. Cette dernière voie est prépondérante en cas de lésion inflammatoire.

I.10 Mesure du transport des protéines

I.10.1 Mesure des paramètres de perméabilité endothéliale aux protéines

Sur une préparation de poumon isolé, une brève perfusion (pendant 3 minutes) d'albumine marquée à l'iode¹²⁵ permet, après rinçage et homogénéisation du poumon, de mesurer l'accumulation d'albumine marquée dans le tissu pulmonaire (J_s/C_p) en fonction du débit liquidien (J_v) mesuré par pesée du poumon. La répétition des mesures à plusieurs niveaux de pression capillaire permet de calculer PS et σ à partir d'une relation linéaire de J_s/C_p en fonction de J_v (Fig.8). Le coefficient de réflexion des protéines σ est calculé grâce à la pente de la droite de régression (pente = $1 - \sigma$) ; le produit perméabilité-surface PS étant lui égal à la valeur de l'ordonnée à l'origine (200) (107) (204). Il est à noter que cette technique surestime le coefficient de réflexion des protéines par rapport à celui mesuré par le recueil de la lymphe pulmonaire (voir infra le paragraphe sur le poumon intact). Cette surestimation est liée à la lenteur de l'équilibration plasma-tissu de l'albumine marquée (98).

D'autres auteurs (163) ont évalué σ en faisant varier la charge osmotique ($\Delta\Pi$) par dilution brusque du perfusé d'une préparation de poumon isolé isogravimétrique. La variation de flux liquidien (J_v) mesurée par la variation de poids ($\Delta w/\Delta t$) liée au changement de concentration protéique ($\Delta\Pi$) permet de calculer le σ à partir de l'équation de Starling simplifiée en situation stable isogravimétrique (cf supra paragraphe 1.6.1.d p.21) :

$$\Delta w/\Delta t = K_{f,c} \cdot \sigma \cdot \Delta\Pi$$

Cette technique nécessite la mesure du coefficient de filtration ($K_{f,c}$) déterminé par des augmentations étagées de pression capillaire ce qui en complique l'utilisation.

Une autre méthode de calcul du σ utilisant les variations d'hématocrite et de concentration protéique du perfusé a été proposée par Maron et coll. (121). Cette méthode surestime le σ du fait de l'hémolyse et de l'évaporation du perfusé. En outre pour que les variations de concentrations soient interprétables, il faut que la filtration liquidienne représente près de 10% du volume perfusé ; ce qui n'existe que dans les lésions très importantes.

L'isolement chirurgical d'un poumon et sa perfusion par un système de circulation extra-corporelle entraînent des lésions d'ischémie-reperfusion avec une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires et une augmentation de la perméabilité capillaire. Ces préparations ne sont pas stables dans le temps (3 heures maximum) (13).

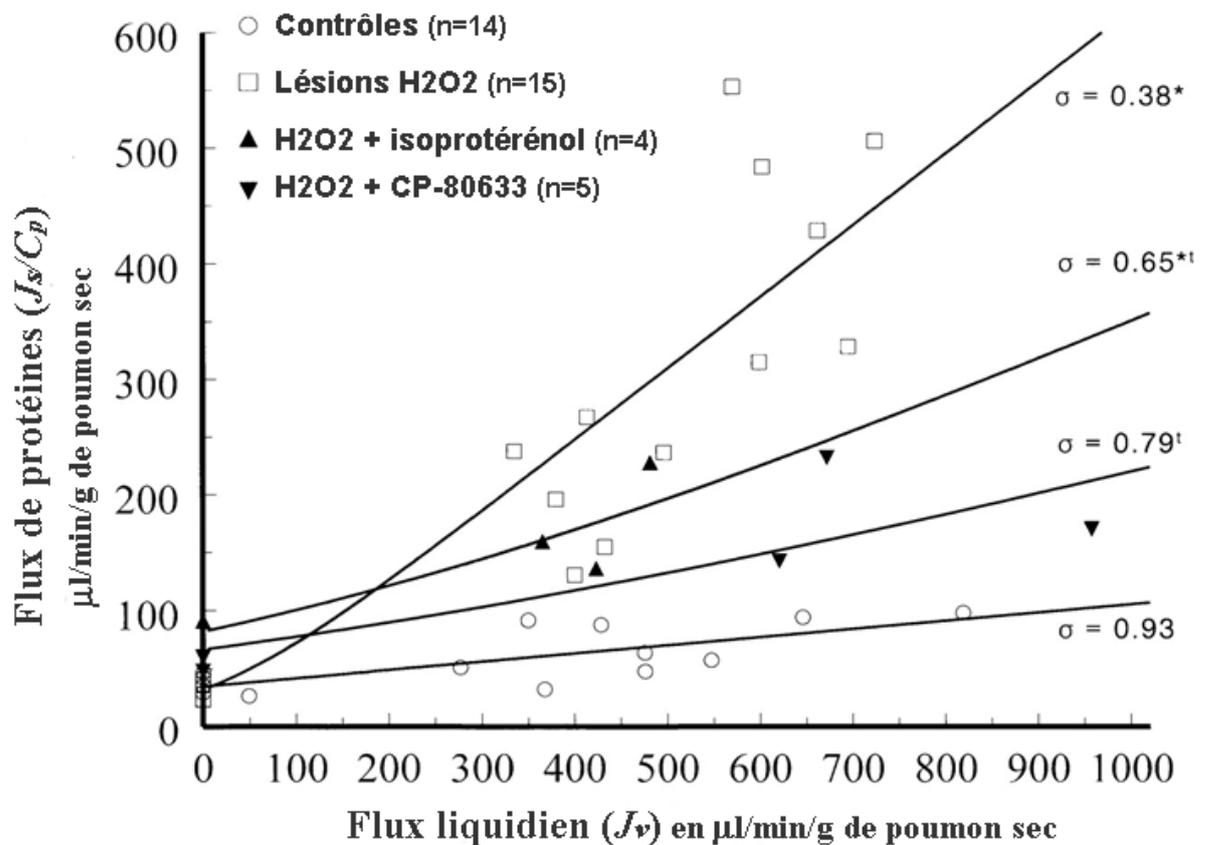


Figure 8 : Calcul du coefficient de réflexion σ pour l'albumine marquée à l'iode¹²⁵ chez le rat, d'après Waypa et col. (204) avec permission.

Abscisse (x) : Filtration liquidienne transcapillaire (J_v)

Ordonnée (y) : Transport d'albumine marquée à l'iode¹²⁵ (J_s/C_p) avec J_s = flux transcapillaire d'albumine et C_p = concentration d'albumine dans le perfusat.

Les courbes représentent les droites de régression linéaires pour des animaux normaux (○) des sujets lésés à l'H₂O₂ (□) traités soit avec un β agoniste (isoprotérénol) (▲), soit avec un inhibiteur des phosphodiésterases IV (CP-80633) (▼)

Le coefficient de réflexion σ est calculé grâce la pente de chaque droite de régression (pente = $1 - \sigma$) ; le produit perméabilité-surface (PS) étant égal à l'ordonnée à l'origine.

Sur une préparation de poumon intact, la canulation des canaux lymphatique permet de mesurer le débit lymphatique de liquide et de protéines endogènes. Le coefficient de réflexion σ de l'endothélium peut alors être grossièrement estimé par le rapport de la concentration lymphatique (C_l) sur la concentration plasmatique (C_p) : $\sigma = 1 - (C_l/C_p)$ mesuré à haut niveau de pression capillaire lorsque le rapport lymphé/plasma de l'albumine endogène (C_l/C_p) devient indépendant de J_v . Le σ est sous-estimé par cette méthode lorsque le temps d'observation est insuffisant (147). σ peut aussi être calculé plus précisément comme la pente de la partie linéaire de la courbe liant le débit protéique au débit liquidien (161).

I.10.2 Mesure de la perméabilité épithéliale aux protéines

Le principe commun aux mesures de perméabilité épithéliale consiste à déposer des protéines dans l'alvéole soit par instillation intra-trachéale soit par aérosols. Les aérosols sont préférables pour atteindre l'épithélium alvéolaire distal, les instillations trachéales reflétant généralement plus la réabsorption bronchique. Le traceur utilisé est souvent de l'albumine marquée à l'iode¹²⁵, (19) ou du Tc^{99m} (13) ou bien de l'albumine bovine ou une immunoglobuline G dont le taux plasmatique est ensuite mesuré par immunoprécipitation (62, 63). Un taux de transfert à travers l'épithélium est ensuite calculé grâce au rapport entre la quantité de traceur administré dans l'alvéole et la concentration du traceur recueilli dans le plasma tout en tenant compte de la cinétique d'élimination plasmatique normale.

Ces techniques ont permis de montrer que le taux de transfert de l'albumine était d'environ 1% par heure dans la plupart des espèces (19, 62, 105) mais pouvait-être multiplié par 5 à 15 en cas d'inflammation du poumon (63).

Ces méthodes utilisant soit le recueil de la lymphe pulmonaire soit la perméabilité épithéliale n'étudient pour chacune d'elles qu'un élément de la barrière capillaro-alvéolaire. Or si, à l'état normal, 90% de la résistance aux protéines de la barrière alvéolo-capillaire se situe au niveau de l'épithélium alvéolaire, il n'en est plus de même au cours d'une lésion pulmonaire. Ainsi, au cours d'une lésion à l'acide oléique, le rapport entre les résistances endothéliales et épithéliales passe de 9 à 2,7 (12). Si l'on admet que la transformation fibro-proliférative du tissu pulmonaire dans le SDRA dépend de l'accumulation alvéolaire des protéines non évacuées par les lymphatiques, les techniques de mesure à utiliser sont celles du transport global plasma-tissu.

I.10.3 Mesures globales de l'accumulation tissulaire des protéines

a) La radiodétection externe d'une protéine marquée

Après injection intraveineuse, la détection pulmonaire est effectuée au niveau de régions d'intérêt (si possible représentatives de l'ensemble du poumon) au moyen d'une sonde portable, d'une gamma-camera, ou d'un PET-scan. Des échantillons sanguins viennent compléter ces mesures.

Deux principaux modèles (linéaire et non linéaire) ont été décrits dans la littérature pour calculer un index de perméabilité aux protéines.

Le modèle linéaire à un seul compartiment ne prend pas en compte le débit de retour des protéines vers le compartiment sanguin.

Après avoir calculé un rapport poumon/sang pour le traceur protéique ainsi que pour le marqueur spécifique des globules rouges, un rapport est calculé :

$$\frac{(\text{Proteine}_{\text{poumon}} / \text{Globule Rouge}_{\text{poumon}})}{(\text{Proteine}_{\text{sang}} / \text{Globule Rouge}_{\text{sang}})}$$

Une régression linéaire de ce rapport en fonction du temps est établie. La pente de la droite de régression est calculée, puis divisée par la valeur de l'ordonnée à l'origine (ceci afin de normaliser la mesure en fonction de différents paramètres physiques). Ce calcul fournit un index de pente (slope index) qui a la valeur d'une constante de temps (min^{-1}). Cet index de transport des protéines dans le poumon prend un nom différent selon les auteurs : Pulmonary Leak Index (160) (119) ou Pulmonary Protein Accumulation (10) ou encore Normalized slope Index (NSI) (175). Roselli (165) a montré qu'en fait tous ces index sont mathématiquement semblables et peuvent être regroupés sous le nom d'index de pente normalisé (Normalized Slope Index = NSI).

Dans le modèle bicompartimental non-linéaire l'accumulation de protéines dans le poumon est soumise à un débit entrant et à un débit sortant à partir du secteur interstitiel.

L'index de transport mesuré est communément appelé Pulmonary Transcapillary Escape Rate (PTCER). Cette méthode a été utilisée pour la première fois chez l'homme par Gorin (72) et repris dans beaucoup d'autres études depuis (32, 102, 103, 110, 142, 174, 175).

Le modèle non-linéaire est plus proche de la réalité physiologique mais est davantage source d'erreurs. Globalement le PTCER est comparable aux index obtenus par voie linéaire (NSI) (79) surtout si la mesure de l'accumulation protéique est de courte durée (165).

Les mesures peuvent être répétées (en moyenne toutes les heures) si l'on ré-injecte un bolus du traceur (préférentiellement de demi-vie courte) et si l'on mesure une nouvelle pente d'accumulation. (Fig.9).

Les radionucléotides les plus utilisés pour le marquage de l'albumine ou du fibrinogène sont l'iode¹²⁵ et l'iode¹³¹ ou encore le Technétium-99m (^{99m}Tc). La transferrine est le plus souvent marquée par de l'Indium 113m (^{113m}In), de l'Indium 111 (¹¹¹In), du Gallium 67 (⁶⁷Ga), ou encore du Gallium 68 (⁶⁸Ga) pour le PET-scan (79) (174). Les radionucléotides qui ont les demi-vies les plus courtes sont le ^{99m}Tc, le ^{113m}In et le ⁶⁸Ga, mais leur liaison au traceur protéique est faible ce qui peut perturber les mesures de l'index de perméabilité. Par exemple l'index de perméabilité de la transferrine marquée au Gallium est six fois supérieur à celui de la même transferrine marquée à l'Indium. Le marquage à l'Indium ou à l'iode¹³¹ est plus stable, mais il faut en administrer de grosses quantités pour un comptage externe correct. La Transferrine marquée au gallium semble être le traceur le plus sensible pour les lésions modérées (79).

Le traceur intra-vasculaire est constitué d'hématies marquées au Chrome51 (91) ou au ^{99m}Tc (156). Son intérêt est d'évaluer le volume sanguin pulmonaire. L'avantage théorique est de permettre une normalisation de l'index de perméabilité par rapport à la surface d'échange (*i.e.* en cas de vasoconstriction pulmonaire la radioactivité pulmonaire mesurée diminue). D'autres auteurs s'affranchissent de ce traceur sanguin en estimant le volume sanguin pulmonaire par la mesure de radioactivité thoracique présente au temps initial (instant où tout le traceur protéique est encore présent dans le sang), et en supposant que ce volume sanguin pulmonaire change peu au cours de la mesure d'accumulation pulmonaire de protéine. (174, 175).

Ces techniques présentent plusieurs inconvénients. Le rayonnement mesuré inclut l'activité contenue dans les parois du thorax ce qui diminue le rapport signal/bruit et donc la sensibilité de la méthode. Les données mesurées dans une région d'intérêt pulmonaire sont extrapolées à tout le poumon, ce qui peut induire des erreurs car il existe des inhomogénéités de perméabilité correspondant aux inhomogénéités de la lésion pulmonaire dans le SDRA. Par ailleurs, ces méthodes sous-estiment la perméabilité capillaire car elles ne tiennent pas compte de la clairance lymphatique qui en situation normale, élimine près de 80% de l'albumine qui a franchi l'endothélium (98). Cette sous-estimation est majorée à la phase interstitielle des oedèmes de perméabilité. Malgré l'emploi de traceurs ayant une demi-vie courte, ces techniques n'autorisent que des points de mesure de perméabilité

espacés qui nécessitent à chaque fois le déplacement d'un patient en état grave dans un service de médecine nucléaire et son immobilisation pendant près d'une heure sous une gamma-caméra ou un PET-scan. Enfin peu de structures sont équipées de tels appareillages qui sont coûteux.

b) Mesure d'un index de perméabilité macromoléculaire par IRM

Certains auteurs proposent de mesurer la perméabilité capillaro-alvéolaire au moyen de l'IRM. La polylysine-gadopentetate dimeglumine est un marqueur macromoléculaire (PM = 40 000) marqué au Gadolinium qui peut être injecté en intra-veineux. En cas d'œdème de perméabilité on observe une augmentation du signal IRM. On peut calculer une constante de passage (fractional leak index) dont l'unité est la min^{-1} (18) (24).

c) Lavages Broncho-Alvéolaires

Le recueil des sécrétions trachéales et le lavage broncho-alvéolaire (LBA), relativement peu invasifs, peuvent se pratiquer au lit du patient sans le déplacer (183). Ces techniques ont montré une forte concentration en protéines plasmatiques du liquide alvéolaire en présence d'un œdème pulmonaire par augmentation de perméabilité. L'augmentation de perméabilité capillaro-alvéolaire, dans ce type d'œdème pulmonaire, a également été confirmée par l'élévation de la clairance d'albumine marquée du sang vers les sécrétions bronchoalvéolaires (178). Néanmoins en dehors du recueil du liquide d'œdème à la phase aiguë, la concentration de protéines mesurée dans le LBA peut être source de confusion quant à la cause de l'œdème du fait notamment de la concentration secondaire des protéines qui sont éliminées de l'alvéole moins vite que l'eau. Ce type de technique présente également des incertitudes quant à la taille du volume pulmonaire exploré ou à une éventuelle contamination par des sécrétions bronchiques.

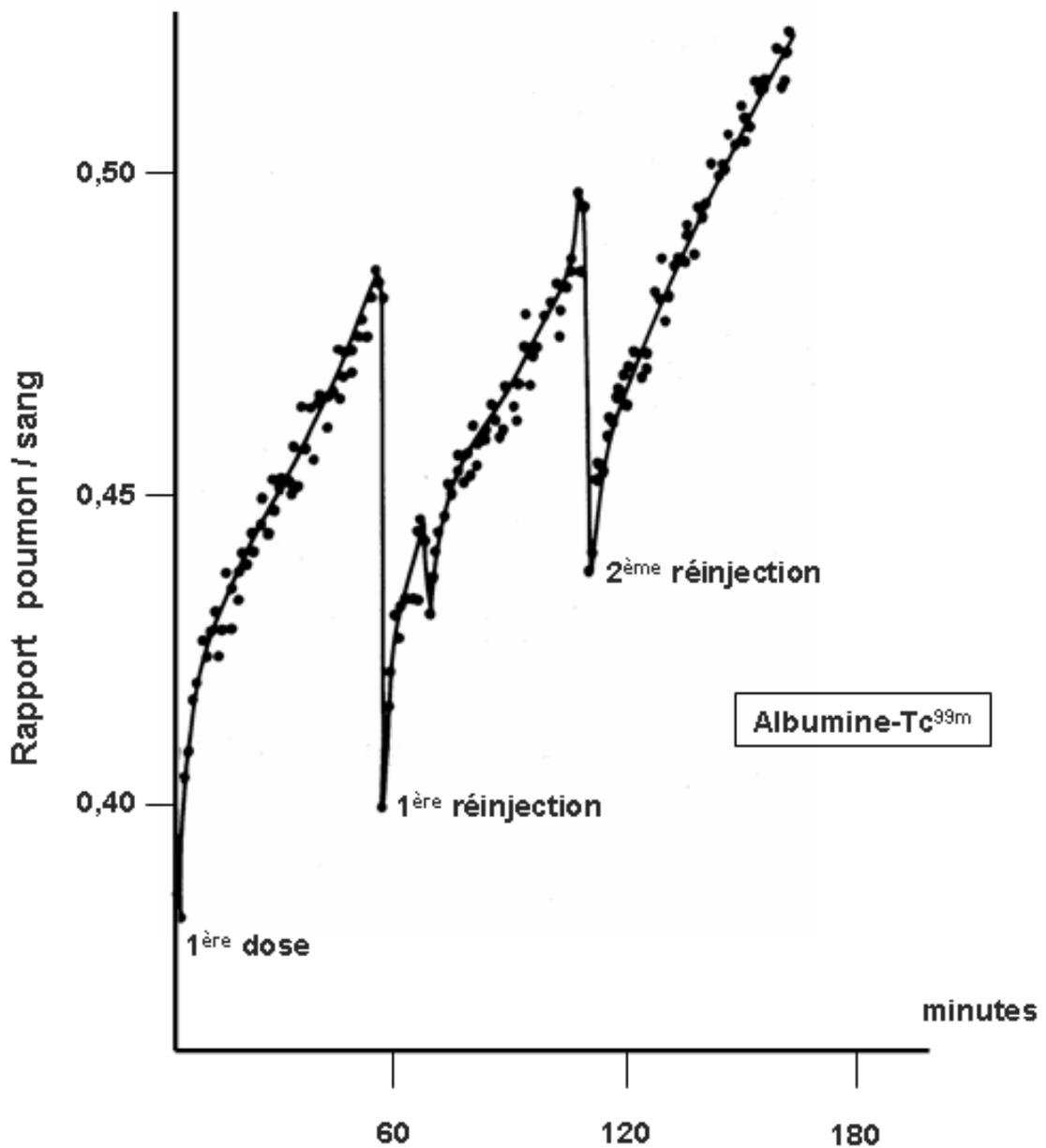


Figure 9 : Mesures répétées d'accumulation pulmonaire d'albumine marquée au Tc^{99m} chez le chien lésé à l'acide oléique ; d'après Tatum et col. (190) avec permission.
 Un index de perméabilité (normalized slope index) est calculé pour chacune des pentes d'accumulation correspondant à des réinjections successives (toutes les heures) d'albumine marquée au Tc^{99m} dont la détection est fait par voie externe au moyen d'une gamma-caméra.

I.11 Choix de la méthode de mesure

Pour tester des thérapeutiques qui sont supposées ralentir l'accumulation alvéolaire des protéines plasmatiques, il faut pouvoir disposer d'une mesure du transport total des protéines du sang vers l'alvéole, plutôt que de mesures lymphatiques n'étudiant que la perméabilité de l'endothélium ou bien de mesures de perméabilité épithéliale seule. Il faut, de plus, pouvoir étudier le passage d'un indicateur exogène, mimant la cinétique des protéines plasmatiques endogènes.

Par ailleurs, à la phase aiguë de l'œdème inflammatoire (phase essentiellement exudative) la filtration des protéines à travers la barrière capillaro-alvéolaire devient essentiellement convective et, de ce fait, intimement liée aux flux liquidiens. Or ces flux liquidiens au travers des capillaires dépendent des paramètres hémodynamiques qui doivent par conséquent être monitorés avec précision tout au long de l'expérience. Le but d'éventuels essais thérapeutiques doit donc être, non seulement de restaurer l'étanchéité de la barrière capillaro-alvéolaire, mais aussi de limiter le débit et la pression sanguine dans les capillaires lésés.

Une technique de LBA à saturation a été développée dans notre laboratoire permettant de pallier aux incertitudes du LBA. Elle permet d'isoler le segment pulmonaire lavé et de mesurer son volume par dilution d'un indicateur non diffusible introduit dans le liquide de lavage. Une série de plusieurs lavages séquentiels est réalisée, en ré-instillant le liquide récupéré et en le complétant pour maintenir la saturation en liquide. Cette technique permet de mesurer le transport d'indicateurs du plasma vers les alvéoles. Le transport d'indicateurs de petite taille permet l'étude des mouvements d'eau et l'évaluation du volume de liquide alvéolaire avant le début des lavages (14). Le transport d'indicateurs de grande taille (dextran de PM proche de celui de l'albumine) permet d'approcher la perméabilité aux protéines au cours d'un modèle classique d'œdème pulmonaire type SDRA provoqué par l'injection iv d'acide oléique chez le chien (12, 170).

Nous avons souhaité, dans cette étude, faire évoluer la technique de LBA à saturation de manière à mesurer la perméabilité toutes les 15 minutes pendant plusieurs heures au cours d'une lésion, ce qui permet de suivre l'évolution de la perméabilité aux protéines à la phase aiguë du SDRA.

I.12 Choix du modèle animal

Nous avons souhaité donner à notre travail une orientation pré-clinique à la fois pour la mise au point de la méthode de mesure et une adaptation au patient à moyen terme, mais aussi pour l'évaluation, *in vivo* chez le gros animal, des traitements réputés efficaces *in vitro* ou sur le petit animal. Nous avons donc choisi de réaliser notre étude sur des chiens beagles pour nous rapprocher du contexte clinique.

I.13 Choix du modèle de lésion pulmonaire

Le modèle de SDRA le plus étudié chez l'animal est le déclenchement d'un œdème pulmonaire inflammatoire par l'injection intra-veineuse d'acide oléique à travers un cathéter veineux profond. Les effets de l'acide oléique chez l'animal ont été décrits avec précision dans une revue exhaustive de Schuster (170). L'acide oléique est un acide gras insaturé qui provoque une lésion pulmonaire inflammatoire brutale semblable à celle déclenchée par une embolie graisseuse chez le patient qui est l'une des causes du SDRA. L'inflammation déclenchée évolue ensuite pour son propre compte et reproduit les principales phases du SDRA quelqu'en soit le facteur déclenchant initial. L'acide oléique obstrue partiellement les capillaires ce qui provoque dès les premières secondes une augmentation de perméabilité capillaire. Cet effet a été visualisé directement en micropleuroscopie qui montrait l'apparitions des phénomènes inflammatoires moins d'une minute après l'injection d'acide oléique (140). L'accumulation d'eau et de protéines extravasculaires commence dès la dixième minute, avec un pic autour de la 60^{ème} minute et un retour à la normale en 5 heures. Ce modèle étant le plus répandu dans la littérature, nous avons souhaité confronter nos données avec celles des études publiées utilisant l'acide oléique. La lésion à l'acide oléique est cependant une lésion brutale, avec des effets hémodynamiques marqués, en partie expliqués par le bolus de l'injection, et une agression directe du poumon ne correspondant pas toujours à certaines étiologies du SDRA comme le sepsis grave où les lésions pulmonaires sont souvent indirectes et plus progressives.

C'est pourquoi nous avons, dans la dernière partie de notre étude, changé de modèle lésionnel et opté pour une lésion à l'endotoxine bactérienne. Ce modèle de lésion à l'endotoxine bactérienne est le plus souvent réalisé par injection intra-veineuse de LipoPolySaccharide (LPS) d'E. Coli. Ce modèle, bien que moins reproductible que celui à l'acide oléique (166) est cependant plus proche du sepsis grave qui est le contexte clinique le plus fréquemment pourvoyeur de SDRA (94, 106, 179, 213).

I.14 Choix des thérapeutiques testées

Nous avons souhaité dans cette étude évaluer l'efficacité de thérapeutiques visant à augmenter le taux d'AMPc intra-cellulaire. En effet l'augmentation d'AMPc a fait la preuve de sa capacité à restaurer les propriétés de la barrière endothéliale (voir supra paragraphe I.8.2. P.31) (133, 195).

- Les médicaments béta2-agonistes sont intéressants à plus d'un titre. Ils sont efficaces pour améliorer la réabsorption liquidienne épithéliale en stimulant l'activité et l'expression génétique des canaux sodiques épithéliaux (ENaC) (125) (39).

Ils sont aussi efficaces pour diminuer la filtration protéique à travers la paroi capillaire à la phase aiguë de la lésion pulmonaire (133) (11, 50, 80, 107).

Action des béta2-agonistes sur les médiateurs de l'inflammation

Plusieurs études ont également montré que les β 2-agonistes peuvent inhiber certains médiateurs de l'inflammation (195).

Les études in vitro sur cultures de cellules ont montré que les β 2-agonistes stimulent l'activité de l'adénylate cyclase laquelle augmente la production intracellulaire d'AMPc et active la synthèse de protéine kinase A (PKA). La PKA inhibe la phospholipase C β dont l'action est de favoriser la transcription génétique des protéines inflammatoires (cytokines, intégrines et sélectines) et des lipides inflammatoires (leucotriènes, thromboxane et Platelet Activating Factor) (42) (196). La dobutamine et le salbutamol inhibent le chimiotactisme des macrophages ainsi que la production de protéines inflammatoires (protéines 1- α et interleukine-8) par les monocytes humains stimulés par du LPS (115). De plus, l'augmentation du taux d'AMPc par l'isoproterenol dans des cultures de fibroblastes humains, diminue la prolifération de ces fibroblastes et limite la synthèse de collagène (117). Cette constatation renforce l'intérêt des β -agonistes pour réduire la fibrose pulmonaire dans le SDRA.

Les études ex vivo sur des fragments de tissu pulmonaire lésé par de l'endotoxine (LPS) ont montré que le traitement par l'isoproterenol diminuait la synthèse de TNF α (Tumor Necrosis Factor qui est l'une des principales cytokines pro-inflammatoires) ainsi que la peroxydation lipidique, et ceci en relation avec une augmentation du taux d'AMPc intracellulaire (214).

In vivo, chez des souris lésées par de l'endotoxine (LPS), les β -agonistes limitent la surproduction de TNF α et de NO (116), diminuent la libération des cytokines proinflammatoires (interleukines 6 et 8) et inhibent le recrutement des neutrophiles (50, 120).

Action des β 2-agonistes sur la perméabilité aux protéines

Les effets des β 2-agonistes sur la perméabilité globale de la barrière capillaro-alvéolaire aux protéines sont controversés.

L'AMPc intracellulaire augmente la phosphorylation, par la protéine kinase A (PKA), de la MLCK (kinase des chaînes légères de myosine), ce qui diminue la tension cellulaire, relâche les cellules endothéliales et accélère la fermeture des interstices intercellulaires qui s'étaient créés au cours de l'inflammation à cause d'une rupture d'adhésion entre les cellules et d'une déformation du cytosquelette (1, 40, 133, 184, 185).

Plusieurs études ont montré que les β 2-agonistes réduisaient l'augmentation de perméabilité microvasculaire endothéliale à la phase aiguë de la lésion dans les modèles expérimentaux.

Les études *in vitro* sur culture cellulaires endothéliales ont montré que l'augmentation de perméabilité à l'albumine après stimulation par la thrombine était réduite par les β 2-mimétiques (135) (3). Le blocage des récepteurs beta2 par un antagoniste spécifique comme le ICI 118,551 a permis de mettre en évidence, aussi bien *in vitro* (135) que *in vivo* (54), l'importance des effets beta2 des cathécholamines sur la perméabilité capillaro-alvéolaire aux protéines.

Sur des poumons isolés de lapins lésés à l'acide arachidonique, Kreienberg (107) a montré une amélioration du coefficient de réflexion σ pour l'albumine après traitement par l'isoproterenol.

In vivo, la perfusion de terbutaline, chez des moutons lésés à l'endotoxine, diminue la fuite microvasculaire pulmonaire (179) et prévient l'accumulation pulmonaire de transferrine marquée à l'In¹¹¹ (213). L'administration, par voie inhalée, de salmeterol ou de salbutamol limite l'augmentation de perméabilité à l'albumine de cochons lésés soit par l'histamine, l'endotoxine ou encore le Platelett Activating Factor (PAF) (210).

Les β 2-mimétiques ont aussi été testés chez des patients présentant un SDRA. Basran (11) a mis en évidence un effet bénéfique d'une perfusion intra-veineuse de terbutaline pour réduire l'accumulation pulmonaire de transferrine marquée à l'In^{113m}. Les β 2-agonistes

peuvent aussi être utilisés par voie inhalée (6). De ce fait ces médicaments sont actuellement souvent cités comme pouvant faire partie de l'arsenal thérapeutique à disposition pour le traitement du SDRA (30, 80).

Cependant, d'autres études sont plus critiques quant aux capacités des β 2-agonistes pour réduire la perméabilité capillaro-alvéolaire.

Dans un modèle de choc septique chez le porc, une perfusion continue de terbutaline n'a pas réussi à faire baisser l'extravasation capillaire d'albumine (81). Le pré-traitement par terbutaline chez des porcs lésés à l'acide oléique n'a pas montré d'effets bénéfiques sur l'accumulation pulmonaire de transferrine marquée à l'In^{113m} (209).

Les effets hémodynamiques des β 2-agonistes sont bien connus et peuvent expliquer leurs effets variables *in vivo*, sur la perméabilité capillaro-alvéolaire aux protéines. En effet, si certains auteurs (136) (106) estiment que l'augmentation de débit cardiaque et de pression artérielle pulmonaire, dues aux effets β 1 inévitables des médicaments β 2-agonistes, ne sont pas préjudiciables en terme de conséquence sur le transport des protéines, d'autres études (68) (57) ont montré une aggravation de la filtration liquidienne après une augmentation du débit cardiaque.

C'est pourquoi, dans la dernière partie de notre étude, nous avons souhaité tester un autre bêta-2 agoniste, le salmeterol, réputé efficace sur la perméabilité (120, 168, 210) et censé avoir moins d'effets hémodynamiques (36, 155). Nous avons voulu le tester en association avec l'autre grande catégorie de médicaments induisant une augmentation d'AMPc intracellulaire : les inhibiteurs des phosphodiéstrases.

- Les inhibiteurs des phosphodiésterases (PDE)

Le groupe des phosphodiésterases (PDE) est une famille complexe qui comporte plusieurs sous-groupes (PDE 1 à 5). Elles hydrolysent l'AMPc et le GMPc et leur action est variable selon le tissu concerné et le sous-groupe considéré (189). Les traitements inhibant la PDE-4 ont fait la preuve de leur efficacité pour réduire l'inflammation pulmonaire chronique notamment dans l'asthme et la broncho-pneumopathie obstructive.

L'augmentation du taux d'AMPc par les inhibiteurs de PDE-4 est aussi efficace, (voir plus efficace) que la stimulation de l'adénylate cyclase par les β 2-agonistes (45, 184, 204). Ces médicaments ont surtout démontré une très forte synergie avec les β 2-agonistes pour augmenter le taux intracellulaire d'AMPc permettant d'espérer un gain thérapeutique via l'association de ces deux classes de médicaments (1, 192).

Dans la dernière partie de notre étude nous avons donc souhaité tester l'efficacité d'une telle association médicamenteuse dans l'espoir d'une potentialisation des effets thérapeutiques sur la perméabilité aux protéines et d'une modération des effets sur les pressions et le débit sanguin dans la circulation pulmonaire.

I.15 Objectifs de l'étude

a) Objectifs principaux :

- L'objectif principal de cette étude était la mise au point d'une méthode permettant des mesures fréquemment répétées de la perméabilité capillaro-alvéolaire globale aux macromolécules plasmatiques au cours de la phase aiguë (exudative) du SDRA. Nous avons donc fait évoluer la technique de LBA à saturation précédemment développée dans notre laboratoire (12) pour pouvoir réaliser, pendant plusieurs heures, un suivi précis de l'évolution de la perméabilité du poumon aux protéines. Le but d'un tel monitoring est d'être un outil d'évaluation des thérapeutiques préalablement testées *in vitro* ou sur le petit animal.
- Nous souhaitons pouvoir comparer cette technique avec les méthodes de mesure de perméabilité tissulaire globale précédemment mises au point et publiées. Nous avons donc fait le choix du modèle lésionnel à l'acide oléique, ce modèle étant le plus répandu dans la littérature.
- Dans un but pré-clinique nous avons développé cette méthode sur de gros animaux (chiens beagles) afin d'en envisager, à moyen terme, le transfert en clinique humaine. Cette méthode se veut facile à mettre en œuvre sans nécessiter le transfert du sujet auprès d'un équipement coûteux et difficile d'accès pour un malade de réanimation.

b) Objectifs secondaires :

- Notre étude avait pour but secondaire d'évaluer *in vivo*, l'effet de la terbutaline, médicament de la classe des béta-2 agonistes, dont les effets sur la perméabilité (*via* l'adénylate cyclase et l'AMPc intracellulaire) ont été beaucoup décrits et sont censés améliorer les propriétés de la barrière capillaro-alvéolaire vis à vis du passage transmembranaire des protéines plasmatiques.
- Nous avons également souhaité tester d'autres classes médicamenteuses pouvant augmenter le taux d'AMPc intracellulaire, en particulier une association de rolipram (inhibiteur des PDE-4) et de salmeterol (β 2-agoniste réputé avoir peu d'effets hémodynamiques).
- Enfin nous avons voulu tester notre méthode de mesure et les thérapeutiques proposées sur un modèle de SDRA par injection intra-veineuse d'endotoxine bactérienne (LPS d'E. Coli) ; modèle moins brutal et plus proche de la réalité clinique.

II – MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1 Préparation expérimentale

Les expériences ont été réalisées sur des chiens beagles d'un poids moyen de $12,6 \pm 0,3$ kg. Un cathéter veineux court de 20 G était introduit dans une veine de la patte antérieure. Les animaux étaient anesthésiés par une injection intra-veineuse de 10 mg/kg de thiopenthal disodique (Nesdonal[®]). L'animal était intubé avec une sonde endotrachéale n°10, puis ventilé à l'aide d'un respirateur mécanique (Palmer[®] SW2). L'anesthésie était entretenue par l'inhalation de fluothane à la concentration de 1% (Halothane[®] Belamont). La fraction inspirée d'oxygène (FiO₂) était ajustée pour maintenir l'oxymétrie de pouls au dessus de 95% de saturation de l'hémoglobine. Une mesure de gazométrie artérielle (ABL500, Radiometer[®]) était effectuée toutes les heures après une période de 10 minutes de ventilation en oxygène pur. Chez les animaux où une lésion pulmonaire était induite, un cathéter artériel fémoral était mis en place et un cathéter artériel pulmonaire à ballonnet distal (sonde de Swan-Ganz 7,5 F ; Baxter[®]) introduit par voie veineuse fémorale et monté jusque dans l'artère pulmonaire.

II.2 Dispositif de lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Le but de ce dispositif était de créer et de maintenir dans un segment pulmonaire, un site d'échantillonnage du liquide de lavage, de volume constant, afin de pouvoir y mesurer la concentration d'un indicateur macromoléculaire perfusé dans le sang (*cf. infra*)

Avant chaque expérience, le liquide de lavage était préparé en ajoutant de l'albumine marquée à l'iode¹²⁵ (Cis Bio International[®]) à 500 ml de sérum salé physiologique (NaCl 9g ‰) de façon à obtenir une radioactivité de 5 µCi/l. Ce traceur servait de marqueur de dilution permettant le calcul du volume du segment pulmonaire lavé. Dans la dernière série d'expériences où une lésion à l'endotoxine était induite, nous avons remplacé l'albumine marquée à l'iode¹²⁵ par de l'albumine bovine (Sigma[®]) dont la concentration dans le liquide de lavage était mesurée par immunoprécipitation par anticorps spécifiques (112).

II.2.1 Dispositif d'étanchéité

Pour pouvoir réaliser des LBA dans un circuit fermé, un ballonnet gonflable à distance a été ajusté à l'extrémité d'un fibroscope (Fujinon[®], Japan). Le fibroscope était introduit à travers le circuit respiratoire et la sonde d'intubation trachéale à travers un raccord étanche permettant une ventilation assistée sans fuite. L'extrémité distale du fibroscope était placée dans une bronche segmentaire du poumon droit ou gauche. Un capteur de pression était relié au canal opérateur du fibroscope. Le ballonnet était ensuite gonflé et l'étanchéité vérifiée par des injections successives de bolus de 10 ml d'air. L'étanchéité était considérée comme satisfaisante lorsque les paliers d'augmentation de pression dues aux injections d'air étaient stables dans le temps. Ces bolus successifs d'air permettait également de déterminer le volume optimal de liquide de lavage à utiliser pour le LBA. Le volume de liquide de lavage optimal était calculé comme le volume d'air injecté entraînant une augmentation de pression juste inférieure à 10 cm d'H₂O. En moyenne ce volume était compris entre 30 ml et 60 ml.

II.2.2 Le circuit de lavage broncho alvéolaire

Le liquide de lavage est instillé et réaspiré en circuit fermé, de façon à pouvoir mesurer le volume de liquide entrant et sortant. La pression régnant dans le compartiment pulmonaire était surveillée et le circuit était remis en contact avec la pression atmosphérique à la fin de chaque réaspiration du liquide de LBA de façon à éviter une surpression ou une dépression excessive. L'élément moteur était une seringue graduée de 60 ml qui permettait d'effectuer les instillations et les réaspirations de liquide de LBA. Le liquide de lavage était dirigé dans les différents circuits à l'aide de robinets à 3 voies (*Fig. 10*). Le même dispositif a été utilisé pour l'ensemble de l'étude.

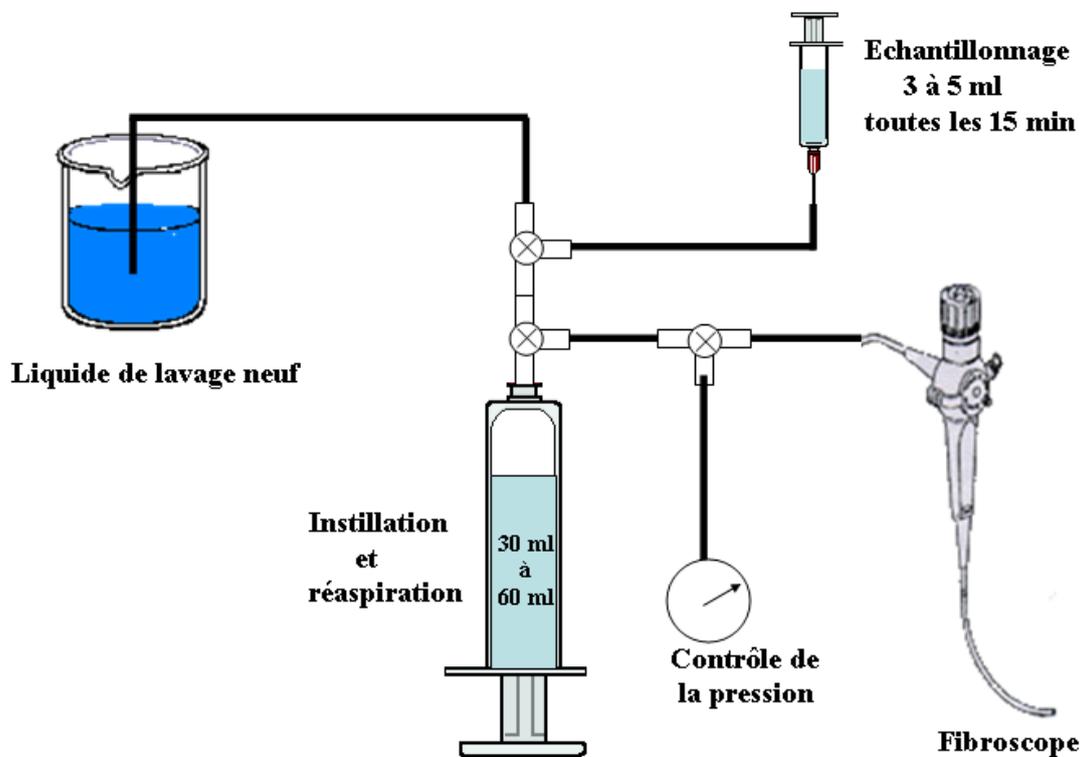


Figure 10 : Circuit de lavage broncho-alvéolaire. Le liquide de lavage neuf est contenu dans un réservoir. Une seringue de 60 ml est utilisée pour instiller le liquide de lavage. Le liquide est instillé et récupéré par le même canal opératoire du fibroscope. La seringue de 60 ml sert à la fois pour injecter le liquide de LBA dans le segment pulmonaire et pour le récupérer à la fin du cycle de lavage. Les robinets à 3 voies interposés servent à orienter le liquide dans les différentes branches du circuit. A la fin de chaque cycle de lavage (soit toutes les 15 min) un échantillon de 4 à 5 ml était prélevé et immédiatement remplacé par le même volume de liquide de lavage neuf. La pression du liquide de lavage est surveillée par un capteur et le circuit est remis en contact avec la pression atmosphérique à la fin de chaque cycle de lavage pour éviter les surpressions ou les dépressions.

II.2.3 Détail d'un cycle de lavage broncho alvéolaire

Il comporte les étapes suivantes :

- Le volume optimal de liquide préalablement déterminé au cours du test d'étanchéité (soit 30 à 60 ml) était instillé en environ 15 secondes afin d'obtenir un bon mélange avec les macromolécules perfusées dans le sang et parvenant à la surface de l'épithélium alvéolaire. Ce volume était fixe pour chacun des cycles de LBA réalisés au cours de la même expérience. 2 à 3 ml d'air étaient injectés pour vider le liquide présent dans l'espace mort du canal opérateur du fibroscope et dans la tubulure de liaison.
 - Le liquide instillé était réaspiré : a) immédiatement au cours des 6 cycles de lavages initiaux servant à saturer le segment pulmonaire ; b) au cours des cycles ultérieurs, le liquide instillé était laissé en place 12 minutes dans le poumon avant d'être réaspiré doucement en 2 à 3 minutes. Dans tous les cas, tout le volume de liquide qui pouvait être réaspiré était retiré. Les effets de la réaspiration de liquide étaient surveillés visuellement et l'aspiration était arrêtée dès que la lumière de la bronche tendait à s'écraser sous l'effet de la dépression.
 - Le volume de liquide réaspiré était noté. Un échantillon d'environ 4 à 5 ml était prélevé dans une seringue préalablement pesée à vide.
 - Du liquide de lavage neuf était ajouté au liquide réaspiré afin de retrouver le volume d'instillation fixe initialement déterminé. L'ensemble était réinstillé dans le cycle de lavage suivant ; le volume d'instillation restant ainsi identique d'un lavage à l'autre dans le but de maintenir constant le volume du liquide dans le secteur pulmonaire lavé.
- Cette procédure était répétée tous les quarts d'heure pendant 3 heures ½ (soit 4 heures après le début de la perfusion de FITC-dextran).

II.3 Protocole expérimental

II.3.1 Procédure commune à tous les sujets

Après l'équipement de surveillance hémodynamique et la mise en place du fibroscope, un état stable de 30 minutes était respecté pendant lequel était perfusé le traceur macromoléculaire plasmatique, le dextran- fluoro isothiocyanate d'un poids moléculaire de 70 000 (FITC-dextran, Sigma®). Cette perfusion de FITC-dextran incluait un bolus de 6 mg.kg^{-1} suivi d'une perfusion continue de $6 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ jusqu'à la fin de l'expérience.

Trente minutes après le début de la perfusion IV de FITC-dextran, le LBA était amorcé par 6 cycle de lavages, réalisés immédiatement l'un derrière l'autre, dont le but était de "saturer" de liquide de lavage le segment pulmonaire occlus par le ballonnet du fibroscope. Une fois ces 6 cycles de saturation effectués, les cycles de lavages étaient espacés toutes les 15 minutes. Pour chaque cycle de lavage, le liquide instillé était laissé en place dans le poumon pendant 12 minutes avant d'être réaspiré pour échantillonnage, puis complété avec du liquide neuf jusqu'au volume d'instillation initialement déterminé, et enfin réinjecté pour le cycle suivant (*cf. supra*). Cette procédure était répétée tous les quarts d'heure pendant 3 heures $\frac{1}{2}$ (soit 4 heures après le début de la perfusion de FITC-dextran).

II.3.2 Déclenchement de la lésion inflammatoire

Chez les animaux lésés à l'acide oléique la lésion était provoquée, 30 minutes après la fin des 6 cycles de LBA de saturation, par l'injection de 0,08 ml / kg d'acide oléique, au travers du canal proximal du cathéter artériel pulmonaire. Cette dose était répartie en 3 bolus d'acide oléique, espacés par un rinçage du cathéter avec 5 ml de sérum physiologique.

Chez les animaux lésés par de l'endotoxine bactérienne la lésion était provoquée 1 heure après la fin des 6 cycles de LBA de saturation, afin de pouvoir bénéficier d'une plus longue période de référence avant la lésion incluant la perfusion d'un traitement préventif, les animaux étant alors leurs propres témoins. L'endotoxine utilisée était du LPS d'E. Coli O55:B5 (Sigma®) administrée à la dose de 1 mg/kg par voie intra-veineuse.

II.3.3 Administration des thérapeutiques testées

Les traitements testés ont été administrés à différents temps de l'expérience.

La terbutaline (animaux lésés à l'acide oléique) a été débutée soit immédiatement après l'initiation de la lésion (terbutaline précoce) soit plus tardivement, 90 minutes après l'injection d'acide oléique (terbutaline tardive). Dans les deux cas la posologie administrée était une perfusion continue de $0,25 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ de terbutaline (Bricanyl, AstraZeneca[®]) poursuivie jusqu'à la fin de l'expérience (quelque soit le début de l'administration). (Fig. 11)

L'association rolipram + salmeterol (animaux lésés à l'endotoxine) a été débutée 30 minute avant l'injection d'endotoxine. Le rolipram (Sigma[®]) et le salmeterol (Serevent, GlaxoSmithKline[®]) étaient administrés conjointement en perfusion continue aux posologies respectives de $0,05 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ et $1 \mu\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ et ce jusqu'à la fin de l'expérience. (Fig. 12)

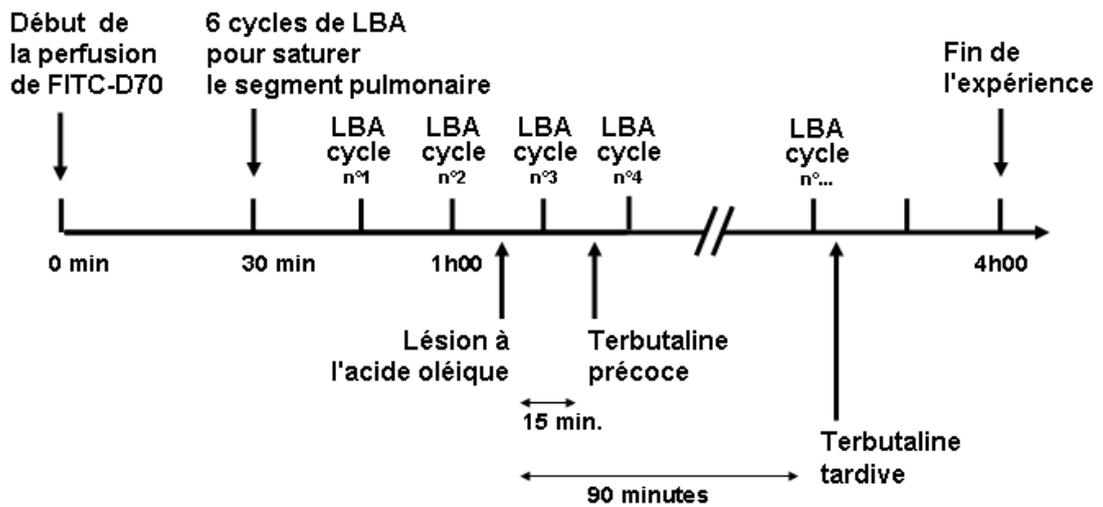


Figure 11 : Protocole expérimental pour les animaux lésés à l'acide oléique et traités par la terbutaline (groupes 1 à 5).

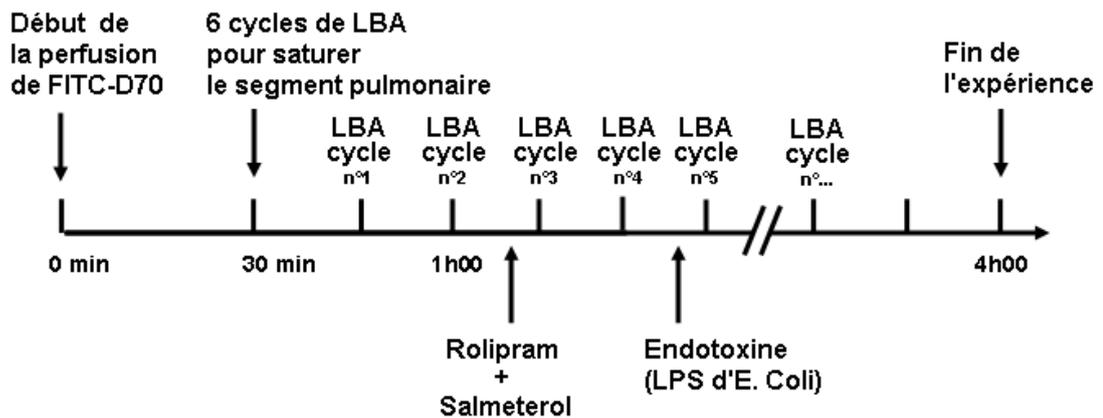


Figure 12 : Protocole expérimental pour les animaux lésés à l'endotoxine bactérienne et traités par l'association rolipram + salmeterol (groupes 6 et 7).

II.3.4 Répartition des sujets dans les différents groupes

La majeure partie l'étude a consisté à étudier l'effet de l'acide oléique sur la cinétique de la perméabilité macromoléculaire au FITC-dextran, et à tester les effets thérapeutiques curatifs de la terbutaline administrée, soit précocement, soit tardivement après l'induction de la lésion.

22 animaux ont été utilisés pour cette partie de l'étude. Ils ont été répartis comme suit :

- Groupe 1 : sujets témoins sans lésion ni traitement (3 animaux).
- Groupe 2 : sujets témoins sans lésion mais avec perfusion de terbutaline débutée 45 minutes après la fin des 6 cycles initiaux de LBA de saturation (3 animaux).
- Groupe 3 : sujets lésés à l'acide oléique et ne recevant pas de traitement (7 animaux).
- Groupe 4 : sujets lésés à l'acide oléique et chez lesquels un traitement par terbutaline était débuté précocement, dans les 15 minutes suivant l'injection d'acide oléique (3 animaux).
- Groupe 5 : sujets lésés à l'acide oléique et chez lesquels le traitement par terbutaline était débuté tardivement, 90 minutes après le début de la lésion (6 animaux). Cette série d'expériences a été effectuée secondairement, après les expériences des 4 premiers groupes, en partie en raison des effets incertains de la terbutaline administrée précocement (*cf.* résultats et discussion).

La dernière partie de l'étude a consisté à transposer notre méthode de mesure sur un autre modèle lésionnel plus proche de la clinique : le modèle par lésion à l'endotoxine bactérienne. Nous avons également souhaité tester les effets thérapeutiques préventifs de l'association de rolipram et de salmeterol sur l'augmentation de perméabilité capillaro-alvéolaire aux protéines induite par l'endotoxine. Six animaux répartis en deux groupes ont été utilisés pour cette étude préliminaire.

- Groupe 6 : sujets lésés par l'endotoxine sans traitement (3 animaux)
- Groupe 7 : sujets lésés par l'endotoxine bénéficiant de l'association thérapeutique rolipram + salmeterol. (3 animaux).

II.4 Traitement des échantillons

L'activité de l'albumine marquée à l'iode¹²⁵ (marqueur de dilution du liquide de LBA) était mesurée à l'aide d'un compteur gamma (Novelec[®]) dans des échantillons de 1 ml de liquide de lavage. Pour les échantillons de LBA de la dernière série expérimentale (lésion à l'endotoxine, l'albumine-I¹²⁵ était remplacée par de l'albumine bovine dont la concentration était mesurée par une technique d'immunoprécipitation par anticorps spécifiques.

La concentration de FITC-dextran était mesurée dans le plasma et dans les échantillons de liquide de LBA par spectrométrie de fluorescence, à l'aide d'un spectrophotomètre (Perkin-Elmer[®] LS50, Norwalk, Connecticut, USA).

Les échantillons de liquide de LBA étaient mesurés purs (avant lésion) ou bien dilués au 1/10^{ème} (après lésion) pour rester dans la gamme de sensibilité du spectrophotomètre.

Les échantillons sanguins étaient centrifugés puis le plasma récupéré était dilué au 1/100^{ème}.

Les dilutions étaient effectuées par addition d'une solution tampon (pH = 7,38).

La fluorescence était mesurée dans des cuves en quartz après excitation lumineuse à une longueur d'onde de 495 nm et le recueil de la fluorescence émise se faisait à la longueur d'onde de 521 nm.

Pour chaque série d'échantillons, une droite d'étalonnage spécifique était calculée par addition d'un volume constant d'une solution standard à une concentration connue. Il a été vérifié que la relation entre la concentration de FITC-dextran et la fluorescence mesurée dans les échantillons était linéaire.

II.5 Acquisition des signaux

Les capteurs de pression étaient connectés à un moniteur Hewlett-Packard (type 78353B).

Les signaux recueillis à la sortie du moniteur étaient numérisés par l'intermédiaire d'une interface MacLab/8 et stockés sur un micro-ordinateur (Apple Macintosh IIsi).

II.6 Variables mesurées

Les variables suivantes ont été enregistrées toutes les trente minutes : pression artérielle systémique (PAS), pression artérielle pulmonaire (PAP), pression de l'artère pulmonaire après occlusion (Papo), débit cardiaque indexé au poids de l'animal (index cardiaque) mesuré en faisant la moyenne de 3 mesures par thermodilution d'un bolus d'eau froide de 3 ml (American Edwards[®], COM-1RS, Irvine, California).

La pression capillaire (Pcap) était mesurée par l'interprétation, selon un modèle bi-compartimental, de la courbe de diminution de pression de l'artère pulmonaire après gonflement du ballonnet de la sonde de Swan-Ganz (*cf. supra* paragraphe I.6.1 p.19). Seule la deuxième exponentielle, correspondant dans ce modèle à la vidange tardive du compartiment capillaire, était ajustée sur la portion de la courbe comprise entre 0,3 secondes et 2,3 secondes après l'occlusion du ballonnet, puis extrapolée au temps t_0 de l'occlusion pour calculer la Pcap (43, 84).

Cette mesure de pression capillaire permettait de décomposer le calcul des résistances et de mesurer la composante de chaque segment vasculaire :

$$\text{Résistances pulmonaires totales} = (\text{PAPm} - \text{Papo}) / \text{Index cardiaque}$$

$$\text{Résistance précapillaires (artériolaires)} = (\text{PAPm} - \text{Pcap}) / \text{Index cardiaque}$$

$$\text{Résistances post-capillaires (veineuses)} = (\text{Pcap} - \text{Papo}) / \text{Index cardiaque}$$

Une mesure de gazométrie artérielle (ABL500, Radiometer®) était effectuée toutes les heures après une période de 10 minutes de ventilation en oxygène pur.

II.7 Modèle mathématique

II.7.1 Modélisation des échanges liquidiens permettant de calculer le volume du segment pulmonaire lavé

Au début d'un cycle de lavage, un volume $V_{i,n}$ de liquide de lavage est instillé. Un volume $V_{r,n}$ est réaspiré au cours du même cycle, et un volume résiduel V_n , reste dans le poumon. Un volume net de liquide $V_{e,n}$ est échangé au cours de ce cycle avec les compartiments extra-alvéolaires. Un volume d'échantillon $V_{s,n}$ est prélevé. Un volume de liquide de lavage neuf $V_{a,n}$ est additionné pour compléter la seringue jusqu'au volume d'instillation optimal préalablement déterminé lors des tests d'étanchéité, volume d'instillation qui reste fixe pour chaque cycle de lavage d'une expérience donnée. Le numéro du cycle de lavage est désigné par n . Le volume de liquide résiduel V_n peut alors être exprimé par l'équation suivante :

$$V_n = V_{n-1} + V_{i,n} + V_{e,n} - V_{r,n}$$

avec

$$V_{i,n} = (V_{r,n-1} - V_{s,n}) + V_{a,n}$$

Nous avons fait l'hypothèse que la quantité de traceur alvéolaire (albumine-I¹²⁵) qui quittait le compartiment alvéolaire pendant les lavages successifs était négligeable. Dans ce cas, la

quantité résiduelle d'albumine-I¹²⁵ (exprimée en radioactivité mesurée : cpm), à la fin de chaque cycle de lavage, dans le territoire pulmonaire lavé, peut-être décrite par l'équation suivante :

$$\underbrace{V_n \cdot C_{r,n}}_{\text{quantité d'albumine restante à la fin du cycle } n} = \underbrace{(V_{n-1} \cdot C_{r,n-1})}_{\text{quantité d'albumine restante du cycle précédent (n-1)}} + \underbrace{(V_{i,n} \cdot C_{i,n})}_{\text{quantité d'albumine instillée au début du cycle } n} - \underbrace{(V_{r,n} \cdot C_{r,n})}_{\text{quantité d'albumine récupérée dans l'échantillon à la fin du cycle } n}$$

où $C_{r,n}$ (cpm / ml) est l'activité de l'albumine-I¹²⁵ dans le liquide de lavage réaspiré ; $C_{r,n-1}$ l'activité de l'albumine-I¹²⁵ dans le liquide de lavage réaspiré au cours du lavage précédent et $C_{i,n}$ l'activité de l'albumine-I¹²⁵ dans le liquide de lavage instillé.

La quantité d'albumine injectée au début du cycle n , $(V_{i,n} \cdot C_{i,n})$ prend notamment en compte la quantité d'albumine ajoutée par l'addition de liquide neuf permettant de retrouver le volume optimal fixe d'instillation.

Le volume total de liquide présent dans le territoire pulmonaire lavé en fin d'instillation, $V_{t,n}$, est défini par :

$$V_{t,n} = V_n + V_{r,n}$$

$V_{r,n}$ étant le volume de liquide réaspiré en fin de cycle et V_n étant le volume de liquide restant dans le poumon après cette réaspiration.

La connaissance de ce volume total $V_{t,n}$ était nécessaire pour s'assurer *a posteriori* que le volume du segment pulmonaire lavé était resté globalement stable ; ce qui ne pouvait être évalué que grossièrement au cours de l'expérience. Le $V_{t,n}$ était aussi nécessaire pour calculer le retentissement, sur la cinétique de passage trans-membranaire du traceur macromoléculaire plasmatique (FITC-dextran), des échantillons de liquide de LBA prélevés toutes les 15 minutes et remplacés par du liquide de lavage neuf. Cet échantillonnage régulier remplacé volume à volume par du liquide neuf constituait en effet un rinçage forcé du segment lavé, dont le taux était calculé grâce à la connaissance du $V_{t,n}$ (cf. infra).

II.7.2 Modélisation du transport transmembranaire du traceur plasmatique

L'analyse des données, relatives aux débits de FITC-dextran de part et d'autre de la barrière capillaro-alvéolaire, a été faite à l'aide d'un modèle bi-compartimental (*Fig. 13*).

Afin de simplifier le modèle, la concentration plasmatique de FITC-dextran, perfusé en continu, était supposée constante tout au long de l'expérience. Les débits de FITC-dextran entre le compartiment sanguin et le compartiment pulmonaire étaient représentés comme étant sous l'influence d'un coefficient d'entrée dans le poumon (K_{PS}) et d'un coefficient de sortie (K_{SP}) du poumon vers le sang.

Le volume des échantillons, prélevés à chaque cycle de lavage et remplacés par du liquide de lavage neuf, était volontairement élevé (3 à 5 ml) afin de tirer profit de cet échantillonnage pour effectuer un rinçage régulier du compartiment alvéolaire et rendre ainsi négligeable le retour du FITC-dextran de l'alvéole vers l'interstitium. Cette perte contrôlée de traceur était calculée pour chaque cycle de lavage sous la forme d'un coefficient de rinçage (K_{EP}) étant égal à :

$$K_{EP} = \frac{V_{EP}}{V_{t,n} \cdot T}$$

où V_{EP} est le volume de l'échantillon prélevé (remplacé par du liquide neuf), $V_{t,n}$ le volume total du compartiment pulmonaire à la fin de l'instillation de liquide (calculé comme détaillé précédemment), T étant la durée du cycle de LBA concerné.

Du fait de l'importance donnée à coefficient de rinçage dû à l'échantillonnage, nous avons fait l'hypothèse de négliger, dans le modèle mathématique, le coefficient de retour physiologique (K_{SP}) commandant théoriquement le flux de macromolécules du poumon vers le sang. En effet cette clearance physiologique des protéines a été estimée sur le poumon normal aux alentours de 1% par heure chez le chien, soit un rythme d'élimination plus de 50 fois plus faible que celui imposé par notre échantillonnage (K_{SP} moyen $\approx 1\% \cdot \text{min}^{-1}$).

L'équation de masse du système d'écrit donc de la façon suivante :

$$\frac{d[\text{FITC} - \text{Dextran}]_{\text{sang}}}{dt} = 0 \quad \leftarrow \text{Concentration plasmatique constante}$$

$$\frac{d[\text{FITC} - \text{Dextran}]_{\text{poumon}}}{dt} = K_{PS}(t)[\text{FITC} - \text{Dextran}]_{\text{sang}} - (K_{EP}(t) + \cancel{K_{SP}(t)})[\text{FITC} - \text{Dextran}]_{\text{poumon}}$$

↓
Coefficient de retour physiologique négligé

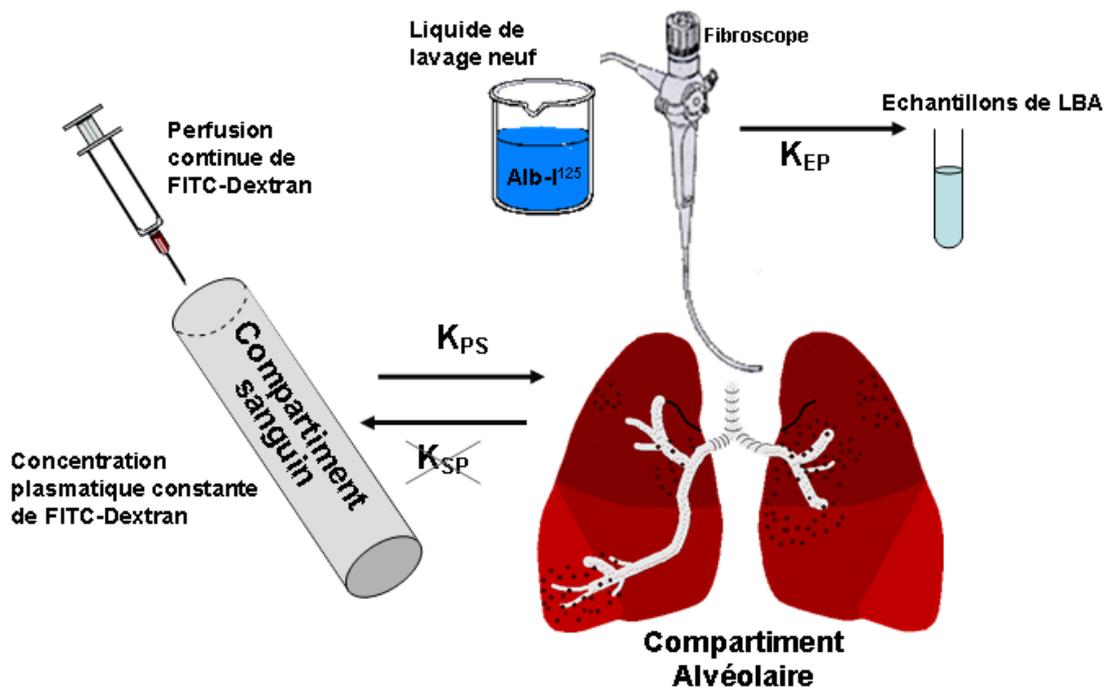


Figure 13 : Modèle compartimental des échanges de FITC-dextran de part et d'autre de la barrière capillaro-alvéolaire. La concentration de dextran est supposée constante dans le compartiment sanguin du fait de sa perfusion continue intra-veineuse. Les flux entrant et sortant de dextran dans l'alvéole pulmonaire sont sous la régulation d'un coefficient d'entrée K_{PS} et d'un coefficient de sortie K_{SP} . Ce coefficient de sortie K_{SP} est négligé mathématiquement devant le coefficient K_{EP} qui est dû au rinçage régulier du compartiment pulmonaire par les échantillons remplacés par du liquide de lavage neuf (K_{EP} environ 50 fois supérieur à K_{SP}). La seule inconnue du système est donc le coefficient d'entrée du dextran dans l'alvéole pulmonaire (K_{PS}) qui peut être déterminé à partir des données expérimentales puisque tous les autres paramètres sont connus.

Pour chaque cycle de LBA de rang i , on définit une période de temps notée $T_i = t_{i+1} - t_i$ où t_{i+1} (respectivement t_i) est le début du cycle $i+1$ (respectivement du cycle i). Nous supposons que K_{EP} et K_{PS} étaient constants sur l'intervalle de temps T_i considéré.

Pour simplifier la résolution du système d'équations différentielles (représenté par l'équation de masse ci-dessus), nous remplaçons dans les équations ci-dessous :

La concentration de dextran alvéolaire $[FITC-dextran]_{poumon}$ au temps t par la fonction $X(t)$

La concentration de dextran plasmatique $[FITC-dextran]_{sang}$ par la fonction $Y(t)$; laquelle est supposée constante pendant la durée de l'expérience.

La solution de l'équation différentielle (résolue par la transformée de Laplace) s'écrit :

$$X(t_{i+1}) = X(t_i) \cdot \exp(K_{EPi}(t_{i+1} - t_i)) + \frac{Y \cdot K_{PSi}}{K_{EPi}} (1 - \exp(K_{EPi}(t_{i+1} - t_i)))$$

Le coefficient de perméabilité (K_{PS}) qui détermine le passage de dextran du sang vers le poumon, peut donc être isolé et calculé pour chaque cycle de LBA (toutes les 15 min.) avec les données expérimentales. Il est exprimé sous la forme d'une constante de temps (min^{-1}).

$$K_{PSi} = \frac{K_{EPi}}{Y} \cdot \frac{X(t_{i+1}) - X(t_i) \exp(K_{EPi}(t_{i+1} - t_i))}{(1 - \exp(K_{EPi}(t_{i+1} - t_i)))}$$

II.8 Analyses statistiques

Les valeurs sont présentées regroupées sous forme de moyenne \pm écart-type de la moyenne (erreur standard : S.E.). Les données de chaque variable étudiée ont d'abord été comparées sur toute la durée de l'expérience avec une analyse de variance (ANOVA). Ensuite, les comparaisons intra-groupes ont été réalisées en utilisant des tests *t*-paireés. Nous avons utilisé un test non paramétrique (test U de Mann-Whitney) pour comparer les données entre les différents groupes. Pour les régressions linéaires, la pente et le coefficient de détermination R^2 au sein d'un même groupe étaient testés par ANOVA. Les comparaisons entre plusieurs droites de régressions (test de parallélisme des pentes) étaient effectuées par une analyse de co-variance (ANCOVA). Les différences étaient considérées comme statistiquement significatives quand le risque d'erreur lié au rejet de l'hypothèse nulle (risque de première espèce α) était inférieur à 5% ($p < 0,05$).

III – RÉSULTATS

III.1 Résultats de l'étude sur le modèle de lésion par l'acide oléique et les essais thérapeutiques par terbutaline

III.1.1 Stabilité de la concentration de FITC-dextran plasmatique

La concentration de FITC-dextran plasmatique a pu être maintenue à peu près constante ($1.53 \cdot 10^{-1} \pm 0.03 \cdot 10^{-1} \text{ mg.ml}^{-1}$) tout au long de l'expérience (262 ± 1 minutes) et ce y compris chez les animaux lésés chez lesquels une perméabilité capillaire accrue dans tout l'organisme entraîne souvent à une hémococentration. Les concentrations plasmatiques de FITC-dextran n'étaient pas différentes entre les différents groupes d'animaux (*Fig. 14*).

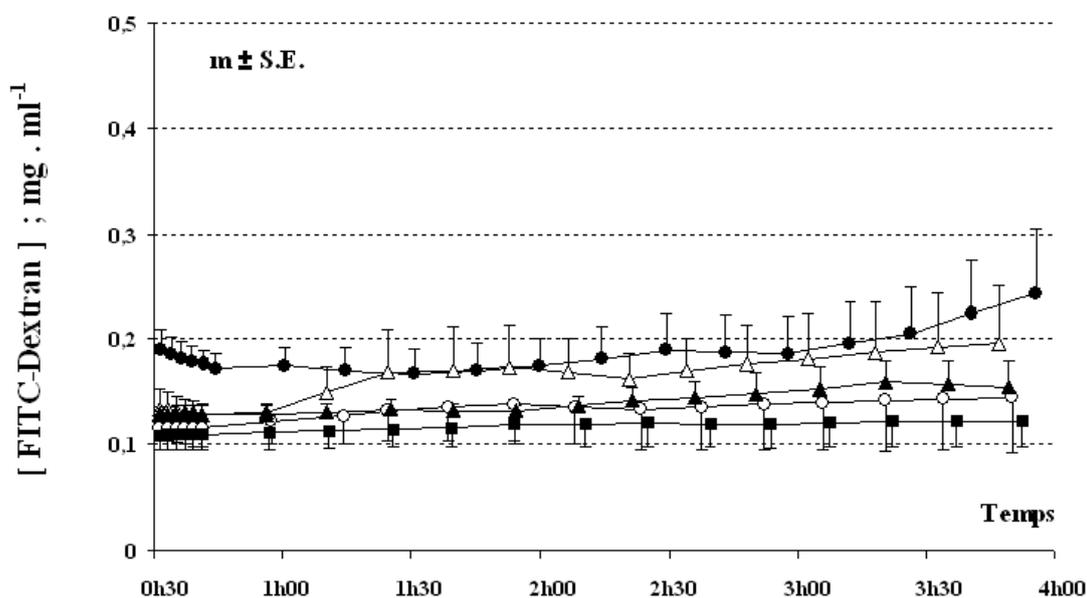


Figure 14 : Concentrations plasmatiques de FITC-dextran (en $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) dans les différents groupes d'animaux. ○ groupe 1, animaux témoins sans lésion ni traitement ; △ groupe 2, animaux témoins sans lésion mais avec perfusion de terbutaline ; ● groupe 3, animaux lésés à l'acide oléique sans traitement associé ; ▲ groupe 4, animaux lésés à l'acide oléique avec administration précoce de terbutaline ; ■ groupe 5, animaux lésés à l'acide oléique avec administration tardive de terbutaline. *N.S.*

III.1.2 Evolution du volume du segment pulmonaire lavé ($V_{t,n}$)

Dans les groupes 1 à 4 le volume du segment pulmonaire lavé ($V_{t,n}$) est resté, comme souhaité, globalement stable ($51,1 \pm 1,0$ ml) au cours des cycles de lavage successifs (Fig. 15).

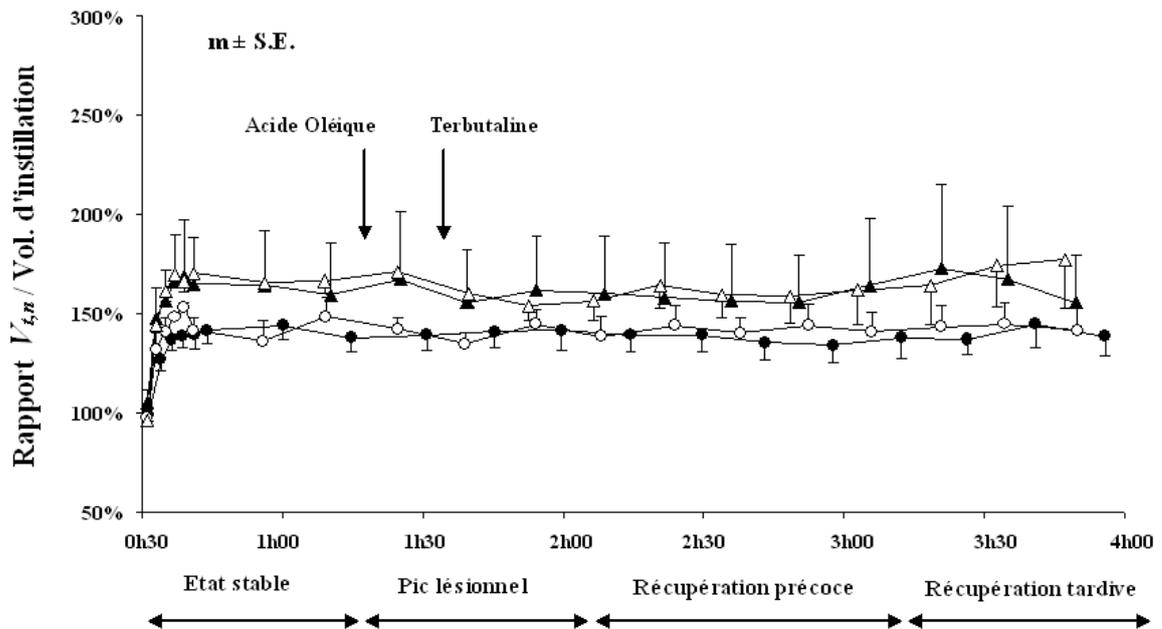


Figure 15 : Evolution du volume du compartiment pulmonaire lavé ($V_{t,n}$) exprimé en proportion du volume d'instillation optimal déterminé en début d'expérience.

○ groupe 1, animaux témoins sans lésion ni traitement ; △ groupe 2, animaux témoins sans lésion mais avec perfusion de terbutaline ; ● groupe 3, animaux lésés à l'acide oléique sans traitement associé ; ▲ groupe 4, animaux lésés à l'acide oléique avec administration précoce de terbutaline. *N.S.*

Dans le groupe 5 (lésion + terbutaline tardive) le $V_{t,n}$ ré-augmente progressivement en fin d'expérience malgré le protocole de LBA qui impliquait un retrait maximal de liquide de lavage à la fin de chaque cycle (Fig. 16). Cette augmentation de $V_{t,n}$ est due à une formation accrue d'œdème en lien avec une aggravation de la lésion sous terbutaline tardive (voir *infra*). Cette formation accrue d'œdème a pu déborder au moins partiellement l'étape de retrait de liquide.

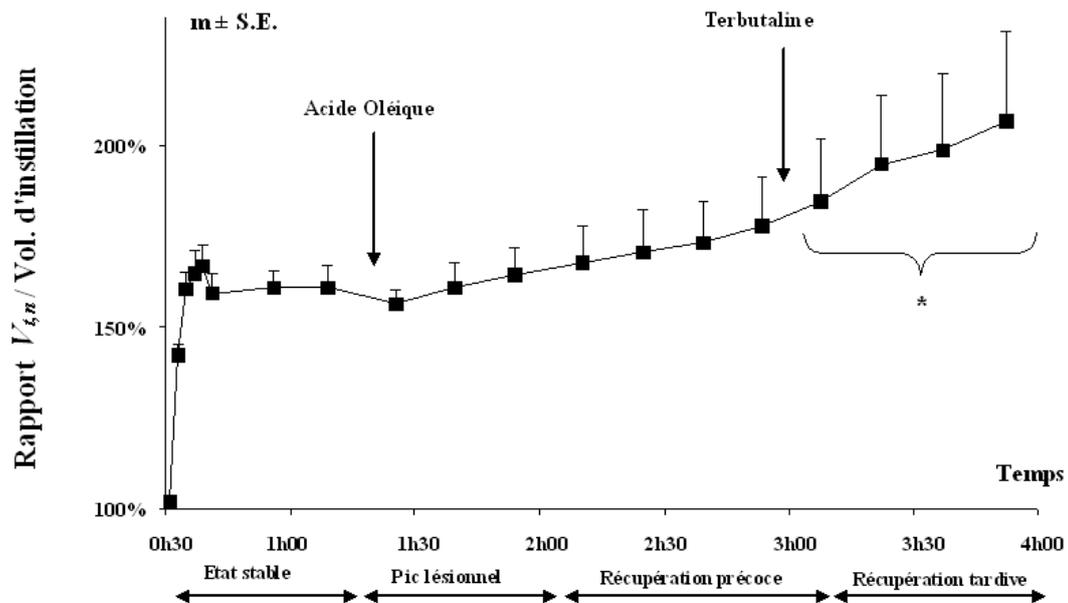


Figure 16 : Evolution du volume du compartiment pulmonaire lavé ($V_{t,n}$) exprimé en proportion du volume d'insufflation optimal (déterminé en début d'expérience) dans le groupe 5 (animaux lésés à l'acide oléique avec administration tardive de terbutaline). * $p < 0.05$; phase de récupération tardive vs. phase de récupération précoce. Données intragroupe comparées par test- t pairé.

III.1.3 Entrée de FITC-dextran dans le compartiment alvéolaire lavé

La concentration alvéolaire de FITC-dextran est proche de zéro dans tous les groupes à l'état normal avant l'injection d'acide oléique. Dans les deux groupes témoins (*i.e.* groupe 1 sans lésion ni traitement, et groupe 2 sans lésion mais avec un traitement par terbutaline précoce), la concentration alvéolaire de FITC-dextran reste proche de zéro pendant toute la durée de l'expérience. Chez les animaux lésés à l'acide oléique (groupes 3, 4 et 5), la concentration de FITC-dextran augmente brutalement après l'injection d'acide oléique et continue de s'accroître durant les 45 premières minutes. Nous décrivons cette période comme étant le pic lésionnel. Dans les groupes 1 et 2 cette augmentation de la concentration de FITC-dextran de le liquide de LBA ralentit durant les 2 dernières heures de l'expérience (*Fig. 17 ; Tableau 1*). Deux périodes distinctes peuvent être définies au sein de ces 2 dernières heures : la période de récupération précoce (les premières 60 minutes après le pic lésionnel) et la période de récupération tardive (les dernières 60 minutes de l'expérience).

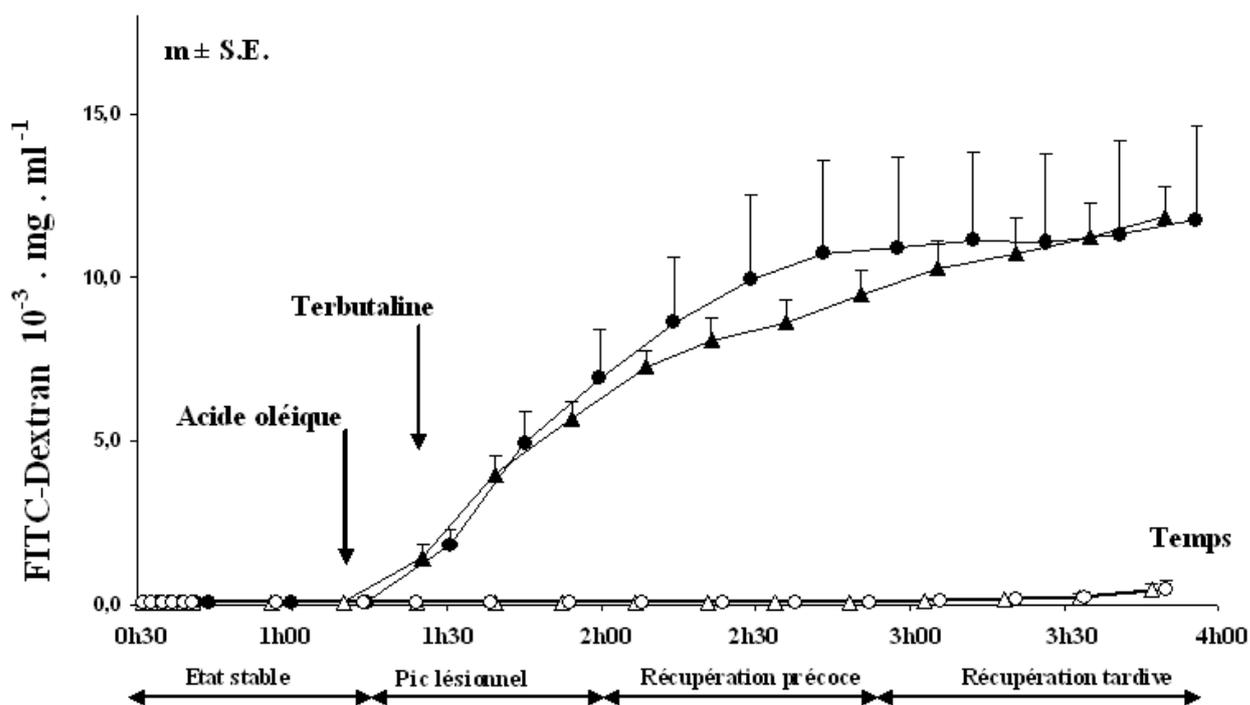


Figure 17 : Evolution de la concentration de FITC-dextran dans l'alvéole pulmonaire ($10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).
○ groupe 1, animaux témoins sans lésion ni traitement ; △ groupe 2, animaux témoins sans lésion mais avec perfusion de terbutaline ; ● groupe 3, animaux lésés à l'acide oléique sans traitement associé ; ▲ groupe 4, animaux lésés à l'acide oléique avec administration précoce de terbutaline.

Tableau 1: Concentrations de FITC-Dextran dans le liquide de LBA au différentes phases de l'expérience

FITC-Dextran (10^{-3} mg.ml ⁻¹) Moy. ± S.E.	Etat stable	Pic de lésion	Récupération précoce	Récupération tardive
	30 – 75 min	75 – 120 min	120 – 180 min	180 – 240 min
Groupe 1 (n=3) Témoins	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,49 ± 0,14
Groupe 2 (n=3) Témoins + terbutaline	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,56 ± 0,14
Groupe 3 (n=7) AO sans terbutaline	0,05 ± 0,01	4,56 ± 0,75	10,10 ± 1,25	11,95 ± 1,12 *
Groupe 4 (n=3) AO + terbutaline précoce	0,05 ± 0,01	3,68 ± 0,66	8,36 ± 0,38	11,94 ± 0,47 **

AO : Acide oléique

* $p < 0,001$ Témoins (groupe 1) vs. acide oléique (groupe 3). ** $p < 0,001$ Témoins avec terbutaline (groupe 2) vs. acide oléique avec terbutaline précoce (groupe 4). Données entre groupes comparées par test U de Mann-Whitney.

Dans le groupe 5 (lésion à l'acide oléique avec perfusion tardive de terbutaline) le ralentissement dans l'accroissement de concentration alvéolaire de FITC-dextran après le pic (phase de récupération précoce) est suivi d'un nouvel afflux de FITC-dextran dans le liquide de LBA après l'introduction de la terbutaline (Fig 18).

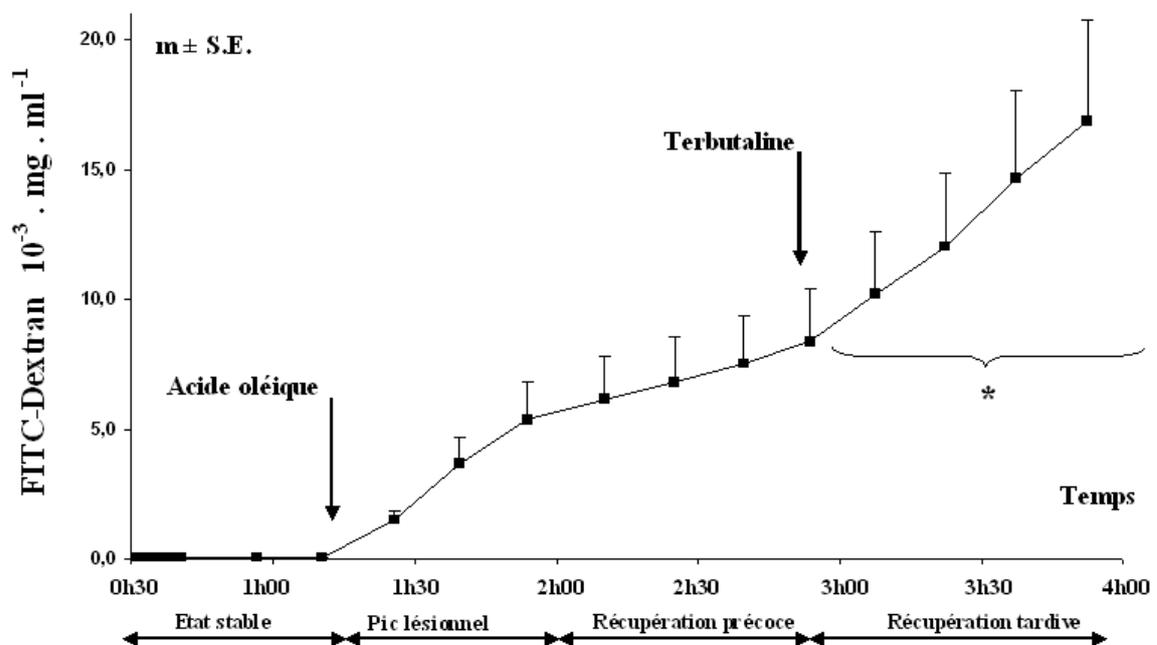


Figure 18 : Evolution de la concentration de FITC-dextran dans l'alvéole pulmonaire (10^{-3} mg . ml⁻¹) au sein du groupe 5 animaux lésés à l'acide oléique avec administration tardive de terbutaline. * $p < 0,05$ phase de récupération tardive vs. phase de récupération précoce. Données intragroupe comparées par test t paillé.

III.1.4 Détermination du coefficient K_{PS} de perméabilité aux macromolécules

Le volume moyen des échantillons de LBA prélevés à la fin de chaque cycle de LBA était de $4,5 \pm 0,04$ ml. Le coefficient K_{EP} de rinçage du compartiment pulmonaire lavé du fait de cet échantillonnage était en moyenne de $2,0 \cdot 10^{-2} \pm 0,2 \cdot 10^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$.

Le coefficient K_{PS} de perméabilité capillaro-alvéolaire, ou encore index de transport du sang vers l'alvéole, était proche de zéro dans tous les groupes avant la lésion à l'acide oléique. Il reste proche de zéro dans les 2 groupes témoins (1 et 2). Chez les animaux lésés à l'acide oléique (groupes 3, 4 et 5) ce coefficient K_{PS} augmente brutalement après l'injection d'acide oléique. K_{PS} atteint un pic environ trente minutes après le début de la lésion puis décroît doucement selon une courbe mono-exponentielle. Les animaux traités précocement par la terbutaline (groupe 4) ne montrent pas de modification significative de leur K_{PS} (ni dans la hauteur du pic, ni dans la cinétique de la récupération) comparés au groupe lésion (groupe 3) (Fig. 19 ; Tableau 2).

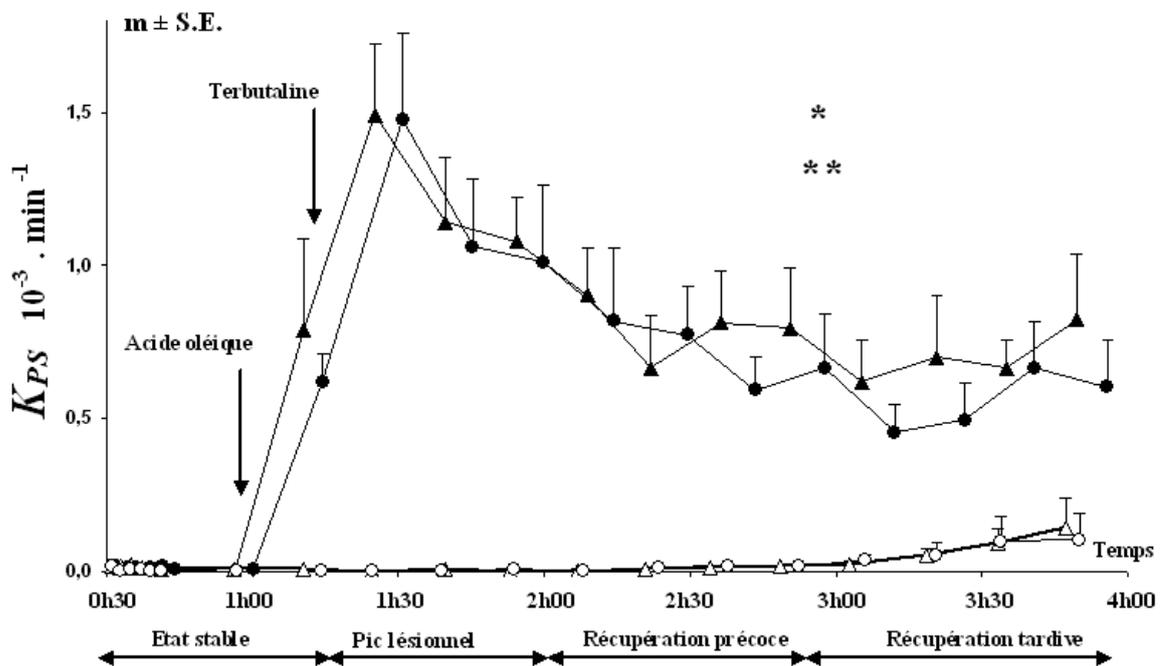


Figure 19 : Evolution du coefficient de perméabilité au FITC-dextran (K_{PS}) ; ○ groupe 1, animaux témoins sans lésion ni traitement ; △ groupe 2, animaux témoins sans lésion mais avec perfusion de terbutaline ; ● groupe 3, animaux lésés à l'acide oléique sans traitement associé ; ▲ groupe 4, animaux lésés à l'acide oléique avec administration précoce de terbutaline.

* $p < 0,001$ témoins (groupe 1) vs. acide oléique (groupe 3), ** $p < 0,001$ témoins terbutaline (groupe 2) vs. acide oléique avec traitement terbutaline précoce (groupe 4).(ANOVA)

Tableau 2: Coefficient K_{PS} de perméabilité au FITC-dextran aux différentes phases de l'expérience

K_{PS} ($10^{-3} \cdot \text{min}^{-1}$) Moy. \pm S.E.	Etat stable 30 – 75 min	Pic de lésion 75 – 120 min	Récupération précoce 120 – 180 min	Récupération tardive 180 – 240 min
Groupe 1 (n=3) Témoins	0,008 \pm 0,003	0,002 \pm 0,001 *	0,008 \pm 0,003	0,052 \pm 0,021
Groupe 2 (n=3) Témoins + terbutaline	0,005 \pm 0,002	0,002 \pm 0,001 **	0,003 \pm 0,001	0,041 \pm 0,015
Groupe 3 (n=7) AO sans terbutaline	0,011 \pm 0,001	1,075 \pm 0,160	0,818 \pm 0,116	0,605 \pm 0,080
Groupe 4 (n=3) AO + terbutaline précoce	0,014 \pm 0,003	1,175 \pm 0,165	0,872 \pm 0,085	0,710 \pm 0,079
Groupe 5 (n=6) AO + terbutaline tardive	0,022 \pm 0,007	1,096 \pm 0,166	0,666 \pm 0,080	1,703 \pm 0,269 ‡

K_{PS} coefficient de transport capillaro-alvéolaire du FITC-dextran du sang vers l'alvéole ; AO : acide oléique
* $p < 0,05$ Témoins (groupe 1) vs. acide oléique (groupe 3). ** $p < 0,05$ Témoins avec terbutaline (groupe 2) vs. acide oléique avec terbutaline précoce (groupe 4). Données entre groupes comparées par test U de Mann-Whitney.

‡ $p < 0,05$; phase de récupération tardive vs. phase de récupération précoce dans le groupe 5 (AO + terbutaline tardive) Données intra-groupe comparées par test t païré.

A noter un ralentissement partiel (non statistiquement significatif) de la récupération précoce et tardive sous terbutaline précoce (groupe 4) vs. acide oléique seul (groupe 3).

Dans le groupe 5 (acide oléique + terbutaline tardive) le coefficient de perméabilité K_{PS} augmente à nouveau après la mise en route de la perfusion de terbutaline, témoignant d'un rebond de transport de FITC-dextran et donc d'une aggravation de la lésion à la phase de récupération tardive (Fig. 20)

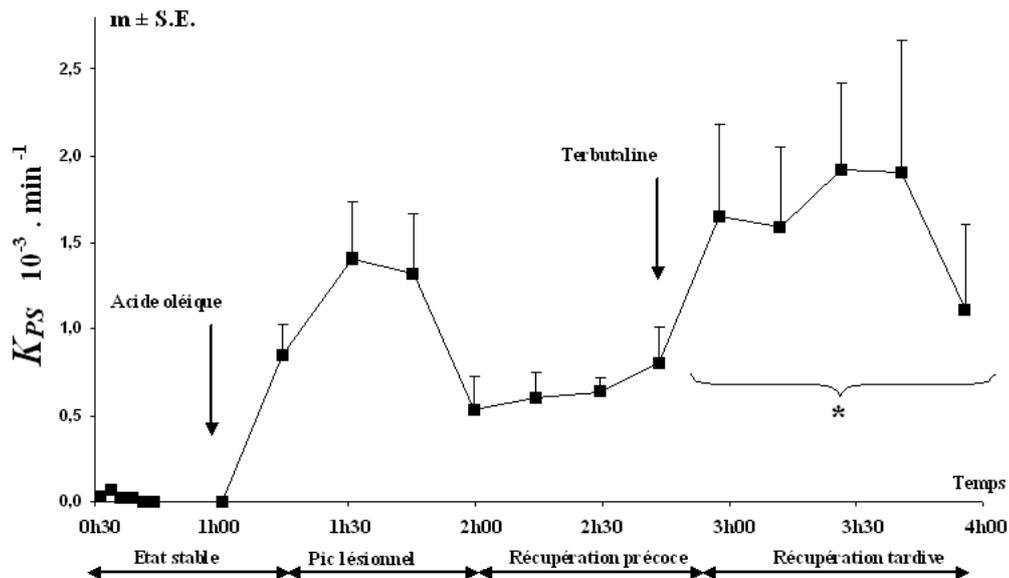


Figure 20 : Evolution du coefficient de perméabilité au FITC-dextran (K_{PS}) au sein du groupe 5 (animaux lésés à l'acide oléique avec administration tardive de terbutaline). * $p < 0,05$ phase de récupération tardive vs. phase de récupération précoce. Données intragroupe comparées par test t païré.

III.1.5 Evolution des paramètres hémodynamiques

Les paramètres hémodynamiques, autres que la fréquence cardiaque, mesurés par méthodes invasives (cathétérisme fémoral), n'étaient relevés que lors des expériences terminales (injection de l'acide oléique) où l'animal était euthanasié en fin d'expérience.

Dans le groupe des animaux lésés sans traitement (groupe 3) le débit cardiaque diminue brutalement juste après l'injection d'acide oléique et reste ensuite stable légèrement en dessous des valeurs normales, malgré une légère récupération en fin d'expérience. Dans le groupe 4 (lésion plus terbutaline précoce) la perfusion de terbutaline entraîne une augmentation de près de 30% du débit cardiaque (Fig. 21).

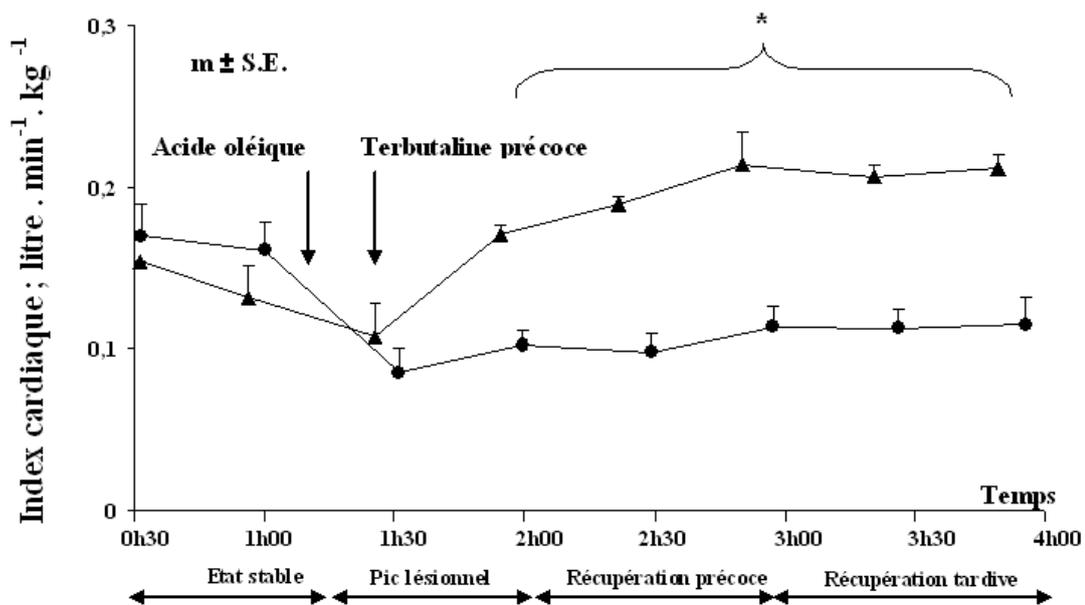


Figure 21 : Débit cardiaque chez les animaux lésés par l'acide oléique (groupe 3) et chez les animaux lésés et traités par terbutaline précoce (groupe 4), * $p < 0,05$ comparaisons des phases de récupération totales (précoce et tardive) entre les 2 groupes par ANOVA.

Dans le groupe 5 (lésion avec traitement par terbutaline tardive) une augmentation du débit cardiaque a également été observée pendant la perfusion de terbutaline ($0,25 \pm 0,02$ lit . min⁻¹ . kg⁻¹ pendant la phase de récupération tardive vs. $0,16 \pm 0,01$ lit . min⁻¹ . kg⁻¹ avant la perfusion de terbutaline durant la phase de récupération précoce ; $p < 0,01$). Au sein de ce même groupe 5, la pression capillaire augmentait significativement au cours de l'expérience avec des valeurs à la phase de récupération tardive ($19,2 \pm 1,9$ mmHg)

significativement supérieures aux valeurs à l'état stable ($13,2 \pm 1,6$ mmHg) ($p > 0,05$). L'aggravation de la perméabilité capillaro-alvéolaire observée dans le groupe 5 (terbutaline tardive) était corrélée aux variations des divers paramètres hémodynamiques (débit cardiaque, PAPm, Pcap (Fig. 22)

Cette tendance à l'augmentation de pression capillaire au cours de la lésion est perceptible mais statistiquement non significative dans les autres groupes d'animaux lésés à l'acide oléique (groupe 3 et groupe 4).

L'ensemble des modifications hémodynamiques sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Valeurs hémodynamiques

<i>Moy. ± S.E.</i>	Etat stable 30 – 75 min	Pic de lésion 75 – 120 min	Récupération précoce 120 – 180 min	Récupération tardive 180 – 240 min
Index cardiaque (lit.min ⁻¹)				
<i>Groupe 3</i>	0,17 ± 0,01 *	0,09 ± 0,01 §	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,01
<i>Groupe 4</i>	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,20 ± 0,01 * §	0,22 ± 0,01 * §
<i>Groupe 5</i>	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,29 ± 0,03 * §
P.A.S.m (mmHg)				
<i>Groupe 3</i>	95,4 ± 4,3	75,3 ± 9,0 §	86,7 ± 5,8	105,1 ± 3,3 *
<i>Groupe 4</i>	91,3 ± 8,1	75,8 ± 9,5 §	82,2 ± 9,0	83,2 ± 6,7
<i>Groupe 5</i>	93,0 ± 8,1	82,5 ± 4,6	101,2 ± 8,2	93,4 ± 4,3
P.A.P.m (mmHg)				
<i>Groupe 3</i>	17,1 ± 1,2	13,2 ± 1,3	14,6 ± 1,0	19,7 ± 2,1
<i>Groupe 4</i>	12,8 ± 0,8	16,7 ± 1,5	17,3 ± 0,9	21,7 ± 0,5 §
<i>Groupe 5</i>	17,9 ± 1,9	18,4 ± 1,4	21,4 ± 1,4	25,8 ± 1,2 §
P. cap (mmHg)				
<i>Groupe 3</i>	12,5 ± 1,1	10,6 ± 1,8	11,5 ± 2,4	13,9 ± 1,7
<i>Groupe 4</i>	9,9 ± 0,6	14,3 ± 0,7	11,8 ± 0,7	12,4 ± 0,5
<i>Groupe 5</i>	13,3 ± 1,6	14,0 ± 1,6	16,3 ± 1,3	19,2 ± 1,9 §

P.A.S.m, pression artérielle systémique moyenne ; P.A.P.m, pression artérielle pulmonaire moyenne ; P.cap, pression capillaire ; Groupe 3 : Lésion à l'acide oléique (AO) sans terbutaline (n=7) ; Groupe 4 : AO + terbutaline précoce (n=3) Groupe 5 : AO + terbutaline tardive

* *versus* pic, $p < 0,05$; § *versus* état stable, $p < 0,05$. Données intra-groupe comparées par test *t* pairé.

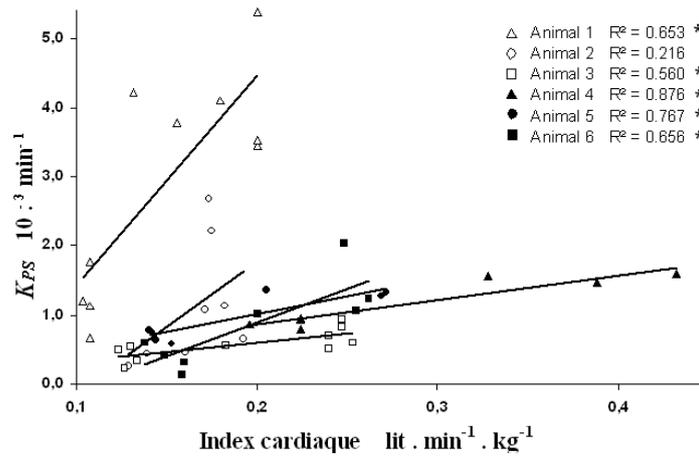
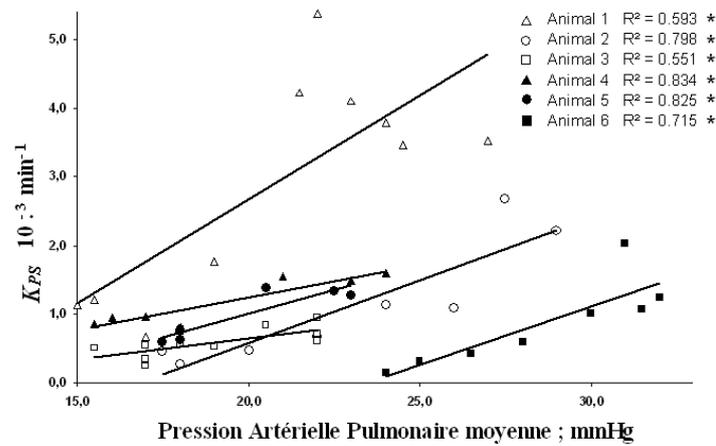
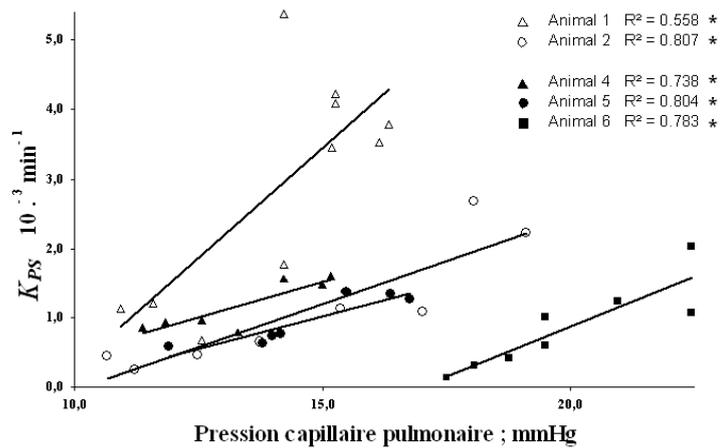
A**B****C**

Figure 22 : Le coefficient K_{PS} de transport du FITC-Dextran est corrélé dans le groupe 5 (lésion à l'acide oléique avec perfusion tardive de terbutaline) **A**) avec le débit cardiaque, **B**) avec la pression artérielle pulmonaire (PAPm), **C**) avec la pression capillaire (Pcap). La Pcap n'était pas mesurable chez le sujet 3 (ballonnet du cathéter artériel pulmonaire hors d'usage)

* $p < 0,05$; coefficient de détermination R^2 testé par ANOVA

Les résistances vasculaires pulmonaires totales étaient augmentées par l'injection d'acide oléique. Dans le groupe 3 (acide oléique seul) les résistances pulmonaires totales passent de $67,0 \pm 5,2$ mmHg . lit.⁻¹ . min⁻¹ . kg⁻¹ à l'état stable, à $93,2 \pm 11,3$ mmHg . lit.⁻¹ . min⁻¹ . kg⁻¹ en fin d'expérience ($p < 0,05$). La perfusion de terbutaline limite cette augmentation de résistance et les résistances pulmonaires totales des animaux sous terbutaline sont significativement plus basses que celles des animaux non traités. Dans le groupe 4 (terbutaline précoce) les résistances pulmonaires totales sont en moyenne de $56,6 \pm 0,9$ mmHg . lit.⁻¹ . min⁻¹ . kg⁻¹ pendant la période de perfusion de la terbutaline (phase de récupération précoce et tardive) pour une valeur dans le groupe 3 (lésion seule) de $99,5 \pm 10,9$ mmHg . lit.⁻¹ . min⁻¹ . kg⁻¹ pendant la même période ($p < 0,05$). Dans le groupe 5 (terbutaline tardive) les résistances pulmonaires totales sont en moyenne de $55,3 \pm 10,6$ mmHg . lit.⁻¹ . min⁻¹ . kg⁻¹ pendant la période de perfusion de la terbutaline (phase de récupération tardive) pour une valeur dans le groupe 3 de $93,16 \pm 11,35$ mmHg . lit.⁻¹ . min⁻¹ . kg⁻¹ pendant la même période ($p < 0,05$).

Cette diminution des résistances, accompagnée d'une augmentation du débit cardiaque et, dans une moindre mesure, d'une augmentation de la pression capillaire, témoignait d'un probable recrutement capillaire sous terbutaline. Par ailleurs pendant la perfusion de terbutaline, la participation relative des résistances précapillaires augmentait. En effet le rapport des résistances post capillaires sur les résistances totales diminuait significativement pendant la période de perfusion de la terbutaline. Dans le groupe 4 (terbutaline précoce) les résistances veineuses ne représentaient plus que $45,1 \pm 0,1$ % des résistances pulmonaires totales pendant la perfusion de terbutaline, contre $52,5 \pm 0,1$ % dans le groupe 3 (lésion seule) pendant la même période ($p < 0,05$). Dans le groupe 5, après la perfusion de terbutaline tardive, les résistances veineuses ne représentaient plus que $43,7 \pm 0,1$ % des résistances pulmonaires totales, contre $51,5 \pm 0,1$ % dans le groupe 3 pendant la même période ($p < 0,05$).

III.1.6 Evolution des paramètres biologiques

L'hématocrite mesuré toute les 30 minutes est resté globalement constant sur toute la durée de l'expérience (valeur moyenne $0,36 \pm 0,1$), et aucune différence significative n'a été notée entre les différents groupes.

La gazométrie artérielle montrait une altération du rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ après l'injection d'acide oléique (*Tableau 4*).

Tableau 4 : Rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ chez les sujets lésés à l'acide oléique

$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (Kpa) Moy. \pm S.E.	Etat stable 30 – 75 min	Pic de lésion 75 – 120 min	Récupération précoce 120 – 180 min	Récupération tardive 180 – 240 min
Groupe 3 (n=7) AO sans terbutaline	$38,8 \pm 0,7$	$14,5 \pm 4,4$ *	$10,4 \pm 2,7$ *	$10,7 \pm 3,8$ *
Groupe 4 (n=3) AO + terbutaline précoce	$23,7 \pm 3,5$	$14,0 \pm 1,1$ *	$11,5 \pm 0,3$ *	$11,1 \pm 0,7$ *
Groupe 5 (n=6) AO + terbutaline tardive	$25,9 \pm 2,0$	$16,6 \pm 2,7$ *	$17,4 \pm 3,3$ *	$18,1 \pm 3,0$ *

$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$: Pression partielle en oxygène mesurée dans le sang artériel après une ventilation de 10 minutes en oxygène pur d'où une fraction inspirée d' O_2 (FiO_2) = 100% ; Groupe **3** : Lésion à l'acide oléique (AO) sans terbutaline (n=7) ; Groupe **4** : AO + terbutaline précoce (n=3) Groupe **5** : AO + terbutaline tardive
* $p < 0,05$ vs. état stable ; données comparées par test t pairé.

III.2 Résultats partiels et préliminaires de l'étude sur le modèle lésionnel à l'endotoxine et les essais thérapeutiques par rolipram et salmeterol

Les résultats présentés ne sont que des résultats partiels pour cette étude encore en cours. Cette petite série préliminaire ne comportait que 6 animaux répartis en 2 groupes : lésion à l'endotoxine sans traitement ($n = 3$) ou bien avec traitement par l'association rolipram – salmeterol ($n=3$). La présentation de ces premiers résultats a pour objectif d'illustrer l'application de notre méthode à d'autres modèles lésionnels et à l'évaluation de diverses thérapeutiques.

Ces résultats ont pour but de souligner le polymorphisme des modèles lésionnels censés mimer un SDRA et le retentissement très différent, d'un modèle à l'autre, des variations hémodynamiques sur la perméabilité capillaro-alvéolaire.

Le volume du compartiment pulmonaire lavé ($V_{t,n}$) a pu être, comme dans l'étude avec l'acide oléique, maintenu stable tout au long de l'expérience, sans différence significative entre les 2 groupes ($V_{t,n}$ moyen : $71,9 \pm 5,4$ ml).

La concentration sanguine de FITC-dextran est restée stable tout au long de l'expérience, sans différence significative entre les 2 groupes (valeur moyenne : $0,18 \pm 0,01$ mg . ml⁻¹).

III.2.1 Entrée de FITC-dextran dans le compartiment alvéolaire lavé

Comme dans le modèle précédent, on n'observe quasiment aucun passage de FITC-dextran du sang vers l'alvéole à l'état stable. L'administration d'endotoxine entraîne une augmentation de concentration alvéolaire de FITC-dextran. Cette afflux de FITC-dextran n'apparaît qu'une heure après l'initiation de la lésion (*Fig. 23*). La concentration mesurée en fin d'expérience dans le groupe des animaux traités par l'association médicamenteuse rolipram + salmeterol est beaucoup moins élevée ($0,47 \cdot 10^{-3} \pm 0,10 \cdot 10^{-3}$ mg . ml⁻¹) que celle mesurée chez les animaux non traités par l'association médicamenteuse ($1,00 \cdot 10^{-3} \pm 0,17 \cdot 10^{-3}$ mg . ml⁻¹) ($p < 0,01$).

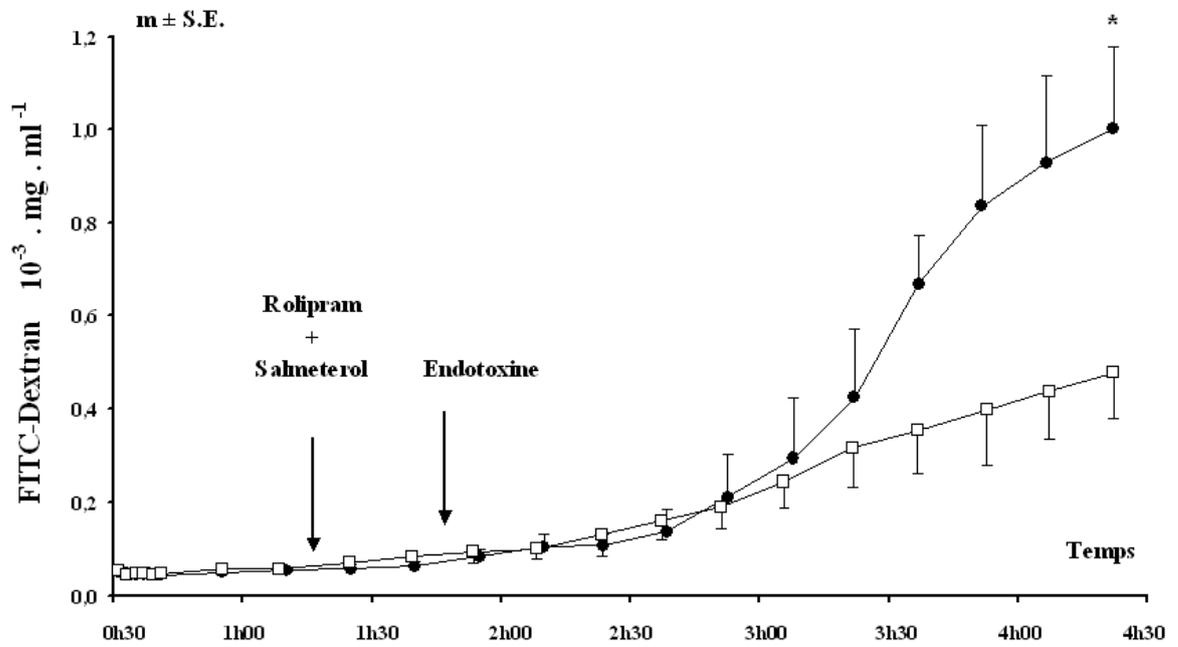


Figure 23 : Evolution de la concentration de FITC-dextran dans l'alvéole pulmonaire ($10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) chez les animaux lésés à l'endotoxine. ● : Groupe 6, sujets lésés par l'endotoxine sans traitement associé ($n=3$) ; □ : Groupe 7, sujets lésés par l'endotoxine avec pré-traitement par l'association rolipram-salmeterol ($n=3$).
* $p < 0,01$; données entre groupes comparées par ANOVA.

III.2.2 Détermination du coefficient K_{PS} de perméabilité au FITC-dextran

Le coefficient K_{PS} de transport capillaro-alvéolaire au FITC-dextran augmente une heure après l'injection d'endotoxine. On observe un pic de perméabilité environ 2 heures après l'initiation de la lésion, puis le K_{PS} amorce une décroissance durant les 45 dernières minutes de l'expérience. Le pic de perméabilité mesuré est d'une hauteur environ 10 fois plus faible que celle mesurée au cours de la lésion à l'acide oléique.

Le prétraitement avec l'association médicamenteuse rolipram - salmeterol prévient la survenue de ce pic de perméabilité, bien que le K_{PS} augmente légèrement après l'injection d'acide oléique (Fig. 24)

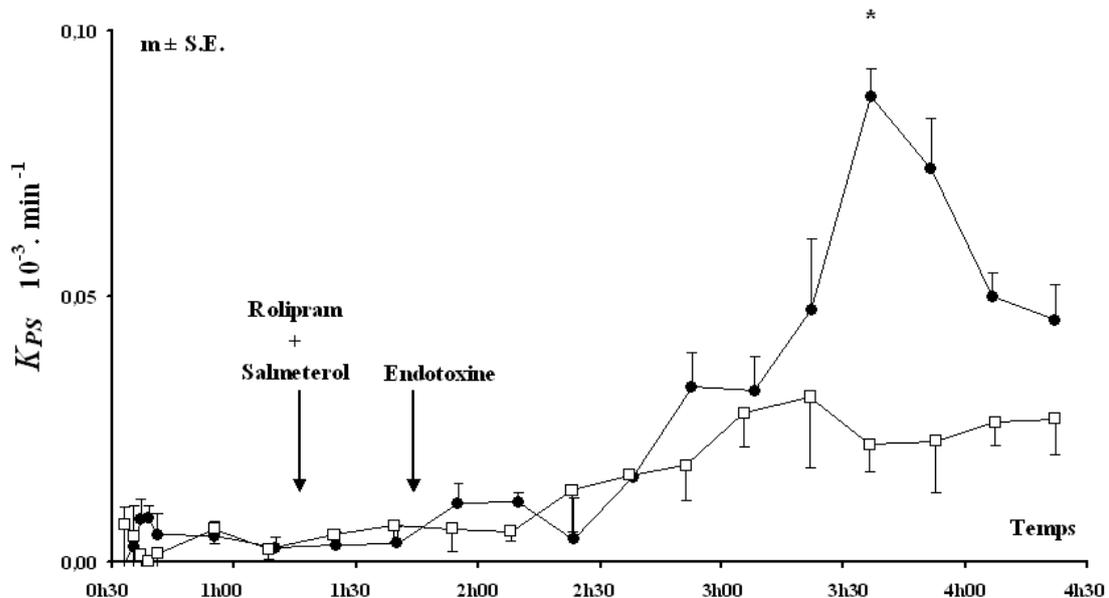


Figure 24 : Evolution du coefficient K_{PS} de transport de FITC-dextran du sang vers l'alvéole pulmonaire chez les animaux lésés à l'endotoxine. ● : Groupe 6, sujets lésés par l'endotoxine sans traitement associé (n=3) ; □ : Groupe 7, sujets lésés par l'endotoxine avec pré-traitement par l'association rolipram-salmeterol (n=3). * $p < 0,01$; données entre groupes comparées par ANOVA.

III.2.3 Evolution des paramètres hémodynamiques

Les résultats présentés ne sont, là encore, que partiels. La pression capillaire n'ayant été, dans cette série, qu'évaluée à partir de l'équation de Gaar (66) :

$$P_{cap} = P_{apo} + 0,4 \cdot (PAPm - P_{apo})$$

Ces résultats montrent que nous n'avons pas réussi, malgré la forte diminution des posologies de béta-2 agoniste, à limiter les effets hémodynamiques du traitement par l'association rolipram-salmeterol. Le débit cardiaque, la pression artérielle pulmonaire moyenne et la pression capillaire ont augmenté de manière sensible dès la mise en route du traitement (*Fig. 25*). Les résistances vasculaires pulmonaire totales étaient également significativement abaissées durant la perfusion de l'association rolipram - salmeterol ($40,5 \pm 7,2 \text{ mmHg} \cdot \text{lit}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) comparativement aux animaux lésés à l'endotoxine non traités ($58,1 \pm 9,9 \text{ mmHg} \cdot \text{lit}^{-1} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$). Cette observation liée à celle de l'augmentation de débit cardiaque et de la pression capillaire, est en faveur d'un recrutement capillaire lors de la perfusion de l'association médicamenteuse rolipram - salmeterol.

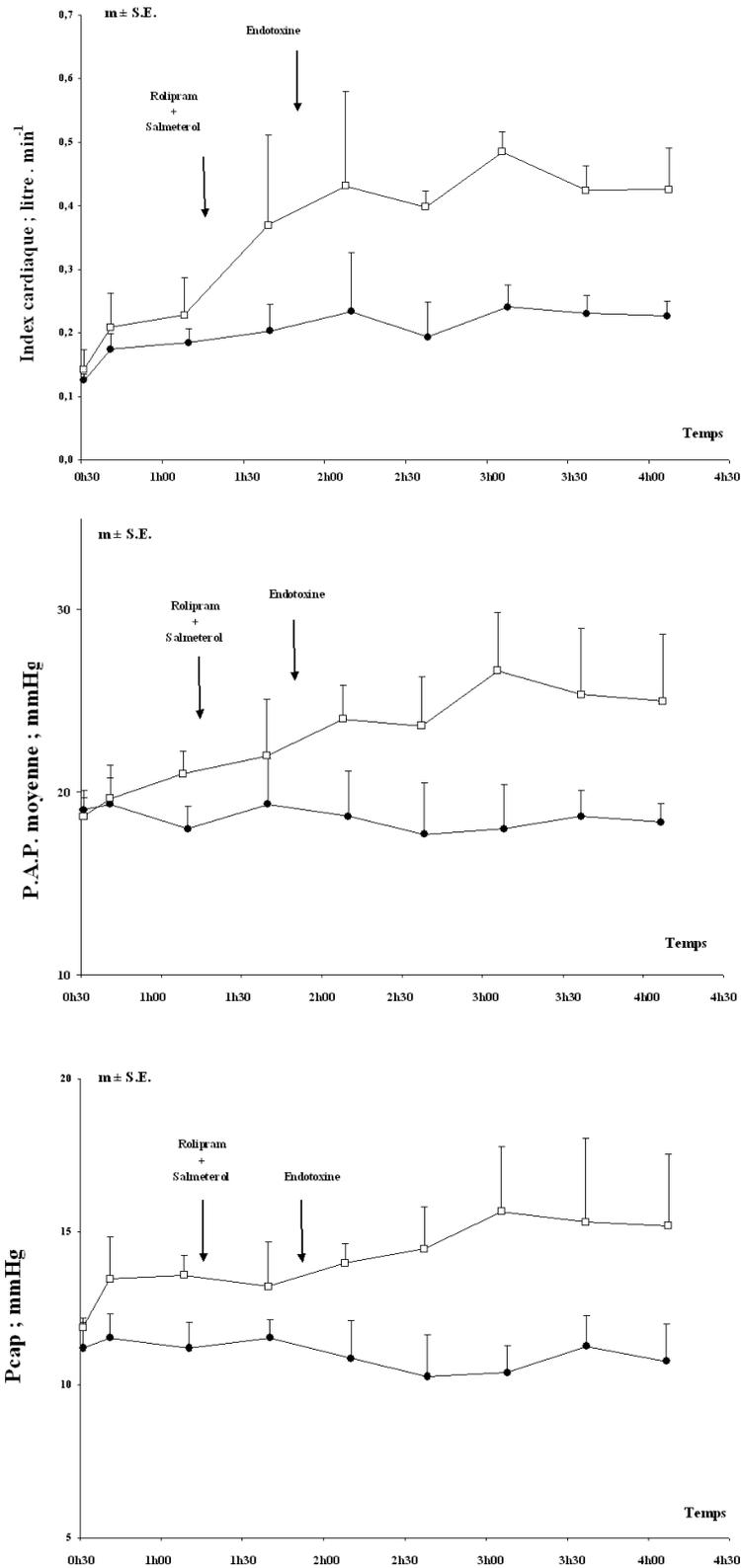


Figure 25 : Evolution des différents paramètres hémodynamique au cours de la lésion à l'endotoxine
 ● : Groupe 6, sujets lésés par l'endotoxine sans traitement associé (n=3) ; □ : Groupe 7, sujets lésés par l'endotoxine avec prétraitement par l'association rolipram-salmeterol (n=3).
 A) Evolution du débit cardiaque, B) Evolution de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm), C) Evolution de la pression capillaire (Pcap).
 Chacun de ces paramètres augmente de façon significative durant la perfusion de l'association médicamenteuse rolipram – salmeterol. $p < 0,05$; données entre groupes comparées par ANOVA.

IV – DISCUSSION

Cette étude montre principalement que la technique de LBA mise au point précédemment dans notre laboratoire pour mesurer la perméabilité capillaro-alvéolaire au FITC-dextran (12) permet de suivre en détail et pendant plusieurs heures l'évolution d'une lésion pulmonaire inflammatoire comme la lésion aiguë du poumon première étape du SDRA. Le FITC-dextran a un poids moléculaire proche de l'albumine (PM : 70 000). Il est donc possible d'imaginer une similitude de comportement, en terme de filtration capillaro-alvéolaire, entre le FITC-dextran et les protéines plasmatiques d'un poids moléculaire moyen comme l'albumine.

Cette étude met en évidence que le transport de FITC-dextran vers l'alvéole est accru quand un traitement par de la terbutaline est initié après le pic lésionnel dû à l'injection d'acide oléique. L'augmentation du débit cardiaque et de la pression capillaire par la terbutaline est suspectée d'être à l'origine de cette aggravation de la lésion pulmonaire par acide oléique.

La lésion à l'endotoxine, plus progressive et moins sévère que celle à l'acide oléique, peut également être suivie avec précision par notre technique. Un pré-traitement par l'association de rolipram et de salmeterol permet de réduire efficacement l'accumulation de FITC-dextran dans l'alvéole pulmonaire.

IV.1 Discussion de la technique de LBA dans le modèle de lésion à l'acide oléique

IV.1.1 Suivi de la cinétique de la lésion

Cette technique permet d'effectuer un point de mesure toutes les 15 minutes. Cette fréquence est bien plus élevée que celle autorisée, dans des modèles expérimentaux comparables, par les techniques de radiodétection externe (par gamma-caméra ou PET-scan) après une ou plusieurs injections intra-veineuses d'un traceur radioactif. En effet, l'utilisation de traceurs radioactifs de demi-vie courte (^{99m}Tc ; ^{113m}In ; ^{68}Ga) pour marquer l'albumine ou la transferrine, permet de réaliser des mesures séquentielles avec des intervalles de 30 minutes (209), 1 heure (190) ou 4 heures (137). Ces mesures espacées dans le temps, ainsi que l'obligation de transporter le sujet sous une gamma-caméra ou un PET-scan, ne facilitent pas l'évaluation de nouvelles thérapeutiques, en particulier à la phase exudative du SDRA où le moment de l'administration du médicament peut avoir un rôle majeur.

Notre fréquence de mesure (tous les ¼ d'heure) est proche de celle fournie par les méthodes de canulation lymphatique sans nécessiter la délicate chirurgie imposée par ces techniques

et en évitant les incertitudes quant au recueil pré-ganglionnaire ou post-ganglionnaire de la lymphe et quant à l'origine purement pulmonaire de celle-ci (78). Notre technique de LBA autorise donc la même précision que l'échantillonnage de la lymphe pour le suivi des variations de perméabilité capillaro-alvéolaire après lésion à l'acide oléique. De plus nos résultats suggèrent que notre technique de LBA détecte ces changements de perméabilité aussi précocement que l'échantillonnage lymphatique. Ce dernier ne reflète pourtant que l'altération de la barrière endothéliale sans présager de l'atteinte de l'épithélium alvéolaire qui est censé offrir une résistance plus importante ; ce qui devrait avoir pour conséquence une détection plus tardive de l'augmentation de perméabilité dans les échantillons de LBA. Notre technique montre pourtant une cinétique de transport du FITC-dextran (jusque dans l'alvéole) similaire au transport trans-capillaire des protéines après une lésion pulmonaire à l'acide oléique. Cette concordance temporelle des variations de perméabilité après injection d'acide oléique est vraie à la fois pour le délai d'apparition du pic de perméabilité et pour le déroulement de la phase de récupération ; et ce aussi bien chez le chien (21, 85) que chez le mouton (101).

Les cinétiques de filtration protéique, similaires dans les études *in vivo* par LBA, par échantillonnage de la lymphe pulmonaire ou par radiodétection externe, peuvent être expliquées par la survenue simultanée d'altérations structurales au niveau des cellules de l'endothélium et de l'épithélium après l'injection d'acide oléique (199). Dans un intervalle de temps comparable, Cioffi & col. (40) ont montré sur des cultures de cellules endothéliales de capillaires pulmonaires, qu'une lésion par la thrombine provoquait une ouverture d'interstices inter-cellulaires en 10 minutes. Ces interstices se refermaient spontanément en une à deux heures (*cf.* Fig. 6, p.33).

Ces observations illustrent la pertinence de notre technique pour détecter, grâce à l'augmentation du transport sang-alvéole précoce de FITC-dextran, les tous premiers stades de la lésion endothéliale par l'acide oléique.

IV.1.2 Sensibilité de la technique

Notre technique par LBA présente une grande sensibilité aux variations de perméabilité comparées aux méthodes par recueil de la lymphe thoracique ou par radiodétection.

K_{PS} , le coefficient de transport du FITC-dextran du sang vers le poumon, est, chez le sujet normal, environ 10 fois moins élevé que celui mesuré par les autres techniques. Une telle différence du transport de FITC-dextran à l'état normal est expliquée par le nombre plus important de barrières que doit franchir le traceur pour atteindre l'alvéole. L'endothélium, l'interstitium et l'épithélium alvéolaire sont autant de résistances, disposées en série, qui s'opposent à l'entrée de FITC-dextran dans l'alvéole. De plus, dans le poumon normal, l'épithélium alvéolaire représente 90% de l'étanchéité de l'ensemble de la barrière (191) avec une filtration protéique dans l'alvéole très basse. A l'état basal, notre technique ne prend pas en compte la filtration endothéliale évacuée par la lymphe et qui ne franchit pas l'épithélium. Ce n'est pas le cas des techniques de recueil lymphatique ou de radiodétection externe qui enregistrent, à l'état basal, ce débit protéique endothélial normalement évacué par la lymphe (148). La radiodétection externe comptabilise également l'accumulation de protéines marquées dans les tissus extra-pulmonaires (paroi thoracique, muscles, ...). En conséquence ces techniques ont probablement un rapport signal / bruit moins favorable et une moindre sensibilité. Ceci explique pourquoi les valeurs de perméabilité normales de FITC-dextran mesurées chez nos animaux contrôles (ainsi qu'à l'état stable avant lésion dans les autres groupes), sont 10 fois plus faible dans nos expériences que les valeurs de perméabilité pour les protéines totales mesurées dans la lymphe pulmonaire (98) ou les valeurs de perméabilité pour l'albumine et la transferrine mesurées par radiodétection externe (209).

Au moment de l'induction de la lésion, K_{PS} , le coefficient de transport du FITC-dextran, est augmenté par un facteur 80 dès la 15^{ème} minute suivant l'injection d'acide oléique. Il atteint même une valeur 150 fois supérieure à la normale à la 30^{ème} minute (pic de la lésion). En valeur absolue, les valeurs atteintes par ce coefficient de transport K_{PS} au moment du pic de la lésion sont assez comparables aux valeurs des index de perméabilité obtenus par radiodétection externe dans des modèles comparables de lésion à l'acide oléique (110, 137, 190, 209). Par contre c'est la différence (d'un facteur 100 en moyenne) entre les valeurs normales et les valeurs pathologiques qui font la sensibilité de la méthode, comparativement aux autres techniques. L'augmentation du transport total de protéines dans la lymphe n'augmente, en cas de lésion à l'acide oléique, que d'un facteur 4 à 5 par

rapport aux valeurs normales (101). La mesure, par radiodétection externe, de l'accumulation d'albumine ou de transferrine marquée, n'augmente que d'un facteur 5 à 10 avec le même type de lésion (110, 137, 190, 209).

En résumé la grande sensibilité de notre technique de LBA, comparée à celle des mesures lymphatiques ou des mesures par radiodétection externe, est due davantage aux valeurs basses de K_{PS} en conditions normales, qu'à des valeurs élevées de K_{PS} en situation pathologique.

IV.1.3 Améliorations apportées à la technique de LBA

La première amélioration a consisté à perfuser dans le sang un traceur macromoléculaire exogène plutôt que de mesurer les protéines endogènes comme marqueur de la perméabilité capillaro-alvéolaire. Dans le contexte d'une situation clinique de SDRA, ceci permet de s'affranchir des protéines ayant déjà franchi l'épithélium avant le début des lavages. La concentration alvéolaire de ces protéines augmente indépendamment de leur taux de filtration puisque la réabsorption épithéliale de liquide est plus rapide que celle des protéines (88).

Nous avons utilisé le FITC-dextran comme traceur plasmatique exogène. Son intérêt est d'être non toxique et non radioactif. Bien que sa forme et sa charge électrique soit différente de celle de l'albumine, il a néanmoins approximativement le même poids moléculaire (PM : 70 000).

L'albumine marquée à l'iode¹²⁵ nous servait de marqueur de dilution pour mesurer le volume du segment pulmonaire lavé. D'autres marqueurs auraient pu être potentiellement envisagés comme l'albumine marquée à l'iode¹³¹ ou l'albumine marquée au Bleu Evans (202). Cependant ce dernier présente l'inconvénient d'une absorbance spectrométrique croisée avec l'hémoglobine, laquelle peut être présente dans le liquide de LBA des animaux lésés par l'acide oléique et dont l'œdème est parfois hémorragique (48).

Les 6 cycles de LBA initiaux assuraient le remplissage (la saturation) du segment pulmonaire par le liquide de lavage. Les volumes conséquents utilisés à chaque lavage (30 à 60 ml) permettaient un brassage correct et un échantillonnage homogène du secteur lavé, comparativement aux techniques usuelles de LBA (14). L'importance des volumes de lavage et la fréquence de leur renouvellement toutes les 15 minutes expliquait l'attention

donnée à maintenir stable le volume du segment pulmonaire lavé qui représentait notre site d'échantillonnage.

Après cette phase de remplissage par les 6 premiers lavages, la procédure de LBA cherchait donc à conserver cette saturation du site d'échantillonnage tout au long de l'expérience. Du liquide de lavage neuf était rajouté en fonction des besoins, à chaque cycle, de manière à compenser les différences entre le volume d'instillation optimal (déterminé en début d'expérience) et le volume de liquide récupéré à la fin de chaque cycle de LBA. Ces différences étaient dues aux échantillons de LBA prélevés tous les $\frac{1}{4}$ d'heure, mais aussi au liquide réabsorbé naturellement par l'épithélium, aux éventuelles fuites autour du ballonnet du fibroscope, ou encore au liquide piégé dans les petites bronches distales (voir infra ; paragraphe *Limites de la technique de LBA*).

La bonne stabilité du volume du segment pulmonaire lavé ($V_{t,n}$) était évaluée grossièrement en cours d'expérience par les volumes liquidiens instillés et récupérés, mais était contrôlée *a posteriori* par les mesures de dilution de l'Albumine- I^{125} dans les échantillons de LBA.

IV.1.4 Précisions des mesures de perméabilité au FITC-dextran

Bien que cette technique de LBA puisse permettre la mesure de la perméabilité capillaro-alvéolaire aux macromolécules à tous les stades de l'évolution de la lésion pulmonaire, nous avons fait le choix de mesurer ce transport de macromolécules à la phase exudative de la lésion. Nous avons par conséquent délibérément négligé la cinétique macromoléculaire liée à la réabsorption de l'œdème pulmonaire.

Dans notre modèle à deux compartiments, les débits de FITC-dextran de part et d'autre de la barrière capillaro-alvéolaire, dépendaient de 3 coefficients de transport (min^{-1}) : le premier coefficient (K_{PS}) contrôle le débit d'entrée de FITC-dextran du sang vers l'alvéole ; le second coefficient (K_{SP}) contrôle le débit de retour de l'alvéole vers le sang, et le 3^{ème} coefficient (K_{EP}) décrit la FITC-dextran liée à l'échantillonnage de liquide de LBA. K_{PS} et K_{SP} représentent la perméabilité globale de la barrière capillaro-alvéolaire, incluant les différentes contributions des barrières endothéliale, interstitielle, et épithéliale, ainsi que leur surface d'échange (cf. Fig.13, p.64).

Le débit de retour vers le compartiment plasmatique augmente au cours d'une lésion inflammatoire comme cela a été montré dans des expériences de réabsorption épithéliale sur des poumons de lapin (63). Une telle augmentation de notre coefficient de retour (K_{SP}) est probable au cours de la lésion à l'acide oléique. Cependant à la phase précoce et

essentiellement exudative de la lésion, le flux entrant de protéines (du sang vers l'alvéole) excède largement les capacités de réabsorption épithéliale de l'alvéole. En effet d'après les observations anatomopathologiques des poumons de patients atteints de SDRA et des poumons de modèles expérimentaux, le débit des protéines qui s'accumulent dans l'oedème interstitiel et alvéolaire est bien supérieur aux possibilités de réabsorption (alvéole → plasma) du poumon. Ceci a été confirmé par l'étude, par PET-scan, des débits de transferrine marquée au cours de la phase exudative de la lésion à l'acide oléique chez le chien. Le coefficient de transport, correspondant au débit de retour des tissus vers le plasma de la transferrine-Ga⁶⁸, était calculé grâce à un modèle d'analyse non linéaire bi-compartimental (cf. I.10.3, p.40). Ce coefficient de retour (équivalent à notre coefficient K_{SP}) était calculé comme étant 9 fois plus faible que le coefficient de transport représentant le flux d'entrée du sang vers les tissus (Pulmonary Transcapillary Escape Rate = PTCER) (174).

Si l'on prend comme hypothèse les données de l'étude de Schuster, et, dans notre étude, le coefficient d'entrée de FITC-dextran dans l'alvéole (K_{PS}) qui augmente en moyenne d'un facteur 100 pendant le pic lésionnel, nous pouvons alors estimer que le débit de retour (K_{SP}) devrait être augmenté d'un facteur 11 par rapport à la normale. La réabsorption alvéolaire épithéliale normale de l'albumine étant proche de 1% par heure chez le chien (19), on peut alors estimer cette clearance à 11% par heure en situation pathologique. Ces estimations coïncident avec les mesures effectuées chez d'autres espèces. La réabsorption épithéliale normale de l'albumine est à peu près identique dans toutes les espèces (105). Par ailleurs, sur des poumons de lapin chez lesquels une inflammation avait été provoquée par plusieurs agents pathogène différents, Folkesson & col. (63) ont montré que cette réabsorption alvéolaire de l'albumine augmentait d'un facteur 5 à 15 au cours de la lésion. Ces taux de réabsorption épithéliale des protéines alvéolaires, proches de 1% par heure sur le poumon normal, même augmentés aux alentours de 10% par heure sur un poumon inflammatoire, sont bien inférieurs au coefficient de rinçage (K_{EP}) dû à notre échantillonnage de 4 à 5 ml tous les ¼ d'heure et à son remplacement par du liquide neuf. En effet sur la période du pic lésionnel ce coefficient de rinçage K_{EP} a été calculé en moyenne à 48% par heure. Ce rinçage lié aux prélèvements de LBA (entièrement connu et maîtrisé) élimine donc au moment du pic de la lésion près de 5 fois plus de FITC-dextran alvéolaire que la clearance épithéliale. En situation normale, ou bien à la phase de récupération de la lésion, ce rapport est encore plus important.

Comme notre objectif était de mesurer l'entrée des protéines dans l'alvéole, nous avons donc tiré profit de ce rinçage lié à l'échantillonnage pour rendre négligeable le coefficient de transport retour des protéines (K_{SP}) de l'alvéole vers le sang.

La formulation mathématique du modèle compartimental peut donc être simplifiée au calcul d'un seul paramètre, K_{PS} , à partir des concentrations de FITC-dextran dans le plasma sanguin et dans les échantillons de LBA.

IV.1.5 Limites de la technique de LBA

La première limite de la technique est liée au fait que la mesure de perméabilité capillaro-alvéolaire n'est effectuée que sur une partie limitée du poumon définie par le secteur isolé par le fibroscope. Cette zone n'est pas représentative de l'ensemble de la lésion pulmonaire qui peut-être très inhomogène notamment dans le modèle à l'acide oléique.

Le positionnement du fibroscope est également une étape clé de l'expérience pour éviter les fuites de liquide de lavage, ou au contraire le piégeage de ce liquide dans le poumon, au cours des 4 heures d'expérimentation. En effet après plusieurs heures de lavage broncho-alvéolaire, la muqueuse bronchique devient œdémateuse et une trop forte dépression lors de la réaspiration de liquide peut aggraver piégeage en collabant les bronchioles. La fréquence d'un tel phénomène peut être diminué (sans pouvoir être exclu) en prenant soin d'isoler un territoire pulmonaire assez grand (volumes de lavages $>$ à 30 ml) en ne plaçant pas l'extrémité du fibroscope dans un territoire trop distal. En effet les bronchioles très périphériques ont une structure moins rigide et sont plus faciles à collaber. De fait nous avons observé une tendance à une corrélation inverse (mais n'atteignant pas la significativité) entre la taille du segment pulmonaire lavé et le temps mis à retirer le liquide de lavage en fin de cycle. Par ailleurs la position optimale du fibroscope doit pouvoir être maintenue sans déplacement tout au long des 4 h de l'expérience.

L'application clinique, au lit du patient, de notre technique de LBA est pour l'instant fortement limitée par ces problèmes mécaniques. Il est notamment inenvisageable de laisser en place un fibroscope plusieurs heures dans l'arbre trachéo-bronchique de patients de réanimation insuffisants respiratoires.

La seconde limite de la technique est l'incertitude quant à l'évolution du volume du compartiment pulmonaire lavé, en temps réel au cours de l'expérience. Bien que n'ayant

pas observé de fuites de liquide de lavage dans la sonde d'intubation chez les animaux témoins, on ne peut pas exclure formellement des fuites de liquide de LBA notamment chez les sujets lésés par l'acide oléique chez lesquels un important œdème pulmonaire se formait. Tant que la concentration d'albumine- I^{125} n'avait pas été mesurée (en fin d'expérience) dans les échantillons LBA, le maintien d'un volume stable du segment pulmonaire lavé restait donc incertain et uniquement basé sur les entrées-sorties liquidiennes macroscopiques en s'attachant à compenser les différences entre le volume d'instillation et les volumes récupérés à l'aspiration.

Les échanges réels de liquides, au sein du site d'échantillonnage que constitue le secteur pulmonaire isolé, sont sous l'influence de plusieurs phénomènes qui peuvent éventuellement se neutraliser ou se potentialiser.

- La réabsorption continue de liquide, par l'épithélium alvéolaire, devrait logiquement diminuer régulièrement le volume du site d'échantillonnage tout au long de l'expérience. Cette diminution du volume d'échantillonnage n'a pas été observée car elle a été régulièrement compensée par des ajouts de liquide.
- Plusieurs phénomènes pouvaient concourir à l'augmentation régulière du volume ($V_{t,n}$) du compartiment pulmonaire : 1) les difficultés mécaniques de réaspiration et les phénomènes de piégeage décrits ci-dessus pouvaient augmenter le $V_{t,n}$; 2) le LBA lui-même est, à la longue, source d'inflammation pulmonaire et d'augmentation de perméabilité (108, 201). Une telle augmentation de perméabilité a en effet été observée lorsque l'expérience se prolongeait au-delà de 3 heures $\frac{1}{2}$ chez les animaux témoins, 3) la formation d'œdème pulmonaire chez les animaux lésés par l'acide oléique (170) pouvait bien entendu être source d'afflux de liquide dans l'alvéole, et ce d'autant plus que la lésion pulmonaire diminue les capacités de réabsorption de l'épithélium alvéolaire (194). Nous n'avons que rarement observé cet effet qui aurait dû être marqué par une diminution des ajouts de liquide frais. Il est possible que la filtration nette de liquide vers l'alvéole ait été limitée par la pression positive générée par le liquide de LBA laissé en place dans le segment pulmonaire. Un tel mécanisme a été suggéré dans des études antérieures pour expliquer la diminution de filtration liquidienne associée à une augmentation de pression alvéolaire ou à une ventilation liquide partielle avec du perfluorocarbène (23, 118). A la fin de chaque cycle de lavage (après la réaspiration du liquide) le compartiment pulmonaire lavé était remis en contact avec la pression atmosphérique afin de s'assurer qu'aucune surpression (ou dépression) chronique ne se créait au cours de l'expérience. L'injection, au début de chaque cycle, du volume optimal prédéterminé de liquide de lavage, s'effectuait donc dans

un compartiment pulmonaire à la pression atmosphérique. Le volume de liquide injecté était calculé en début d'expérience par le volume d'air augmentant au maximum à 10 cm d'H₂O la pression alvéolaire. Or le remplissage du poumon avec ce même volume de liquide n'entraîne pas une augmentation de pression aussi élevée. En effet la distension pulmonaire par du liquide augmente la compliance et réduit l'augmentation de pression (Fig. 26). Nous supposons donc que notre remplissage pulmonaire par du sérum physiologique a permis d'établir une faible pression positive (< à 10 cm d'H₂O) à l'intérieur du compartiment lavé, limitant la filtration liquidienne de l'interstitium vers l'alvéole à la manière d'une PEEP modérée telle qu'elle est utilisée chez les patients de réanimation (29). Le transport convectif (lié au débit d'eau) de FITC-dextran entre l'interstitium et l'alvéole était donc probablement réduit et le transport de FITC-dextran était sans doute essentiellement diffusif.

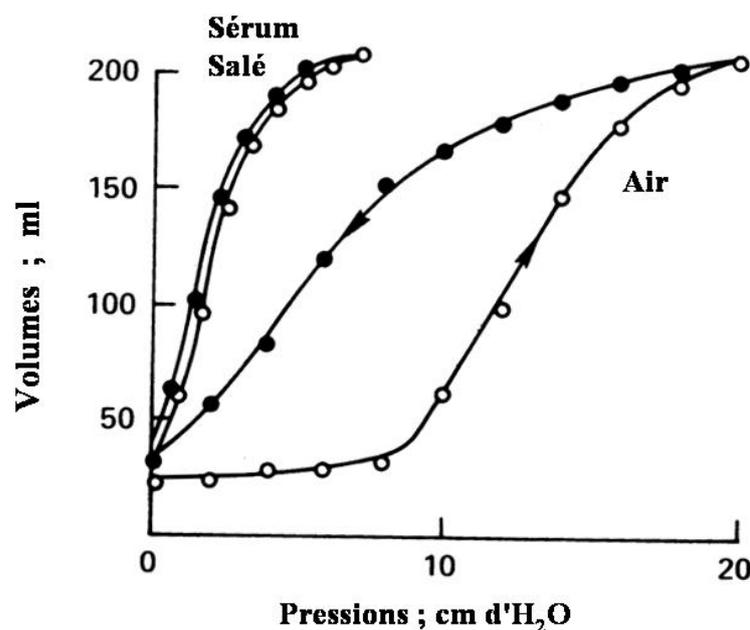


Figure 26 : Comparaison des courbes pression-volume de poumons remplis avec de l'air et de poumons remplis avec du sérum salé physiologique. Cercles ouverts : inflation ; cercles fermés : déflation. D'après Radford E.P.(159)

Le calcul plus précis du $V_{t,n}$ par la mesure de dilution de l'albumine-I¹²⁵ a permis de confirmer la relative bonne stabilité du volume du compartiment pulmonaire au cours de l'expérience, et ce dans chaque groupe, excepté le groupe 5 (lésion à l'acide oléique avec traitement tardif par terbutaline) (Fig. 15 p.69 et Fig.16 p.70). Dans ce groupe 5 l'augmentation de débit et de pression dans la circulation pulmonaire a entraîné une

filtration capillaro-alvéolaire plus importante. Cette production d'œdème augmentait le volume de liquide aspiré en fin de cycle de lavage au-delà du volume d'instillation. Dans ce cas de figure, très peu de liquide neuf est ajouté pour compenser l'échantillon soustrait (voire pas du tout) ; le but étant toujours de réinstiller au cycle suivant le volume fixe déterminé au départ. Malgré cette précaution le $V_{t,n}$ calculé par la dilution de l'albumine- I^{125} a augmenté en fin d'expérience dans ce groupe terbutaline tardive. Nous soupçonnons que cette augmentation de $V_{t,n}$ est due à des retraits de liquide en fin de cycle "insuffisants" (bien qu'en général supérieurs, en volume, à la quantité de liquide instillée en début de cycle) au regard de l'œdème qui se constituait pendant cette période de filtration particulièrement élevée.

La mesure du $V_{t,n}$ par la dilution de l'albumine- I^{125} peut avoir été biaisée par la fuite du marqueur de dilution vers l'interstitium, notamment au cours de la lésion et en particulier dans le groupe terbutaline tardive où la distension du compartiment lavé a pu majorer la perméabilité. On peut cependant, en utilisant le même raisonnement que celui développé ci-dessus pour le débit de retour du FITC-dextran, négliger cette fuite d'albumine- I^{125} vers l'interstitium du fait des grands échantillons de liquide de LBA remplacés par du liquide neuf. Nous avons néanmoins effectué des simulations montrant que de larges et improbables variations du $V_{t,n}$ ($\pm 20\%$ / heure) n'entraînaient pas de modifications importantes du coefficient de perméabilité capillaro-alvéolaire au FITC-dextran (K_{PS}). En effet ni le délai d'apparition ni la hauteur du pic du K_{PS} n'étaient modifiées. Seule la cinétique de la période de récupération variait légèrement avec les variations simulées de $V_{t,n}$ (Fig.27). Ces simulations de variation de $V_{t,n}$ illustrent la robustesse de notre technique et de notre modèle compartimental pour la détermination précise du coefficient de perméabilité K_{PS} .

Finalement malgré les incertitudes concernant la mesure du $V_{t,n}$, nous avons réussi à garder globalement stable le volume du compartiment lavé servant de site d'échantillonnage pour le LBA, ce qui nous a permis de garder une bonne précision de mesure du débit de FITC-dextran pénétrant dans l'alvéole.

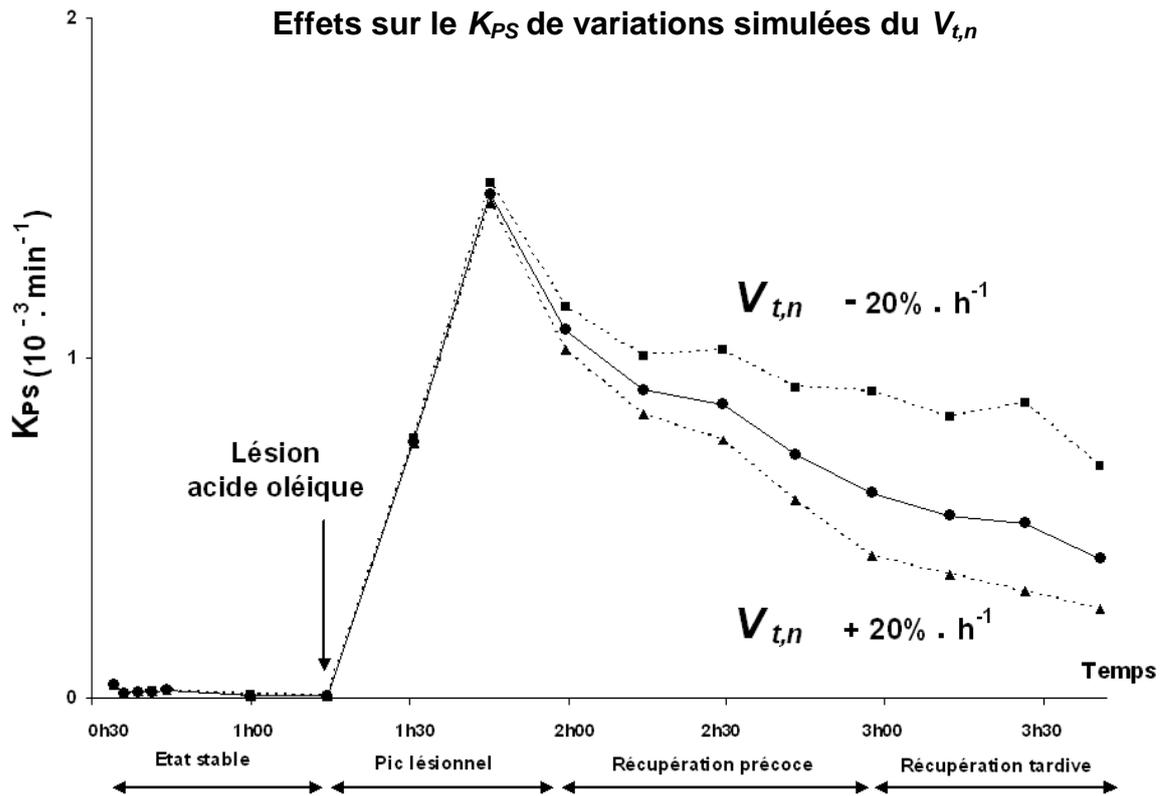


Figure 27 : Cinétique du K_{PS} , le coefficient de transport du FITC-dextran du sang vers l'alvéole chez les animaux lésés à l'acide oléique, pour différentes variations simulées du volume du segment pulmonaire lavé ($V_{t,n}$). $V_{t,n}$ stable (● ligne continue), $V_{t,n}$ augmentant de 20% par heure (▲ ligne pointillée); $V_{t,n}$ diminuant de 20% par heure (■ ligne pointillée).

IV.1.6 Applications possibles de la technique de LBA

Cette technique permet d'évaluer la quantité de protéines plasmatiques qui inondent l'alvéole à la phase exudative précoce au cours d'un modèle de SDRA *in vivo*. On peut extrapoler, à partir du transport cumulé de FITC-dextran, l'accumulation d'albumine dans l'espace alvéolaire de l'ensemble des 2 poumons. En supposant une concentration d'albumine plasmatique de 2,9 g/l et un volume pulmonaire total de 72 ml/kg chez le chien (44), on peut évaluer à environ 1,9 g la quantité d'albumine plasmatique s'étant accumulée en 2 heures ½ dans les poumons d'un animal d'un poids moyen de $12,6 \pm 0,3$ kg. Cette estimation grossière peut permettre de quantifier d'autres protéines d'origine plasmatique comme les divers substrats du système de coagulation qui engendreront les dépôts de fibrine dans l'alvéole (97). Cette technique pourrait éventuellement être adaptée au petit animal chez lesquels il est possible de faire des LBA répétés (197).

Cette technique peut servir à étudier les mécanismes et la cinétique des lésions pulmonaires inflammatoires sur des modèles pré-cliniques. Une des applications pré-cliniques les plus intéressantes de la méthode est l'évaluation *in vivo* des thérapeutiques.

IV.2 Discussion des effets de la terbutaline sur la lésion à l'acide oléique

Le contexte pré-clinique de notre modèle nous a conduit tout d'abord à tester les effets curatifs de la terbutaline avant ses effets préventifs. Nous avons comparé 2 modes d'administration : l'un précoce, juste après le début de la lésion ; puis, en raison des résultats difficiles à interpréter, un mode d'administration un peu plus tardif, 1 heure ½ après le début de la lésion.

IV.2.1 Discussion de l'absence d'effet de la terbutaline précoce

Nous avons tout d'abord évalué si la terbutaline, administrée juste après l'induction de la lésion à l'acide oléique, pouvait limiter l'augmentation de perméabilité capillaro-alvéolaire aux macromolécules.

Nous n'avons observé aucun effet sur la perméabilité de la terbutaline administrée précocement. Ces résultats sont similaires avec ceux observés par McAuley & col. (126) dans un modèle lésionnel un peu différent. Ces auteurs avaient testé, chez des rats lésés à l'acide chlorhydrique (HCl), les effets bénéfiques sur la perméabilité endothéliale et sur la perméabilité épithéliale, de plusieurs béta2-agonistes administrés par voie intra-trachéale.

De l'albumine marquée à l'iode¹³¹ était perfusée en intra-veineux et servait à calculer un index de perméabilité endothéliale grâce à un ratio de concentration poumon/sang mesuré après l'ablation d'un poumon en fin d'expérience. Un LBA était réalisé sur l'autre poumon et la radioactivité mesurée dans le liquide de lavage permettait d'évaluer plus spécifiquement la perméabilité épithéliale. Les index de perméabilité étaient mesurés 2 ou 4 heures après la lésion à l'HCl. Les effets bénéfiques des β 2-agonistes sur la perméabilité endothéliale n'étaient visibles que 4 heures après la lésion tandis qu'aucun effet sur la perméabilité épithéliale à l'albumine-I¹³¹ n'était observable.

L'absence d'effet (bénéfique ou néfaste) de la terbutaline sur le pic de perméabilité, dans notre série d'animaux traités précocement, est difficile à interpréter. Une première hypothèse est de considérer que la lésion à l'acide oléique entraîne une perméabilité d'emblée très importante, peu sensible au traitement par β 2-agoniste. Une autre hypothèse est de considérer que l'augmentation de débit cardiaque et de pression capillaire, provoquée par la perfusion de terbutaline, ne peut augmenter le recrutement capillaire qui est alors maximum car les phénomènes protecteurs de vasoconstriction hypoxique et inflammatoire ne sont pas encore efficaces (*cf. infra*). En revanche, la perfusion de terbutaline précoce semble avoir ralenti la phase de récupération suivant le pic de perméabilité, en même temps qu'elle augmentait la pression capillaire et le débit cardiaque et diminuait les résistances vasculaires. Bien que cette tendance ne soit pas statistiquement significative elle semble réelle sur les derniers cycles de lavage de la phase de récupération tardive.

La difficulté d'interprétation de l'efficacité du traitement par terbutaline précoce nous a conduit à réaliser une série d'expériences avec un traitement par terbutaline administrée tardivement par rapport au pic lésionnel (90 minutes après). Dans un contexte pré-clinique, cette administration tardive présente tout autant (voire plus) d'intérêt. Cette série "terbutaline tardive" a donc été effectuée secondairement après les 4 premières séries (témoins ; lésions seules ; terbutaline précoce). Les résultats ont donc pour cela souvent été présentés séparément.

IV.2.2 Discussion de l'aggravation de perméabilité par la terbutaline tardive

Nous avons observé une aggravation du flux de FITC-dextran dans l'alvéole ayant coïncidé avec le début de la perfusion de terbutaline durant la phase de récupération tardive de la lésion.

La perfusion de terbutaline entraînait une augmentation de débit cardiaque et de pression artérielle pulmonaire aussi bien dans le groupe traité précocement que dans le groupe traité tardivement. La diminution simultanée des résistances vasculaires pulmonaires totales montre que l'augmentation relative de débit cardiaque a été plus importante que l'augmentation relative des pressions. Ces constatations évoquent une augmentation de pression capillaire et/ou un recrutement de capillaires lésés jusqu'alors non perfusés, ayant entraîné un débit plus important de FITC-dextran du sang vers l'alvéole.

A la phase exudative de la lésion, la filtration au travers des parois capillaires augmente à un tel point que le débit de protéines devient essentiellement convectif (161). La partie diffusive du transport des protéines pouvant être négligée, le flux protéique du plasma vers l'alvéole (J_S) peut alors être exprimé sous une forme simplifiée :

$$J_S = J_V (1 - \sigma) \cdot C_P$$

J_V étant le flux liquidien, σ le coefficient de réflexion aux protéines et C_P la concentration plasmatique. La prédominance de la convection au travers des parois capillaires est due à la diminution du coefficient de réflexion de la paroi capillaire aux protéines. Elle est aussi intimement liée au débit de liquide qui entraîne avec lui les protéines à travers les interstices cellulaires créés au cours de la lésion. Le débit liquidien du sang vers l'interstitium dépend donc essentiellement des forces de Starling (surtout de la pression capillaire) et de la surface de filtration (qui dépend en partie du débit sanguin à travers les capillaires pulmonaires).

Par contre nos données ne montrent pas d'afflux de liquide d'œdème dans l'alvéole durant la lésion (sauf pour le groupe terbutaline tardive). Ceci est peut-être dû à la petite pression positive générée dans le segment pulmonaire par le liquide de lavage. On peut donc supposer que le débit des protéines, qui ont pénétré dans l'alvéole à partir de l'interstitium chez les animaux lésés, était essentiellement lié à un transport diffusif et à un gradient de concentration entre l'interstitium et le site de lavage alvéolaire. Ce gradient de concentration favorisant le transport diffusif était, d'une certaine façon, entretenu par le rinçage régulier du site de lavage lié à notre échantillonnage de liquide et à son remplacement par du liquide neuf.

IV.2.3 Effets sur la perméabilité d'une augmentation de pression capillaire

- Sur un poumon normal, une augmentation modérée de pression capillaire, telle que celle observée dans notre étude, peut accroître le débit transcapillaire d'eau et de protéines vers l'interstitium. Elle s'accompagne d'une augmentation plus importante du débit d'eau que du débit de protéines ce qui induit une baisse de la concentration des protéines dans l'interstitium augmentant les forces osmotiques rappelant l'eau vers le compartiment vasculaire. Cette légère augmentation de filtration sera, sur un poumon normal, aisément éliminée par la circulation lymphatique.(21, 77, 98, 134, 147).
- Sur un poumon lésé dont la perméabilité capillaro-alvéolaire augmente vis-à-vis des liquides mais aussi des protéines (baisse du σ), une augmentation de pression capillaire identique, entraîne une plus grande augmentation de filtration liquidienne et un transport massif de protéines vers l'interstitium et l'alvéole (22) (76) (17).

IV.2.4 Effets sur la perméabilité d'une augmentation de débit cardiaque

- Sur un poumon normal, une augmentation de débit cardiaque est longtemps bien tolérée et n'induit pas, par elle-même, d'aggravation de la perméabilité de la barrière capillaro-alvéolaire. Townsley & col. ont montré, sur des poumons de chiens isolés et perfusés à débit constant, qu'une réduction progressive de la masse pulmonaire n'augmentait pas le coefficient de filtration liquidien $K_{f,c}$ (77). Ehrart & col. ont observé qu'une augmentation du débit cardiaque par un facteur 5, sur des poumons isolés de chiens, augmentait le débit lymphatique sans modifier le coefficient σ de réflexion des protéines (56).
- Sur poumon lésé, plusieurs études ont montré que l'augmentation de débit cardiaque pouvait lever la vasoconstriction hypoxique et inflammatoire qui protège le poumon, ce qui entraîne une aggravation de la lésion pulmonaire. Takeda & col. (188) ont montré, sur des poumons lésés à l'acide chlorhydrique (HCl) que la redistribution du flux sanguin du poumon normal vers le poumon lésé, aggravait la lésion. Ehrhart & col. (57) ont observé, sur des poumons isolés de chiens lésés à l'acétate de phorbol myristate, que l'augmentation de débit cardiaque exacerbait la lésion pulmonaire par recrutement capillaire tandis que le coefficient σ de réflexion des protéines restait inchangé. La lésion à l'acide oléique chez des chiens équipés d'une fistule artério-veineuse permettant d'augmenter le débit cardiaque,

entraînait un œdème plus important et de plus faibles résistances précapillaires chez les animaux qui avaient un plus haut débit cardiaque (87).

Ces constatations évoquent un phénomène de recrutement capillaire lié à l'augmentation du débit cardiaque.

D'autres études (55) (146) ont démontré que, pour une pression capillaire déterminée, l'augmentation de débit cardiaque dans un poumon perfusé en zone 2 de West (*i.e.* pression artériolaire > pression alvéolaire > pression des veinules) entraînait une plus forte augmentation de la surface d'échange qu'un passage de zone 2 en la zone 3 (*i.e.* pression artériolaire > pression des veinules > pression alvéolaire) par augmentation de la pression auriculaire gauche.

Une des explications possible de ce recrutement capillaire serait un effet de cisaillement au niveau de l'endothélium, créé par l'augmentation de débit cardiaque, provoquant une libération de NO par les cellules endothéliales, ce qui pourrait diminuer le tonus vasomoteur et diminuer la pression critique d'ouverture des capillaires préalablement vasoconstrictés (114).

Nos résultats montrent que la lésion à l'acide oléique entraîne une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires totales. La terbutaline administrée soit précocement soit tardivement abaisse ces résistances vasculaires pulmonaires totales élevées, jusqu'à des valeurs proches de la normale. Par ailleurs la terbutaline (précoce ou tardive) diminue le rapport entre les résistances post-capillaires et les résistances totales, ce qui témoigne d'une augmentation (en proportion) de l'importance de la part précapillaire (artériolaire) dans les résistances pulmonaires totales.

D'autres études ont rapporté le même phénomène. Pelett & col. (150) ont montré, *in vivo*, chez des chiens lésés à l'acide oléique, que la lésion augmentait le gradient entre la Pcap et la Papo. La perfusion de dobutamine majorait encore ce gradient entre la Pcap et la Papo. Anglade & col. (4) ont comparé, sur des préparations de poumons de lapin lésés à l'acide oléique, les effets respectifs d'une augmentation de débit cardiaque et d'une augmentation de pression auriculaire gauche. L'accroissement du débit sanguin pulmonaire augmente le coefficient de filtration liquidien $K_{f,s}$ à lésion égale et à pression capillaire égale. Les auteurs attribuent l'élévation de $K_{f,s}$ à un recrutement capillaire par l'augmentation du débit de perfusion. Afin d'expliquer l'existence d'un recrutement capillaire ne modifiant pour autant pas le rapport entre la proportion de poumon perfusé en zone 2 et celle perfusée en zone 3, ces auteurs concluent que deux mécanismes peuvent co-exister pour expliquer l'augmentation de $K_{f,s}$: 1) le recrutement de quelques capillaires très perméables en zone 2

et en zone 3, et/ou un déplacement vers l'aval du point de compression de la zone 2 entraînant une augmentation de la surface de filtration. 2) l'ouverture et le remplissage de capillaires borgnes en zone 1 (i.e. ouverts à leur extrémité artériolaire mais bouchés à leur extrémité veineuse).

Ce phénomène de capillaire borgne peut-être du à un veinospasme induit par les médiateurs de l'inflammation, en particulier le thromboxane (177). L'augmentation de débit sanguin pulmonaire peut aussi déplacer vers le lit d'aval (veinules) des thrombi obstruant les capillaires. Velazquez & col. (198) ont montré une grosse disparité de perfusion entre les 2 poumons au cours d'une lésion unilatérale pulmonaire à l'acide oléique chez le chien. La perfusion de substances vasodilatatrices comme des prostaglandines ou de l'endotoxine (198), ou encore du nitroprussiate de sodium (172) n'arrivait pas lever cette obstruction et à améliorer la perfusion du poumon lésé.

Ces observations accréditent l'hypothèse des capillaires borgnes. La mise en charge, par l'augmentation du débit cardiaque, de tels capillaires borgnes, peut augmenter considérablement la filtration capillaire puisque la pression dans ces capillaires non circulants s'équilibre avec la pression artériolaire pulmonaire. Il en résulte une fuite importante en amont de l'obstruction. Comme il s'agit de capillaires très atteints par la lésion, le coefficient de réflexion σ aux protéines de leurs parois est très bas, et une grande quantité de protéines fuit au travers de celles-ci. Le même phénomène se reproduit (à une moindre échelle) dans les capillaires recrutés en zone 2 avec la migration vers l'aval (vers les veinules) du point de compression (*Fig.28*).

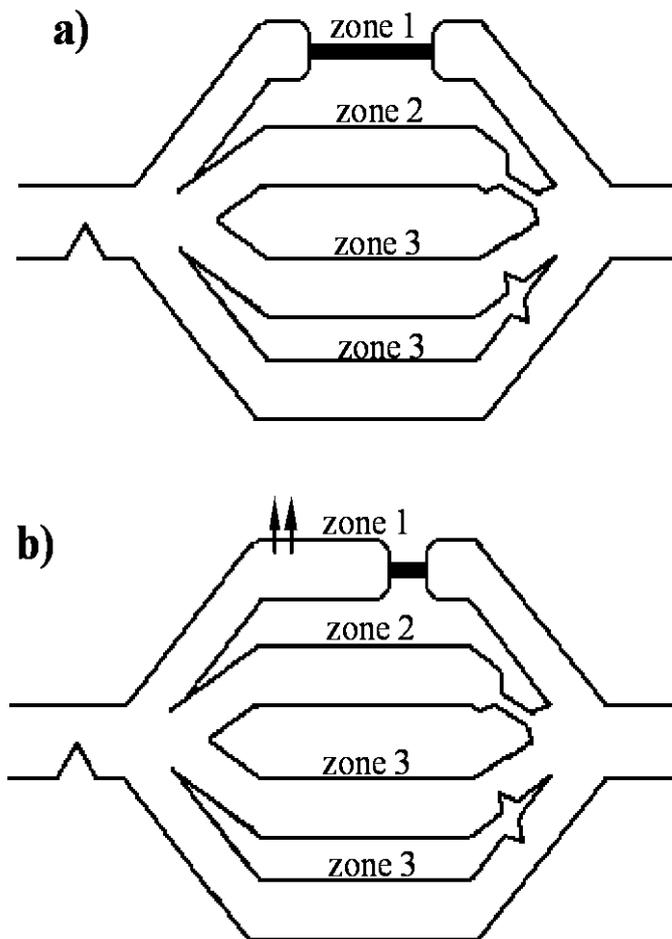


Figure 28 : Modèle d'interprétation des variations de perfusion au sein du poumon lésé par l'acide oléique. D'après Anglade & col. (4) avec permission.

Le modèle de circulation comporte 4 branches représentées en parallèles dans le même plan horizontal.

a) Au cours de la lésion à l'acide oléique, les conditions de perfusion (zone 1, 2 ou 3 de West) diffèrent de celles d'un poumon normal par la compression extravasculaire, la vasoconstriction et l'obstruction capillaire qui prévalent sur la compression vasculaire par l'air alvéolaire. La réduction du débit sanguin en zone 2 est schématisée par un rétrécissement de la branche au niveau du point de compression. L'absence de flux sanguin d'aval en zone 1 est représentée par un trait plein.

b) Une augmentation du débit cardiaque majore le recrutement capillaire mais ne modifie pas le rapport zone 2 / zone 3. Le recrutement se fait essentiellement aux dépens de la zone 1. Le remplissage des capillaires borgnes de la zone 1 (*i.e.* ouverts à leur extrémité artérielle mais bouchés à leur extrémité veineuse) peut augmenter considérablement la filtration (flèches).

IV.3 Effets des béta-agonistes sur la redistribution du flux sanguin pulmonaire

Dans notre étude, les effets sur la lésion pulmonaire d'un accroissement du débit cardiaque par la terbutaline sont plus ou moins masqués selon le moment où l'augmentation de débit sanguin pulmonaire survient par rapport au pic de la lésion. Administrée tardivement la terbutaline aggrave nettement la lésion, alors qu'une perfusion débutée 15 minutes après l'injection d'acide oléique n'affecte pas le pic lésionnel mais ralentit seulement la phase de récupération.

Nous faisons l'hypothèse que le recrutement capillaire est maximum dans la première demi-heure de la lésion et que les phénomènes de vasoconstriction hypoxique et inflammatoire qui protègent le poumon n'ont pas encore eu le temps d'agir. L'augmentation de débit cardiaque par la terbutaline ne majore pas, à cet instant, le recrutement. La phase de récupération que l'on observe après le pic est essentiellement à la mise en œuvre de ces mécanismes protecteurs de vasoconstriction. L'augmentation du débit cardiaque par la terbutaline viendrait forcer cette vasoconstriction et reperfuser des territoires lésés préalablement exclus.

IV.3.1 La redistribution protectrice du flux sanguin pulmonaire

Cette vasoconstriction protectrice est due à la fois à une vasoconstriction hypoxique des territoires lésés, qui sont perfusés mais mal ventilés du fait de l'œdème alvéolaire, et aussi à une vasoconstriction inflammatoire liée aux eicosanoïdes. En effet l'inflammation augmente la libération de thromboxane (vasoconstricteur) et inhibe la cyclo-oxygénase ce qui a pour effet de diminuer la synthèse de prostacycline vasodilatatrice (170). Cette phénomène protège le poumon car il redistribue le flux sanguin vers les zones pulmonaires les moins atteintes, ce qui améliore le rapport ventilation / perfusion. Cette vasoconstriction entraîne une augmentation de la pression artérielle pulmonaire mais limite la perfusion dans les zones où la lésion est la plus sévère.

Cette vasoconstriction peut-être prévenue par des pré-traitements vasodilatateurs administrés avant la lésion. La perfusion de petites doses d'endotoxine (50 fois plus faibles que celles utilisées pour déclencher un SDRA) augmente le taux de prostacycline, vasodilate les artérioles, réduit l'augmentation de PAP et empêche la redistribution du débit sanguin pulmonaire (27) (83). La composante hypoxique de la vasoconstriction après acide oléique peut être prévenue par l'établissement d'une alcalose métabolique (pH 7,60) avant la lésion (27). La vasoconstriction peut aussi être prévenue par la perfusion d'anti-

endothélines (comme le bosentan) (95), les endothélines A et B jouant un rôle important dans le tonus des muscles lisses artériolaires. Limiter la vasoconstriction protectrice augmente la perfusion des zones lésées ce qui aggrave la lésion. Cette redistribution du flux sanguin pulmonaire peut au contraire être renforcée : l'effet vasodilatateur d'une perfusion d'endotoxine disparaît si l'on administre conjointement un anti cyclo-oxygénase (meclofenamate) qui inhibe la synthèse de la prostacycline vasodilatatrice (83). Avant la lésion à l'acide oléique, un prétraitement par indométhacine (inhibant la cyclo-oxygénase) ou par Nomega-nitro-L-arginine (qui inhibe la NO synthétase) renforce la vasoconstriction hypoxique et limite la lésion pulmonaire (113).

Par contre les traitements vasodilatateurs comme l'endotoxine, la prostacycline ou le nitroprussiate de sodium administrés *a posteriori*, une fois la lésion à l'acide oléique installée, sont inefficaces pour lever la vasoconstriction et la réduction de débit sanguin pulmonaire (172, 198). Schuster note (173) que le traitement par petites doses d'endotoxine relargue des prostacyclines en 30 à 45 minutes, et ce, aussi bien en prétraitement qu'en administration après la lésion. Malgré des taux plasmatiques similaires de prostacycline dans les 2 modes de traitement, la perfusion d'endotoxine débutée après la lésion ne réussit pas à modifier la pression artérielle pulmonaire ; cependant une petite redistribution du flux sanguin est observable grâce au PET-scan.

Ces observations sont en accord avec l'hypothèse des capillaires borgnes créés par vasoconstriction et par obstruction capillaire par des thrombi ; obstacles impossibles à lever par des traitement vasodilatateurs.

IV.3.2 L'effet des béta-agonistes varie selon le moment et selon le type de lésion

La plupart des études décrivent les phénomènes de vasoconstriction comme débutants au bout d'une heure et augmentant progressivement sur les 2 à 3 heures suivantes. Les manifestations hémodynamiques transitoires observées immédiatement après l'injection d'acide oléique sont en général liées au bolus lui-même et à sa mauvaise tolérance par l'organisme (170). Une injection très lente (sur 30 minutes) peut faire disparaître ces phénomènes hémodynamiques transitoires (186). L'augmentation de perméabilité capillaire est par contre immédiate et la formation d'œdème peut être objectivée dès la 10^{ème} minute et persister plusieurs heures (170).

Dans notre étude, au pic de la lésion (30 minutes après l'injection d'acide oléique) les dommages membranaires sont donc maximaux et la vasoconstriction protectrice n'a pas encore eu le temps d'intervenir. C'est probablement la raison de l'absence d'effet de la terbutaline perfusée précocement au moment du pic de perméabilité. La même augmentation de débit cardiaque au cours de la période de récupération, recrute des capillaires borgnes qui avaient été exclus de la circulation, ce qui accroît brutalement la filtration.

Les conséquences d'une augmentation de débit cardiaque sont également différentes selon le modèle lésionnel utilisé. Les lésions directes de l'endothélium capillaire pulmonaire provoquent probablement plus de nécroses et de phénomènes obstructifs conduisant à la formation de capillaires borgnes. Les études expérimentales décrivant des lésions primaires (directes) du poumon sont souvent aggravées par une augmentation de débit cardiaque et de pression artérielle pulmonaire. Cette aggravation liée au débit cardiaque a été souvent décrite dans les modèles de lésion à l'acide oléique (4, 87, 150, 158). Elle a été aussi observée au cours de lésions à l'HCl (188), à l'acétate de phorbol myristate (57), et dans des modèles de lésion pulmonaire par l'injection de micro-embols d'air (145).

A l'inverse, les lésions pulmonaires secondaires provoquées par une injection intraveineuse d'endotoxine ou par un sepsis sévère, semblent moins aggravées par les variations hémodynamiques dues aux béta-agonistes. Chez des moutons lésés à l'endotoxine, le traitement par la terbutaline limite la formation d'œdème (179) et limite l'accumulation pulmonaire de transferrine marquée à l'In¹¹¹ (213). Dans le même type de modèle, la perfusion de dobutamine n'augmente pas le débit lymphatique davantage que ne le fait la lésion elle-même, et la dobutamine ne paraît pas rouvrir les capillaires (106). Dans la

péritonite expérimentale chez le mouton, la dobutamine augmente modérément le débit lymphatique pulmonaire mais sans variation du transport capillaire des protéines (68).

Enfin dans un petit groupe de patients atteints de SDRA, une perfusion de terbutaline entraîne une réduction significative de l'accumulation de transferrine marquée à l'In¹³³ seulement chez les patients survivants, mais aucun effet chez les patients décédés (11).

Dans ces lésions pulmonaires par endotoxine ou choc septique, les lésions endothéliales sont probablement moins directes avec peu de nécroses et d'obstructions mécaniques conduisant à des capillaires borgnes. Les phénomènes réversibles d'accroissement de la perméabilité endothéliale paracellulaire y sont peut-être prépondérants. De ce fait ces modèles de lésion expérimentale sont probablement moins sensibles aux variations de débit cardiaque et une augmentation de débit cardiaque a moins de risque de recruter des capillaires borgnes lésés. Ces modèles sont peut-être plus accessibles au traitement par béta2-agonistes.

IV.4 Conséquences sur l'utilisation potentielle des béta2-agonistes

Il semble, d'après nos données et l'étude de la littérature, que les effets bénéfiques des béta2-mimétiques sur la perméabilité capillaro-alvéolaire puissent être, dans certaines circonstances, contrebalancés par une augmentation de débit cardiaque et de pression artérielle pulmonaire dues à leurs propriétés β_1 intrinsèques. Il est essentiel de limiter ces effets secondaires de manière à garder aux β_2 -agonistes leur intérêt dans le traitement de du SDRA. Tous les β_2 -mimétiques ont en gros les mêmes effets hémodynamiques (58). Même administrée sous forme d'aérosols, la terbutaline atteint des concentrations plasmatiques significatives susceptibles d'induire des effets sur la circulation systémique (100). Des concentrations de 10^{-6} Molaire de béta-agonistes ont une action positive sur la réabsorption épithéliale et les concentrations alvéolaires mesurées après administration par aérosols chez des patients atteints d'œdème pulmonaire atteignent facilement ces niveaux (6).

Une stratégie thérapeutique envisageable serait de diminuer autant que possible les posologies intra-veineuses de β_2 -agonistes, afin de limiter leurs conséquences hémodynamiques, tout en essayant d'augmenter, éventuellement par une association médicamenteuse, leurs effets bénéfiques AMPc-dépendants sur la perméabilité.

IV.5 Discussion du modèle de lésion à l'endotoxine

Le but de cette dernière série d'expériences était d'une part de profiter de l'expérience acquise grâce au premier modèle à l'acide oléique pour transposer la méthode sur un modèle plus proche de la clinique humaine, et d'autre part d'essayer d'autres substances élevant le taux intracellulaire d'AMPc afin de diminuer l'altération de perméabilité au cours de la lésion. Nous espérons par une association médicamenteuse réduire les posologies de béta-agoniste et minimiser leurs effets hémodynamiques. Enfin nous souhaitons tester l'effet préventif de ces substances, dans la mesure où elles peuvent-être efficaces à faibles doses, toujours dans une optique préclinique.

Cette étude est restée incomplète en raison de l'interruption de la mise à disposition des locaux destinés à l'expérimentation sur grands animaux.

Les chocs septiques dus à des bactéries Gram négatif sont très fréquemment à l'origine d'un SDRA chez l'homme (123). L'endotoxine bactérienne injectée par voie intra-veineuse reproduit sur l'animal les mécanismes du choc septique et provoque un SDRA proche de celui observés chez ce type de patients (26, 176, 206). Sa survenue est plus lente et moins brutale que celle du choc septique. En effet, dans notre étude l'augmentation de perméabilité n'est survenue qu'une heure après l'injection, sans réel pic de perméabilité. Un délai d'une à plusieurs heures est classiquement décrit avant l'observation d'une augmentation de perméabilité après administration d'endotoxine (25, 176).

La concentration de FITC-dextran qui s'accumulait dans l'alvéole en fin d'expérience était dix fois moins importante que lors de la lésion à l'acide oléique. La barrière épithéliale semble particulièrement résistante à l'agression par l'endotoxine (154, 211). Les dégâts cellulaires provoqués par l'endotoxine au niveau de la barrière capillaro-alvéolaire, sont probablement moins importants que ceux de l'acide oléique (166). L'augmentation de perméabilité au cours de la lésion à l'endotoxine semble essentiellement liée à des processus inflammatoires réversibles (90, 128, 144, 151, 207) avec probablement moins de lésions endothéliales directes comme dans la lésion à l'acide oléique (170).

Ce modèle de lésion est cependant moins standardisé que celui induit par l'acide oléique. Les effets semblent variables en fonction des souches de lipopolysaccharides(LPS) utilisées et de l'espèce animale étudiée. Le mouton a été très étudié (25, 71, 179, 211) ainsi que le chien bien que ce dernier semble plus résistant à l'endotoxine (94, 206) (26, 52). Les posologies proposées par les auteurs varient d'un facteur 1 à 100. Bien que certains auteurs

aient utilisé du LPS de *Salmonella enteritidis* (206), le LPS d'*E. Coli* est l'endotoxine la plus fréquemment citée mais avec, là encore, des disparités dans les souches utilisées comme la souche 0127:B8 (179) ou bien la souche 055:B5 (52).

Les effets hémodynamiques de la lésion à l'endotoxine sont moins immédiats que ceux de l'acide oléique.

Dans notre série, l'endotoxine affecte peu le débit cardiaque et les pressions artérielles pulmonaires mais diminue la pression artérielle systémique des animaux. Les résistances pulmonaires sont peu modifiées. Ces constatations sont concordantes avec celles publiées dans la littérature qui relatent fréquemment un débit cardiaque stable avec une diminution des résistances vasculaires systémiques et une augmentation parfois retardée des résistances pulmonaires (144) (51, 52, 109).

La lésion pulmonaire à l'endotoxine offre donc un modèle plus progressif de SDRA, se rapprochant davantage du contexte clinique. Néanmoins la grande variabilité des effets sur les différentes espèces en fonction des souches et des posologies utilisées en font pour l'instant un modèle difficile à standardiser pour des comparaisons entre études pré-cliniques.

IV.6 Discussion du traitement par rolipram et salmeterol

Notre dernière série d'expériences a montré un effet significatif, sur l'accumulation de FITC-dextran alvéolaire, de l'association du rolipram et du salmeterol.

Ces deux substances augmentent l'AMPC intra-cellulaire. Les béta2-agonistes (comme le salmeterol) stimulant l'adénylate cyclase, les inhibiteurs de la phosphodiesterase 4 (comme le rolipram) diminuant la destruction d'AMPC. Les cellules endothéliales capillaires pulmonaires semblent plus réceptives à l'inhibition de la phosphodiesterase 4 qu'à la stimulation de l'adénylate cyclase (184) (204) peut-être parce que l'activité de la PDE-4 y est plus importante que dans les cellules endothéliales artérielles pulmonaires (45). L'effet synergique de l'association des 2 classes médicamenteuses (inhibiteurs de PDE-4 et β_2 -agoniste) a été montré dans plusieurs études. Le taux d'AMPC dans des cellules endothéliales capillaires pulmonaires est 15 fois plus élevé avec une association rolipram + β -agoniste que sous l'action de chaque médicament testé isolément (192). Adamson & col. (1) ont par ailleurs constaté un plus grand nombre de jonctions intercellulaires serrées sur des cultures de cellules capillaires pulmonaires traitées avec telle association médicamenteuse qu'avec les traitements utilisés seuls.

Un des objectifs recherchés par l'association de ces 2 classes de médicaments était de profiter de leur synergie pharmacologique sur le taux d'AMPc intra-cellulaire pour réduire les posologies de β_2 -agoniste et limiter ainsi l'augmentation de débit cardiaque et de PAP observée précédemment sous terbutaline et probablement à l'origine de l'aggravation de la lésion à l'acide oléique. Dans la même optique nous avons décidé de remplacer la terbutaline par le salmeterol, un β_2 -agoniste réputé avoir moins d'effets hémodynamiques que la terbutaline ou le salbutamol (36, 155).

Si l'association médicamenteuse rolipram – salmeterol a montré, dans notre série, son efficacité pour réduire l'accumulation alvéolaire de FITC-dextran, en revanche elle n'a pas réussi à limiter l'augmentation de débit cardiaque et de pression artérielle pulmonaire. Le rolipram ayant parmi ses effets secondaires une action tachycardisante (ainsi que action émétisante et des effets réveillants) (89) peut-être la synergie pharmacologique avec les β_2 -agonistes s'applique-t-elle aussi à ces effets hémodynamiques ce qui expliquerait que malgré de très faibles doses de salmeterol nous enregistrons des effets hémodynamiques marqués.

Cette augmentation du flux sanguin pulmonaire et de la PAP n'a pas aggravé la lésion contrairement au modèle à l'acide oléique. Peut-être faut-il voir là une plus grande efficacité thérapeutique de cette association sur la perméabilité endothéliale paracellulaire. Le fait que le traitement ait été administré à titre préventif, avant l'initiation de la lésion, a peut-être contribué à améliorer son efficacité.

Enfin, la différence de modèle de lésion a probablement joué un rôle. En effet la lésion à l'endotoxine est beaucoup moins agressive que celle à l'acide oléique. Elle entraîne probablement moins d'obstructions capillaires par des débris cellulaires et des thrombi (86, 132, 164) que l'acide oléique qui lèse lui plus directement les cellules endothéliales (15). La lésion à l'endotoxine génère probablement moins de capillaires borgnes, très perméables lorsqu'ils sont recrutés par une augmentation de débit cardiaque.

Nous pensons donc qu'une grande part du retentissement sur la perméabilité des variations hémodynamiques induites par les β_2 -agonistes est conditionnée par le type et la gravité de la lésion.

V – CONCLUSIONS

V – Conclusions

L'objectif initial de cette étude était de mettre au point une technique permettant d'effectuer des mesures répétées de la perméabilité capillaro-alvéolaire aux macromolécules plasmatiques s'accumulant dans le poumon au cours d'œdèmes pulmonaires inflammatoires qui imitent le syndrome de détresse respiratoire aiguë chez les patients (SDRA). Cette perméabilité est maximale à la phase aiguë, exudative, du SDRA et les études cliniques montrent un lien entre l'accumulation protéique alvéolaire et la survie des patients. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier l'évolution de cette perméabilité capillaro-alvéolaire durant les premières heures de la phase aiguë de la lésion inflammatoire et de tester une thérapeutique controversée dans un modèle expérimental de type pré-clinique.

Nous avons pour cela adapté une technique, précédemment développée dans notre laboratoire, de lavage broncho-alvéolaire (LBA) à saturation chez le chien sous anesthésie générale. Cette technique isole le compartiment pulmonaire lavé, tout en prenant les précautions nécessaires pour éviter une surpression dans ce compartiment. Cette technique assure un mélange homogène avec le liquide alvéolaire par la mobilisation de grands volumes de liquide au cours du lavage. La taille du compartiment lavé peut être connue grâce à la mesure d'un traceur de dilution (Albumine-I¹²⁵). Cette mesure permet de contrôler *a posteriori* la stabilité du volume du site de lavage au cours du temps.

Un indicateur macromoléculaire marqué à la fluorescéine (FITC-dextran) était perfusé dans le sang à débit constant. Nous avons étudié le transport de ce traceur plasmatique du sang vers l'alvéole pulmonaire à l'état normal, et au cours d'une lésion à l'acide oléique. Les données étaient analysées par un modèle bicompartimental qui permettait de déterminer un coefficient d'entrée du FITC-dextran du sang vers l'alvéole pulmonaire (min⁻¹).

Un point de mesure était réalisé toutes les 15 minutes par échantillonnage régulier du liquide de LBA et ce pendant trois heures et demie. Nous avons par ailleurs évalué l'effet d'un traitement par β 2-agoniste (terbutaline) administré soit juste après la lésion, soit plus tardivement 90 minutes après l'injection d'acide oléique. D'après de nombreuses études *in vitro*, la terbutaline est réputée réduire l'augmentation de la perméabilité capillaro-alvéolaire aux protéines au cours des lésions inflammatoires, par la stimulation de l'adénylate cyclase augmentant le taux d'AMPc intra-cellulaire. En revanche, ses effets *in vivo* sont controversés.

Nos résultats montrent que l'injection intra-veineuse d'acide oléique est suivie d'un pic d'augmentation du transport capillaro-alvéolaire de FITC-dextran dans la première demi-heure (pic de la lésion), suivi d'un retour progressif vers les valeurs normales. La perfusion précoce de terbutaline ne modifie pas cette cinétique alors qu'une perfusion tardive au cours de la phase de récupération entraîne un rebond de transport de FITC-dextran. La perfusion de terbutaline s'accompagne par ailleurs d'une augmentation de débit cardiaque, d'une augmentation de la pression artérielle pulmonaire et de la pression capillaire, ainsi que d'une baisse des résistances vasculaires pulmonaires.

Par rapport aux techniques existantes notre méthode présente plusieurs avantages. Sa simplicité de mise en œuvre, sa fréquence de mesure élevée et sa bonne sensibilité en font un outil intéressant pour suivre l'évolution de la perméabilité globale de la barrière capillaro-alvéolaire au cours d'études pré-cliniques.

Ses inconvénients sont essentiellement mécaniques. L'encombrement du dispositif de LBA dans l'arbre trachéo-bronchique restreint pour l'instant son utilisation aux études sur de gros animaux. La pression positive générée dans l'alvéole par le liquide de lavage, même si elle est faible, gêne la filtration liquidienne de l'interstitium vers l'alvéole et limite l'appréciation de la formation d'œdème alvéolaire.

L'absence d'effet de la terbutaline perfusée précocement et le rebond de perméabilité sous terbutaline tardive ont été reliés, d'une part aux effets hémodynamiques marqués de la terbutaline, d'autre part à la particularité de la lésion pulmonaire par l'acide oléique qui est une lésion rapide et sévère du lit capillaire pulmonaire. La terbutaline injectée immédiatement après l'acide oléique ne parvient pas à limiter l'augmentation de perméabilité au moment du pic de la lésion. Son action est difficile à interpréter en phase de récupération de la lésion. En revanche la perfusion de terbutaline tardive durant la phase de récupération de la lésion, entraîne une aggravation du transport de FITC-dextran. Nous interprétons cette aggravation comme une ré-ouverture à la circulation sanguine de capillaires fortement lésés qui avaient été dérecrutés par une vasoconstriction protectrice d'origine hypoxique et/ou inflammatoire.

Nous avons commencé une autre série d'expériences visant à transposer cette méthode sur un modèle de lésion inflammatoire du poumon par injection d'endotoxine bactérienne (LPS d'E.Coli) dont l'effet est plus progressif et peut-être plus proche des conditions de survenue d'un SDRA en clinique humaine. Dans cette nouvelle série d'expériences nous avons également cherché à limiter les effets hémodynamiques des β 2-agonistes en diminuant beaucoup les posologies administrées tout en escomptant une synergie

pharmacologique sur l'accroissement du taux d'AMPc intra cellulaire par l'adjonction de rolipram, un inhibiteur des phosphodiesterases-4. Du fait des faibles doses, nous cherchions à tester l'effet d'un tel traitement commencé en préventif, avant le début de la lésion.

Les résultats partiels et préliminaires de cette nouvelle série montrent un échec de cette tentative de limitation des effets hémodynamiques. L'augmentation de débit cardiaque, de pression artérielle pulmonaire, et de pression capillaire est très marquée pendant la perfusion de l'association rolipram - salmeterol. Par contre ce traitement par rolipram - salmeterol réduit significativement l'augmentation de perméabilité au FITC-dextran de la barrière capillaro-alvéolaire après l'injection d'endotoxine.

Nous faisons l'hypothèse que la lésion à l'endotoxine, dont l'effet sur le transport capillaro-alvéolaire du FITC-dextran est 10 fois plus faible que l'acide oléique, est moins aggravée par une augmentation de débit cardiaque qu'une lésion à l'acide oléique. Ceci est peut-être dû à l'existence d'un plus faible nombre de capillaires gravement lésés (décrits comme des capillaires borgnes) dans la lésion à l'endotoxine que dans la lésion à l'acide oléique. Dans la lésion à l'acide oléique, le recrutement de ce type de capillaires par l'augmentation de débit cardiaque conditionnerait l'aggravation de la perméabilité et l'absence de manifestation des effets bénéfiques des médicaments augmentant l'AMPc intra-cellulaire.

En conclusion, notre technique est avant tout un outil permettant le suivi de l'évolution de la perméabilité capillaro-alvéolaire des macromolécules plasmatiques à la phase aiguë d'une lésion pulmonaire inflammatoire. Notre méthode permet de comparer les différents modèles de lésion, d'émettre des hypothèses sur leurs mécanismes *in vivo*, et de tester les effets des thérapeutiques supposées efficaces sur la perméabilité et ce à différents moments par rapport à l'initiation de la lésion.

La méthode doit évoluer, peut-être dans le sens d'une miniaturisation du dispositif de lavage, pour pouvoir être appliquée soit à des petits animaux pour des séries plus importantes, soit à l'homme.

VI – RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VI – Références bibliographiques

1. **Adamson RH, Liu B, Fry GN, Rubin LL, and Curry FE.** Microvascular permeability and number of tight junctions are modulated by cAMP. *Am J Physiol* 274: H1885-1894, 1998.
2. **Allegra L and Piatti G.** Architecture of alveolar ducts, sacs, alveoli and non resident cells. In: *Lungscapes Chap. 6*, edited by L. BPCA. Berlin, 1992, p. 59-76.
3. **Allen MJ and Coleman RA.** Beta 2-adrenoceptors mediate a reduction in endothelial permeability in vitro. *Eur J Pharmacol* 274: 7-15., 1995.
4. **Anglade D, Corboz M, Menaouar A, Parker JC, Sanou S, Bayat S, Benchetrit G, and Grimbert FA.** Blood flow vs. venous pressure effects on filtration coefficient in oleic acid-injured lung. *J Appl Physiol* 84: 1011-1023., 1998.
5. **Artigas A, Bernard GR, Carlet J, Dreyfuss D, Gattinoni L, Hudson L, Lamy M, Marini JJ, Matthay MA, Pinsky MR, Spragg R, and Suter PM.** The American-European Consensus Conference on ARDS, part 2: Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies, and issues related to recovery and remodeling. Acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1332-1347., 1998.
6. **Atabai K, Ware LB, Snider ME, Koch P, Daniel B, Nuckton TJ, and Matthay MA.** Aerosolized beta(2)-adrenergic agonists achieve therapeutic levels in the pulmonary edema fluid of ventilated patients with acute respiratory failure. *Intensive Care Med* 28: 705-711., 2002.
7. **Bachofen M and Weibel ER.** Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* 116: 589-615, 1977.
8. **Bachofen M and Weibel ER.** Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 3: 35-56, 1982.
9. **Barrowcliffe MP, Zanelli GD, and Jones JG.** Pulmonary clearance of radiotracers after positive end-expiratory pressure or acute lung injury. *J Appl Physiol* 66: 288-294., 1989.
10. **Basran GS, Byrne AJ, and Hardy JG.** A noninvasive technique for monitoring lung vascular permeability in man. *Nucl Med Commun* 6: 3-10, 1985.
11. **Basran GS, Hardy JG, Woo SP, Ramasubramanian R, and Byrne AJ.** Beta-2-adrenoceptor agonists as inhibitors of lung vascular permeability to radiolabelled transferrin in the adult respiratory distress syndrome in man. *Eur J Nucl Med* 12: 381-384., 1986.
12. **Bayat S, Anglade D, Menaouar A, Martiel JL, Lafond JL, Benchetrit G, and Grimbert FA.** In vivo measurement of lung capillary-alveolar macromolecule permeability by saturation bronchoalveolar lavage. *Crit Care Med* 28: 2937-2942., 2000.
13. **Bayat S and Grimbert F.** Experimental and clinical measurement of pulmonary edema. In: *Methods in pulmonary research*, edited by Uhlig S and Taylor AE. Basel: Birkhäuser, 1998, p. 161-223.
14. **Bayat S, Menaouar A, Anglade D, Ettinger H, Francois-Joubert A, Benchetrit G, and Grimbert FA.** In vivo quantitation of epithelial lining fluid in dog lung. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 1715-1723., 1998.
15. **Beilman G.** Pathogenesis of oleic acid-induced lung injury in the rat: distribution of oleic acid during injury and early endothelial cell changes. *Lipids* 30: 817-823, 1995.
16. **Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, Legall JR, Morris A, and Spragg R.** The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 818-824., 1994.
17. **Berner ME, Teague WG, Jr., Scheerer RG, and Bland RD.** Furosemide reduces lung fluid filtration in lambs with lung microvascular injury from air emboli. *J Appl Physiol* 67: 1990-1996, 1989.
18. **Berthezene Y, Vexler V, Jerome H, Sievers R, Moseley ME, and Brasch RC.** Differentiation of capillary leak and hydrostatic pulmonary edema with a macromolecular MR imaging contrast agent. *Radiology* 181: 773-777, 1991.

19. **Berthiaume Y, Broaddus VC, Gropper MA, Tanita T, and Matthay MA.** Alveolar liquid and protein clearance from normal dog lungs. *J Appl Physiol* 65: 585-593., 1988.
20. **Berthiaume Y, Staub NC, and Matthay MA.** Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep. *J Clin Invest* 79: 335-343., 1987.
21. **Blomqvist H, Berg B, Frostell C, Wickerts CJ, and Hedenstierna G.** Net fluid leakage (LN) in experimental pulmonary oedema in the dog. *Acta Anaesthesiol Scand* 34: 377-383, 1990.
22. **Blomqvist H, Berg B, Frostell C, Wickerts CJ, and Hedenstierna G.** Thoracic lymph drainage in the dog: evaluation of a new model. *Intensive Care Med* 17: 45-51, 1991.
23. **Bo G, Hauge A, and Nicolaysen G.** Alveolar pressure and lung volume as determinants of net transvascular fluid filtration. *J Appl Physiol* 42: 476-482, 1977.
24. **Brasch RC, Berthezene Y, Vexler V, Rosenau W, Clement O, Muhler A, Kuwatsuru R, and Shames DM.** Pulmonary oxygen toxicity: demonstration of abnormal capillary permeability using contrast-enhanced MRI. *Pediatr Radiol* 23: 495-500, 1993.
25. **Brigham KL, Bowers R, and Haynes J.** Increased sheep lung vascular permeability caused by Escherichia coli endotoxin. *Circ Res* 45: 292-297, 1979.
26. **Brigham KL and Meyrick B.** Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 133: 913-927, 1986.
27. **Brimioulle S, Julien V, Gust R, Kozlowski JK, Naeije R, and Schuster DP.** Importance of hypoxic vasoconstriction in maintaining oxygenation during acute lung injury. *Crit Care Med* 30: 874-880, 2002.
28. **Broaddus VC, Wiener-Kronish JP, and Staub NC.** Clearance of lung edema into the pleural space of volume-loaded anesthetized sheep. *J Appl Physiol* 68: 2623-2630, 1990.
29. **Brochard L and Maggiore S.** Syndrome de détresse respiratoire aiguë. Evaluation et monitoring des anomalies mécaniques ventilatoires. *Réanimation* 10: 22-26, 2001.
30. **Brower RG, Ware LB, Berthiaume Y, and Matthay MA.** Treatment of ARDS. *Chest* 120: 1347-1367., 2001.
31. **Brun-Buisson C, Minelli C, and Bertolini G.** Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med* 30: 51-61, 2004.
32. **Calandrino FS, Jr., Anderson DJ, Mintun MA, and Schuster DP.** Pulmonary vascular permeability during the adult respiratory distress syndrome: a positron emission tomographic study. *Am Rev Respir Dis* 138: 421-428, 1988.
33. **Campbell AR, Folkesson HG, Berthiaume Y, Gutkowska J, Suzuki S, and Matthay MA.** Alveolar epithelial fluid clearance persists in the presence of moderate left atrial hypertension in sheep. *J Appl Physiol* 86: 139-151, 1999.
34. **Carlile PV and Gray BA.** Type of lung injury influences the thermal-dye estimation of extravascular lung water. *J Appl Physiol* 57: 680-685, 1984.
35. **Caruthers SD, Paschal CB, Pou NA, and Harris TR.** Relative quantification of pulmonary edema with noncontrast-enhanced MRI. *J Magn Reson Imaging* 7: 544-550, 1997.
36. **Cazzola M, Imperatore F, Salzillo A, Di Perna F, Calderaro F, Imperatore A, and Matera MG.** Cardiac effects of formoterol and salmeterol in patients suffering from COPD with preexisting cardiac arrhythmias and hypoxemia. *Chest* 114: 411-415., 1998.
37. **Chapman HA.** Disorders of lung matrix remodeling. *J Clin Invest* 113: 148-157, 2004.
38. **Charach G, Rabinovich P, Grosskopf I, and Weintraub M.** Transthoracic monitoring of the impedance of the right lung in patients with cardiogenic pulmonary edema. *Crit Care Med* 29: 1137-1144, 2001.
39. **Chen XJ, Eaton DC, and Jain L.** Beta-adrenergic regulation of amiloride-sensitive lung sodium channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L609-620, 2002.

40. **Cioffi DL, Moore TM, Schaack J, Creighton JR, Cooper DM, and Stevens T.** Dominant regulation of interendothelial cell gap formation by calcium-inhibited type 6 adenylyl cyclase. *J Cell Biol* 157: 1267-1278, 2002.
41. **Clark JG, Milberg JA, Steinberg KP, and Hudson LD.** Type III procollagen peptide in the adult respiratory distress syndrome. Association of increased peptide levels in bronchoalveolar lavage fluid with increased risk for death. *Ann Intern Med* 122: 17-23, 1995.
42. **Cooke BA.** Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 151: 25-35, 1999.
43. **Corboz M, Sanou S, and Grimbert F.** Capillary pressure estimates from arterial and venous occlusion in intact dog lung. *Eur Respir J* 8: 1122-1129, 1995.
44. **Crapo JD, Crapo RO, Jensen RL, Mercer RR, and Weibel ER.** Evaluation of lung diffusing capacity by physiological and morphometric techniques. *J Appl Physiol* 64: 2083-2091, 1988.
45. **Creighton JR, Masada N, Cooper DM, and Stevens T.** Coordinate regulation of membrane cAMP by Ca²⁺-inhibited adenylyl cyclase and phosphodiesterase activities. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L100-107, 2003.
46. **Crestani B, Jaffré S, and Stern JB.** Réparation Alvéolaire. *Réanimation* 10: 27-33, 2001.
47. **Curry FE.** Mechanics and thermodynamics of transcapillary exchange. In: *Handbook of Physiology. The cardiovascular system. Microcirculation.*, edited by M.D. APFaADFB: Am. Physiol. Society, 1984, p. 309-374.
48. **Dallal MM and Chang SW.** Evans blue dye in the assessment of permeability-surface area product in perfused rat lungs. *J Appl Physiol* 77: 1030-1035, 1994.
49. **Deheinzelin D, Jatene FB, Saldiva PH, and Brentani RR.** Upregulation of collagen messenger RNA expression occurs immediately after lung damage. *Chest* 112: 1184-1188, 1997.
50. **Dhingra VK, Uusaro A, Holmes CL, and Walley KR.** Attenuation of lung inflammation by adrenergic agonists in murine acute lung injury. *Anesthesiology* 95: 947-953, 2001.
51. **D'Orio V, Halleux J, Rodriguez LM, Wahlen C, and Marcelle R.** Effects of Escherichia coli endotoxin on pulmonary vascular resistance in intact dogs. *Crit Care Med* 14: 802-806, 1986.
52. **D'Orio V, Wahlen C, Rodriguez LM, Fossion A, Juchmes J, Halleux J, and Marcelle R.** A comparison of Escherichia coli endotoxin single bolus injection with low-dose endotoxin infusion on pulmonary and systemic vascular changes. *Circ Shock* 21: 207-216, 1987.
53. **Dvorak AM and Feng D.** The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem Cytochem* 49: 419-432, 2001.
54. **Dyess DL, Hunter JL, Lakey JR, Moyer D, Dougherty FC, and Townsley MI.** Attenuation of histamine-induced endothelial permeability responses after pacing-induced heart failure: role for endogenous catecholamines. *Microcirculation* 7: 307-315, 2000.
55. **Effros RM, Hacker A, Jacobs E, Audi S, and Murphy C.** Continuous measurements of changes in pulmonary capillary surface area with 201Tl infusions. *J Appl Physiol* 77: 2093-2103, 1994.
56. **Ehrhart IC, McCloud LL, Orfanos SE, Catravas JD, and Hofman WF.** Effect of high blood flow on pulmonary vascular permeability to protein. *J Appl Physiol* 76: 2342-2347, 1994.
57. **Ehrhart IC, Orfanos SE, McCloud LL, Sickles DW, Hofman WF, and Catravas JD.** Vascular recruitment increases evidence of lung injury. *Crit Care Med* 27: 120-129, 1999.
58. **Eryonucu B, Uzun K, Guler N, and Bilge M.** Comparison of the acute effects of salbutamol and terbutaline on heart rate variability in adult asthmatic patients. *Eur Respir J* 17: 863-867., 2001.
59. **Fein A, Grossman RF, Jones JG, Goodman PC, and Murray JF.** Evaluation of transthoracic electrical impedance in the diagnosis of pulmonary edema. *Circulation* 60: 1156-1160, 1979.
60. **Fernandez-Mondejar E, Castano-Perez J, Rivera-Fernandez R, Colmenero-Ruiz M, Manzano F, Perez-Villares J, and de la Chica R.** Quantification of lung water by transpulmonary thermodilution in normal and edematous lung. *J Crit Care* 18: 253-258, 2003.

61. **Folkesson HG, Matthay MA, Westrom BR, Kim KJ, Karlsson BW, and Hastings RH.** Alveolar epithelial clearance of protein. *J Appl Physiol* 80: 1431-1445., 1996.
62. **Folkesson HG, Westrom BR, and Karlsson BW.** Permeability of the respiratory tract to different-sized macromolecules after intratracheal instillation in young and adult rats. *Acta Physiol Scand* 139: 347-354, 1990.
63. **Folkesson HG, Westrom BR, Pierzynowski SG, and Karlsson BW.** Lung to blood passage of different-sized molecules during lung inflammation in the rat. *J Appl Physiol* 71: 1106-1111, 1991.
64. **Fuchs-Buder T, de Moerloose P, Ricou B, Reber G, Vifian C, Nicod L, Romand JA, and Suter PM.** Time course of procoagulant activity and D dimer in bronchoalveolar fluid of patients at risk for or with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 163-167, 1996.
65. **Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Kimura G, Kawanami O, and Masugi Y.** The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am J Pathol* 126: 171-182, 1987.
66. **Gaar KA, Jr., Taylor AE, Owens LJ, and Guyton AC.** Pulmonary capillary pressure and filtration coefficient in the isolated perfused lung. *Am J Physiol* 213: 910-914, 1967.
67. **Gattinoni L, Presenti A, Torresin A, Baglioni S, Rivolta M, Rossi F, Scarani F, Marcolin R, and Cappelletti G.** Adult respiratory distress syndrome profiles by computed tomography. *J Thorac Imaging* 1: 25-30, 1986.
68. **Gnidec AG, Finley RR, and Sibbald WJ.** Effect of dobutamine on lung microvascular fluid flux in sheep with "sepsis syndrome". *Chest* 93: 180-186, 1988.
69. **Godje O, Peyerl M, Seebauer T, Dewald O, and Reichart B.** Reproducibility of double indicator dilution measurements of intrathoracic blood volume compartments, extravascular lung water, and liver function. *Chest* 113: 1070-1077, 1998.
70. **Goodman BE, Fleischer RS, and Crandall ED.** Evidence for active Na⁺ transport by cultured monolayers of pulmonary alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 245: C78-83, 1983.
71. **Gorin AB.** Noninvasive measurement of regional interstitial lung volume in sheep. *J Appl Physiol* 64: 1561-1566., 1988.
72. **Gorin AB, Kohler J, and DeNardo G.** Noninvasive measurement of pulmonary transvascular protein flux in normal man. *J Clin Invest* 66: 869-877., 1980.
73. **Granger DN and Taylor AE.** Permeability of intestinal capillaries to endogenous macromolecules. *Am J Physiol* 238: H457-464., 1980.
74. **Gray BA, Beckett RC, Allison RC, McCaffree DR, Smith RM, Sivak ED, and Carlile PV, Jr.** Effect of edema and hemodynamic changes on extravascular thermal volume of the lung. *J Appl Physiol* 56: 878-890, 1984.
75. **Grimbert F, Teboul JL, and Amardeil P.** Pression capillaire et oedème pulmonaire. In: *Oedèmes Pulmonaires*, edited by Masson. Paris: Lemaire, F. Zelter, M., 1992, p. 61-88.
76. **Grimbert FA.** Effective pulmonary capillary pressure. *Eur Respir J* 1: 297-301, 1988.
77. **Grimbert FA, Martin D, Parker JC, and Taylor AE.** Lymph flow during increases in pulmonary blood flow and microvascular pressure in dogs. *Am J Physiol* 255: H1149-1155, 1988.
78. **Grimbert FA, Parker JC, and Taylor AE.** Increased pulmonary vascular permeability following acid aspiration. *J Appl Physiol* 51: 335-345, 1981.
79. **Groeneveld AB.** Radionuclide assessment of pulmonary microvascular permeability. *Eur J Nucl Med* 24: 449-461., 1997.
80. **Groeneveld AB.** Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Vascul Pharmacol* 39: 247-256, 2002.
81. **Groeneveld AB, den Hollander W, Straub J, Nauta JJ, and Thijs LG.** Effects of N-acetylcysteine and terbutaline treatment on hemodynamics and regional albumin extravasation in porcine septic shock. *Circ Shock* 30: 185-205., 1990.

82. **Guery BP, Mason CM, Dobard EP, Beaucaire G, Summer WR, and Nelson S.** Keratinocyte growth factor increases transalveolar sodium reabsorption in normal and injured rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 1777-1784., 1997.
83. **Gust R, Kozlowski J, Stephenson AH, and Schuster DP.** Synergistic hemodynamic effects of low-dose endotoxin and acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1919-1926, 1998.
84. **Hakim TS, Maarek JM, and Chang HK.** Estimation of pulmonary capillary pressure in intact dog lungs using the arterial occlusion technique. *Am Rev Respir Dis* 140: 217-224, 1989.
85. **Hara N, Furukawa T, Yoshida T, Motohiro A, and Inokuchi K.** Effect of free fatty acid on pulmonary transvascular fluid and protein exchange. *ResExpMedBerl* 184: 41-48, 1984.
86. **Hasan FM, Teplitz C, Farrugia R, Huan E, and Schwartz S.** Lung function and structure after *Escherichia coli* endotoxin in rabbits: effect of dose and rate of administration. *Circ Shock* 13: 1-19, 1984.
87. **Hasinoff I, Ducas J, and Prewitt RM.** Increased cardiac output increases lung water in canine permeability pulmonary edema. *J Crit Care* 3: 225 - 231, 1988.
88. **Hastings RH, Folkesson HG, and Matthay MA.** Mechanisms of alveolar protein clearance in the intact lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L679-689, 2004.
89. **Heaslip RJ and Evans DY.** Emetic, central nervous system, and pulmonary activities of rolipram in the dog. *Eur J Pharmacol* 286: 281-290., 1995.
90. **Hirano S, Rees RS, Yancy SL, Welsh MJ, Remick DG, Yamada T, Hata J, and Gilmont RR.** Endothelial barrier dysfunction caused by LPS correlates with phosphorylation of HSP27 in vivo. *Cell Biol Toxicol* 20: 1-14, 2004.
91. **Hoegerle S, Benzing A, Nitzsche EU, Moenting JS, Reinhardt MJ, Geiger K, and Moser E.** Radioisotope albumin flux measurement of microvascular lung permeability: an independent parameter in acute respiratory failure? *Nuklearmedizin* 40: 44-50, 2001.
92. **Holm C, Tegeler J, Mayr M, Pfeiffer U, Henckel von Donnersmarck G, and Muhlbauer W.** Effect of crystalloid resuscitation and inhalation injury on extravascular lung water: clinical implications. *Chest* 121: 1956-1962, 2002.
93. **Hu X, Adamson RH, Liu B, Curry FE, and Weinbaum S.** Starling forces that oppose filtration after tissue oncotic pressure is increased. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H1724-1736, 2000.
94. **Hubbard JD and Janssen HF.** Increased microvascular permeability in canine endotoxic shock: protective effects of ibuprofen. *Circ Shock* 26: 169-183., 1988.
95. **Hubloue I, Biarent D, Abdel Kafi S, Bejjani G, Melot C, Naeije R, and Leeman M.** Endothelin receptor blockade in canine oleic acid-induced lung injury. *Intensive Care Med* 29: 1003-1006, 2003.
96. **Icard P and Saumon G.** Alveolar sodium and liquid transport in mice. *Am J Physiol* 277: L1232-1238., 1999.
97. **Idell S.** Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit Care Med* 31: S213-220, 2003.
98. **Ishibashi M, Reed RK, Townsley MI, Parker JC, and Taylor AE.** Albumin transport across pulmonary capillary-interstitial barrier in anesthetized dogs. *J Appl Physiol* 70: 2104-2110., 1991.
99. **Jain L, Chen XJ, Ramosevac S, Brown LA, and Eaton DC.** Expression of highly selective sodium channels in alveolar type II cells is determined by culture conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L646-658, 2001.
100. **Janson C and Herala M.** Plasma terbutaline levels in nebulisation treatment of acute asthma. *Pulm Pharmacol* 4: 135-139, 1991.
101. **Julien M, Hoeffel JM, and Flick MR.** Oleic acid lung injury in sheep. *J Appl Physiol* 60: 433-440, 1986.

102. **Kaplan JD, Calandrino FS, and Schuster DP.** A positron emission tomographic comparison of pulmonary vascular permeability during the adult respiratory distress syndrome and pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 143: 150-154, 1991.
103. **Kaplan JD, Trulock EP, Anderson DJ, and Schuster DP.** Pulmonary vascular permeability in interstitial lung disease. A positron emission tomographic study. *Am Rev Respir Dis* 145: 1495-1498, 1992.
104. **Kedem O and Katchalsky A.** Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes. 1958. *Biochim Biophys Acta* 1000: 413-430., 1989.
105. **Kim KJ and Malik AB.** Protein transport across the lung epithelial barrier. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L247-259., 2003.
106. **Knox J, Youn YK, Lalonde C, and Demling R.** Effect of dobutamine on oxygen consumption and fluid and protein losses after endotoxemia. *Crit Care Med* 19: 525-531, 1991.
107. **Kreienberg PB, Vincent PA, Bell DR, Saba TM, and Minnear FL.** Isoproterenol decreases protein permeability in edematous isolated rabbit lungs: estimation of PS and sigma. *J Appl Physiol* 77: 325-331., 1994.
108. **Krombach F, Fiehl E, Burkhardt D, Rienmuller R, Konig G, Adelmann-Grill BC, Idel H, and Rosenbruch M.** Short-term and long-term effects of serial bronchoalveolar lavages in a nonhuman primate model. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 153-158, 1994.
109. **Lambermont B, Kolh P, Detry O, Gerard P, Marcelle R, and D'Orio V.** Analysis of endotoxin effects on the intact pulmonary circulation. *Cardiovasc Res* 41: 275-281, 1999.
110. **Lange NR, Kozlowski JK, Gust R, Shapiro SD, and Schuster DP.** Effect of partial liquid ventilation on pulmonary vascular permeability and edema after experimental acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 271-277, 2000.
111. **Lasnier JM, Wangenstein OD, Schmitz LS, Gross CR, and Ingbar DH.** Terbutaline stimulates alveolar fluid resorption in hyperoxic lung injury. *J Appl Physiol* 81: 1723-1729., 1996.
112. **Lee BS, Gupta S, Krisnanchettier S, and Lateef SS.** Catching protein antigens by antibody affinity electrophoresis. *Electrophoresis* 25: 3331-3335, 2004.
113. **Leeman M, de Beyl VZ, Biarent D, Maggiorini M, Melot C, and Naeije R.** Inhibition of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in hypoxic vasoconstriction and oleic acid-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 1383-1390, 1999.
114. **Leeman M, De Beyl VZ, Gilbert E, Melot C, and Naeije R.** Is nitric oxide released in oleic acid lung injury? *J Appl Physiol* 74: 650-654, 1993.
115. **Li CY, Tsai CS, Hsu PC, Wu CT, Wong CS, and Ho ST.** Dobutamine modulates lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory protein-1alpha and interleukin-8 production in human monocytes. *Anesth Analg* 97: 210-215, table of contents, 2003.
116. **Liaw WJ, Tzao C, Wu JY, Chen SJ, Wang JH, and Wu CC.** Inhibition by terbutaline of nitric oxide and superoxide anion levels of endotoxin-induced organs injury in the anesthetized rat. *Shock* 19: 281-288, 2003.
117. **Liu X, Ostrom RS, and Insel PA.** cAMP-elevating agents and adenylyl cyclase overexpression promote an antifibrotic phenotype in pulmonary fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1089-1099, 2004.
118. **Loer SA and Tarnow J.** Partial liquid ventilation reduces fluid filtration of isolated rabbit lungs with acute hydrochloric acid-induced edema. *Anesthesiology* 94: 1045-1049, 2001.
119. **Maggiorini M, Melot C, Pierre S, Pfeiffer F, Greve I, Sartori C, Lepori M, Hauser M, Scherrer U, and Naeije R.** High-Altitude Pulmonary Edema Is Initially Caused by an Increase in Capillary Pressure. *Circulation* 103: 2078-2083., 2001.
120. **Maris NA, van der Sluijs KF, Florquin S, de Vos AF, Pater JM, Jansen HM, and van der Poll T.** Salmeterol, a beta2-receptor agonist, attenuates lipopolysaccharide-induced lung inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L1122-1128, 2004.

121. **Maron MB and Pilati CF.** Calculation of the reflection coefficient from measurements of endogenous vascular indicators. *J Appl Physiol* 64: 1746-1748, 1988.
122. **Marshall RP, Bellingan G, Webb S, Puddicombe A, Goldsack N, McNulty RJ, and Laurent GJ.** Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 1783-1788., 2000.
123. **Martin MA and Silverman HJ.** Gram-negative sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Clin Infect Dis* 14: 1213-1228, 1992.
124. **Matthay MA, Berthiaume Y, and Staub NC.** Long-term clearance of liquid and protein from the lungs of unanesthetized sheep. *J Appl Physiol* 59: 928-934, 1985.
125. **Matthay MA, Folkesson HG, and Clerici C.** Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev* 82: 569-600., 2002.
126. **McAuley DF, Frank JA, Fang X, and Matthay MA.** Clinically relevant concentrations of beta2-adrenergic agonists stimulate maximal cyclic adenosine monophosphate-dependent airspace fluid clearance and decrease pulmonary edema in experimental acid-induced lung injury. *Crit Care Med* 32: 1470-1476, 2004.
127. **McIntyre RC, Jr., Pulido EJ, Bensard DD, Shames BD, and Abraham E.** Thirty years of clinical trials in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 28: 3314-3331, 2000.
128. **McVerry BJ, Peng X, Hassoun PM, Sammani S, Simon BA, and Garcia JG.** Sphingosine 1-phosphate reduces vascular leak in murine and canine models of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 987-993, 2004.
129. **Meduri GU.** The role of the host defence response in the progression and outcome of ARDS: pathophysiological correlations and response to glucocorticoid treatment. *Eur Respir J* 9: 2650-2670, 1996.
130. **Meduri GU, Kohler G, Headley S, Tolley E, Stentz F, and Postlethwaite A.** Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome. *Chest* 108: 1303-1314, 1995.
131. **Mehta D, Bhattacharya J, Matthay MA, and Malik AB.** Integrated control of lung fluid balance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L1081-1090, 2004.
132. **Meyrick BO.** Endotoxin-mediated pulmonary endothelial cell injury. *Fed Proc* 45: 19-24, 1986.
133. **Michel CC and Curry FE.** Microvascular permeability. *Physiol Rev* 79: 703-761., 1999.
134. **Minnear FL, Barie PS, and Malik AB.** Effects of transient pulmonary hypertension on pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol* 55: 983-989, 1983.
135. **Minnear FL, DeMichele MA, Leonhardt S, Andersen TT, and Teitler M.** Isoproterenol antagonizes endothelial permeability induced by thrombin and thrombin receptor peptide. *J Appl Physiol* 75: 1171-1179., 1993.
136. **Minnear FL, Johnson A, and Malik AB.** Beta-adrenergic modulation of pulmonary transvascular fluid and protein exchange. *J Appl Physiol* 60: 266-274., 1986.
137. **Mintun MA, Dennis DR, Welch MJ, Mathias CJ, and Schuster DP.** Measurements of pulmonary vascular permeability with PET and gallium-68 transferrin. *J Nucl Med* 28: 1704-1716, 1987.
138. **Miseroocchi G, Negrini D, and Gonano C.** Direct measurement of interstitial pulmonary pressure in situ lung with intact pleural space. *J Appl Physiol* 69: 2168-2174, 1990.
139. **Miseroocchi G, Negrini D, Passi A, and De Luca G.** Development of Lung Edema: Interstitial Fluid Dynamics and Molecular Structure. *News Physiol Sci* 16: 66-71, 2001.
140. **Motohiro A, Furukawa T, Yasumoto K, and Inokuchi K.** Mechanisms involved in acute lung edema induced in dogs by oleic acid. *Eur Surg Res* 18: 50-57., 1986.
141. **Murray J, Matthay M, and Luce J.** An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 138: 720-723, 1988.

142. **Nama V, Kozlowski JK, and Hamvas A.** Measurement of protein flux with positron emission tomography in neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 80: F26-29, 1999.
143. **Noble WH and Kay JC.** Effects of emboli, positive-pressure ventilation, and airway water on lung water measurements. *J Appl Physiol* 65: 156-164, 1988.
144. **Nyberg A, Fagerberg A, Ahlqvist M, Jern C, Seeman-Lodding H, and Aneman A.** Pulmonary net release of tissue-type plasminogen activator during porcine primary and secondary acute lung injury. *Acta Anaesthesiol Scand* 48: 845-850, 2004.
145. **O'Brodovich H and Coates G.** Effect of exercise on lung lymph flow in unanesthetized sheep with increased pulmonary vascular permeability. *Am Rev Respir Dis* 134: 862-866, 1986.
146. **Overholser KA, Lomangino NA, Parker RE, Pou NA, and Harris TR.** Pulmonary vascular resistance distribution and recruitment of microvascular surface area. *J Appl Physiol* 77: 845-855, 1994.
147. **Parker JC, Parker RE, Granger DN, and Taylor AE.** Vascular permeability and transvascular fluid and protein transport in the dog lung. *Circ Res* 48: 549-561, 1981.
148. **Parker JC and Townsley MI.** Evaluation of lung injury in rats and mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L231-246., 2004.
149. **Patlak CS, Goldstein DA, and Hoffman JF.** The flow of solute and solvent across a two-membrane system. *J Theor Biol* 5: 426-442., 1963.
150. **Pellett AA, Lord KC, Champagne MS, deBoisblanc BP, Johnson RW, and Levitzky MG.** Pulmonary capillary pressure during acute lung injury in dogs. *Crit Care Med* 30: 403-409, 2002.
151. **Peng X, Hassoun PM, Sammani S, McVerry BJ, Burne MJ, Rabb H, Pearse D, Tudor RM, and Garcia JG.** Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 1245-1251, 2004.
152. **Pignataro C and Payen D.** Définition et épidémiologie du syndrome de détresse respiratoire aiguë. *Conférences d'actualisation de la S.F.A.R.*, edited by Elsevier, Paris, 2004, p. 225-232.
153. **Pistolesi M, Miniati M, and Giuntini C.** Pleural liquid and solute exchange. *Am Rev Respir Dis* 140: 825-847, 1989.
154. **Pittet JF, Wiener-Kronish JP, Serikov V, and Matthay MA.** Resistance of the alveolar epithelium to injury from septic shock in sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 1093-1100, 1995.
155. **Prevost A, Leperre A, Moreau F, Kantelip JP, and Millart H.** Cardiotoxic effects of salmeterol in comparison with salbutamol on the isolated perfused Langendorff-heart of the rat. *Arzneimittelforschung* 47: 39-43., 1997.
156. **Putensen C, Mutz N, Himmer G, Neumann M, Waibel U, Putz G, Braunsberger B, and Oberladstätter M.** Gamma scintigraphic imaging of lung microvascular permeability in adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 18: 807-812, 1990.
157. **Quinn DA, Carvalho AC, Geller E, Khaw BA, Barlaikovach M, Zielonka J, Greene R, Strauss HW, and Zapol WM.** ^{99m}Tc-fibrinogen scanning in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 135: 100-106, 1987.
158. **Quintel M, Pelosi P, Caironi P, Meinhardt JP, Luecke T, Herrmann P, Taccone P, Rylander C, Valenza F, Carlesso E, and Gattinoni L.** An Increase of Abdominal Pressure Increases Pulmonary Edema in Oleic Acid-induced Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 534-541, 2004.
159. **Radford EP.** *Tissue Elasticity.* Washington, D.C.: Am. Physiol. Soc., 1957.
160. **Raijmakers PG, Groeneveld AB, Teule GJ, and Thijs LG.** Diagnostic value of the gallium-67 pulmonary leak index in pulmonary edema. *J Nucl Med* 37: 1316-1322., 1996.
161. **Reed RK, Townsley MI, Korthuis RJ, and Taylor AE.** Analysis of lymphatic protein flux data. V. Unique PS products and sigma dS at low lymph flows. *Am J Physiol* 261: H728-740, 1991.
162. **Rippe B, Rosengren BI, Carlsson O, and Venturoli D.** Transendothelial transport: the vesicle controversy. *J Vasc Res* 39: 375-390, 2002.

163. **Rippe B, Townsley M, Parker JC, and Taylor AE.** Osmotic reflection coefficient for total plasma protein in lung microvessels. *J Appl Physiol* 58: 436-442, 1985.
164. **Rojas M, Woods CR, Mora AL, Xu J, and Brigham KL.** Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L333-341, 2005.
165. **Roselli RJ and Riddle WR.** Analysis of noninvasive macromolecular transport measurements in the lung. *J Appl Physiol* 67: 2343-2350, 1989.
166. **Rosenthal C, Caronia C, Quinn C, Lugo N, and Sagy M.** A comparison among animal models of acute lung injury. *Crit Care Med* 26: 912-916, 1998.
167. **Saldias FJ, Lecuona E, Comellas AP, Ridge KM, Rutschman DH, and Sznajder JL.** beta-adrenergic stimulation restores rat lung ability to clear edema in ventilator-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 162: 282-287., 2000.
168. **Sartori C, Allemann Y, Duplain H, Lepori M, Egli M, Lipp E, Hutter D, Turini P, Hugli O, Cook S, Nicod P, and Scherrer U.** Salmeterol for the prevention of high-altitude pulmonary edema. *N Engl J Med* 346: 1631-1636., 2002.
169. **Sartori C and Matthay MA.** Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights. *Eur Respir J* 20: 1299-1313, 2002.
170. **Schuster DP.** ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 245-260., 1994.
171. **Schuster DP.** Positron emission tomography: theory and its application to the study of lung disease. *Am Rev Respir Dis* 139: 818-840, 1989.
172. **Schuster DP and Haller J.** Regional pulmonary blood flow during acute pulmonary edema: a PET study. *J Appl Physiol* 69: 353-361, 1990.
173. **Schuster DP, Kozlowski JK, McCarthy T, Morrow J, and Stephenson A.** Effect of endotoxin on oleic acid lung injury does not depend on priming. *J Appl Physiol* 91: 2047-2054, 2001.
174. **Schuster DP, Markham J, and Welch MJ.** Positron emission tomography measurements of pulmonary vascular permeability with Ga-68 transferrin or C-11 methylalbumin. *Crit Care Med* 26: 518-525., 1998.
175. **Schuster DP, Stark T, Stephenson J, and Royal H.** Detecting lung injury in patients with pulmonary edema. *Intensive Care Med* 28: 1246-1253, 2002.
176. **Scott RL, Adcock DK, Drake RE, and Gabel JC.** Effect of Escherichia coli endotoxin on dog lung fluid balance. *Am J Physiol* 244: H763-768, 1983.
177. **Shibamoto T, Wang HG, Yamaguchi Y, Hayashi T, Saeki Y, Tanaka S, and Koyama S.** Effects of thromboxane A2 analogue on vascular resistance distribution and permeability in isolated blood-perfused dog lungs. *Lung* 173: 209-221, 1995.
178. **Sibbald WJ, Driedger AA, Moffat JD, Myers ML, Reid BA, and Holliday RL.** Pulmonary microvascular clearance of radiotracers in human cardiac and noncardiac pulmonary edema. *J Appl Physiol* 50: 1337-1347., 1981.
179. **Sigurdsson GH and Christenson JT.** Influence of terbutaline on endotoxin-induced lung injury. *Circ Shock* 25: 153-163., 1988.
180. **Staub NC.** Lung liquid and protein exchange: the four inhomogeneities. *Ann Biomed Eng* 15: 115-126, 1987.
181. **Staub NC.** Pulmonary edema. *Physiol Rev* 54: 678-811, 1974.
182. **Staub NC, Hyde RW, and Crandall E.** NHLBI workshop summary. Workshop on techniques to evaluate lung alveolar-microvascular injury. *Am Rev Respir Dis* 141: 1071-1077., 1990.
183. **Steinberg KP, Mitchell DR, Maunder RJ, Milberg JA, Whitcomb ME, and Hudson LD.** Safety of bronchoalveolar lavage in patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* 148: 556-561., 1993.

184. **Stevens T, Creighton J, and Thompson WJ.** Control of cAMP in lung endothelial cell phenotypes. Implications for control of barrier function. *Am J Physiol* 277: L119-126, 1999.
185. **Stevens T, Garcia JGN, Shasby DM, Bhattacharya J, and Malik AB.** Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L419-422, 2000.
186. **Sum-Ping ST, Symreng T, Jebson P, and Kamal GD.** Stable and reproducible porcine model of acute lung injury induced by oleic acid. *Crit Care Med* 19: 405-408, 1991.
187. **Tagliabue M, Casella TC, and Zincone GE.** CT and chest radiography in the evaluation of adult respiratory distress syndrome. *Acta Radiol* 35: 230-234, 1994.
188. **Takeda K, Knapp MJ, Wolfe WG, and Crapo JD.** Hypoxia enhances unilateral lung injury by increasing blood flow to the injured lung. *J Appl Physiol* 63: 2516-2523, 1987.
189. **Tanahashi M, Hara S, Yoshida M, Suzuki-Kusaba M, Hisa H, and Satoh S.** Effects of rolipram and cilostamide on renal functions and cyclic AMP release in anesthetized dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 1533-1538., 1999.
190. **Tatum JL, Strash AM, Sugerman HJ, Hirsch JI, Beachley MC, and Greenfield LJ.** Single isotope evaluation of pulmonary capillary protein leak (ARDS model) using computerized gamma scintigraphy. *Invest Radiol* 16: 473-478, 1981.
191. **Theodore J, Robin ED, Gaudio R, and Acevedo J.** Transalveolar transport of large polar solutes (sucrose, inulin, and dextran). *Am J Physiol* 229: 989-996., 1975.
192. **Thompson WJ, Ashikaga T, Kelly JJ, Liu L, Zhu B, Vemavarapu L, and Strada SJ.** Regulation of cyclic AMP in rat pulmonary microvascular endothelial cells by rolipram-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase (PDE4). *Biochem Pharmacol* 63: 797-807., 2002.
193. **Townsley MI, Parker JC, Kortheuis RJ, and Taylor AE.** Alterations in hemodynamics and Kf,c during lung mass resection. *J Appl Physiol* 63: 2460-2466, 1987.
194. **Vadasz I, Morty RE, Kohstall MG, Olschewski A, Grimminger F, Seeger W, and Ghofrani HA.** Oleic Acid Inhibits Alveolar Fluid Reabsorption: a Role in Acute Respiratory Distress Syndrome? *Am J Respir Crit Care Med*: 200407-200954OC, 2004.
195. **van Nieuw Amerongen GP and van Hinsbergh VW.** Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability and barrier function. *Vascul Pharmacol* 39: 257-272, 2002.
196. **Vandenbroeck K, Alloza I, Gadina M, and Matthys P.** Inhibiting cytokines of the interleukin-12 family: recent advances and novel challenges. *J Pharm Pharmacol* 56: 145-160, 2004.
197. **Varner AE, Sorkness RL, Kumar A, Kaplan MR, and Lemanske RF, Jr.** Serial segmental bronchoalveolar lavage in individual rats. *J Appl Physiol* 87: 1230-1233, 1999.
198. **Velazquez M and Schuster DP.** Pulmonary blood flow distribution after lobar oleic acid injury: a PET study. *J Appl Physiol* 65: 2228-2235, 1988.
199. **Velazquez M, Weibel ER, Kuhn C, 3rd, and Schuster DP.** PET evaluation of pulmonary vascular permeability: a structure-function correlation. *J Appl Physiol* 70: 2206-2216, 1991.
200. **Vincent PA, Kreienberg PB, Minnear FL, Saba TM, and Bell DR.** Simultaneous measurement of fluid and protein permeability in isolated rabbit lungs during edema. *J Appl Physiol* 73: 2440-2447., 1992.
201. **Von Essen SG, Robbins RA, Spurzem JR, Thompson AB, McGranaghan SS, and Rennard SI.** Bronchoscopy with bronchoalveolar lavage causes neutrophil recruitment to the lower respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 144: 848-854, 1991.
202. **Wang le F, Patel M, Razavi HM, Weicker S, Joseph MG, McCormack DG, and Mehta S.** Role of inducible nitric oxide synthase in pulmonary microvascular protein leak in murine sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1634-1639, 2002.
203. **Ware LB and Matthay MA.** The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342: 1334-1349., 2000.

204. **Waypa GB, Morton CA, Vincent PA, Mahoney JR, Jr., Johnston WK, 3rd, and Minnear FL.** Oxidant-increased endothelial permeability: prevention with phosphodiesterase inhibition vs. cAMP production. *J Appl Physiol* 88: 835-842, 2000.
205. **Weibel ER.** Functional morphology of lung parenchyma. In: *Handbook of Physiology, The Respiratory System, section 3*, edited by Mead PTMaJ. Bethesda: Am. Physiol Soc., 1987, p. 89 - 111.
206. **Welsh CH, Dauber IM, and Weil JV.** Endotoxin increases pulmonary vascular protein permeability in the dog. *J Appl Physiol* 61: 1395-1402, 1986.
207. **Welsh CH, Lien D, Worthen GS, and Weil JV.** Pentoxifylline decreases endotoxin-induced pulmonary neutrophil sequestration and extravascular protein accumulation in the dog. *Am Rev Respir Dis* 138: 1106-1114, 1988.
208. **Welty-Wolf KE, Carraway MS, Ortel TL, and Piantadosi CA.** Coagulation and inflammation in acute lung injury. *Thromb Haemost* 88: 17-25, 2002.
209. **Wetterberg T, Svensjo E, Larsson A, Sigurdsson G, Z GW, and Willen H.** Acute lung injury monitored with radiolabeled transferrin and lung volume measurements. *Acta Anaesthesiol Scand* 33: 359-368., 1989.
210. **Whelan CJ and Johnson M.** Inhibition by salmeterol of increased vascular permeability and granulocyte accumulation in guinea-pig lung and skin. *Br J Pharmacol* 105: 831-838., 1992.
211. **Wiener-Kronish JP, Albertine KH, and Matthay MA.** Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin. *J Clin Invest* 88: 864-875, 1991.
212. **Wiener-Kronish JP, Broaddus VC, Albertine KH, Gropper MA, Matthay MA, and Staub NC.** Relationship of pleural effusions to increased permeability pulmonary edema in anesthetized sheep. *J Clin Invest* 82: 1422-1429, 1988.
213. **Youssef HA, Sigurdsson GH, Christenson JT, and Owunwanne A.** Use of indium-111-labeled transferrin to study plasma extravasation during endotoxin shock and the effects of the beta-2 agonist terbutaline. *Am J Physiol Imaging* 6: 85-89., 1991.
214. **Zhang H, Kim YK, Govindarajan A, Baba A, Binnie M, Marco Ranieri V, Liu M, and Slutsky AS.** Effect of adrenoreceptors on endotoxin-induced cytokines and lipid peroxidation in lung explants. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1703-1710, 1999.