



**HAL**  
open science

# Modulation de l'équilibre hydrique pulmonaire au cours de l'agression pulmonaire aiguë infectieuse

Laurent Robriquet

► **To cite this version:**

Laurent Robriquet. Modulation de l'équilibre hydrique pulmonaire au cours de l'agression pulmonaire aiguë infectieuse. Physiologie [q-bio.TO]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT: . tel-00365175

**HAL Id: tel-00365175**

**<https://theses.hal.science/tel-00365175>**

Submitted on 2 Mar 2009

**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.

**Université du Droit et de la Santé – Lille II**

**Ecole Doctorale Biologie - Santé de Lille**

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Discipline : Réanimation Médicale

Présentée et soutenue publiquement

Par

Laurent ROBRIQUET

Le 22 décembre 2008

**Modulation de l'équilibre hydrique pulmonaire au cours  
de l'agression pulmonaire aiguë infectieuse**

**Membres du Jury :**

Président : Professeur François FOURRIER (Lille)

Rapporteurs : Professeur Bruno LEVY (Nancy)

Docteur Christian JAYR (Paris)

Examineur : Professeur Bertrand GUIDET (Paris)

Directeur de thèse : Professeur Benoît GUERY (Lille)

*Je remercie sincèrement,*

*Ma famille sans qui je n'aurais pu mener ce travail.*

*Le professeur Benoît Guery qui m'a donné l'opportunité de travailler dans des domaines passionnants et fait découvrir le monde de la recherche.*

*Le professeur Claude Chopin qui a guidé mes premiers pas dans le monde de la Réanimation.*

*Le professeur François Fourrier pour avoir accepté d'être président du jury.*

*Les rapporteurs de cette thèse, le Professeur Bruno Levy et le Docteur Christian Jayr, pour avoir accepté d'expertiser ce travail.*

*Le Professeur Bertrand Guidet qui nous a fait l'honneur d'apporter un éclairage critique à cette thèse.*

*Le Professeur Michael Matthay qui m'a accueilli avec enthousiasme au sein de son laboratoire à San Francisco.*

*Mes collègues et amis de la Réanimation Polyvalente à Lille qui m'ont permis de passer du temps au laboratoire.*

## TABLE DES MATIERES

	Pages
Liste des abréviations	7
Résumé	12
<b>I) Introduction</b>	14
<b>1) revue de la littérature</b>	
A) Agression pulmonaire aiguë et syndrome de détresse respiratoire aigu	15
1) Définitions	15
2) Epidémiologie	15
3) Facteurs de risque	16
4) Physiopathologie	17
4.1) Agression de la barrière alvéolo-capillaire	17
4.1.1) Agression endothéliale	17
4.1.2) Agression épithéliale	17
4.2) Agression pulmonaire dépendante des PNN	18
4.2.1) Séquestration des PNN	18
4.2.2) Migration transendothéliale des PNN	19
4.2.3) Rôle des molécules d'adhésion	19
4.2.3.1) Sélectines	19
4.2.3.2) Intégrines	19
4.2.3.3) Chémokines	20
4.3) Sécrétion pulmonaire de médiateurs inflammatoires	21
4.3.1) IL-1 $\beta$	21

4.3.2) TNF- $\alpha$	21
4.3.3) IL-10	22
4.3.4) MIF	22
4.3.5) HMG-1	23
4.4) Agents lésionnels incriminés	23
4.4.1) Stress radicalaire	23
4.4.2) Protéases	25
4.4.3) Médiateurs lipidiques	26
4.4.4) Apoptose	27
4.5) Résolution de l'agression pulmonaire aiguë et du SDRA	27
B) Rôle de la cascade de la coagulation	29
1) Généralités sur l'hémostase normale	29
1.1) Hémostase primaire	29
1.1.1) Vasoconstriction réflexe	29
1.1.2) Sécrétion plaquettaire	29
1.2) Schéma général de la coagulation	29
1.3) Régulation de la coagulation plasmatique	31
1.3.1) Antithrombine	31
1.3.2) TFPI	32
1.3.3) PC	34
1.4) La fibrinolyse et les inhibiteurs de la fibrinolyse	35
2) La coagulation au cours de l'agression pulmonaire aiguë	37
2.1) Initiation de la coagulation	37

2.1.1) Rôle de l'épithélium alvéolaire	37
2.1.2) Modulation du facteur tissulaire	39
2.2) Propagation de la coagulation	39
2.2.1) Antithrombine	39
2.2.2) Protéine C	40
2.3) La fibrinolyse	44
3) Interactions entre l'inflammation et l'hémostase	46
4) Conséquences de l'altération de la coagulation	48
C) La résorption de l'œdème pulmonaire	50
1) Introduction	50
2) Mécanisme de base de la résorption de l'œdème pulmonaire	50
2.1) transport actif de sodium : la clairance liquidienne alvéolaire	51
2.2) Surface d'échange pulmonaire	51
2.3) Les cellules alvéolaires de type II	52
2.4) Les cellules alvéolaires de type I	54
2.5) Etudes <i>in vivo</i> pour le transport actif de sodium	54
2.6) Régulation dépendante des catécholamines	55
2.7) Rôle du canal CFTR	56
2.8) Régulation indépendante des catécholamines	57
2.9) Rôle de l'environnement lipidique	57
3) Transport liquidien alvéolaire en conditions pathologiques	58
3.1) Etudes expérimentales	58
3.1.1) Infection bactérienne et inflammation	58

3.1.2) Hypoxie	60
3.1.3) La ventilation mécanique	61
3.1.4) La coagulation	61
3.1.5) Stimulation pharmacologique	62
3.1.6) Thérapie génique	64
3.2) Etudes cliniques	64
3.2.1) Résolution de l'œdème pulmonaire hydrostatique	65
3.2.2) Résolution de l'œdème pulmonaire lésionnel	65
3.2.3) Stimulation pharmacologique	66
<b>2) Plan de l'étude et objectifs du travail</b>	<b>68</b>
<b>II) Travaux personnels</b>	<b>69</b>
A) Matériels et méthodes	70
1) Animaux	70
2) Traceurs radioactifs	70
3) Agents chimiques et réactifs	70
4) Souches bactériennes et conditions de culture	71
4.1) <i>P. aeruginosa</i>	71
4.2) <i>E. coli</i>	71
5) Charge bactérienne pulmonaire	71
6) Instillation intratrachéale	72
6.1) Instillation intratrachéale chez le rat	72

6.2) Instillation intratrachéale chez la souris	72
7) Administration intraveineuse de la rhPCa chez le rat	72
8) Préparations chirurgicales	73
9) Paramètres mesurés	75
9.1) Evaluation de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire	75
9.1.1) Eau extravasculaire pulmonaire	75
9.1.2) Fuite protéique bidirectionnelle chez le rat	76
9.1.3) Perméabilité vasculaire pulmonaire chez la souris	77
9.2) Mouvements liquidiens alvéolaires et pulmonaires	77
9.2.1) Clairance liquidienne alvéolaire <i>in vivo</i>	77
9.2.2) Clairance liquidienne alvéolaire <i>in situ</i>	79
10) Recueil du LBA et cytologie	80
11) Mesures des paramètres de la coagulation	81
12) Mesures des cytokines	81
13) Mesures des catécholamines plasmatiques	82
14) Histologie	82
B) Protocoles expérimentaux	82
1) Evaluation de la rhPCa sur l'équilibre hydrique pulmonaire	82
2) Evaluation du tonus $\beta$ -adrénergique	83
2.1) Inhibition du tonus $\beta$ -adrénergique endogène	83
2.2) Equilibre hydrique pulmonaire au cours de la stimulation $\beta_2$ -adrénergique exogène	84
C) Résultats	85

<b>III) Discussion</b>	107
A) Effets de la rhPCa au cours de l'agression pulmonaire aiguë induite par <i>Pa</i>	108
B) Implication du tonus adrénergique sur l'équilibre hydrique pulmonaire	113
C) Stimulation $\beta_2$ -adrénergique exogène au cours de la pneumopathie aiguë à <i>Pa</i>	118
<b>IV) Conclusions et perspectives</b>	120
<b>V) Collaborations</b>	123
<b>VII) Références bibliographiques</b>	125
<b>VIII) Articles</b>	142

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribodésoxynucléique
AT III	Antithrombine III
ATP	Adénosine triphosphate
C4bBP	<i>C4b binding protein</i>
CD18	<i>Cluster of differentiation 18</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance</i>
CFU	Unité formant colonie
CIVD	Coagulation intra-vasculaire disséminée
CLA	Clairance liquidienne alvéolaire
CLP	Clairance liquidienne pulmonaire
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
DAG	Diacylglycerol
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPRC	<i>Endothelial cell PC receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FT	Facteur tissulaire
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IL	<i>Interleukin</i>

IP3	Inositol triphosphate
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i>
LBA	Lavage bronchoalvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinases</i>
NFkB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
Pa	<i>P. aeruginosa</i>
PA	<i>Plaminogen activator</i>
PAF	<i>Platelet activating factor</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAR	<i>Protease activated receptor</i>
PCa	Protéine C activée
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandine I <sub>2</sub>
PI	Phosphatidylinositol
PKA	<i>cAMP-dependent protéine kinase</i>
PNN	Polynucléaires neutrophiles
PS	Protéine S
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SDRA	Syndrome de détresse respiratoire aigu
SSI	Sérum salé isotonique

TAFI	<i>Thrombin activable fibrinolysis inhibitor</i>
TAT	Thrombine antithrombine
TFPI	<i>TF pathway inhibitor</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TM	thrombomoduline
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
t-PA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
u-PA	<i>Urokinase plasminogen activator</i>
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLA	<i>Very late antigen</i>
vWF	Facteur von Willebrand

Ce travail réalisé d'une part à l'université de Lille II, à la faculté de Médecine et d'autre part à l'université de San Francisco a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications :

Direct visual instillation as a method for efficient delivery of fluid into the distal airspaces of anesthetized mice. Su X, Looney M, **Robriquet L**, Fang X, Matthay MA. *Exp Lung Res* 2004;30:479-493

Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury. Matthay MA, **Robriquet L**, Fang X. *Proc Am Thorac Soc* 2005 ;2(3) :206-13

Intravenous administration of activated protein C in Pseudomonas-induced lung injury: impact on lung fluid balance and the inflammatory response. **Robriquet L**, Collet F, Tournoy A, Prangère T, Nevriere R, Fourrier F, Guery B. *Respir Res* 2006 ; 22 :7-41

Protective effect of endogenous beta-adrenergic tone on lung fluid balance in acute bacterial pneumonia in mice. Su X, **Robriquet L**, Folkesson HG, Matthay MA. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L769-L776

Communications à des congrès internationaux :

Effect of endogenous beta-adrenergic inhibition on lung fluid balance in acute *E. coli* pneumonia in mice. **Robriquet L**, Su X, Folkesson HG, Frank JA, Matthay MA. American Thoracic Society International Conference, 2004.

IL-1 $\beta$  is an important mediator of increased endothelial permeability and alveolar epithelial injury in experimental ventilator-induced lung injury. Frank JA, McAuley DF, Pittet JF, Gutierrez J, **Robriquet L**, Roux J, Dobbs L, Matthay MA. American Thoracic Society International Conference, 2004.

Effect of pharmacological inhibition of chloride transport on lung fluid balance in acute *E. coli* pneumonia in mice. **Robriquet L**, Song Y, Folkesson HG, Frank JA, Verkman AS, Matthay MA. Abstract ISICEM 2005

Effect of  $\beta$ -adrenergic stimulation on lung fluid balance in acute *P. aeruginosa* pneumonia in rats. **Robriquet L**, Chopin C, Guery B. American Thoracic Society International Conference, Abstract 2006

Communications à des congrès nationaux :

Effets de l'inhibition du transport de chlore sur la pneumonie aiguë à *E. coli* chez la souris. **Robriquet L**, Franke JA, Verkman AS, Matthay MA. Congrès de la société de Réanimation de Langue Française, abstract 2005

Effets de l'administration des  $\beta_2$  agonistes sur la pneumonie aiguë à *P. Aeruginosa* chez le rat. **Robriquet L**, Chopin C, Guery B. Congrès de la société de Réanimation de Langue Française, abstract 2006

## Résumé :

L'agression pulmonaire aiguë et le syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) sont caractérisés par une augmentation de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire à l'origine de l'exsudation d'un liquide d'œdème riche en protéines conduisant à une altération sévère des échanges gazeux. En dépit des progrès réalisés ces dernières années dans la prise en charge des patients, la mortalité demeure élevée (30-40%) (1). L'agression pulmonaire aiguë est marquée par un état procoagulant et antifibrinolytique à l'origine de dépôts de fibrine et de membranes hyalines dans le poumon distal (2).

La protéine C activée est un important régulateur de la coagulation et exerce des propriétés anti-inflammatoires pulmonaires (3). Ainsi, dans un premier temps, notre travail a consisté à caractériser l'équilibre pulmonaire au cours de l'administration de protéine C activée *in vivo* sur un modèle murin de pneumopathie aiguë à *P. aeruginosa* (*Pa*). Nos résultats ont montré que l'administration de PCa à la phase précoce de l'agression pulmonaire aiguë induite par *Pa* tendait à augmenter la formation de l'œdème pulmonaire avec une perte de la compartimentalisation de la réponse inflammatoire.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'équilibre hydrique pulmonaire dépendant du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli*. L'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène induisait une augmentation de l'œdème pulmonaire en diminuant la résorption de l'œdème alvéolaire et en majorant le trouble de perméabilité vasculaire pulmonaire. Enfin, la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique exogène diminuait l'œdème pulmonaire au décours de la pneumonie à *Pa*.

Ainsi, des approches pharmacologiques différentes peuvent moduler l'équilibre hydrique pulmonaire au cours des pneumonies aiguës. Les connaissances fondamentales acquises au cours de ce travail de thèse seront directement valorisables par la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques au cours de l'agression pulmonaire aiguë secondaire à la pneumonie aiguë.

**Abstract:**

Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome (ARDS) are characterized by increased permeability of the alveolar-capillary barrier, resulting in influx of protein-rich edema fluid and consequently impairment in arterial oxygenation. Although mortality has decreased over recent decades, it remains high (30-40%), and pulmonary and non pulmonary morbidity in ARDS survivors is significant (1). Procoagulant-antifibrinolysis imbalance is evident within the distal airspaces of the injured lung, resulting in fibrin and hyaline membrane deposition (2).

The activated protein C pathway is an important regulation of the coagulation system and exerts anti-inflammatory propriety on the distal lung (3). The first aim of our study was to examine the effects of activated protein C on lung fluid balance in the early phase of *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*)-induced lung injury. Our results have showed that administration of activated protein C in the early stage of *Pa*-induced lung injury tended to increase lung edema formation with a loss of the inflammatory response compartmentalization.

The second aim was to evaluate the effect of endogenous  $\beta$ -adrenergic tone on lung fluid balance in acute *E. coli* pneumonia in mice.  $\beta$ -adrenoceptor inhibition worsened pulmonary edema by both increasing lung vascular permeability and decreasing alveolar fluid clearance. Finally, exogenous  $\beta_2$ -stimulation attenuated the degree of pulmonary edema following *Pa*-induced lung injury.

Thus, different pharmacological approaches can modulate lung fluid balance in acute pneumonia. These new fundamental mechanisms could be useful to develop new therapeutic strategies in pneumonia induced acute lung injury.

# **INTRODUCTION**

## I) Revue de la littérature

### A) Agression pulmonaire aiguë et syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA)

#### 1) Définitions

En 1967, Ashbaugh et col ont décrit pour la première fois 12 patients présentant une détresse respiratoire aiguë, une cyanose réfractaire à l'oxygénothérapie associée à une diminution de la compliance et à des infiltrats pulmonaires diffus sur la radiographie de thorax (4). Peu après, le même auteur associé à Petty publiait un article dans lequel le terme de SDRA était employé pour la première fois (5). En 1988, Murray et al ont proposé de quantifier l'atteinte pulmonaire par un score basé sur le niveau de pression positive de fin d'expiration, le rapport entre la pression partielle d'oxygène ( $O_2$ ) dans le sang artériel ( $PaO_2$ ) et la fraction inspirée d' $O_2$  ( $FiO_2$ ), la compliance statique pulmonaire et l'importance de l'infiltration pulmonaire sur la radiographie de thorax (6). En 1994, une conférence de consensus américano-européenne a proposé une nouvelle définition du SDRA (7). Deux concepts ont été introduits, celui d'agression pulmonaire aiguë (« acute lung injury ») et le SDRA actuel. Le SDRA a été défini comme un syndrome caractérisé par une inflammation pulmonaire et une augmentation de la perméabilité capillaire pulmonaire, associées à des anomalies cliniques, radiologiques et physiologiques, qui ne peuvent être expliquées mais peuvent coexister avec une hypertension artérielle pulmonaire ou auriculaire gauche. La différence principale entre l'agression pulmonaire aiguë et le SDRA réside dans la sévérité de l'hypoxémie, exprimée par le rapport  $PaO_2/FiO_2$ . Dans le SDRA, ce rapport est inférieur à 200 mm Hg, dans l'agression pulmonaire aiguë, il est inférieur à 300 mm Hg.

#### 2) Epidémiologie

Une évaluation ancienne du National Institutes of Health suggérait une incidence annuelle aux Etats-Unis de 75 cas de SDRA pour 100 000 habitants (8). Par la suite, des études plus récentes réalisées aux Etats-Unis et en Europe ont retrouvé des incidences plus basses de l'ordre de 1,5 à 8,3 pour 100 000 habitants (9-11). Quant à l'agression pulmonaire aiguë, son incidence est moins bien connue.

L'incidence était estimée entre 10 à 20 cas pour 100 000 habitants bien qu'une étude récente américaine conduite dans 21 hôpitaux a retrouvé une incidence bien plus élevée de l'ordre de 78,9 pour 100 000 habitants avec une mortalité hospitalière de 38,5% (12). D'autre part, une étude réalisée dans les services de réanimation en France a montré que ces deux affections représentaient environ 50% des patients ventilés pour une détresse respiratoire aiguë hypoxémiante (13).

### 3) Facteurs de risque

Les facteurs de risque de développement d'une agression pulmonaire aiguë et d'un SDRA sont représentés par des agressions directes et indirectes (tableau I). Parmi les agressions directes, la pneumopathie aiguë infectieuse représente la cause la plus fréquente (14). Parmi les agressions indirectes, le sepsis présente le risque le plus élevé de progression vers une agression pulmonaire aiguë et un SDRA, approximativement de 40% (15).

**Tableau I:** facteurs de risque de développement d'un SDRA.

Atteinte pulmonaire directe	Atteinte pulmonaire indirecte
Pneumopathies infectieuses	Sepsis sévère
Inhalation du liquide gastrique	Traumatisme majeur
Contusion pulmonaire	Transfusions multiples
Noyade	Pancréatite aiguë
Inhalation de gaz toxique	Overdose
Irradiation thoracique	Brûlures
Ischémie reperfusion pulmonaire	Circulation extra-corporelle
Embolies graisseuses	Etat de choc de toute origine

#### 4) Physiopathologie

Au cours de l'évolution du SDRA, trois principales phases, pouvant s'associer se distinguent :

- Phase exsudative caractérisée par un afflux alvéolaire de PNN et une lésion diffuse de la barrière alvéolo-capillaire
- Phase de fibrose caractérisée par une prolifération fibroblastique
- Phase de résolution des phénomènes inflammatoires et du processus fibrotique

##### 4.1) Agression de la barrière alvéolo-capillaire

###### 4.1.1) Agression endothéliale

L'atteinte de l'endothélium pulmonaire au cours du SDRA a été mise en évidence par des études ultrastructurales il y a environ 30 ans (16). L'augmentation de la perméabilité microvasculaire pulmonaire a été confirmée en utilisant des protéines marquées par des traceurs radioactifs chez les patients présentant un SDRA et en comparant simultanément les concentrations protéiques dans le liquide de LBA et dans le plasma des patients (17). D'autre part, des marqueurs circulants de lésions cellulaires endothéliales, comme l'endotheline-1 ou le facteur von Willebrand (vWF) ont été mis en évidence chez les patients présentant un SDRA (18).

###### 4.1.2) Agression épithéliale

La distinction entre la perméabilité endothéliale et épithéliale est importante. Wiener-Kronish et al ont montré qu'il pouvait exister une atteinte sélective de la perméabilité endothéliale, qui ne soit pas à l'origine d'un œdème pulmonaire lésionnel (19). *In vitro*, la perméabilité des jonctions serrées de l'épithélium alvéolaire est régulée. L'élévation de la concentration intracellulaire d'AMPC ou de calcium induit une augmentation de la résistance transépithéliale et un changement de structure des jonctions serrées. A l'inverse, l'activation de la protéine kinase C (PKC) diminue la perméabilité des jonctions serrées (18).

## 4.2) Agression pulmonaire dépendante des polynucléaires neutrophiles (PNN)

Les études histologiques obtenues à la phase précoce du SDRA ont montré une infiltration des PNN dans le parenchyme pulmonaire (20). Par ailleurs, les PNN représentent 70 à 80% de la population cellulaire au sein du liquide du lavage bronchoalvéolaire (LBA) au cours du SDRA (18). Bien que l'agression pulmonaire aiguë et le SDRA puissent se rencontrer chez les patients présentant une neutropénie profonde, l'activation et la transmigraton des PNN circulants jouent un rôle majeur à la phase précoce de l'agression pulmonaire aiguë (21).

### 4.2.1) Séquestration des PNN dans le poumon inflammatoire

La séquestration des PNN correspond à l'accumulation de PNN dans la circulation pulmonaire en réponse à un stimulus inflammatoire. La migration des PNN de l'espace vasculaire à l'espace alvéolaire se fait au niveau des capillaires pulmonaires où les leucocytes vont se bloquer du fait d'une diminution de leur déformabilité, par opposition à la circulation systémique où ce phénomène a lieu à partir des veinules post capillaires. Les PNN présentent des modifications biomécaniques importantes en réponse à différents médiateurs comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-8, le *platelet-activating factor* (PAF) et le N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), facteur chémoattractif d'origine bactérien (22, 23). Les PNN activés perdent ainsi leurs capacités à se déformer du fait d'une polymérisation intracellulaire des filaments d'actines à l'origine de la prolongation du temps de transit dans la circulation pulmonaire (24). L'inhibition de la réorganisation des filaments d'actine par la cytochalasine prévient la séquestration des PNN induite par la fMLP (25). Le rôle des molécules d'adhésion dans ce processus n'est pas clair. Sur un modèle de SDRA induit par l'injection intraveineuse d'*E.coli* chez le babouin, l'administration d'anticorps anti-sélectines E et L n'a pas modifié la séquestration de PNN ni protégé les animaux de l'agression pulmonaire aiguë (26). Cependant, le blocage du CD18, de l'intégrine  $\alpha_4$  et  $\alpha_5$  induisait une réduction significative de la séquestration pulmonaire des PNN induite par le fMLP. L'inhibition additionnelle des sélectines E et P atténuait la séquestration de PNN alors que l'inhibition isolée de ces sélectines n'avait aucun effet (27).

#### 4.2.2) Migration transendothéliale des PNN

La migration transendothéliale nécessite la présence de facteurs chémoattractants des PNN (par exemple : IL-8, LTB<sub>4</sub>, C5a) et implique une participation active de la cellule endothéliale (ouverture des jonctions intercellulaires secondaire à une augmentation du calcium intracellulaire) (28). La migration au travers de la matrice extracellulaire (membrane basale puis tissu interstitiel) met en jeu l'action locale des protéases des PNN.

#### 4.2.3) Rôle des molécules d'adhésion

Suite à l'activation des monocytes/macrophages, de nombreux médiateurs sont sécrétés et vont activer les cellules endothéliales afin de permettre l'extravasation des leucocytes. Ce processus se déroule en trois phases : « rolling », adhésion et diapédèse. Les cellules endothéliales vont exposer à leurs surfaces, les sélectines E et P, les « *intercellular adhesion molecules* » (ICAM)-1 et les « *vascular cell adhesion molecules* » (VCAM). Les leucocytes activés vont exprimer le « *leukocyte function-associated antigen* » (LFA)-1 ou le « *very late antigen* » (VLA)-4. LFA-1 et VLA-4 vont s'associer respectivement à l'ICAM-1 et VCAM afin de permettre le roulement et l'adhérence des leucocytes sur les cellules endothéliales.

##### 4.2.3.1) Sélectines

Bien que les sélectines jouent un rôle fondamental dans les processus de « rolling » dans la circulation systémique, leurs rôles dans la migration des PNN au niveau de la microcirculation pulmonaire sont mal précisés et dépendent du stimulus inflammatoire. Sur un modèle murin d'instillation intratrachéale de liposaccharide (LPS) bactérien, l'inhibition des sélectines E, L et P n'avait aucun effet sur la migration des PNN dans l'espace alvéolaire (29). Par ailleurs, la migration des PNN n'était pas modifiée après instillation intratrachéale de *S. pneumoniae* chez des souris génétiquement déficientes pour les sélectines P et E et après blocage des sélectines L (30).

##### 4.2.3.1) Intégrines

L'activation des PNN conduit à l'expression sur leurs surfaces de molécules d'adhésion de la famille des  $\beta_2$ -intégrines (CD11a/CD18, CD11b/CD18). Les  $\beta_2$ -intégrines sont des protéines transmembranaires hétérodimériques et elles sont les plus étudiées au cours de l'agression pulmonaire aiguë.

La migration des PNN dans le poumon peut faire intervenir des voies dépendantes et indépendantes du CD18 en fonction du stimulus. Ainsi, le recrutement des PNN requiert le CD18 en cas de stimulation par *E. coli*, *P. aeruginosa* ou IL-1 alors que les bactéries à Gram-positif, l'hyperoxie ou le facteur du complément C5a utilisent une voie indépendante du CD18 (24). L'inhalation d'acide chlorhydrique induisait une migration de PNN dépendante du CD 18 dans le site d'inhalation mais une migration de PNN indépendante du CD18 dans le poumon controlatéral (31). La plupart des stimuli conduisant à une migration de PNN dépendante du CD18 induisent l'expression endothéliale d'un ligand majeur, l'ICAM-1. Sur un modèle murin de pneumonie, l'expression endothéliale d'ICAM-1 était augmentée après l'instillation intratrachéale de LPS mais n'était pas modifiée après l'instillation de *S. pneumoniae* (32).

#### 4.2.3.3) Chémokines

Les chémokines constituent une famille de polypeptides ayant en commun un motif de quatre cystéines. Ils exercent un effet chémoattractant et jouent un rôle important dans l'activation et la migration des leucocytes. Selon le nombre d'acides aminés présents entre les deux premières cystéines, les chémokines sont classées en quatre groupes : CC, CXC, CX3C et le groupe C. Les chémokines exercent leurs activités en interagissant avec des récepteurs cellulaires transmembranaires. Suite à la liaison de la chémokine à son récepteur, la protéine G hétérotrimérique couplée au récepteur active une protéine effectrice. Il s'agit généralement d'une phospholipase C (PLC) qui à partir du phosphatidylinositol (PI) génère de l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycerol (DAG). Suite à l'activation de GTPases, la restructuration du cytosquelette conduit à des changements de forme, la migration et l'adhérence des cellules (33). Chez l'homme, les chémokines sont produites par les macrophages activés, les monocytes, les PNN, l'endothélium, l'épithélium, les plaquettes et diverses cellules parenchymateuses. La chémokine la plus étudiée chez l'homme est CXCL8 (IL-8). Des concentrations élevées d'IL-8 dans le liquide de LBA chez les patients présentant un SDRA étaient corrélées aux concentrations de PNN dans les voies aériennes et *in vitro*, l'activité chémoattractante du LBA pouvait être inhibée par l'utilisation d'anticorps anti IL-8 (34). Sur des modèles expérimentaux d'agression pulmonaire aiguë induite par l'acide chlorhydrique (35), d'ischémie reperfusion (36) et de pancréatite aiguë nécrotique (37), le blocage de l'IL-8 par un anticorps induisait une amélioration de l'agression pulmonaire aiguë.

Dans le SDRA, Matthay et al ont montré que le LBA contenait de l' $\alpha_2$ -macroglobuline qui était liée à des médiateurs pro-inflammatoires, notamment à l'IL-8. Le rôle de cette molécule est complexe puisqu'elle peut faciliter la phagocytose de l'IL-8 par les macrophages qui possèdent un récepteur à l' $\alpha_2$ -macroglobuline mais elle peut aussi exercer un effet protecteur en protégeant l'IL-8 d'une dégradation protéolytique (38). Enfin, il existe dans le LBA au cours du SDRA des anticorps anti-IL-8. Ces anticorps polyclonaux immunoglobulines (Ig)G3 et IgG4 ont une forte affinité pour l'IL-8 et empêchent la liaison entre la chémokine et son récepteur sur les PNN. Kurdowska et al ont montré une association significative entre la concentration en complexes IL-8/anticorps anti IL-8 et le risque de survenue d'un SDRA. De la même manière, il existait une association entre les taux de concentration et la mortalité chez les patients présentant un SDRA (39).

#### 4.3) Sécrétion pulmonaire de médiateurs de l'inflammation

Un réseau complexe de cytokines et de médiateurs pro-inflammatoires peut initier et amplifier la réponse inflammatoire au cours de l'agression pulmonaire aiguë et du SDRA.

##### 4.3.1) *Interleukin-1 $\beta$* (IL-1 $\beta$ )

Plusieurs études ont confirmé la présence d'IL-1 $\beta$  et de son antagoniste spécifique, l'*interleukin-1 receptor inhibitor* (IL-1ra) dans le liquide de LBA des patients présentant un SDRA (40, 41). Quand les auteurs ont comparé les concentrations de l'IL-1 $\beta$  et son antagoniste l'IL-1ra, un ratio de 1 a été retrouvé dans le LBA des volontaires sains alors que le ratio était de 10/1 dans le LBA des patients présentant un SDRA persistant, suggérant le rôle de l'IL-1 $\beta$  pour maintenir un état inflammatoire persistant dans le poumon (41).

##### 4.3.2) *Tumor necrosis factor- $\alpha$* (TNF- $\alpha$ )

Comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  est aussi une cytokine pro-inflammatoire précoce qui peut stimuler la production de nombreuses autres cytokines. Les effets du TNF- $\alpha$  sur les cellules épithéliales et endothéliales sont les suivants : augmentation de la perméabilité *in vitro*, stimulation de la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , de l'IL-8 et de protanoïdes (PAF, LTB-4), induction de l'expression de molécules d'adhésion.

De nombreuses études ont montré que la concentration de TNF- $\alpha$  était élevée dans le liquide du LBA de patients présentant un SDRA mais que celle-ci n'était pas prédictive de l'évolution clinique (42, 43). Cependant, une étude récente a mesuré les concentrations de TNF- $\alpha$  et des *soluble TNF receptors* I et II (TNFRI et II) dans le LBA avant et après le début du SDRA et a montré que l'activité biologique du TNF- $\alpha$  augmentait au cours de la première semaine du SDRA. Il y avait une relation directe entre le ratio TNF- $\alpha$ /TNFR dans le LBA et la sévérité de la pathologie, évaluée par l'importance de l'hypoxémie et la compliance pulmonaire (44).

#### 4.3.3) *Interleukin-10* (IL-10)

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire qui inhibe la production de cytokines par les macrophages et son expression est en relation étroite avec l'expression de TNF- $\alpha$  (45, 46). L'IL-10 a été identifiée dans les poumons des patients présentant un SDRA et des concentrations élevées dans le LBA étaient associées à une augmentation de la survie (47). L'IL-10 joue un rôle de contre régulation de l'expression de HLA-DR sur les monocytes de patients présentant un choc septique et peut ainsi intervenir dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte (48). Sur une série de 46 patients présentant un SDRA, un pic de sécrétion d'IL-10 était mis en évidence le premier jour du SDRA puis la sécrétion diminuait pour devenir indétectable à la troisième semaine (44).

#### 4.3.4) *Macrophage migration inhibitory factor* (MIF)

Le MIF est produit par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales bronchiques. Le MIF non seulement potentialise les effets du LPS et des bactéries à Gram-positif mais il est aussi essentiel dans la régulation de la réponse des macrophages au LPS par ses effets sur l'expression des *Toll-like receptor-4* (49). Donnelly et al ont mis en évidence la présence du MIF dans le LBA des patients à la phase précoce du SDRA. Les auteurs ont montré que le MIF inhibait de façon dose dépendante les effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes (50).

#### 4.3.5) *High-mobility group-1* (HMG-1)

HMG-1 est une protéine capable de se lier à des séquences spécifiques de l'ADN, de favoriser la transcription de gènes et de réguler l'activité des récepteurs des hormones stéroïdes. Chez la souris, l'instillation intratrachéale d'HMG-1 a induit un œdème pulmonaire avec une infiltration à PNN et une augmentation de la production locale d'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et de *macrophage inflammatory protein* (MIP)-2. Au cours de l'inflammation pulmonaire aiguë induite par le LPS, l'administration d'anticorps anti-HMG-1 a diminué l'œdème pulmonaire sans modifier la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (51). Ces données indiquent qu'HMG-1 est un médiateur important et tardif de l'agression pulmonaire aiguë.

#### 4.4) Les agents lésionnels incriminés

##### 4.4.1) Le stress radicalaire

Les espèces réactives de l'O<sub>2</sub> (« *reactive oxygen species* » ROS) et de l'azote (« *reactive nitrogen species* » RNS) sont à l'origine du stress radicalaire. Ce sont des molécules très instables, hautement réactives, au pouvoir oxydant élevé. Ces composés causent des dommages non spécifiques à tous les types de biomolécules telle que l'ADN mitochondrial et nucléaire, les protéines, les lipides ou autres carbohydrates (52, 53).

##### 4.4.1.1) Les espèces réactives de l'azote

Les RNS incluent le NO et les S-nitrosothiols (SNO<sub>S</sub>). Ces derniers se composent d'acides aminés, de peptides ou de protéines modifiés au niveau de leurs résidus cystéines par le NO. Le NO est produit par des enzymes spécialisées : les NO synthases (NOS). Ces enzymes convertissent la L-arginine en L-citrulline et NO. L'ensemble du NO produit peut réagir avec des molécules soufrées et former des SNO<sub>S</sub>.

##### 4.4.1.2) Les espèces réactives de l'oxygène

Les ROS comportent deux sous-familles : les radicaux libres (exemple : anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>) et les espèces non radicalaires (exemple : peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et peroxy-nitrite ONOO<sup>-</sup>). La chaîne respiratoire mitochondriale peut être responsable d'une partie de la production des ROS (54).

Entre 1 et 3% de l'oxygène consommé par la mitochondrie génère des radicaux libres ; La production de ces ROS a lieu au niveau des complexes I et III ainsi qu'au niveau de l'ubiquinone. Des systèmes enzymatiques endogènes sont prévus pour lutter contre cette production physiologique. L' $O_2^-$  est converti en  $H_2O_2$  par la manganèse superoxyde dismutase (Mn-SOD) du côté matriciel et par la cuivre-zinc superoxyde dismutase (CuZn-SOD) dans l'espace intermembranaire. Ce peroxyde d'hydrogène est ensuite neutralisé soit par la glutathion peroxydase (GPx), soit par la catalase. Récemment, il a été montré que parmi d'autres cytokines pro-inflammatoires, le TNF- $\alpha$  conduisait à une augmentation d' $O_2^-$  via la stimulation de systèmes enzymatiques tels que la NADH oxydase ou la xanthine oxydase (55). Pour neutraliser les effets des ROS, les cellules expriment des antioxydants endogènes : superoxyde dismutase, catalase, et glutathion peroxydase.

#### 4.4.1.3) Rôle des ROS dans l'agression pulmonaire aiguë

La réaction spontanée entre l' $O_2^-$  et le NO résulte en la formation d'une molécule toxique : le peroxyde nitrite. Les peroxyde nitrites représentent l'espèce radicalaire la plus toxique. Sur un modèle animal de poumons isolés et perfusés chez le lapin, l'administration d'une substance oxydante, comme la xanthine oxydase dans la perfusion pulmonaire induisait une vasoconstriction et un œdème pulmonaire (56). Les ROS peuvent aussi indirectement contribuer à l'agression pulmonaire aiguë en inactivant les anti-protéases et diminuant les antioxydants. Sur un modèle de poumons isolés et perfusés,  $H_2O_2$  et les dérivés oxydants diminuaient l'activité anti-élastolytique du poumon et augmentaient l'agression pulmonaire dépendante de l'élastase des PNN (57).

Au cours du SDRA, chez l'homme, les études immunohistochimiques de poumons ont mis en évidence des résidus nitrotyrosines, dont la présence était corrélée à l'importance de la sévérité de l'agression pulmonaire, suggérant que le  $ONOO^-$  était un oxydant important dans la pathologie pulmonaire inflammatoire (58). Les patients avec un SDRA avaient une augmentation de  $H_2O_2$  dans les condensats de l'air exhalé (59). Le liquide de LBA chez ces patients contenait un excès de protéines oxydées et une diminution des molécules antioxydantes comme le glutathion (60).

Ainsi, il existe une augmentation de la production des ROS au cours de l'agression pulmonaire aiguë, qui dépasse les capacités de défense antioxydative à l'origine de lésions cellulaires oxydatives potentielles. Les PNN et les macrophages sont la principale source des ROS au cours du SDRA (61).

#### 4.4.2) Les protéases

Les protéases sont des enzymes protéolytiques sécrétées par les PNN. Les PNN produisent deux groupes d'enzymes impliqués dans le SDRA : l'élastase et les métalloprotéases (*matrix metalloproteinases*, MMP) (62).

L'élastase leucocytaire est une sérine protéase capable de dégrader les constituants de la matrice extracellulaire et constitue la protéase majoritaire des granules des PNN. L'élastase joue également un rôle antimicrobien, en particulier contre les bactéries à Gram-négatif et leurs toxines. L'élastase a été impliquée dans la pathogénèse de l'agression pulmonaire aiguë, notamment au cours du sepsis à bacilles à Gram-négatif. Les souris génétiquement modifiées, qui n'exprimaient pas l'élastase étaient protégées de l'agression pulmonaire induite par le LPS (63). D'autres études expérimentales ont montré que l'agression pulmonaire induite par l'instillation intratrachéale d'élastase pouvait être prévenue par un inhibiteur spécifique. Au cours du SDRA, des concentrations élevées en élastase ont été mises en évidence dans le liquide de LBA et le plasma. Cependant, une grande partie de l'élastase est retrouvée dans le poumon complexée à un inhibiteur, comme l' $\alpha_1$ -antitrypsine ou l' $\alpha_2$ -macroglobuline, suggérant que la balance protéase-antiprotéase est potentiellement importante au cours du SDRA. Par ailleurs, des concentrations plasmatiques élevées d'élastase des PNN ont été observées dans les minutes qui suivent un polytraumatisme et celles-ci étaient corrélées à l'importance de l'agression pulmonaire aiguë (64).

Les MMP sont un groupe d'enzymes dont l'action dépend de la présence de zinc. Quatre classes ont été décrites : les collagénases interstitielles (avec MMP-1 et 4), les stromalysines (MMP-3 et 7), les gélatinases (MMP-2 et 9) et les métalloprotéases de membrane. Les inhibiteurs naturels des MMP sont l' $\alpha_2$ -macroglobuline, inhibiteur non spécifique et les TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*). Des concentrations élevées de gélatinases ont été observées dans le liquide de LBA chez les patients présentant un SDRA comparé à des sujets contrôles (65).

Les gélatinases dégradent plus particulièrement le collagène de type IV, constituant des membranes basales et le collagène XVII, constituant des jonctions intercellulaires. Cependant, le fait que les gélatinases participent au trouble de la perméabilité observé au cours de l'œdème pulmonaire lésionnel est remis en cause.

*In vitro*, le TNF- $\alpha$  induisait un trouble de la perméabilité épithéliale via la formation intracellulaire de fibres de stress et une action sur les jonctions intercellulaires. Le TNF- $\alpha$  induisait également une augmentation de la gélatinase B et d'un inhibiteur, le TIMP-1 mais sans augmentation de la balance gélatinolytique (66). *In vivo*, sur deux modèles d'agression pulmonaire aiguë différents chez le rat (instillation d'acide chlorhydrique et de LPS), Delclaux et al ont montré que les protéases des PNN (élastase et gélatinase B) ne participaient pas à l'augmentation de la perméabilité alvéolo-capillaire (67). Ainsi, les gélatinases ne semblent pas participer à l'augmentation de perméabilité à la phase initiale du SDRA mais pourraient être impliquées lors des phénomènes de réparation de cette barrière alvéolo-capillaire.

#### 4.4.3) Médiateurs lipidiques

Les métabolites de l'acide arachidonique sont impliqués dans la physiopathologie du SDRA. Ces métabolites sont libérés à partir des phospholipides par la phospholipase A<sub>2</sub>. L'acide arachidonique peut être oxydé soit par la voie des cyclooxygénases (COX) pour donner les prostanoides qui comprennent les prostaglandines, la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), soit par la voie des lipooxygénases pour former les leucotriènes. La PGI<sub>2</sub> synthétisée par l'endothélium vasculaire est un puissant antiagrégant plaquettaire aux propriétés vasorelaxantes. A l'inverse, le TXA<sub>2</sub> synthétisé principalement par les plaquettes et les macrophages induit une agrégation plaquettaire et des effets bronchoconstricteurs et vasoconstricteurs. Le TXA<sub>2</sub> est responsable d'hypertension artérielle pulmonaire précoce mais ne semble pas avoir d'effet direct sur la perméabilité capillaire. Pour les leucotriènes, notamment le leucotriène B<sub>4</sub>, leurs effets sont multiples; ils favorisent le chémotactisme des PNN et leurs adhésions et activations, ils interviennent aussi dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la contraction des cellules musculaires lisses et modulent la prolifération cellulaire. Les leucotriènes sont principalement sécrétés par les PNN et les macrophages.

Des concentrations élevées de leucotriènes ont été mises en évidence dans le liquide LBA et dans le plasma au cours de la phase précoce du SDRA et la concentration plasmatique de LTB4 au premier jour était corrélée avec la mortalité des patients (68).

#### 4.4.3) Apoptose dans l'agression pulmonaire aiguë

La voie extrinsèque de l'apoptose, via les récepteurs de mort a été impliquée au cours de l'agression pulmonaire aiguë. L'activation de la voie Fas Ligand/Récepteur Fas est un mécanisme important d'agression des cellules épithéliales alvéolaires au cours de l'agression pulmonaire aiguë. *In vitro*, le liquide LBA de patients présentant un SDRA induisait l'apoptose par un mécanisme dépendant du FasL soluble sur des cultures de cellules épithéliales alvéolaires (69). Albertine et al ont montré sur des prélèvements histologiques de poumons de patients présentant un SDRA une augmentation de l'expression de Fas sur l'épithélium alvéolaire des patients qui décédaient versus ceux qui décédaient d'une autre cause (70). D'autres voies de l'apoptose, notamment la voie intrinsèque mitochondriale sont impliquées dans l'agression pulmonaire aiguë. Des cultures cellulaires épithéliales alvéolaires soumises à l'hyperoxie induisait l'apoptose en activant la protéine pro-apoptotique « bax » au niveau de la membrane mitochondriale, ce qui conduisait à la libération du cytochrome C et à l'activation de la caspase 9 et à l'apoptose cellulaire (71).

#### 4.5) Résolution de l'agression pulmonaire aiguë et du SDRA

Elle aboutit le plus souvent à la restitution *ad integrum* des fonctions pulmonaires. L'œdème alvéolaire riche en protéines doit être résorbé, donc l'épithélium alvéolaire doit être réparé et les phénomènes inflammatoires résolus. Durant cette phase, le nombre de macrophages alvéolaires augmente pour éliminer les PNN entrés en phase d'apoptose. L'apoptose des PNN est un phénomène de limitation de la réaction inflammatoire. La résorption de l'œdème pulmonaire fait intervenir un transport actif de sodium et de chlore du secteur alvéolaire vers le secteur interstitiel. L'eau suit passivement selon un gradient iso-osmotique.

L'épithélium alvéolaire lésé est réparé par prolifération des cellules alvéolaires de type II afin de tapisser la membrane basale mise à nue puis les cellules se différencient en cellules alvéolaires de type I pour restaurer une architecture alvéolaire normale. La prolifération de cellules alvéolaires de type II est contrôlée par des facteurs de croissance produits comme le *keratinocyte growth factor* (KGF) et l'*hepatocyte growth factor* (HGF). La réparation de l'endothélium vasculaire pulmonaire fait intervenir un phénomène de migration et de prolifération des cellules endothéliales. Les progéniteurs endothéliaux circulants participent à la réparation de l'endothélium sur des modèles expérimentaux (72). La prolifération, la migration et l'incorporation des cellules endothéliales aux vaisseaux en formation sont sous la dépendance de molécules de la famille du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et de l'angiopoïétine. Dans une étude récente, l'augmentation des progéniteurs endothéliaux était associée à une augmentation de la survie au cours de l'agression pulmonaire aiguë (73).

## B) La cascade de la coagulation au cours de l'agression pulmonaire aiguë et du SDRA

L'activité pro-coagulante au cours du SDRA a été mise en évidence il y a plus de 30 ans. Bone et al ont rapporté en 1976 sur des autopsies de patients présentant un SDRA l'existence de microthrombi de fibrine dans les poumons que les patients présentaient ou non une coagulation intra-vasculaire disséminée CIVD (74).

### 1) Généralités sur l'hémostase normale

#### 1.1) Hémostase primaire

Au cours de cette étape interviennent la paroi vasculaire, les plaquettes et des protéines plasmatiques (en particulier, le facteur von Willebrand et le fibrinogène).

##### 1.1.1) Vasoconstriction réflexe

La vasoconstriction réflexe du vaisseau lésé constitue le premier moyen de défense visant à limiter le saignement. Cette étape représente le temps vasculaire et facilite l'adhésion des plaquettes au collagène du sous endothélium

##### 1.1.2) Sécrétion plaquettaire

L'agrégation plaquettaire s'effectue en présence de calcium. Les plaquettes s'agrègent entre elles par l'intermédiaire des molécules du fibrinogène qui se fixent sur un récepteur de la membrane plaquettaire, le GPIIb/IIIa. Cette étape devient irréversible sous l'action de la thrombine, générée par la coagulation plasmatique.

Les plaquettes agrégées meurent rapidement, leurs membranes fusionnent, les cellules sont lysées et libèrent leurs contenus cytoplasmiques. L'amas formé par ces plaquettes fusionnées correspond au clou plaquettaire ou thrombus blanc.

#### 1.2) Schéma général de la coagulation

L'activation de la cascade de la coagulation constitue un événement précoce au décours d'une agression tissulaire. La fonction primaire de ce système complexe et hautement régulé est de générer un réseau insoluble de filaments de fibrine qui fixe et stabilise un thrombus plaquettaire formé au niveau des tissus lésés.

La formation de ce caillot provisoire dépend de l'action de la thrombine et il est généré par l'activation successive de protéinases à partir des systèmes de la voie intrinsèque et extrinsèque. *In vivo*, l'activation de la coagulation est initiée par la voie extrinsèque. En conditions normales, le sang n'est pas exposé au facteur tissulaire (FT). En cas de lésion tissulaire, l'expression du FT à la surface des cellules non vasculaires ou des cellules endothéliales activées induit la formation du complexe FT-facteur VII activé (FVIIa). Le complexe TF-FVIIa catalyse l'activation du facteur X en facteur X activé (FXa) et du facteur IX en facteur IX activé (FIXa). Le FXa en association avec le facteur V activé catalyse la conversion de la prothrombine en thrombine qui convertit le fibrinogène en fibrine, le constituant principal du caillot. La coagulation se prolonge lorsque la thrombine synthétisée à partir du complexe initial TF-FVIIa-FXa catalyse l'activation de FXI, FIX, FVIII et FX. Ainsi la voie intrinsèque est activée et conduit à une génération prolongée de thrombine et une coagulation sanguine. La voie extrinsèque est importante dans l'initiation de la coagulation à partir de l'activation d'une quantité limitée de thrombine alors que la voie intrinsèque prolonge la coagulation par une amplification du signal initial. La thrombine peut également jouer un rôle dans la réponse inflammatoire et fibroproliférative pulmonaire. La thrombine favorise également l'inflammation en stimulant le chémotactisme des PNN et des lymphocytes, la prolifération des fibroblastes et des cellules musculaires lisses et en déclenchant la sécrétion de facteurs de croissance et de protéases à partir des cellules endothéliales, des macrophages et des cellules épithéliales (75). L'activation des plaquettes par la thrombine induit la sécrétion de médiateurs de l'inflammation : sérotonine, thromboxane A<sub>2</sub>, prostacyclines et facteurs de croissance (PDGF) (76).

D'autres effets de la thrombine ont été rapportés : activation plaquettaire précoce et indépendante de la coagulation, augmentation de l'adhésion leucocytaire, vasorelaxation. Ces effets ont été rapportés à l'activation de récepteurs cellulaires à la thrombine : les PAR (*proteinase activated receptor*) localisés au niveau des cellules immunitaires. Les PAR sont une famille de récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Quatre récepteurs ont été individualisés (PAR 1, 2, 3 et 4), dont trois sont activés par la thrombine. Le fonctionnement de ces récepteurs est fondé sur une protéolyse spécifique au niveau de l'extrémité N-terminale extracellulaire. L'activation génère un processus de signalisation intracellulaire via les protéines G et l'activation de la transcription de médiateurs inflammatoires.

La thrombine active les PAR 1, 3 et 4 sur les plaquettes. La signalisation intracellulaire conduit à une activation plaquettaire en coopération avec les récepteurs de membrane des plaquettes. En dehors de la thrombine, certaines protéases générées par l'activation de la coagulation peuvent activer les PAR : complexe trimoléculaire « FT-FVIIa-FXa » et PC pour PAR1, trypsine, FVIIa pour PAR2. L'activation des PAR au niveau des cellules endothéliales module également le tonus vasculaire microcirculatoire.

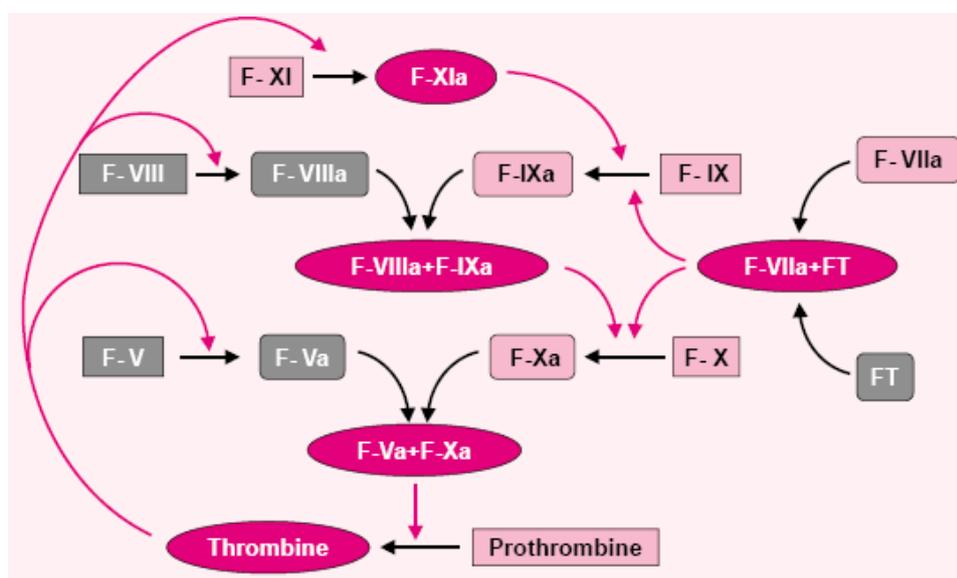
### 1.3) Régulation de la coagulation plasmatique :

La cascade de la coagulation est contrôlée par des mécanismes de rétrocontrôle négatif et par des anticoagulants circulants endogènes ou produits localement.

#### 1.3.1) L'antithrombine III (AT III)

L'AT III appartient à la famille des serpins (serines protéases). Elle joue un rôle majeur dans la régulation de la coagulation *in vivo*. L'AT III est synthétisée au niveau hépatique. Elle se fixe aux héparane-sulfates de la paroi vasculaire et inhibe les sérines protéases qui diffusent à distance de l'amas plaquettaire : la thrombine, le facteur Xa mais aussi les facteurs IXa, XIa et XIIa. Ces enzymes échappent au contrôle de l'AT tant qu'elles sont liées aux phospholipides de la membrane plaquettaire ce qui prolonge la production de thrombine au niveau du caillot hémostatique. Elles deviennent accessibles quand elles diffusent vers la phase liquide et plus encore vers la paroi vasculaire. La liaison de l'AT aux héparane-sulfates de la paroi vasculaire entraîne un changement de conformation de l'inhibiteur, lui permettant d'inhiber la thrombine, et les facteurs Xa, IXa, XIa, XIIa. L'AT n'inhibe pas le facteur VIIa de façon efficace. L'AT III agit en formant avec chacune de ces sérines protéases un complexe équimoléculaire qui implique le site actif de l'enzyme et le site réactif de l'AT III. Le site réactif arg 393-ser 394 de l'AT III, situé dans la région carboxy-terminale de la molécule, est scindé par la sérine protéase et la scission est suivie de l'établissement d'une liaison ester covalente entre la sérine active de l'enzyme et l'arginine du site réactif de l'AT III. Le complexe formé, irréversible et inactif, se détache de l'héparane-sulfate et se fixe sur un récepteur de l'hépatocyte pour être internalisé. L'héparane-sulfate est alors disponible de nouveau pour fixer l'AT. L'interaction entre l'AT III et les sérines protéases est lente mais considérablement accélérée par l'héparine. L'AT régule la génération de thrombine initiée par le FT et cet effet est potentialisé par le *TF pathway inhibitor* (TFPI).

Les complexes thrombine-antithrombines sont ensuite éliminés de la circulation sanguine par le système réticulo-endothélial. Les autres inhibiteurs physiologiques importants sont représentés par l'héparine cofacteur II et la protéase nexin-1 qui inhibent la thrombine ; l' $\alpha_2$ -macroglobuline et l' $\alpha_1$ -antitrypsine inhibent la thrombine et les facteurs IXa, Xa et Xa ; enfin, l'inhibiteur de la protéase dépendante de la protéine Z induit une inhibition rapide du facteur Xa en présence de la protéine Z, des phospholipides pro-coagulants et du calcium. Le schéma simplifié de la cascade de la coagulation est représenté sur la figure 1.

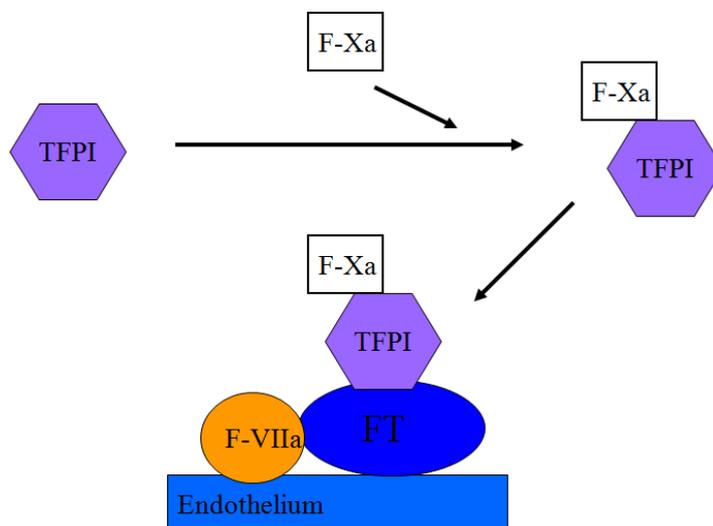


**Figure 1:** Schéma simplifié de la cascade de la coagulation. La cascade est déclenchée par la liaison du facteur VIIa à son cofacteur : le FT. Sans son cofacteur, le facteur VII est essentiellement inactif. Le FT est exposé en cas de brèche vasculaire. Une fois lancée, la cascade est amplifiée (1) : verticalement, chaque complexe du facteur IXa, associé à son cofacteur activé (VIIIa) catalyse l'activation du facteur X et en s'associant avec le facteur Va, chaque facteur Xa catalyse l'activation de la thrombine (2) : circulairement, l'amplification cyclique résulte de l'activation, par le produit ultime de la cascade (la thrombine), du facteur XI et des deux cofacteurs-clés du système (V et VIII).

### 1.3.2) Le *TF pathway inhibitor* (TFPI)

La voie extrinsèque est principalement contrôlée par un inhibiteur plasmatique produit par les cellules endothéliales, le TFPI qui inactive les complexes TF-FVIIa. Le TFPI est un anticoagulant naturel présent dans le sang circulant et fixé sur les glycoaminoglycanes de la paroi vasculaire.

Le TFPI forme d'abord un complexe binaire avec le facteur Xa, puis ce complexe se fixe sur le facteur VIIa, lui-même fixé au FT. Le complexe quaternaire Xa-TFPI-VIIa-FT bloque l'activité du FT (figure 2). La voie intrinsèque est contrôlée par l'antithrombine qui inhibe la thrombine les autres sérines protéases de la cascade de la coagulation en présence d'héparine.

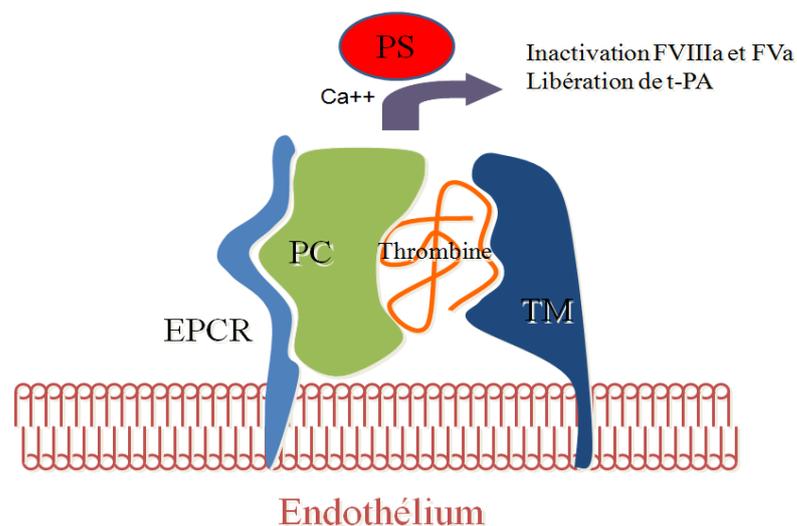


**Figure 2:** activation du TFPI (*Tissue factor pathway inhibitor*). Le TFPI forme un complexe binaire avec le facteur Xa, puis ce complexe se fixe sur le facteur VIIa, lui-même fixé au FT. Le complexe quaternaire Xa-TFPI-VIIa-FT bloque l'activité du FT

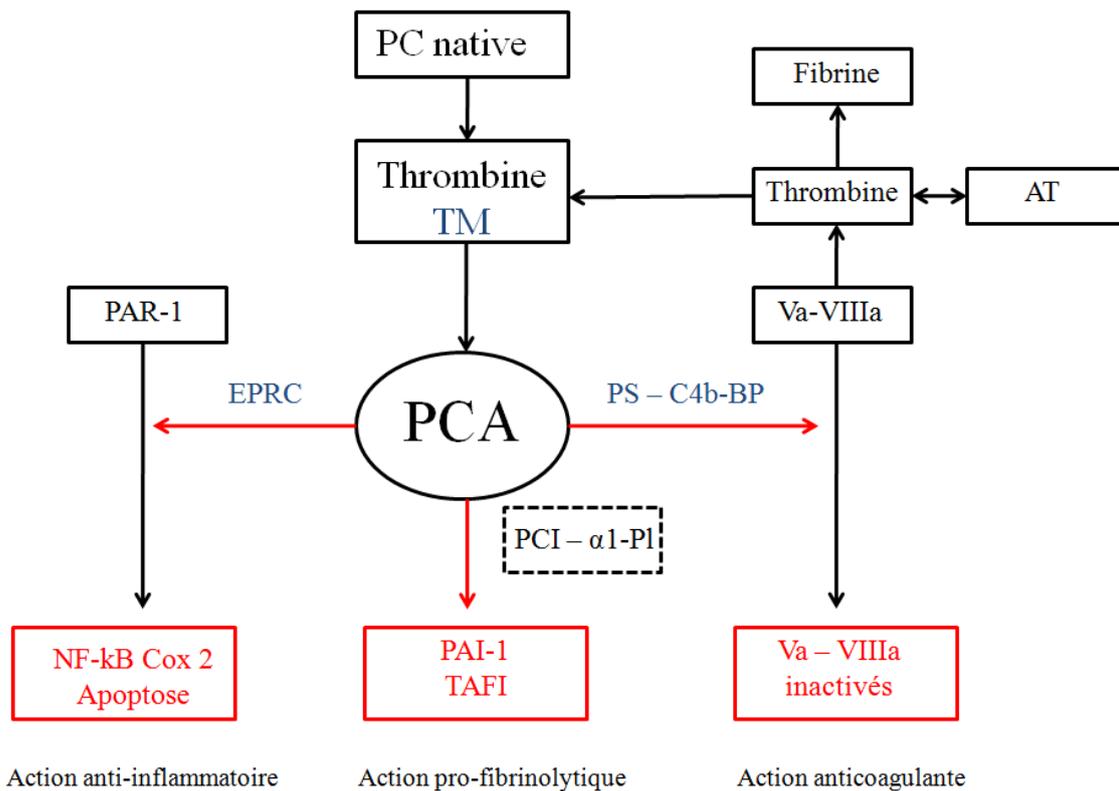
### 1.3.3) La protéine C

Le système de la protéine C activée (PCa) limite la génération de thrombine et exerce une activité pro-fibrinolytique et anti-inflammatoire. La PC est synthétisée par le foie sous la dépendance de vitamine K à l'état de zymogène inactif. Elle est activée par la thrombine au niveau d'un récepteur spécifique, l'*Endothelial protein C receptor*, (EPRC). Son activation est régulée par un récepteur membranaire de la cellule endothéliale : la thrombomoduline (TM). La PC n'est activée que lorsque la thrombine a été produite. La liaison de la thrombine à la TM induit une modification importante de la conformation du cofacteur. Cette transformation, en dévoilant un site de liaison cryptique pour la PC, permet à la thrombine d'activer rapidement la PC en PCa. Ainsi, en se fixant à la TM, la thrombine perd ses propriétés procoagulantes et acquiert des propriétés anticoagulantes : elle devient incapable de transformer le fibrinogène en fibrine, d'activer les plaquettes ou les facteurs V et VIII mais est capable d'activer la PC.

Le complexe TM-thrombine formé active la PCa et la TM amplifie cette conversion plus de 1000 fois comparativement à l'action de la thrombine seule. L'activation de la PC se fait par scission d'une seule liaison peptidique (arg 12-leu) sur la chaîne lourde, libérant un peptide d'activation. Le système d'activation de la PCa est représenté sur les figures 3 et 4. La PCa est une sérine protéase qui exerce ensuite une action protéolytique vis-à-vis des cofacteurs Va et VIIIa. La réaction nécessite que l'enzyme (PCA) et les substrats (FVa et FVIIIa) soient fixés sur les phospholipides anioniques exposés à la surface des plaquettes activées, en présence de calcium et en présence d'un cofacteur protéique, la protéine S (PS). La PS est synthétisée sous forme active par le foie, sous la dépendance de la vitamine K. La PS circule dans le plasma sous une forme soluble et une forme liée à une protéine transporteuse du complément, la *C4b binding protéin* (C4bBP). L'activation de la PC est de plus augmentée (environ 20 fois) *in vivo* lorsqu'elle est liée au récepteur endothélial à la PC (EPRC). Ce second récepteur pour la PC dont la densité est très élevée dans les gros vaisseaux comme l'aorte fixe la PC et accélère donc son activation par le complexe thrombine-TM (77). La PC exerce donc une rétroaction négative sur la production de thrombine, dans une cascade d'activation faisant intervenir le complexe thrombine-TM comme mécanisme activateur du zymogène, l'EPRC comme modulateur de l'activation et la PS libre comme cofacteur de l'activité anticoagulante (78). La PCa est inhibée physiologiquement par l' $\alpha_1$  protéinase inhibiteur, l' $\alpha_2$ -macroglobuline et par un inhibiteur plasmatique (protéine C inhibiteur ou PCI), dont l'activité est augmentée par l'héparine (78).



**Figure 3:** système d'activation de la PCa. PS: protéine S, TM: thrombomoduline, EPCR: *Endothelial cell PC receptor*.

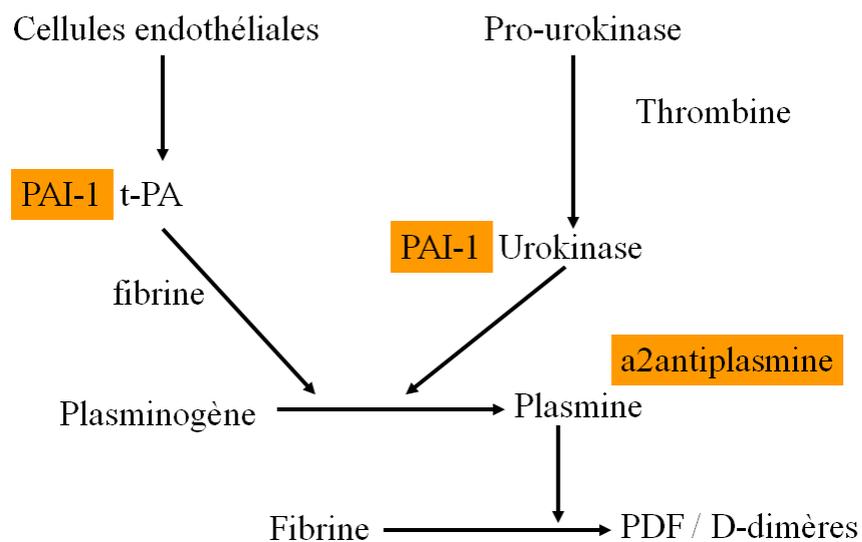


**Figure 4:** le système PC-PCA (d’après Rezaie et al (79)).  $\alpha$ 1-PI : alpha 1 protéinase inhibiteur ; AT : antithrombine ; C4bBP : protéine de liaison du C4b ; EPRC : récepteur endothélial de la protéine C ; NF-kB : facteur de transcription nucléaire ; PAI-1 : inhibiteur de l’activateur du plasminogène ; PAR-1 : protéase activated receptor ; PCA : protéine C activée ; PS : protéine S ; TAFI : inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine ; TM : thrombomoduline. En bleu sont figurés les cofacteurs régulateurs des effets physiologiques de la PC, en rouge les effets majeurs de la protéine.

#### 1.4) La fibrinolyse et les inhibiteurs de la fibrinolyse

La fibrinolyse est le processus qui entraîne la dissolution de la fibrine formée au niveau de la brèche vasculaire. Ce processus fait intervenir le plasminogène, une glycoprotéine plasmatique de synthèse hépatique, comportant dans sa structure cinq boucles lui permettant de se fixer au caillot de fibrine. Sous l’influence d’activateurs, le plasminogène est transformé en une sérine protéase, la plasmine, qui scinde la fibrine en produits de dégradation solubles dans le plasma qui seront emportés par le flux sanguin. Les cellules endothéliales synthétisent l’activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et son inhibiteur, le *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) (figure 5).

Dans le plasma, le PAI-1 est en excès par rapport à son enzyme cible, le tPA, ainsi ce dernier complexé au PAI-1 est inactif. Si un thrombus se forme, le tPA qui a une affinité très importante pour la fibrine, se fixe sur celle-ci, échappant à l'inhibition du PAI-1. Parallèlement, le plasminogène dont l'affinité pour la fibrine est aussi très élevée, se fixe sur la fibrine, et le tPA fixé à proximité transforme le plasminogène en plasmine. Dans la paroi vasculaire, un autre activateur, l'urokinase (uPA), transforme le plasminogène en plasmine qui intervient dans les processus de dégradation de la matrice extracellulaire en activant les métalloprotéases. Ainsi, la fibrinolyse extravasculaire en particulier, pulmonaire est contrôlée par l'uPA et la thrombolyse intravasculaire par tPA. La conversion du plasminogène en plasmine est régulée par des inhibiteurs endogènes, le PAI-1. Le PAI-1 est une serpine produite par de nombreuses cellules (cellules endothéliales, monocytes, hépatocytes, fibroblastes, adipocytes, mégacaryocytes). Il est circulant dans le plasma et peut être libéré par les plaquettes. Le rôle de PAI-1 est de prévenir toute activation de la fibrinolyse en inactivant le tPA et l'uPA. L' $\alpha$ 2-antiplasmine est un autre inhibiteur, synthétisé par le foie, elle inhibe rapidement la plasmine dans la circulation. Le TAFI (*thrombin activatable fibrinolysis inhibitor*) ou procarboxypeptidase B est également synthétisé par le foie et présent dans le plasma. Il est transformé par le complexe thrombine-TM en carboxypeptidase. Son activité carboxypeptidase élimine les sites C-terminaux de la fibrine sur lesquels se lie le t-PA et le plasminogène ayant ainsi un effet inhibiteur sur la fibrinolyse.



**Figure 5** : schéma de la fibrinolyse. PAI-1 : *Plasminogen activator inhibitor-1* ; PDF : produits de dégradation du fibrinogène.

## 2) La cascade de la coagulation au cours de l'agression pulmonaire aiguë

### 2.1) Initiation de la coagulation

#### 2.1.1) Rôle de l'épithélium alvéolaire

En cas d'agression pulmonaire aiguë et de maladies pulmonaires chroniques comme la fibrose pulmonaire, l'équilibre hémostatique est en faveur d'une activité procoagulante et antifibrinolytique (80).

Les macrophages alvéolaires participent à l'état procoagulant intra-alvéolaire en favorisant la production de FT. *In vitro*, les macrophages alvéolaires humains en culture exprimaient à leurs surfaces l'activité FT et avaient la capacité de libérer des vésicules procoagulantes dans la média (81). L'épithélium alvéolaire joue également un rôle important pour la modulation du FT au cours de l'agression pulmonaire aiguë. Les cultures cellulaires épithéliales de rats exprimaient une activité procoagulante dépendante du FT dix à vingt fois plus importante que les cultures concomitantes de macrophages alvéolaires (82). Sur un modèle de culture cellulaire alvéolaire épithéliale humaine (lignée A549), l'utilisation d'une combinaison de cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) stimulait l'expression du FT (83). Ces études suggèrent donc que l'épithélium alvéolaire peut activer la coagulation intraalvéolaire dépendante du FT en réponse à un stimulus inflammatoire.

*In vivo*, plusieurs études expérimentales ont évalué le rôle du FT au cours de l'agression pulmonaire aiguë. Sur un modèle d'agression pulmonaire induite par l'administration intraveineuse de LPS chez le lapin, Jesmin et al ont montré que l'hypoxémie et le trouble de perméabilité vasculaire coïncidaient avec l'augmentation de l'expression du FT au niveau de l'endothélium vasculaire pulmonaire, l'épithélium alvéolaire et les muscles lisses bronchiques et des voies aériennes (84). L'augmentation de l'expression du FT peut survenir en partie par la stimulation de la transcription de NF $\kappa$ B, constituant un lien entre l'inflammation et la coagulation (85). En particulier, l'IL-6 est la cytokine principale impliquée dans l'expression du FT (86). L'augmentation de l'expression du FT peut aussi survenir en réponse à une agression pulmonaire directe. L'exposition à l'hyperoxie chez les babouins entraînait une augmentation du complexe FT-FVIIa dans le liquide du LBA, suggérant une initiation intraalvéolaire de la coagulation en réponse à cette agression pulmonaire (87).

Chez les patients présentant un SDRA, la voie extrinsèque dépendante du FT est le mécanisme prédominant qui active la cascade de la coagulation localement dans les poumons. En 1989, Idell et al ont rapporté que l'activité procoagulante TF-FVII était augmentée dans le liquide de LBA au cours du SDRA (88). Cette activité procoagulante pouvait persister jusqu'au 7<sup>e</sup> jour. Les patients à risque de développer une agression pulmonaire aiguë ont également une augmentation de l'activité procoagulante dans le compartiment alvéolaire comparé aux sujets sains (89). Dans une étude récente, l'étude immunohistochimique de biopsies pulmonaires de patients présentant un SDRA a révélé la présence de FT au niveau des cellules épithéliales alvéolaires, des macrophages intraalvéolaires et des membranes hyalines (83). L'antigène plasmatique du FT et l'activité procoagulante du FT étaient plus élevés dans le liquide d'œdème pulmonaire que dans le plasma. Ce travail suggérait que l'épithélium alvéolaire était capable de moduler la coagulation intraalvéolaire en stimulant l'expression du FT en réponse à un stimulus inflammatoire et contribuait ainsi à la déposition intraalvéolaire de fibrine au cours du SDRA. Par ailleurs, l'activité procoagulante du FT est élevée dans le compartiment alvéolaire au cours de l'agression pulmonaire aiguë directe et infectieuse ou indirecte et secondaire au sepsis. Gunther et al ont montré une augmentation intra-alvéolaire de l'activité procoagulante dépendante du FT dans quatre groupes de patients : les patients ayant un SDRA, les patients en ventilation spontanée et ceux bénéficiant d'une ventilation mécanique pour une pneumonie et les patients ventilés pour une pneumonie et un SDRA (90). En plus des modifications alvéolaires de la voie du FT, une activation systémique de la coagulation peut survenir au cours de l'agression pulmonaire aiguë. L'équilibre entre le FT et le TFPI est également perturbé au cours du SDRA. Une augmentation du FT associée à une diminution du TFPI circulant a été mise en évidence chez les patients avec un SDRA survenant au cours du sepsis ou d'un polytraumatisme par rapport à des patients à risque de SDRA ou des sujets sains (91). Les auteurs suggéraient qu'au cours du SDRA, l'augmentation de l'élastase sécrétée par les PNN activés dégradait le TFPI. Enfin, Bastarache et al ont mesuré le TFPI sur le liquide d'œdème pulmonaire de patients présentant un SDRA. Le TFPI intraalvéolaire était augmenté dans le SDRA mais celui-ci était une forme tronquée et inactive, incapable de neutraliser l'activité procoagulante du FT (92).

## 2.1.2) Modulation du FT

La modulation pharmacologique de la voie du FT a été réalisée sur différents modèles expérimentaux d'agression pulmonaire aiguë. L'administration en pré et posttraitement du TFPI recombinant chez le rat au cours de l'agression pulmonaire induite par le sepsis inhibait le trouble de perméabilité vasculaire pulmonaire induit par le LPS, l'expression du TNF- $\alpha$  dans les tissus pulmonaires, les cytokines chémoattractantes pour les PNN et l'activité myéloperoxydase (93). Dans cette étude, l'inhibition spécifique des facteurs VIIa et Xa ne produisaient pas les mêmes effets, suggérant que le TFPI pouvait avoir des effets physiologiques indépendants de la coagulation et réduire l'agression pulmonaire par inhibition de l'activation des leucocytes. Chez les rats bénéficiant d'une instillation intratrachéale de LPS, le blocage spécifique du FT avec inactivation du FVIIa diminuait l'inflammation pulmonaire et les dépôts de fibrine, la fuite protéique alvéolo-capillaire avec diminution de l'expression de l'ARNm du TFPI dans les poumons (94). Sur un modèle de sepsis léthal à *E. coli* chez le babouin, Carraway et al ont montré que l'injection de l'inhibiteur du facteur VIIa améliorait la fonction rénale et diminuait l'agression pulmonaire avec une amélioration de la mortalité (95).

Une étude clinique, randomisée et multicentrique a évalué l'administration de TFPI recombinant humain chez les patients présentant un sepsis sévère et une coagulopathie. 1754 patients ont été étudiés dont 86% présentaient une agression pulmonaire aiguë. L'administration de TFPI recombinant ne modifiait pas la mortalité à la fin de l'étude et majorait les risques de saignement (96).

## 2.2) Propagation de la coagulation

### 2.2.1) L'antithrombine (AT)

L'héparine et d'autres glycosaminoglycanes et protéoglycanes sont exprimées à la surface endothéliale et fixe l'AT avec une grande affinité. Pour inactiver la thrombine, l'AT doit être liée à l'héparine. En absence d'héparine, l'AT se fixe à la surface endothéliale et se comporte comme un anticoagulant mais possède également des effets sur la sécrétion de prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>). La PGI<sub>2</sub> est un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, qui diminue la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, l'activation des PNN ainsi que leur adhésion aux cellules endothéliales, elle inhibe aussi la libération d'élastase et des ROS (97).

L'AT a été utilisée au cours de différents modèles expérimentaux. Dans un modèle d'agression pulmonaire induite par le LPS, l'administration intraveineuse d'AT (250 UI/kg) réduisait l'agression vasculaire pulmonaire et la séquestration pulmonaire des PNN (98). L'héparine, seule ou en combinaison avec l'AT ou l'administration d'un inhibiteur de l'AT (le DEGR-Xa) ou de l'AT avec de l'indométacine, un inhibiteur de la lipooxygénase ne prévenaient pas les lésions pulmonaires. L'étude suggérait que les propriétés anti-inflammatoires de l'AT étaient dépendantes de la libération de la prostacycline. La dose nécessaire d'AT pour neutraliser l'agression vasculaire induite par le LPS était bien plus élevée que la dose anticoagulante. Ainsi, ces effets sont seulement retrouvés en l'absence de concentration élevée d'héparine et en présence de concentrations supraphysiologiques d'AT. Sur un modèle canin d'ischémie reperfusion de transplantation pulmonaire, l'AT prévenait l'hypoxémie et réduisait l'expression des molécules d'adhésion et la réponse inflammatoire (97). A l'inverse, Dschietzig et al suggérait que l'AT n'induisait pas la sécrétion de prostacycline. Sur leur modèle de poumons isolés exposés au LPS, l'utilisation d'AT induisait la sécrétion d'endothéline-1 mais pas de prostacycline (99). Finalement, la combinaison d'AT et d'inhibiteur de la C1 estérase a été proposée pour majorer l'inhibition des dépôts de fibrine et du trouble de la perméabilité vasculaire (100). Sur des modèles d'agression pulmonaire directe, les données sont moins nombreuses et plus contradictoires. Sur un modèle d'agression pulmonaire associant l'inhalation de fumée et l'instillation intratrachéale de *P. aeruginosa*, l'administration intraveineuse d'AT humaine recombinante en post traitement réduisait l'œdème pulmonaire et diminuait l'obstruction des voies aériennes par les moules bronchiolaires (101). Sur un modèle de pneumopathie aiguë à *P. aeruginosa*, une étude issue de notre laboratoire a montré que l'administration d'ATIII recombinante s'accompagnait d'une activation massive de la thrombine alvéolaire et d'une majoration du trouble de perméabilité alvéolo-capillaire (102).

## 2.2.2) La PC

### 2.2.2.1) PCa et coagulation

La PCa joue un rôle majeur dans la coagulation en limitant la génération de thrombine. La PCa possède ainsi une activité antithrombotique visant à réduire les dépôts de fibrine au cours de l'agression pulmonaire aiguë mais aussi une action profibrinolytique.

*In vitro*, la PCa inhibe l'activité de PAI-1 et peut, en réduisant la génération de thrombine, limiter l'activation du TAFI (103, 104). La PCa exerce un effet anticoagulant sur le poumon inflammatoire. En effet, l'administration de PCa par voie intraveineuse après instillation pulmonaire de LPS chez l'homme induisait une diminution de la coagulation locale (baisse des complexes thrombine-AT et du FT soluble dans le LBA) (3).

#### 2.2.2.2) PCa et inflammation

La PC joue un rôle fondamental dans la régulation de l'inflammation. Les capacités de production de la PC sont limitées dans le poumon mais la PCa est présente dans le liquide de LBA (105).

L'activation de la PCa est altérée au cours de l'inflammation pulmonaire et cette contre-régulation est dépendante de la TM. En effet, sur un modèle d'agression pulmonaire induit par le LPS chez le rat, l'administration intraveineuse de TM soluble recombinante prévient l'augmentation de perméabilité vasculaire pulmonaire induite par le LPS (106). Les auteurs ont montré que la TM recombinante prévenait le trouble de perméabilité via l'activation de la PC et que cette action était indépendante de son activité anticoagulante mais dépendante de sa capacité à inhiber l'activation des leucocytes.

L'inflammation pulmonaire aiguë est modifiée par la PCa. La PCa peut prévenir l'agression pulmonaire sur des modèles expérimentaux d'endotoxémie. *In vivo*, l'administration de PCa prévenait le trouble de perméabilité vasculaire pulmonaire induit par l'injection intraveineuse de LPS chez le rat (107). L'effet était indépendant de la coagulation et la PCa diminuait l'infiltration pulmonaire des PNN. *In vitro*, Grey et al ont montré que l'administration de PCa sur des cultures cellulaires de monocytes humains diminuait la production de TNF- $\alpha$  en réponse au LPS, suggérant que la PC avait des effets directs anti-inflammatoires sur les cellules immunes (108). White et al ont montré par la suite que la diminution de la production du TNF- $\alpha$  était le résultat de l'inhibition de l'activation du facteur de transcription, « *nuclear factor-kappa B* » (NFkB) (109). La PC peut également moduler le chimotactisme des PNN et des monocytes par l'interaction avec un récepteur similaire de l'EPRC. En effet, *in vitro*, l'administration d'un anticorps bloquant l'interaction entre la PCa et l'EPRC diminuait les effets inhibiteurs de la PCa sur la migration de PNN humains (110).

La PCa semble exercer son activité anti-inflammatoire indépendamment de ses propriétés antithrombotiques. Sur un modèle de rats cirrhotiques, après injection de LPS, l'administration de PCa prévenait la dysfonction d'organes et améliorait la survie à 12 heures (111). La PCa prévenait la déposition de fibrine dans le foie, les reins et les poumons. L'œdème interstitiel et l'infiltration des PNN étaient significativement diminués en comparaison avec les animaux ayant reçu le LPS seul. Le TNF- $\alpha$  plasmatique était diminué et l'expression des molécules d'adhésion-1 était diminuée dans le foie, les reins mais pas dans les poumons en dépit d'une amélioration sur le plan histologique. Sur un modèle d'agression pulmonaire induite par le LPS chez le rat, la PCa (100  $\mu$ g/kg) mais pas le DEGR-Xa (un inhibiteur sélectif de la génération de la thrombine) ni le DIP-PAC (PC inactive) prévenait l'œdème pulmonaire et l'infiltration des PNN dans le secteur interstitiel pulmonaire et diminuait la concentration plasmatique de TNF- $\alpha$  (112). De la même manière, l'amélioration de la lésion vasculaire ne semblait pas être en relation avec l'inhibition de la génération de thrombine. La PCa ne réduisait pas *in vitro* la sécrétion d'élastase par les PNN activés suggérant que la réduction de l'infiltration pulmonaire des PNN n'était pas une inhibition directe des PNN par la PCa mais secondaire à la diminution de la sécrétion de TNF- $\alpha$ . De plus, le TNF- $\alpha$  peut augmenter l'expression des sélectines E par les cellules endothéliales et favoriser l'adhésion des leucocytes activés.

Les interactions entre la PCa et l'inflammation ont été confirmées sur certaines études réalisées chez l'homme. Dans une étude portant sur 779 patients présentant une agression pulmonaire aiguë ou un SDRA, les concentrations de PC étaient significativement diminuées et constituaient un facteur indépendant de mortalité hospitalière (113). Wang et al ont montré que la concentration de l'EPRC soluble au cours de l'agression pulmonaire aiguë était deux fois plus élevée dans le liquide de LBA que dans le plasma, suggérant une production pulmonaire. *In vitro*, les cultures cellulaires épithéliales alvéolaires exprimaient la TM et l'EPRC et pouvaient activer la PC à leurs surfaces cellulaires. La PCa pouvait être inhibée par une solution de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$  et IFN- $\gamma$ ), soulignant l'association entre la coagulation et l'inflammation (114). Ces données montrent ainsi le rôle central de l'épithélium alvéolaire dans la modulation de la coagulation intraalvéolaire.

#### 2.2.2.3) PCa et endothélium pulmonaire

L'endothélium vasculaire pulmonaire est particulièrement sensible à l'agression induite par le sepsis, le polytraumatisme ou d'autres situations d'agression systémique. La diminution de l'activation de la PC à la surface de l'endothélium vasculaire pulmonaire peut contribuer au développement de thromboses microvasculaires diffuses survenant au cours de l'agression pulmonaire aiguë. *In vitro*, les études indiquaient que la PCa possédait des effets anti-inflammatoires et antiapoptotiques sur les cellules endothéliales. Un mécanisme possible est l'interaction avec l'apoptose endothéliale en bloquant la voie dépendante de la protéine p53 (115). Esmon et al ont montré que la PCa en combinaison avec son récepteur membranaire réduisait la translocation nucléaire de NFκB, avec une réduction de la production de cytokines et de l'expression de molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium (116). Ces données suggèrent que la PCa peut prévenir l'agression vasculaire pulmonaire induite par le LPS en inhibant la production de TNF-α par les monocytes et non par ses propriétés anticoagulantes. Enfin, *in vitro*, la PCa à dose thérapeutique diminuait le trouble de perméabilité des cellules endothéliales induit par la thrombine et l'IL1-β. L'effet était lié à des réarrangements du cytosquelette d'actine et myosine via l'activation de la voie de signalisation du système rho/rhokinases (117).

#### 2.2.2.4) TM et agression pulmonaire aiguë

La TM a été étudiée dans le poumon où son expression est réduite au cours du sepsis (118). La TM peut être clivée de la surface endothéliale par l'élastase des neutrophiles et circuler sous forme de TM recombinante soluble (rhs-TM) et activer la PCa. Sur un modèle de thrombo-embolies induites par l'injection de thrombine chez la souris, l'administration de TM recombinante réduisait les dépôts de fibrine dans les artères pulmonaires (119). Le prétraitement par la rhs-TM chez le rat avant l'injection de LPS réduisait l'œdème pulmonaire, la formation de microthromboses et l'accumulation de l'albumine marquée à l'iode radioactif dans les poumons (120). Uchiba et al ont montré que la rhs-TM prévenait de l'agression pulmonaire induite par le LPS en favorisant la génération de PCa et non par un mécanisme lié à l'inhibition de thrombine. La même équipe a montré que les propriétés anti-inflammatoires de la rhs-TM étaient corrélées à sa capacité à générer de la PCa (121).

L'infiltration leucocytaire et l'augmentation du trouble de la perméabilité vasculaire ne pouvaient pas être prévenues quand la liaison de la rhs-TM à la thrombine était inhibée par un anticorps monoclonal dirigé contre le site de fixation de la thrombine, avec une réduction conséquente de la PC (122). Sur un modèle murin de glomérulonéphrite et d'hémorragie alvéolaire induites par le LPS et des anticorps anti-membrane basale glomérulaire, le rhs-TM en posttraitement était comparé à l'héparine. Des doses élevées d'héparine (250 UI/kg/h) et la rhs-TM prévenaient la formation de thrombi et les dépôts de fibrine mais l'héparine était associée à des hémorragies pulmonaires massives (123).

### 2.3) La fibrinolyse au cours de l'agression pulmonaire aiguë

En situation normale, la formation de fibrine via le FT est contre balancée par sa dégradation par le système du plasminogène. La fibrinolyse est altérée chez les patients présentant une agression pulmonaire aiguë et une fibrose pulmonaire. Des études expérimentales et humaines ont montré que les concentrations de PAI-1 étaient augmentées dans ces situations pathologiques. Comme pour le FT et la PC, l'activité de PAI-1 est en étroite relation avec l'inflammation. *In vitro*, sur des cultures cellulaires endothéliales, le TNF- $\alpha$  induisait la production de PAI-1 via l'activation de NFkB (124). Les poumons peuvent moduler l'activité fibrinolytique en réponse à un stimulus inflammatoire. Les macrophages alvéolaires humains isolés chez des sujets sains exprimaient l'activité PA et étaient capables de dégrader une matrice de fibrine en présence de plasminogène (125). Par ailleurs, les macrophages alvéolaires humains exposés au LPS inhibaient la fibrinolyse par une augmentation de l'activité de PAI-1 (126). Les études *in vivo* supportent ces résultats. *In vivo*, sur un modèle murin, l'instillation intratrachéale de LPS augmentait l'expression génique de PAI-1 sur les macrophages alvéolaires (127). Sur un modèle murin d'irradiation pulmonaire, les macrophages alvéolaires isolés présentaient une diminution dose dépendante de l'activité fibrinolytique par un mécanisme dépendant du PA (128). Chez les patients présentant un SDRA, l'analyse par hybridation *in situ* de macrophages alvéolaires humains a objectivé une augmentation de l'ARNm de PAI-1 (126).

Ainsi ces données suggèrent que les poumons ou les macrophages alvéolaires isolés et exposés à un stimulus inflammatoire, comme le sepsis peuvent diminuer l'activité fibrinolytique en diminuant l'activateur du plasminogène et augmentant son inhibiteur, le PAI-1. Le PA a été utilisé au cours d'un modèle léthal d'agression pulmonaire aiguë par traumatisme chez le cochon (129). Le traumatisme induisait un œdème alvéolaire hémorragique. L'administration de PA (urokinase ou t-PA) prévenait de l'hypoxémie et tous les animaux survivaient sans hémorragie alvéolaire ni infiltration pulmonaire à PNN. L'endothélium vasculaire pulmonaire se comporte différemment des autres endothéliums vasculaires dans la modulation du système activateur du plasminogène. *In vitro*, les cellules endothéliales microvasculaires humaines sécrétait l'uPA alors que le tPA était le PA prédominant sécrété par les cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (130). Une étude a évalué l'activité fibrinolytique à partir de cellules endothéliales microvasculaires de patients présentant un SDRA. Grau et al ont montré que les cellules endothéliales microvasculaires au cours du SDRA exprimaient de façon constitutive plus de PAI-1 que les cellules de sujets contrôles et avaient une diminution marquée du potentiel fibrinolytique évalué par la mesure du rapport tPA :PAI-1 (131). Cette étude suggère qu'en conditions de base, l'endothélium vasculaire pulmonaire favorise la fibrinolyse mais l'équilibre bascule vers un état antifibrinolytique en cas d'agression pulmonaire aiguë. Gunther et al ont comparé le liquide de LBA des patients en ventilation spontanée présentant une pneumonie à des sujets contrôles, des patients ventilés pour une pneumonie, des patients ventilés pour un SDRA et des patients ventilés pour une pneumonie et un SDRA. Les auteurs ont observé une diminution de l'activité fibrinolytique et une augmentation de l'uPA dans tous les groupes comparés au groupe contrôle et une augmentation de l'activité du PAI-1 dans tous les groupes à l'exception des patients en ventilation spontanée présentant une pneumonie (90). Prabhakaran et al ont mesuré la concentration de l'antigène PAI-1 dans le liquide de LBA au cours de l'agression pulmonaire aiguë en comparaison avec les patients présentant un œdème pulmonaire aiguë hydrostatique (132). Les niveaux de PAI-1 dans le plasma et le liquide d'œdème étaient plus élevés plus au cours de l'agression pulmonaire aiguë et étaient corrélés à la mortalité des patients. De plus, les concentrations de PAI-1 étaient plus élevées dans le liquide d'œdème que dans le plasma suggérant une source intra-alvéolaire de PAI-1. D'autres études ont mesuré le PA et le PAI-1 circulants au cours de l'agression pulmonaire aiguë.

Les patients avec un SDRA et ceux à risque de SDRA avaient des concentrations plus élevées de PAI-1 comparées au groupe contrôle mais les concentrations n'étaient pas corrélées avec les scores d'agression pulmonaire, la perméabilité pulmonaire microvasculaire et l'évolution clinique (133, 134). Enfin une dernière étude portant sur 779 patients avec une agression pulmonaire aiguë ou un SDRA a montré qu'une concentration plasmatique élevée de PAI-1 constituait un facteur prédictif indépendant de mortalité (113). Ces données suggèrent l'hypothèse que la fibrinolyse dans le poumon joue un rôle plus important dans le développement et la résolution de l'agression pulmonaire aiguë que la fibrinolyse systémique et illustre la parfaite complexité des interactions entre les facteurs locaux et systémiques dans l'agression pulmonaire induite par le sepsis. La voie d'activation extrinsèque de la coagulation, de la fibrinolyse et des inhibiteurs naturels de la coagulation dans le compartiment alvéolaire sont représentés schématiquement sur la figure 6.

### 3) Interactions entre l'inflammatoire et l'hémostase

Durant la réponse inflammatoire, le poumon présente un état pro-coagulant. Inflammation et coagulation ont des interactions étroites et vont ensemble dans une direction proinflammatoire et procoagulante. Ces interactions peuvent être résumées de la manière suivante :

Modulation de la coagulation par la réponse inflammatoire :

- L'IL-6 stimule l'expression du FT mais n'a pas d'effet sur la fibrinolyse (135, 136).
- L'injection de TNF- $\alpha$  au volontaire sain induit une fibrinolyse, suivie d'une activation de la coagulation et d'une inhibition de la fibrinolyse (137). Le TNF- $\alpha$  stimule l'expression du FT via l'augmentation de la production de l'IL-6 (138).
- Le TNF- $\alpha$  diminue la transcription du gène de la TM et l'expression de cette protéine à la surface des cellules endothéliales (139).
- Le TNF- $\alpha$  augmente les concentrations de PAI-1 (140).
- Le TNF- $\alpha$  inhibe l'activité de la PCa (141).
- L'IL-1 stimule l'expression du FT et diminue l'expression de la TM (142).

- L'élastase des PNN diminue l'activité de la TM par clivage de la molécule (143).
- Les ROS produits par les PNN oxydent les résidus méthionines de la TM et diminuent son activité (144).

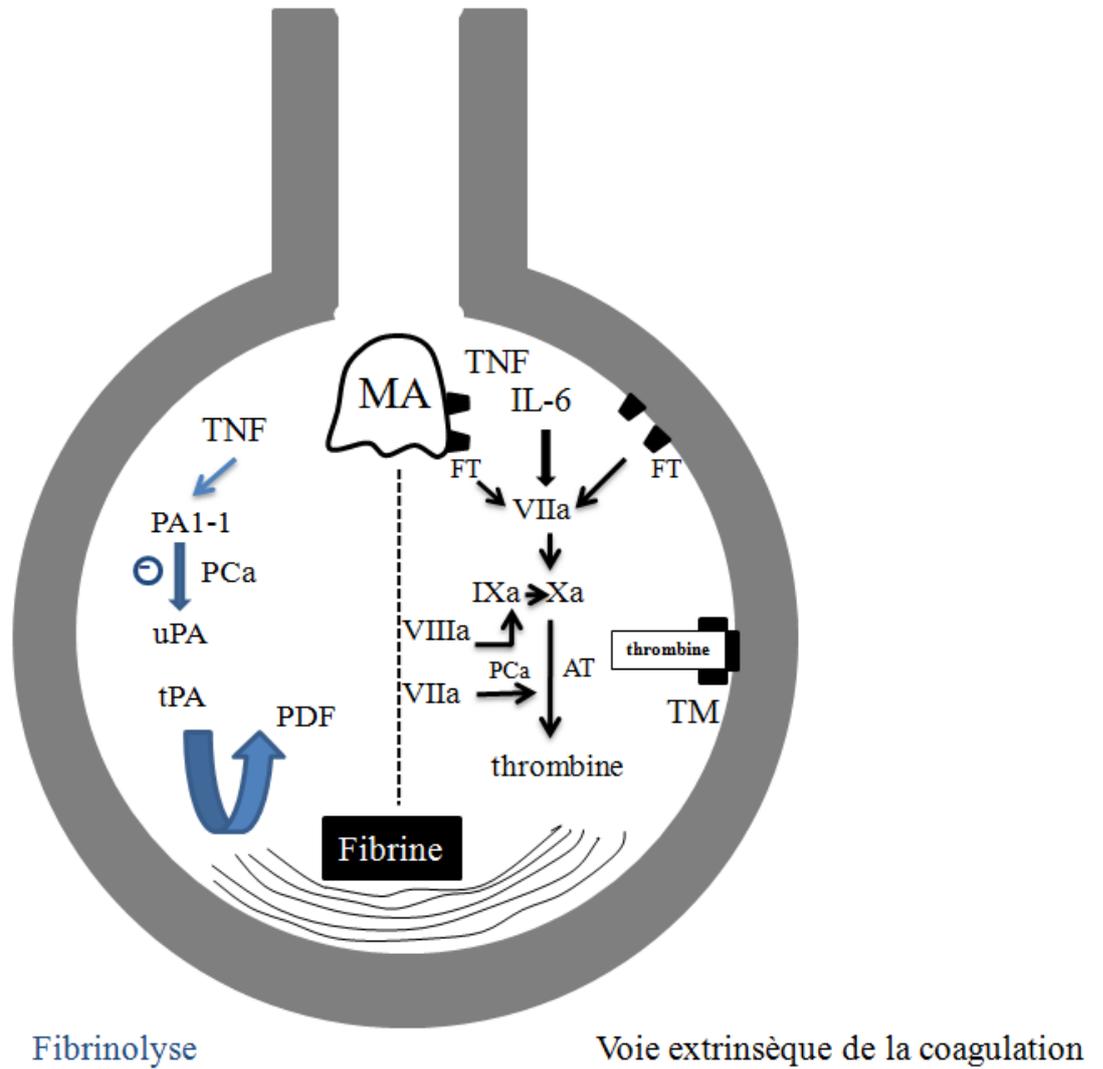
Modulation de la réponse inflammatoire par la coagulation :

- Le complexe TF-FVIIa stimule la sécrétion de cytokines proinflammatoires et de chémokines (145).
- Le complexe FT-FVIIa active les PARs qui augmentent l'expression des molécules d'adhésion et les lésions vasculaires induites par les leucocytes (146).
- La fibrine induit la réponse inflammatoire (147).
- L'antithrombine
  - Diminution de l'expression de l'intégrine mac-1 : contrôle des liaisons entre les leucocytes et les plaquettes et/ou l'endothélium (148).
  - Stimulation de la PGI<sub>2</sub> : inhibition de l'activation plaquettaire (149).
  - Inhibition de la voie de signalisation de NFκB : diminution de l'expression d'IL-6 et de FT par les monocytes et les cellules endothéliales (150, 151).
- La PCa
  - La diminution de la PCa induit une augmentation d'IL-6, du fait de la perte de l'inhibition de la sécrétion d'IL-6 (152).
  - Inhibition de la voie de signalisation du NFκB monocytaire (153).
  - Inhibition du chémotactisme leucocytaire (110).
- Le complexe thrombine-TM
  - Prévention de l'activation des PARs.
  - Activation du TAFI (carboxypeptidase B).
  - Inhibition des bradykinines et de l'anaphylatoxine C5a (vasoactives) (154, 155).

- Les inhibiteurs naturels de la coagulation, TFPI, AT et PCZ ont des propriétés anti-inflammatoires.

#### 4) Conséquences de l'altération de la coagulation

La coagulation normale et l'équilibre fibrinolytique sont altérés au cours du sepsis et de l'agression pulmonaire aiguë, favorisant un état procoagulant et antifibrinolytique. Les conséquences sont l'accumulation délétère de la thrombine et de la fibrine dans la microcirculation et le risque de favoriser un syndrome de défaillance multiviscérale. Une stratégie potentielle visant à stopper la formation de fibrine est d'inhiber la formation de thrombine; une stratégie qui semblait efficace dans plusieurs études chez l'homme (156, 157). Une métaanalyse de ces études montrait une réduction de 22,9% de la mortalité au 30<sup>e</sup> jour en faveur du traitement par l'antithrombine III. Une étude multicentrique, en double aveugle, randomisée contre placebo a été réalisée au cours du sepsis (158). Dans cette étude, la mortalité à J28 dans le groupe traité par l'AT III était de 38,9 versus 38,7% dans le groupe placebo (p=0,94). Les critères de jugement secondaires comme la survie en réanimation, et la mortalité au 56<sup>e</sup> et 90<sup>e</sup> jour n'étaient pas différents. Malgré les résultats négatifs globaux de cette étude, l'AT III a montré son efficacité dans un sous groupe de patients ayant un sepsis sévère et un risque élevé de mortalité, avec une réduction du risque absolu de mortalité de 6,8% au 56<sup>e</sup> jour (159).



**Figure 6:** représentation schématique de la voie d'activation extrinsèque de la coagulation, de la fibrinolyse et des inhibiteurs naturels de la coagulation dans le compartiment alvéolaire.

AT: antithrombine ; MA: macrophage alvéolaire, PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor* ; PCa: protéine C activée ; PDF: produits de dégradation de la fibrine ; TPIF: *tissue factor pathway inhibitor* ; TM: thrombomoduline ; tPA : *tissue-type plasminogen activator* ; uPA : *urokinase-type plasminogen factor*.

## C) La résorption de l'œdème pulmonaire

### 1) Introduction

Les mécanismes impliqués dans la régulation du transport actif du sodium et de l'eau par l'épithélium alvéolaire et des voies aériennes distales du poumon sont une voie de recherche importante pour la compréhension de l'équilibre hydrique pulmonaire en condition physiologique et pathologique. Les études portant sur les capacités de résorption de l'épithélium alvéolaire distal ont fourni de nouveaux concepts sur la résolution de l'œdème pulmonaire, une situation clinique ayant des conséquences directes dans la physiopathologie de l'agression pulmonaire aiguë.

### 2) Mécanismes de base de la résorption de l'œdème pulmonaire

Avant 1982, il n'y avait aucune information concernant la régulation de la balance hydrique pulmonaire à travers l'épithélium alvéolaire et des voies aériennes distales sur le poumon mature. Quelques travaux avaient été réalisés sur les capacités de sécrétion et d'absorption de liquide alvéolaire sur le poumon fœtal et chez le nouveau né (160). En 1982, certaines études ont mis en évidence une régulation par un transport actif de sodium de la balance hydrique pulmonaire (161, 162). Pendant de nombreuses années, il a été généralement admis que les différences de pressions oncotique et hydrostatique (les forces de l'équation de Starling) permettaient l'élimination de l'excès de liquide présent dans les alvéoles. Ce concept a longtemps existé d'une part parce que les études expérimentales évaluant les mouvements de solutés à travers la barrière alvéolo-capillaire du poumon ont été réalisées à température ambiante et d'autre part, ces études ont été réalisées sur le chien, une espèce animale connue pour avoir un taux très bas de transport actif de  $\text{Na}^+$  (163). Ainsi jusqu'au début des années 80, il n'y avait pas de modèle animal satisfaisant pour étudier la résolution de l'œdème alvéolaire, l'isolement et la mise en culture des cellules épithéliales alvéolaires de type II constituaient la seule méthode expérimentale disponible pour l'étude du transport de  $\text{Na}^+$  (162). Actuellement, sur la base des données *in vivo* et *in vitro*, il apparaît que le transport de  $\text{Na}^+$  et d'eau à travers l'épithélium alvéolaire est le principal déterminant pour la résorption de fluide, donnant au poumon la possibilité d'éliminer l'œdème alvéolaire à la naissance mais aussi au poumon mature la capacité de réabsorber un œdème pulmonaire au cours de certaines conditions pathologiques.

## 2.1) Transport actif de sodium conduisant à la résorption du liquide alvéolaire : concept de clairance liquidienne alvéolaire

Le modèle général du transport de fluide à travers l'épithélium est un transport actif de  $\text{Na}^+$  à l'origine d'un transport osmotique d'eau. Ce paradigme est probablement correct pour l'élimination du liquide d'œdème alvéolaire à travers l'épithélium pulmonaire distal (163). Les résultats de plusieurs études *in vivo* ont démontré que les changements de pression oncotique et hydrostatique ne peuvent être tenus responsables de l'élimination de l'excès de fluide au niveau de l'espace alvéolaire. De plus, des inhibiteurs pharmacologiques du transport de  $\text{Na}^+$  peuvent réduire le taux de résorption de fluide dans les poumons sur différentes espèces animales, et sur le poumon humain. Par ailleurs, l'isolement des cellules épithéliales alvéolaires a apporté la preuve d'un transport actif de  $\text{Na}^+$  et d'autres ions dans le poumon (163).

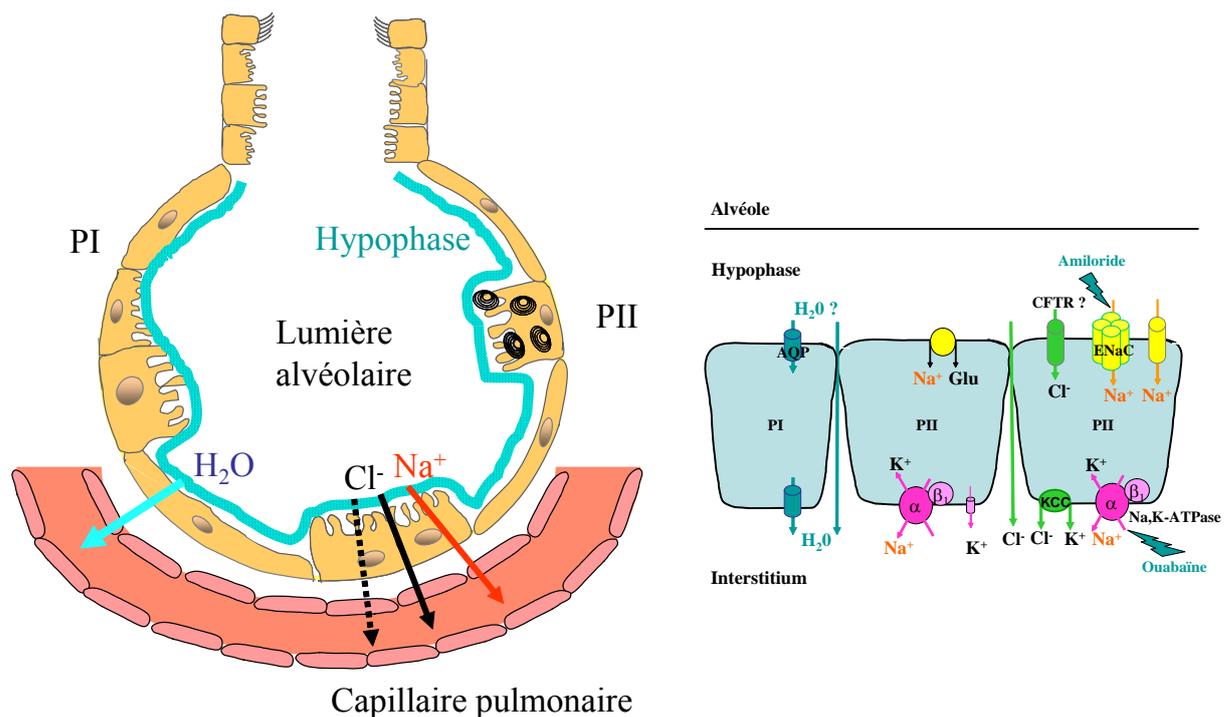
## 2.2) Surface d'échange pulmonaire pour la résorption de liquide alvéolaire

La contribution précise de chaque unité anatomique de l'espace aérien distal pour la résorption de fluide n'est pas clairement établie. L'épithélium des voies aériennes distales est composé d'unités bronchiolaires et respiratoires terminales contenant des cellules épithéliales polarisées ayant la capacité de transporter le sodium et le chlore, comme les cellules ciliées de Clara et les cellules cuboïdes non ciliées. Les alvéoles elles mêmes sont composées d'un épithélium alvéolaire très mince (0,1-0,2  $\mu\text{m}$ ) couvrant 99% de la surface aérienne du poumon et contenant des cellules alvéolaires de type I, minces et squameuses et des cellules de type II cuboïdes. Les cellules alvéolaires de type I couvrent 95% de la surface alvéolaire. En conditions normales, la barrière alvéolo-capillaire constitue une barrière très peu perméable aux solutés. L'apposition étroite entre l'épithélium alvéolaire et l'endothélium vasculaire facilite les échanges gazeux, mais constitue aussi une barrière serrée pour les mouvements de liquides et de protéines à partir de l'espace interstitiel et vasculaire pulmonaire, contribuant à maintenir les alvéoles relativement sèches (163). Toutes les cellules alvéolaires et de l'épithélium des voies aériennes distales contiennent des transporteurs d'ions et peuvent contribuer au transport de  $\text{Na}^+$  et d'eau.

### 2.3) Les cellules alvéolaires de type II

Les cellules les plus étudiées de l'épithélium alvéolaire distal sont les cellules alvéolaires de type II, et cela en grande partie parce que ces cellules peuvent être facilement isolées à partir du poumon pour être étudiées *in vitro*. Les cellules alvéolaires de type II sont à l'origine de la sécrétion de surfactant mais aussi du transport vectoriel de  $\text{Na}^+$  du pôle apical vers le pôle baso-latéral de la cellule (164, 165). Le transport actif de  $\text{Na}^+$  à travers les cellules alvéolaires de type II est le mécanisme prépondérant pour la résorption de liquide alvéolaire. Le  $\text{Na}^+$  entre par le pôle apical de la cellule épithéliale alvéolaire par des canaux sensibles et insensibles à l'amiloride. L'amiloride inhibe 40 à 70% du transport épithélial de  $\text{Na}^+$  chez le mouton, lapin, rat, souris et sur le poumon humain. La relation entre la clairance liquidienne alvéolaire et le transport de  $\text{Na}^+$  a été également établie par le fait qu'en l'absence de  $\text{Na}^+$  au niveau de l'espace alvéolaire, la résorption de liquide alvéolaire est complètement abolie (166). Le canal épithélial de  $\text{Na}^+$  sensible à l'amiloride (ENaC) et participant au mouvement de  $\text{Na}^+$  à travers la membrane apicale de la cellule, a été cloné et caractérisé en 1994 (167). Ce canal est une protéine multimérique comportant 3 sous unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , il est distribué dans de nombreux épithéliums (pulmonaires, rénaux et coliques) et sa présence est indispensable à la résorption du liquide alvéolaire fœtal à la naissance. Ainsi, les souris dont le gène codant pour la sous-unité  $\alpha$  du canal épithélial à  $\text{Na}^+$  a été inactivé sont incapables de résorber le liquide alvéolaire durant la période périnatale, développent une détresse respiratoire et meurent avant la 40<sup>ème</sup> heure (168). Les souris mutées pour la sous unité  $\beta$  ou  $\gamma$  sont capables de résorber l'œdème alvéolaire mais la résorption est plus lente et les animaux décèdent d'hyperkaliémie. Le système de régulation du canal ENaC est complexe et fait intervenir un 2<sup>ème</sup> messager l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) qui active la protéine kinase AMPC dépendante (PKA) qui active à son tour des phosphorylases kinases. Peu de données sont disponibles concernant les canaux épithéliaux à  $\text{Na}^+$  insensibles à l'amiloride, leur contribution dans le transport actif de  $\text{Na}^+$  est fonction de l'espèce animale étudiée et ils sont représentés par des co-transporteurs  $\text{Na}^+$ -glucose ou  $\text{Na}^+$ -acide aminé. Le canal cystic fibrosis transmembrane conductance (CFTR) est un canal à  $\text{Cl}^-$  régulé par l'AMPC et exprimé au pôle apical des cellules épithéliales alvéolaires et des voies aériennes. L'activation du canal CFTR augmente le transport actif de  $\text{Na}^+$  sensible à l'amiloride (169). Par la suite, le  $\text{Na}^+$  est sécrété en échange du  $\text{K}^+$  selon un mécanisme actif par une pompe  $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -adénosine triphosphatase ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase) du pôle baso-latéral de la surface cellulaire vers le secteur interstitiel du poumon.

La pompe  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase est une protéine hétérodimérique constituée d'une sous unité  $\alpha$  catalytique, site de fixation d'un inhibiteur (ouabaïne) et d'une sous unité  $\beta$  glycosylée et régulatrice. Ce transport transépithélial de  $\text{Na}^+$  génère un gradient osmotique à l'origine d'un mouvement passif d'eau du pôle apical de l'épithélium (espace alvéolaire) au pôle basolatéral par une voie paracellulaire et par des canaux aqueux de la famille des aquaporines (AQP). Cependant, la présence de ces canaux aqueux n'est pas essentielle pour le transport épithélial alvéolaire maximal dans le poumon. En effet, les souris knockout pour les AQP 1,4 et 5 gardent les mêmes capacités de résorption de l'œdème pulmonaire à la période périnatale et au cours des œdèmes pulmonaires expérimentaux induits par l'exposition à l'hyperoxie, l'administration d' $\alpha$ -naphthylthiourée (ANTU) et l'instillation intratrachéale d'acide chlorhydrique (170). La représentation schématique des mouvements de  $\text{Na}^+$  et d'eau au niveau de l'épithélium pulmonaire distal est résumée sur la figure 1.



**Figure 1:** représentation schématique des mouvements de  $\text{Na}^+$  et d'eau au niveau de l'épithélium pulmonaire distal. PI : pneumocytes de type I ; PII : pneumocytes de type II ; AQP : aquaporine ; ENaC : canal épithélial sodique sensible à l'amiloride.

#### 2.4) Les cellules alvéolaires de type I

Certaines équipes de recherche ont souligné le rôle potentiel des cellules alvéolaires de type I dans le transport vectoriel de  $\text{Na}^+$ . Sur la base d'études portant sur l'isolement de cellules de type I, il a été montré que ces cellules possèdent une haute perméabilité osmotique à l'eau et expriment l'AQP 5 à leurs surfaces apicales (171). Des études récentes *in vitro* ont également rapporté la présence de la sous unité  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  de la pompe  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase sur les cellules de type I (172).

#### 2.5) Etudes *in vivo* pour le transport actif de sodium

La première preuve *in vivo* d'un transport actif de sodium permettant la résorption du liquide d'œdème alvéolaire par l'épithélium pulmonaire distal d'un poumon mature a été apportée par les études réalisées sur des moutons anesthésiés et ventilés, en instillant dans les alvéoles une solution iso-osmolaire de sodium et d'eau (161). Dans ces études, la concentration initiale de protéines instillée dans les alvéoles est la même que la concentration plasmatique. Après quatre heures, la concentration de protéines dans les voies aériennes augmente de 6,5 g/100 ml à 8,4 g/100 ml, alors que la concentration plasmatique demeure inchangée. Sur des modèles de moutons en ventilation spontanée, les concentrations protéiques alvéolaires atteignent des niveaux très importants. A la 12 et 24<sup>ème</sup> heure, la concentration alvéolaire en protéines augmente respectivement à 10,2 et 12,9 g/100 ml (173). Cette augmentation de la concentration en protéines est associée à une augmentation de la pression oncotique dans les espaces aériens distaux de 25 à 65 cm H<sub>2</sub>O (163). La concentration protéique dans le système lymphatique drainant l'interstitium pulmonaire diminue, mettant ainsi en évidence que seul le liquide alvéolaire sans les protéines est réabsorbé de l'espace aérien distal vers l'interstitium pulmonaire (161). Les études morphologiques ont mis en évidence que le liquide interstitiel pulmonaire ne contient pas de bleu d'Evans, un colorant marquant les protéines instillées dans les alvéoles (163). Ces données, notamment une augmentation de la pression osmotique des protéines dans les alvéoles en moyenne à 40 cm H<sub>2</sub>O, valeur bien plus importante que celle du secteur vasculaire et interstitiel pulmonaire ont suggéré un mécanisme actif de transport ionique à l'origine de la résorption de liquide présent dans les alvéoles. D'autre part, si un transport actif ionique était impliqué dans l'élimination du liquide d'œdème, alors la résorption de fluide devrait être dépendante de la température. Sur le modèle de poumon perfusé *in situ*, le taux de liquide éliminé de l'alvéole diminue progressivement alors que la température corporelle baisse de 37 à 18°C (174).

Des résultats similaires ont été retrouvés sur des modèles de poumons de rats perfusés (175) et *ex vivo* sur des poumons humains (176), où l'hypothermie inhibait le transport de sodium et de fluide. L'utilisation de l'amiloride, un inhibiteur de la fixation du  $\text{Na}^+$  au pôle apical des cellules alvéolaires a également apporté d'autres preuves de l'existence d'un transport ionique actif. L'amiloride inhibe 40 à 70% de la clairance liquidienne de base chez les moutons, lapins, rats, cochons d'Inde, souris et sur les poumons humains. L'inhibition de la pompe  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase par l'ouabaïne a également permis d'explorer plus précisément le rôle du transport ionique actif. Sur un modèle de poumon isolé de rats, l'ouabaïne inhibe plus de 90% de la clairance liquidienne (163).

#### 2.6) Régulation de la clairance liquidienne alvéolaire dépendante des catécholamines

La régulation dépendante des catécholamines est le mécanisme de stimulation le plus étudié pour le transport épithélial de  $\text{Na}^+$ . De nombreux travaux expérimentaux ont suivi l'étude initiale de Goodman et al qui montrait que les  $\beta$ -agonistes pouvaient stimuler le transport actif trans-épithélial de  $\text{Na}^+$  sur des cellules épithéliales alvéolaires de rats (177). Sur des animaux nouveaux nés, la sécrétion de catécholamines endogènes, en particulier l'épinéphrine, stimule la résorption de liquide pulmonaire foetal à partir des espaces aériens distaux du poumon (160, 178). Sur la plupart des espèces mammifères adultes, en particulier *ex vivo* sur le poumon humain, la stimulation des  $\beta_2$  récepteurs par le salmétérol, la terbutaline, ou l'épinéphrine augmente la clairance liquidienne alvéolaire (179, 180). Cette stimulation apparaît rapidement après l'administration intraveineuse d'épinéphrine ou l'instillation intraalvéolaire de terbutaline ; l'effet passe par des mécanismes dépendants de l'AMPc et cette stimulation de clairance liquidienne alvéolaire est inhibée par le propranolol, un antagoniste non spécifique des  $\beta$  récepteurs (181). Bien que la stimulation des récepteurs  $\beta_1$  puisse augmenter le transport alvéolaire actif de  $\text{Na}^+$ , les études réalisées sur les souris mutées et déficientes pour les récepteurs  $\beta_2$  adrénergiques suggèrent que les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques sont responsables de la majeure partie de la stimulation de clairance liquidienne alvéolaire (182). L'augmentation de la clairance liquidienne induite par les  $\beta_2$ -agonistes peut être prévenue par l'amiloride, indiquant que cette stimulation passe aussi par une augmentation du transport trans-épithélial de  $\text{Na}^+$  (179, 183).

De la même manière, les études réalisées sur les poumons humains perfusés ont démontré que les agonistes  $\beta$ -adrénergiques augmentent la clairance liquidienne alvéolaire et cette stimulation peut être inhibée par le propranolol ou l'amiloride (176, 180). Laffon et al ont montré que l'administration intraveineuse de lidocaïne, un inhibiteur du canal sodique diminuait la clairance liquidienne alvéolaire basale de 50%, l'effet était réversible après l'administration de terbutaline (184). Les mécanismes proposés pour la stimulation du transport de  $\text{Na}^+$  à travers l'épithélium alvéolaire comportent une augmentation de la phosphorylation de la sous unité  $\alpha$  de la pompe à  $\text{Na}^+$ , l'augmentation du nombre et de la probabilité d'ouverture du canal ENaC (185), l'augmentation de l'expression du gène codant pour la sous unité  $\alpha$  du canal ENaC et la sous unité  $\alpha_1$  de la pompe  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (186) et l'augmentation du transport du canal ENaC du cytoplasme à la membrane cellulaire (187). Ces données sont particulièrement importantes car l'utilisation thérapeutique de  $\beta$ -agonistes chez certains patients pourrait accélérer la résolution de l'œdème alvéolaire.

#### 2.7) Rôle potentiel du canal CFTR dans la régulation de la clairance liquidienne alvéolaire dépendante de l'AMPc

Certaines études ont rapporté le rôle du canal CFTR présent dans les voies aériennes dans la régulation du canal ENaC (188). Une stimulation indirecte du mouvement transépithélial de sodium a été mise en évidence lors de la stimulation de CFTR en présence de  $\beta_2$ -agonistes ou d'AMPc (189, 190). Ces données soulignent le rôle essentiel du  $\text{Cl}^-$  sur le mouvement transépithélial de  $\text{Na}^+$  impliqué dans la régulation de la clairance liquidienne alvéolaire, d'autant plus que le canal CFTR est distribué au niveau de l'épithélium distal pulmonaire et alvéolaire sur les poumons humains (191). Par ailleurs, la stimulation de la clairance liquidienne alvéolaire par les  $\beta_2$ -adrénergiques est abolie sur des souris mutées déficientes pour le canal CFTR et *in situ* sur les poumons de souris sauvages instillés avec le glibenclamide, un inhibiteur non spécifique des canaux  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$  (192). Le mécanisme de régulation du canal ENaC par la protéine CFTR pourrait impliquer des protéines du cytosquelette ou faire intervenir une interaction directe entre les deux protéines (188).

## 2.8) Régulation de la clairance liquidienne alvéolaire indépendante des catécholamines

Les facteurs hormonaux, comme les glucocorticoïdes peuvent stimuler la clairance liquidienne alvéolaire par des mécanismes post-transcriptionnels, alors que les hormones thyroïdiennes semblent intervenir sur des mécanismes de régulation post-traductionnels (193). Certains facteurs de croissance interviennent par des effets post-transcriptionnels mais peuvent aussi avoir un effet direct membranaire en augmentant le nombre de cellules alvéolaires de type II. Le *Keratinocyte growth factor* (KGF) peut augmenter la clairance liquidienne alvéolaire, principalement en stimulant la prolifération de pneumocytes de type II (194). Le *Transforming growth factor- $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ) peut augmenter la clairance liquidienne alvéolaire sur des rats anesthésiés, par un mécanisme impliquant la voie des tyrosines kinases (195). D'autres parts, des facteurs pro-inflammatoires, comme le *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) et les leucotriènes D4 peuvent stimuler la fixation de Na<sup>+</sup> et donc le transport de fluide (196). Les serine protéases peuvent réguler le canal ENaC et augmenter la clairance liquidienne à travers l'épithélium distal des voies aériennes (197). Des agents vasoactifs comme la dopamine peuvent augmenter la clairance liquidienne alvéolaire chez le rat (198) en stimulant les récepteurs dopaminergiques D1, avec translocation de la pompe Na<sup>+</sup> du compartiment intracellulaire endosomal au pôle baso-latéral des pneumocytes de type II alors que la dobutamine stimule les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergiques (199). L'insuline peut augmenter le transport de Na<sup>+</sup> à travers les cultures de pneumocytes de type II en augmentant la probabilité d'ouverture du canal ENaC (200).

## 2.9) Rôle de l'environnement lipidique dans la fonction de la pompe Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

Le rôle des acides gras poly-insaturés (AGPI) a déjà été évoqué à plusieurs reprises dans la littérature. Wu et al ont étudié l'influence de la composition lipidique des membranes sur l'activité de la pompe Na<sup>+</sup> (201). En utilisant des pompes issues de bovins ou de crocodiles (hervivores, carnivores) et en inversant les environnements lipidiques, les auteurs ont montré qu'un environnement riche en AGPI de la série oméga 3 améliorerait de façon significative l'activité de la pompe Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase comparée à une ambiance riche en AGPI de la série oméga 6. Ces résultats suggèrent que les lipides de membranes et leurs dérivés jouent un rôle important dans l'activité de la pompe sodium.

*In vivo*, dans un modèle de pneumonie chronique à *P. aeruginosa* chez la souris, nous avons mis en évidence une amélioration significative de la clairance alvéolaire au 4<sup>ème</sup> jour après le challenge bactérien dans le groupe d'animaux bénéficiant d'une diète enrichie en AGPI de la série oméga 3 (202). Dans cette étude nous montrons aussi des modifications majeures de la composition membranaire en lipides entre les différentes diètes. L'ensemble de ces données obtenues *in vitro* et *in vivo* sont en accord avec la théorie de pace maker membranaire développé par Hubert et al (203, 204). Les conséquences et éventuels débouchés thérapeutiques restent à explorer.

### 3) Transport liquidien alvéolaire en conditions pathologiques

L'étude des propriétés de transport de Na<sup>+</sup> et d'eau par l'épithélium alvéolaire est une voie de recherche importante. La clairance liquidienne alvéolaire peut être mesurée sur des modèles expérimentaux animaux simulant des conditions pathologiques cliniques et sur des patients bénéficiant d'une ventilation mécanique pour une détresse respiratoire à partir du liquide d'œdème pulmonaire.

#### 3.1) Etudes expérimentales

De nombreux modèles expérimentaux d'agression pulmonaire aigue ont été établis pour étudier les mécanismes de résorption de l'œdème pulmonaire. Sur certains modèles, une stimulation du transport de Na<sup>+</sup> et de fluide est observée.

##### 3.1.1) Infection bactérienne et médiateurs pro-inflammatoires

Les effets de l'injection intra-vasculaire d'endotoxine et de bactéries sur la perméabilité vasculaire pulmonaire ont été caractérisés chez le mouton il y a de nombreuses années (205, 206). L'injection intravasculaire d'endotoxine chez le mouton augmente la perméabilité endothéliale pulmonaire avec une élévation du débit lymphatique pulmonaire sans changement de la perméabilité épithéliale aux protéines et de la capacité de résorption de cet épithélium. Ces expériences ont été réalisées à 4 et 24 heures, et sur certains animaux, l'endotoxine a été administrée par voies intravasculaire et intraalvéolaire. Dans tous les cas, la barrière épithéliale demeurait intacte et gardait ses capacités normales de résorption de liquide alvéolaire.

Il apparaît donc que l'épithélium alvéolaire est bien plus résistant à l'agression induite par l'injection d'endotoxine que l'endothélium vasculaire pulmonaire. Cependant, lorsque des concentrations élevées de bactéries vivantes sont utilisées (*Pseudomonas aeruginosa*) chez le mouton, les perméabilités endothéliales et épithéliales pulmonaires aux protéines augmentent (19). Les animaux présentent une inondation alvéolaire et leurs capacités à résorber le liquide d'œdème alvéolaire sont altérées, et ce de façon similaire aux patients qui développent un œdème pulmonaire lésionnel au cours d'un choc septique. Ainsi, à l'inverse de l'injection intraalvéolaire d'endotoxine, l'administration de bactéries vivantes dans les espaces aériens distaux peut augmenter la perméabilité épithéliale aux protéines et diminuer les capacités de transport de fluide chez le mouton (19). Des travaux ultérieurs ont montré que dans l'état de choc septique induit par l'injection de bactéries vivantes (183), dans l'état de choc hémorragique chez le rat (207) mais aussi au cours de la phase aiguë de l'œdème pulmonaire neurogène (208), la concentration plasmatique en épinéphrine augmente remarquablement. Cette augmentation plasmatique peut stimuler les capacités de transport de fluide de l'épithélium alvéolaire. Au cours du choc septique à *P. aeruginosa* chez le rat, la clairance liquidienne alvéolaire augmente de près de 100 % par rapport aux animaux contrôles (183). Cette stimulation de clairance est inhibée par l'instillation intraalvéolaire d'amiloride ( $10^{-4}$  M) ou de propranolol ( $10^{-4}$  M), démontrant ainsi que cet effet dépend d'une stimulation adrénergique du transport transépithélial de  $\text{Na}^+$ . Ainsi, il est possible qu'à court terme, cette stimulation de la clairance liquidienne alvéolaire protège de l'inondation alvéolaire lorsque la perméabilité vasculaire pulmonaire augmente et que le liquide d'œdème s'accumule dans le secteur interstitiel. D'autres études ont caractérisé les facteurs de virulence à l'origine de l'agression épithéliale. L'exoenzyme S et la phospholipase C induisent une agression de la barrière épithéliale au cours de la pneumonie à *P. aeruginosa* chez le lapin avec une diminution du transport vectoriel de  $\text{Na}^+$  (209). L'immunisation passive et active contre certains déterminants de *P. aeruginosa* peut prévenir de l'agression épithéliale chez le mouton (210) et la souris (211). L'infection expérimentale pulmonaire à *Mycoplasma* chez la souris inhibe l'expression membranaire du canal ENaC et la clairance liquidienne alvéolaire par des mécanismes dépendant des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (212). La nitration et l'oxydation des protéines semblent donc être un élément important pour le transport épithélial de fluide. D'autres études soulignent le rôle des cytokines sur le transport épithélial alvéolaire de fluide.

L'instillation intraalvéolaire d'exotoxine A de *Pseudomonas aeruginosa* (213) ou d'endotoxine d'*Escherichia coli* chez le rat (214), peut stimuler la clairance liquidienne alvéolaire par un mécanisme indépendant des catécholamines. L'instillation intraalvéolaire d'un anticorps monoclonal anti *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) inhibe l'augmentation de la clairance liquidienne alvéolaire survenant à 24 heures d'une pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* chez le rat (215). Le mécanisme d'action du TNF- $\alpha$  sur la stimulation de la clairance liquidienne alvéolaire n'est pas clairement établi mais il est probable qu'il ne s'agisse pas d'un effet direct sur le transport de Na<sup>+</sup> puisque le TNF- $\alpha$  diminue ce transport sur les cellules épithéliales alvéolaires (216). Cependant, Fukuda et al ont montré chez le rat que les différents domaines du TNF- $\alpha$  peuvent avoir des effets opposés. L'interaction du TNF- $\alpha$  et de son récepteur induit une inflammation et une augmentation de la perméabilité pulmonaire alors que le domaine lectine du TNF- $\alpha$  active directement le canal ENaC et stimule la clairance liquidienne alvéolaire (217). Ces données expérimentales suggèrent que lorsque l'épithélium alvéolaire reste intact et fonctionnel, la clairance liquidienne alvéolaire peut être stimulée, même lorsqu'il existe un œdème interstitiel pulmonaire ou un œdème alvéolaire modéré. Par contre, lorsque l'agression pulmonaire est plus sévère, une augmentation de la perméabilité para-cellulaire aux protéines signifie des lésions importantes de l'épithélium alvéolaire et donc une perte conséquente des capacités de transport de Na<sup>+</sup> et d'eau par les cellules épithéliales alvéolaires.

A l'inverse, certaines situations pathologiques sont associées à une diminution de la clairance liquidienne alvéolaire.

### 3.1.2) L'hypoxie

L'hypoxie est une caractéristique fréquente au cours de l'agression pulmonaire aiguë. L'exposition expérimentale à l'hypoxie (1,5-14% O<sub>2</sub> pendant 2 heures) augmente la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire sur les poumons isolés de rats ventilés et perfusés (218), inhibe le transport transépithélial de Na<sup>+</sup> *in vitro* sur les pneumocytes de type II (219) mais aussi *ex vivo* sur des poumons humains (176). L'exposition pendant 48 heures à l'hypoxie diminue *in vivo* la clairance liquidienne alvéolaire et l'activité de la pompe Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase chez le rat (220). Un travail *in vivo* a montré que l'hypoxie diminue de 50% la clairance liquidienne alvéolaire chez le rat alors que l'expression de la sous unité  $\alpha$  du canal ENaC est modérément augmentée (221).

De façon intéressante, la terbutaline stimule la clairance liquidienne alvéolaire, laissant suggérer par Snyder et al que l'augmentation de l'AMPC favorise l'insertion du canal ENaC au niveau de la membrane cellulaire des pneumocytes de type II (187).

### 3.1.3) La ventilation mécanique

La ventilation mécanique avec un volume courant élevé peut également altérer les capacités pulmonaires de résorption de l'œdème alvéolaire. La ventilation mécanique chez le rat ( $V_t$  à 40 ml/kg, pression de pic à 35 cmH<sub>2</sub>O pendant 40 minutes) diminue l'activité de la pompe Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase et le transport actif de Na<sup>+</sup> (222). La ventilation mécanique peut aussi aggraver des lésions pulmonaires préexistantes. Frank et al ont montré que la ventilation mécanique avec un volume courant à 3 ml/kg chez le rat préserve les capacités normales de transport de fluide au cours de l'agression pulmonaire induite par l'instillation intratrachéale d'acide chlorhydrique (223). La ventilation mécanique avec un volume courant élevé ( $V_t$  à 30 ml/kg pendant une heure chez le rat) diminue de façon significative et transitoire la clairance liquidienne alvéolaire de base. Par contre, la clairance liquidienne dépendante de l'AMPC reste altérée jusqu'à 3 heures et est associée à une augmentation de l'expression pulmonaire de l'oxyde nitrique synthase inductible et de la production pulmonaire de nitrites (224). La déplétion en macrophages alvéolaires chez le rat par une solution liposomale intratrachéale diminue *in vivo* l'œdème pulmonaire induit par la ventilation mécanique à haut volume courant et *in vitro* la production de nitrites (225). Ces données suggèrent que la libération d'oxyde nitrique par les macrophages alvéolaires peut inhiber le transport de Na<sup>+</sup> au cours de l'agression pulmonaire induite par la ventilation mécanique. Ainsi, la ventilation mécanique avec un volume courant élevé favorise la formation d'un œdème alvéolaire mais altère également les capacités de résorption.

### 3.1.4) La coagulation

L'étude de la coagulation est d'un grand intérêt dans la pathogénèse et le traitement de l'œdème pulmonaire lésionnel. Un travail de Vasdasz et al a montré sur un modèle de poumons isolés ventilés et perfusés chez le lapin que l'administration de thrombine dans le secteur vasculaire altère la clairance liquidienne alvéolaire. Ainsi la thrombine peut à la fois augmenter la perméabilité vasculaire pulmonaire et inhiber la réabsorption de liquide alvéolaire, par un phénomène d'endocytose de la pompe Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase (226). Les voies de la régulation de la clairance liquidienne alvéolaire sont rapportées sur le tableau I.

**Tableau I** : voies de la régulation de la clairance liquidienne alvéolaire.

Stimulation	Inhibition
Catécholamines et agonistes $\beta$ -adrénergiques	Dérivés oxydatifs de l'O <sub>2</sub> et du NO
Dopamine	Anesthésiques halogénés
Corticostéroïdes et minéralocorticoïdes	Lidocaïne
Hormones thyroïdiennes	Hypoxie
<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>	Facteur natriurétique
<i>Keratinocyte growth factor</i>	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
<i>Transforming growth factor-<math>\alpha</math></i>	
<i>Epidermal growth factor</i>	
Leukotriène D4	

### 3.1.5) Effet de la stimulation pharmacologique de la clairance liquidienne alvéolaire sur les modèles expérimentaux d'agression pulmonaire aiguë :

Certains mécanismes peuvent stimuler les capacités de résorption de l'épithélium alvéolaire distal. Cependant, cette stimulation peut être insuffisante pour contre balancer l'inondation alvéolaire. Les capacités de résorption de l'œdème pulmonaire sont indissociables de la sévérité de la lésion de la barrière alvéolo-capillaire. Il apparaît donc que les traitements visant à stimuler les capacités de résorption de l'épithélium alvéolaire sont aussi importants que ceux visant à limiter l'agression endothéliale pulmonaire et épithéliale alvéolaire.

Les  $\beta_2$ -agonistes constituent une thérapeutique intéressante car ils sont couramment utilisés en pratique clinique et ils présentent peu d'effets indésirables, même chez les patients hospitalisés en réanimation.

Ils stimulent la clairance liquidienne alvéolaire, peuvent réduire le trouble de perméabilité vasculaire pulmonaire sur le modèle de poumons isolés de rats et ont également un effet sur la sécrétion de surfactant et un effet anti-inflammatoire (227). De nombreuses données expérimentales sont disponibles sur la stimulation de clairance liquidienne alvéolaire sur des modèles d'œdème pulmonaire cardiogénique et lésionnel. Les  $\beta_2$ -agonistes peuvent favoriser la résolution de l'œdème pulmonaire et améliorer l'oxygénation au cours de l'œdème pulmonaire hydrostatique chez le rat et le mouton (228). Les  $\beta_2$ -agonistes augmentent la clairance liquidienne alvéolaire sur de nombreux modèles expérimentaux d'agression pulmonaire, comme l'exposition à l'hyperoxie, ils restaurent les capacités de résorption de l'œdème pulmonaire au cours de l'agression induite par la ventilation mécanique. La colchicine, en modifiant le trafic intracellulaire des microtubulles inhibe cet effet (163). Au cours de l'œdème pulmonaire lésionnel induit par l'instillation d'acide chlorhydrique chez le rat, l'administration intra-alvéolaire de salmétérol ( $10^{-6}$  M) diminue l'œdème pulmonaire en réduisant à la fois le trouble de perméabilité endothéliale pulmonaire et en stimulant la clairance liquidienne alvéolaire (74). La surexpression génique de récepteurs  $\beta_2$  sur des souris transgéniques augmente la clairance liquidienne alvéolaire de 40% (229). Le transfert de  $\beta_2$  récepteurs par un adénovirus sur l'épithélium alvéolaire sur des rats et des souris normales augmente la clairance liquidienne alvéolaire en stimulant l'expression et l'activité du canal ENaC et de la pompe  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase sur le poumon distal (182).

Puisque l'agression pulmonaire aiguë peut être responsable de la mise à nu de l'épithélium alvéolaire, une autre approche pharmacologique est de favoriser la réparation de la barrière alvéolaire. L'instillation intratrachéale de facteur de croissance comme le KGF chez le rat avant l'agression pulmonaire par les radiations, la bléomycine, l'ANTU, l'hyperoxie et l'instillation d'acide chlorhydrique diminue la sévérité de l'agression pulmonaire et la mortalité. L'effet maximal apparaît 48 ou 72 heures après l'administration et la stimulation de la clairance liquidienne alvéolaire persiste plusieurs jours. La combinaison du KGF et des  $\beta_2$ -agonistes a un effet additif sur la stimulation des capacités de résorption de l'œdème alvéolaire (163).

### 3.1.6) La thérapie génique

Différentes études ont montré que la clairance liquidienne alvéolaire était corrélée à l'activité de la pompe  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase à la fois sur les poumons normaux et lésés. La surexpression de la sous unité  $\beta_1$  ou  $\alpha_2$  par transfection de gène par un adénovirus augmente l'expression et la fonction de la pompe à  $\text{Na}^+$  sur le poumon de rat adulte. L'utilisation de cette technique en prétraitement augmente la survie des rats exposés à l'hyperoxie et à l'ANTU. Le transfert de gènes et la surexpression génique sur des animaux transgéniques ont été aussi réalisés pour les récepteurs  $\beta_2$ -adrénergiques. Cette technique a montré une stimulation de la clairance liquidienne alvéolaire en augmentant la sensibilité aux catécholamines sur des poumons normaux de rats et de souris (230).

### 3.2) Etudes cliniques

Deux propriétés de la barrière épithéliale peuvent être évaluées cliniquement. Premièrement, la barrière épithéliale étant normalement imperméable aux protéines, le rapport de la concentration protéique entre le liquide d'œdème alvéolaire et le secteur plasmatique est un bon index de perméabilité épithéliale (231). Deuxièmement, les mesures séquentielles de concentration protéique dans le liquide d'œdème alvéolaire permettent d'évaluer les capacités de résorption de l'épithélium alvéolaire. Les études cliniques évaluant la clairance liquidienne alvéolaire ont été réalisées sur des patients intubés, bénéficiant d'une ventilation mécanique, en mesurant sur des prélèvements séquentiels la concentration totale en protéines sur le liquide non dilué d'œdème pulmonaire. Cette procédure clinique a été validée chez les patients en démontrant la relation entre la clairance liquidienne et l'amélioration de l'oxygénation et de la radiographie de thorax (231, 232). Cette méthode a également montré que la résorption du liquide alvéolaire survenait très tôt, dans les premières heures suivant l'intubation et l'initiation de la ventilation mécanique chez les patients présentant un œdème pulmonaire hydrostatique ou lésionnel (232, 233).

### 3.2.1) Résolution de l'œdème pulmonaire hydrostatique

Sur 65 patients présentant un œdème pulmonaire hydrostatique associé à une dysfonction ventriculaire gauche, 75 % avaient une clairance liquidienne alvéolaire intacte. Le taux de résorption de l'œdème alvéolaire était maximal (> 14%/h) pour 38% des patients et submaximal (3-14%/h) pour 37%. Les patients ayant des capacités de résorption de l'œdème pulmonaire préservées ont l'amélioration la plus importante de l'oxygénation à la 24<sup>ème</sup> heure, la durée de ventilation mécanique a tendance à être plus courte et la mortalité hospitalière plus basse (232). Le groupe de patients avec un œdème pulmonaire hydrostatique constitue aussi un groupe contrôle utile pour les études cliniques en comparaison avec les patients présentant un œdème lésionnel.

### 3.2.2) Résolution de l'œdème pulmonaire lésionnel

La phase aiguë du syndrome de détresse respiratoire aiguë est marquée par une augmentation de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire et par l'afflux d'un liquide d'œdème riche en protéines dans les espaces aériens (234). La majorité des patients ayant une agression pulmonaire aiguë et un œdème lésionnel présentent une altération du transport de fluide de l'épithélium alvéolaire. Sur 79 patients présentant un œdème pulmonaire lésionnel, seulement 13 % ont un taux de clairance liquidienne alvéolaire maximal et plus de 50% ont une altération des capacités de résorption de l'œdème. Pour ces patients, l'altération du transport de fluide est associée à une détresse respiratoire plus prolongée et une mortalité plus élevée. A l'inverse, les patients ayant conservé leurs capacités de résorption de l'œdème pulmonaire ont un taux de survie plus important (231-233). La mortalité hospitalière était de 20% pour les patients présentant une stimulation maximale de clairance liquidienne alvéolaire contre 62% pour les patients présentant une altération des capacités de résorption. Ces résultats suggèrent qu'un épithélium alvéolaire fonctionnel est associé à un meilleur pronostic pour les patients présentant une agression pulmonaire aiguë. De la même manière, ces résultats supportent l'hypothèse que le degré de l'agression de l'épithélium alvéolaire est un déterminant majeur sur l'évolution des patients présentant un œdème lésionnel consécutif à une agression pulmonaire aiguë.

Les capacités de résorption de l'épithélium alvéolaire peuvent être conservées chez les patients présentant un œdème pulmonaire secondaire à l'ischémie reperfusion après transplantation pulmonaire, confirmant une nouvelle fois que l'épithélium alvéolaire peut être intact et fonctionnel même en présence d'une agression pulmonaire cliniquement sévère. L'existence d'une clairance liquidienne alvéolaire normale était corrélée à des lésions histologiques moins sévères, une résolution plus rapide de l'hypoxémie et des infiltrats pulmonaires à la radiographie de thorax et une tendance plus courte par la durée de ventilation mécanique et de séjour en réanimation (235).

### 3.2.3) Stimulation pharmacologique de la clairance liquidienne alvéolaire

Peu d'études cliniques sont disponibles sur la stimulation du transport transépithélial, comme traitement de l'œdème pulmonaire. Sartori et al ont montré dans une étude randomisée en double aveugle contre placebo que l'inhalation prophylactique de salmétérol (125 µg/12 heures) diminue l'incidence de l'œdème pulmonaire de haute altitude de plus de 50 % chez les patients à risque de développer cette pathologie (83). L'administration d'albutérol par aérosol aux posologies habituelles chez des patients présentant une détresse respiratoire aiguë et bénéficiant d'une intubation et d'une ventilation mécanique permet d'obtenir des concentrations thérapeutiques de  $\beta_2$ -agonistes dans le liquide d'œdème pulmonaire (236). Une étude récente randomisée et monocentrique contre placebo réalisée sur 40 patients présentant une agression pulmonaire aiguë a montré que l'administration intraveineuse de salbutamol (15 µg/kg/h) diminuait l'eau extravasculaire pulmonaire en comparaison avec le groupe de patients traité par placebo (237). Cette étude n'avait cependant pas la puissance nécessaire pour mettre en évidence un effet bénéfique sur la mortalité.

Les  $\beta_2$ -agonistes semblent donc être une thérapeutique efficace chez les patients présentant un œdème pulmonaire lésionnel, cependant il existe plusieurs limites. D'une part, les lésions de l'épithélium alvéolaire peuvent être trop sévères chez certains patients pour répondre à la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique. D'autre part, certaines conditions pathologiques peuvent également limiter leur action. Lors d'une augmentation de pression dans les cavités cardiaques gauches, le facteur natriurétique peut inhiber la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique sur la clairance liquidienne alvéolaire (238).

Au cours du choc hémorragique prolongé, la production de dérivés oxydatifs inhibe la réponse de l'épithélium alvéolaire aux  $\beta_2$ -agonistes et l'AMPC ne stimule plus la clairance liquidienne alvéolaire (207). Dans les situations pathologiques impliquant une altération de la clairance liquidienne alvéolaire dépendante des dérivés oxydatifs, un traitement visant à inhiber l'oxyde nitrique synthase inductible et anti-oxydant par N-acétylcystéine pourrait être utilisé afin de restaurer le transport actif de  $\text{Na}^+$  sensible aux  $\beta$ -agonistes. Par ailleurs, les changements dans l'activité et dans l'expression des mécanismes de transport ionique peuvent modifier les effets de la  $\beta_2$ -stimulation, notamment du fait de l'interdépendance entre le canal CFTR et des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans la régulation du transport actif alvéolaire de  $\text{Na}^+$ . La transfection du gène du canal CFTR par un adénovirus recombinant augmente le transport actif de  $\text{Na}^+$  et la clairance liquidienne alvéolaire de 92% par rapport aux animaux contrôles (239). Cependant, il est possible qu'en modifiant l'expression des canaux ioniques, la réponse à la  $\beta_2$ -stimulation puisse être restaurée. Par exemple, un traitement par glucocorticoïdes peut inhiber les effets du TNF- $\alpha$  sur l'expression du canal ENaC et restaurer un transport de fluide normal à travers l'épithélium alvéolaire (240). Une autre limite potentielle théorique des  $\beta_2$ -agonistes est la désensibilisation des récepteurs. L'administration continue de  $\beta_2$ -agonistes peut altérer la stimulation de la clairance liquidienne alvéolaire seulement si un  $\beta$ -agoniste non spécifique (isoprotérénol) ou lorsque des doses élevées de  $\beta_2$ -agonistes sont utilisées. Cette désensibilisation est liée à la réduction de la densité des récepteurs membranaires et des modifications intracellulaires dans la transmission du signal (163).

Le but de ce travail était de moduler l'équilibre hydrique pulmonaire au cours de l'agression pulmonaire aiguë induite par des agents infectieux. Les moyens mis en œuvre ont été les suivants :

- 1) Etude de la balance hydrique pulmonaire au cours de l'administration de la protéine C activée sur un modèle d'agression pulmonaire aiguë induite par *P. aeruginosa*
  
- 2) Modulation  $\beta$ -adrénergique et équilibre hydrique pulmonaire au cours de l'agression pulmonaire aiguë infectieuse
  - 2.1) Validation d'un modèle de pneumopathie infectieuse aiguë à *E. coli*
  - 2.2) Effets du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène sur l'équilibre hydrique pulmonaire au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli*
  - 2.3) Effets de la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique exogène au cours de la pneumonie aiguë à *P. aeruginosa*

# **TRAVAUX PERSONNELS**

## A) Matériel et méthodes

### 1) Animaux

Des rats Sprague Dawley pesant 250 à 280 grammes (Elevage Charles Rivers, France) ont été utilisés. L'hébergement a été assuré au sein de l'animalerie de la faculté de Médecine de Lille. Durant leur séjour dans l'animalerie, les animaux avaient un accès libre à l'eau et à la nourriture. Le protocole avait reçu l'approbation du comité d'éthique animal de la faculté de Médecine de Lille.

Des souris CD1 (pesant entre 25 et 35 g) ont également été utilisées. L'hébergement était réalisé au sein de l'animalerie du centre médical et universitaire de San Francisco, USA. Les animaux avaient libre accès à l'eau et à la nourriture et la température de l'animalerie était contrôlée à  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ . Le comité éthique de recherche expérimentale sur animaux de l'Université de San Francisco avait approuvé le protocole.

### 2) Traceurs radioactifs

L'albumine marquée à l'iode 125 (Alb-I<sup>125</sup>) était fournie par CIS International (Gif-sur-Yvette, France) et conservée à +4°C. L'albumine marquée à l'indium 111 (Alb-In<sup>111</sup>) était fabriquée par le service de Médecine Nucléaire du CHRU de Lille selon la méthode décrite par Hunter et al et conservée à -20°C (241). La stabilité de la liaison de l'iode à l'albumine était analysée par chromatographie d'affinité. Un taux de dissociation supérieur ou égal à 5% était éliminé.

### 3) Agents chimiques et réactifs

Le propranolol, l'amiloride et la terbutaline étaient fournis par Sigma (St Louis, MO). Ils étaient dissous dans du sérum salé physiologique avant chaque expérimentation.

#### 4) Souches bactériennes et conditions de culture

##### 4.1) *P. aeruginosa*

La souche PAO1 était utilisée. La souche était aliquotée en milieux felix à -80°C. La souche bactérienne était mise en culture dans un bouillon de culture de trypticase soja (laboratoire Mérieux, France) à 37°C sur un agitateur rotatif pendant 12 heures. La culture bactérienne obtenue était centrifugée à 1000 x g pendant 15 minutes, lavée 2 fois et le culot bactérien était mis en suspension dans du sérum salé physiologique. L'inoculum était ajusté à 10<sup>9</sup> CFU/ml par spectrophotométrie (mesure de la densité optique à 440 nm).

##### 4.2) *E. coli*

Le sérotype K1 était initialement isolé du sang d'un patient ayant présenté un sepsis biliaire. Les bactéries étaient mises en culture dans un bouillon de culture LB à 37°C sur un agitateur rotatif pendant 12-16 heures. Le bouillon de culture contenant les bactéries était secondairement dilué dans une solution de glycérol 30% puis aliquoté et stocké à -70°C. A chaque expérience, un prélèvement était décongelé, puis dilué au 1/100 dans un bouillon LB et incubé pendant 12-16 heures à 37°C sur un agitateur rotatif. Le bouillon bactérien était ensuite centrifugé (3500 x g pendant 20 min) et lavé 2 fois dans une solution tampon phosphate salin. La quantification des bactéries était mesurée par spectrophotométrie (lecture de la densité optique à 600 nm) pour ajuster un inoculum à 10<sup>7</sup> CFU/mL.

#### 5) Charges bactériennes pulmonaires

Chez le rat, après sacrifice de l'animal, les poumons étaient récupérés de façon aseptique puis homogénéisés dans un milieu trypticase soja. L'homogénat pulmonaire était étalé sur des boîtes d'Agar par dilutions successives au dixième, et les bactéries viables numérées après 24 heures d'incubation à 37°C.

Chez la souris, les poumons étaient extraits de façon aseptique de la cage thoracique puis homogénéisés avec de l'eau stérile. 0,1 ml d'homogénat pulmonaire était inoculé sur des boîtes d'Agar Luria-Bertani avec des dilutions séquentielles. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les colonies d'*E. coli* étaient comptées.

## 6) Instillation intratrachéale

### 6.1) Instillation intratrachéale chez le rat :

La face ventrale du cou était badigeonnée à l'alcool à 70° et la partie médiane incisée sur deux centimètres, la trachée exposée était injectée à l'aide d'une aiguille 25 gauge montée sur une seringue de 1 ml contenant l'inoculum bactérien suivi de 0,5 ml d'air pour favoriser le dépôt pulmonaire distal. L'incision était fermée par un point de suture (Ethicon, Jonshon, Bruxelles, Belgique).

### 6.2) Instillation intratrachéale chez la souris

L'anesthésie des animaux était réalisée par une injection intrapéritonéale de kétamine (90 mg/kg) et d'hydralazine (10 mg/kg). Une méthode d'instillation par visualisation directe développée dans le laboratoire a été utilisée. Une source de lumière froide (Industrie Dolan-Jenner, Lawrence, MA) avec deux fibres optiques articulées permettait une illumination cervicale transcutanée et la visualisation de la glotte et des cordes vocales de la souris pour délivrer sous contrôle de la vue 30 µL de solution d'*E. coli* via un cathéter en polyéthylène (PE-10).

## 7) Administration intraveineuse de la rhPCa chez le rat

La protéine C recombinante humaine (rhPCa) était généreusement fournie par le laboratoire Lilly (Saint-Cloud, France). Les animaux étaient anesthésiés par un mélange de kétamine (60 mg/kg) et chlorhydrate de chlorpromazine (1 mg/kg) par voie intramusculaire. Un cathéter élastique était inséré dans la veine cave supérieure via la veine jugulaire externe droite. Le cathéter était tunnélisé par voie sous-cutanée dans la région interscapulaire. La rhPCa était administrée par voie intraveineuse en continue à la posologie de 300 µg/kg/h pendant 4 heures. La concentration était choisie selon les recommandations du fabricant, en prenant compte des spécificités d'espèces pour la rhPCa.

## 8) Préparation chirurgicale

### 8.1) Modèle expérimental chez le rat

Les rats étaient anesthésiés par une injection intrapéritonéale de 0,5 mL/kg de phénobarbital (Sanofi-Winthrop, Gentilly, France). Après une incision sur la face ventrale du cou, la trachée était exposée puis canulée par un cathéter (PE-240, intramedic, Clay Adams, Sparks, MD, USA) et reliée à un ventilateur pour petits animaux (Harvard, apparatus, South Natick, MA, USA). Les paramètres de ventilation étaient adaptés pour obtenir un volume courant de 10 ml/kg, avec une  $FiO_2$  à 100%, une fréquence respiratoire à 60 cycles par minute et une pression expiratoire positive de 3 cm H<sub>2</sub>O. Les pressions aériennes étaient mesurées pendant toute la durée de l'expérimentation (BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA, USA). Un cathétérisme sélectif de l'artère carotide gauche par un cathéter polyéthylène 50 (PE-50, Intramedic, Clay Adams, Sparks, MD, USA), permettait une surveillance constante de la pression artérielle de l'animal et un abord vasculaire pour prélèvements sanguins et un remplissage vasculaire éventuel. L'animal était curarisé par du bromure de pancronium (0,3 mg/kg) en période basale et avant l'instillation pulmonaire à la trentième minute. Un traitement par héparine de bas poids moléculaire était administré par le cathéter (100 UI/kg). Des gaz du sang étaient effectués en période basale afin de stabiliser la PaCO<sub>2</sub> entre 30 et 40 mmHg (ABL 520, Radiometer, Copenhague).

Une période d'équilibration de 15 minutes initiait le protocole afin de stabiliser la pression artérielle et d'optimiser la ventilation mécanique. Puis l'animal était mis en décubitus latéral gauche jusqu'à la fin de l'expérience. Au terme de la période d'équilibration, 1  $\mu$ Ci d'albumine marquée à l'iode 125 (Alb-I<sup>125</sup>) était injecté par voie intra-vasculaire. Trente minutes après cette injection, un prélèvement sanguin et une mesure des gaz du sang étaient effectués. Puis un cathéter de type PE-50 était introduit par la canule de trachéotomie et embolisé dans le poumon gauche sur une longueur fixe de 10 cm par rapport à l'orifice d'introduction. Par ce cathéter était instillé 1 ml d'une solution d'albumine bovine à 5% diluée dans du ringer isotonique à laquelle était ajouté 1  $\mu$ Ci d'albumine marquée à l'indium 111 (Alb-In<sup>111</sup>). Un échantillon de l'instillât était conservé afin de quantifier la radioactivité et le taux de protides. Une heure après le début de l'instillation, une mesure des gaz du sang, des prélèvements sanguins pour mesure de l'hémoglobine et des protides totaux étaient effectués.

Après exsanguination de l'animal, une sternotomie médiane permettait un clampage du tronc souche droit et l'extraction du bloc cœur poumon. Un examen macroscopique permettait de vérifier la bonne localisation de l'instillât dans le poumon gauche. Un nouveau cathéter de type PE-50 était descendu dans l'arbre bronchique gauche permettant l'aspiration du liquide intra-alvéolaire résiduel représentant l'aspirât final. Le liquide ainsi obtenu était centrifugé (Sigma 2K15, Bioblock Scientific, Osterodeam Harz, Allemagne), la concentration protidique et la radioactivité étaient mesurées. Les deux poumons étaient pesés, broyés et homogénéisés dans 2 mL d'eau stérile puis centrifugés à 3500 tours/min pendant 8 minutes. Un comptage de la radioactivité en Alb-I<sup>125</sup> et en Alb-In<sup>111</sup> (LKB 1282, Wallach, France) était réalisé sur les échantillons des deux homogénats pulmonaires, les deux surnageants obtenus après centrifugation et sur les prélèvements sanguins.

## 8.2) Modèle expérimental chez la souris

Quinze minutes avant la fin de l'expérimentation, les souris étaient anesthésiées. A l'aide d'un microscope binoculaire, un cathéter (PE-10) imprégné d'héparine était inséré dans l'artère carotidienne droite et connecté à un moniteur de surveillance continue (BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA, USA) via un capteur de pression pour mesurer la pression artérielle. 50 µL de sang artériel était prélevé pour mesurer la gazométrie artérielle avec un analyseur de gaz du sang (Diamond Diagnostics, Holliston, MA). Pour mesurer la pression dans l'oreillette droite, la veine jugulaire droite était isolée, pour permettre l'introduction d'un cathéter (PE-50) enfoncé sur 1-1,5 cm, puis raccordé au système de recueil des données BIOPAC grâce à un capteur de pression. Un point de suture 3/0 à la peau sécurisait les cathéters en position. Le capteur de pression était au même niveau que l'oreillette droite de la souris.

## 9) Paramètres physiologiques mesurés

### 9.1) Evaluation des modifications de perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire

#### 9.1.1) Mesure de l'eau extravasculaire pulmonaire

Chez le rat, l'eau extravasculaire était déterminée par le calcul du rapport du poids de poumon mouillé sur le poids de poumon sec exsangue (ratio M/S), évalué par gravimétrie. Dans ce but, des échantillons pulmonaires étaient pesés (poids de poumon mouillé), puis placés en étuve à 37°C pendant une période de 7 jours afin d'obtenir le poids de poumon sec. La fraction sanguine du poumon est calculée à partir du contenu en hémoglobine du surnageant. Le ratio M/S est évalué pour le poumon instillé et pour le poumon non instillé dans chaque groupe d'animaux. Seule la valeur obtenue par le poumon non instillé de chaque animal est prise en compte pour l'analyse.

Chez la souris, les animaux étaient sacrifiés par une inhalation létale d'halothane. Les poumons étaient extraits de la cavité thoracique, pesés puis homogénéisés (avec 1 mL d'eau distillée). Un prélèvement sanguin était collecté par ponction du ventricule droit. Le poumon homogénéisé était pesé et une partie était centrifugée (12 000 tpm pendant 8 minutes) pour la mesure de la concentration en hémoglobine dans le surnageant de l'homogénat (H<sub>S</sub>). Une autre partie de l'homogénat (FW<sub>H</sub>), le surnageant (FW<sub>S</sub>) et le sang (FW<sub>B</sub>) étaient pesés, puis placés en étuve (60°C pendant 24 heures) pour la mesure par gravimétrie de l'eau extravasculaire pulmonaire.

L'eau extravasculaire pulmonaire était calculée par l'équation suivante :

$$\text{Eau extravasculaire pulmonaire} = Q_H \times FW_H - Q_B \times FW_B - Q_{\text{eau}}$$

$$Q_B = 1.039 \times (Q_H \times FW_H \times Hb_S) / (FW_S \times Hb_B)$$

1,039 est la densité du sang, Q<sub>H</sub> le poids de l'homogénat pulmonaire, Q<sub>B</sub> est le volume sanguin dans le poumon.

### 9.1.2) Mesure de la fuite protéique bidirectionnelle chez le modèle de rat

Un système de double marquage de l'albumine par de l'iode et de l'indium radioactif permettait de suivre le sens de passage des protéines à travers la membrane alvéolo-capillaire. L'intégrité des barrières épithéliale et endothéliale peut être altérée indépendamment ou conjointement.

Le flux bidirectionnel d'albumine était estimé de la manière suivante : du secteur vasculaire vers le secteur alvéolaire, quantifié par la fuite du traceur vasculaire l'alb-In<sup>111</sup> ; de l'alvéole vers le secteur vasculaire, évalué par la quantification sérique du traceur alvéolaire, l'alb-I<sup>125</sup>.

#### 9.1.2.1) la fuite du marqueur alvéolaire

Afin de mesurer la perméabilité de l'épithélium alvéolaire à l'albumine, l'accumulation plasmatique de ce marqueur a été mesurée. La clairance du traceur alvéolaire est calculée à partir de la radioactivité totale instillée et donc exprimée en pourcentage de la radioactivité totale.

#### 9.1.2.2) la fuite du traceur vasculaire

Le rapport aspirât/plasma d'alb-In<sup>111</sup> est défini comme le rapport de la radioactivité en indium 111 du liquide aspiré en fin d'expérience, sur la moyenne de la radioactivité en iode 125 sur deux prélèvements sanguins effectués en milieu et en fin d'expérimentation.

$$\text{Alb-In}^{111} \text{ Aspirât/plasma} = \text{Alb-In}^{111}_{\text{asp}} / ((\text{Alb-I}^{125}_{\text{pl}} + \text{Alb-I}^{125}_{\text{plf}}) / 2)$$

$\text{Alb-In}^{111}_{\text{asp}}$  : nombre de coups par minutes (cpm) d'indium 111 par gramme d'aspirât

$\text{Alb-I}^{125}_{\text{pl}}$  : nombre de cpm d'iode 125 par gramme de plasma prélevé en milieu d'expérience

$\text{Alb-I}^{125}_{\text{plf}}$  : nombre de cpm d'iode 125 par gramme de plasma prélevé en fin d'expérience

L'accumulation du traceur vasculaire dans l'espace pulmonaire extravasculaire était déterminée par le comptage total extravasculaire en cpm de la radioactivité de l'Alb-In<sup>111</sup> dans le poumon divisé par la moyenne des comptages en cpm de la radioactivité de l'Alb-In<sup>111</sup> dans le plasma et correspondait aux équivalents plasmatiques extravasculaires (EPEV), exprimés en  $\mu\text{L}$  (242).

### 9.1.3) Mesure de la perméabilité vasculaire pulmonaire chez la souris

Une injection de 0,05  $\mu\text{Ci}$  d'Alb-I<sup>125</sup> était administrée par voie intrapéritonéale après l'instillation intratrachéale de bactéries. Au sacrifice des animaux, les poumons étaient extraits de la cavité thoracique et la radioactivité pulmonaire et sanguine était mesurée (Packard, Meriden, CT). Les équivalents plasmatiques extravasculaires (EPEV) pulmonaires (correspondant à un index de perméabilité vasculaire pulmonaire) étaient calculés et correspondaient au comptage en cpm de la radioactivité en Alb-I<sup>125</sup> dans le tissu pulmonaire divisée par le comptage en cpm de la radioactivité en Alb-I<sup>125</sup> dans le plasma (35).

## 9.2) Evaluation du mouvement liquidien alvéolaire et pulmonaire

### 9.2.1) mouvements liquidiens alvéolaires : clairance liquidienne alvéolaire *in vivo*

La vitesse de résorption de la fraction liquidienne de l'œdème alvéolaire reflète la clairance liquidienne alvéolaire (CLA). Durant les 60 minutes de l'expérimentation elle est définie par le pourcentage de liquide instillé ayant quitté l'alvéole vers le secteur interstitiel et/ou vasculaire. Deux méthodes ont été utilisées.

- Le rapport final/initial en albumine native (F/I prot)

L'instillât est une solution contenant de l'albumine radiomarquée et libre en suspension. La contraction liquidienne due à la clairance alvéolaire implique une augmentation de sa concentration. Ce rapport est calculé en divisant la concentration finale des protéines natives de l'aspirât (F) par la concentration initiale de ces protéines dans l'instillât (I).

- Le rapport final/initial de l'alb-In<sup>111</sup> (F/I In<sup>111</sup>)

Ce rapport est obtenu en divisant la radioactivité de l'in<sup>111</sup> mesurée en cpm par gramme d'aspirât sur les cpm d'In<sup>111</sup> par gramme d'instillât.

Ces deux paramètres permettent d'évaluer la clairance liquidienne alvéolaire (CLA) par la formule suivante :

$$CLA = (V_i \times Fw_i - V_f \times fw_f) / (V_i \times fw_i) \times 100$$

Fw est la fraction aqueuse du liquide initial instillé (i) et du liquide final total restant dans les alvéoles (f), dont le liquide aspiré en fin d'expérimentation est un échantillon.

Fw = (poids de la solution mouillée – poids de la solution sèche) / poids de la solution mouillée

V est le volume initial instillé (i) et le volume final alvéolaire (f).

Vf a été calculé de deux façons :

- A partir des concentrations de protéines non marquées

Vf = (Vi x TPasp étant les concentrations de protides mesurées respectivement dans le liquide initial instillé (i) et final aspiré (asp)

La clairance alvéolaire évaluée par cette méthode est la CLA Prot

- A partir des changements de concentration d'<sup>111</sup>In-Alb

$$Vf = (Vi \times {}^{111}\text{In}_i \times P^{111}\text{In}) / {}^{111}\text{In}_{\text{asp}}$$

<sup>111</sup>In<sub>i</sub> et <sup>111</sup>In<sub>asp</sub> sont les cpm/g en Indium 111 du liquide instillé (i) et du liquide aspiré (asp) et P<sup>111</sup>In le pourcentage d'indium 111 instillé restant dans le poumon en fin d'expérimentation

La clairance alvéolaire évaluée par cette méthode est la CLA 111

En cas de lésion pulmonaire :

Cette formule de clairance alvéolaire, valable sur poumon sain, est modifiée en cas de lésion pulmonaire de par la fuite bidirectionnelle des protéines marquées et non marquées.

$$CLA = (V_i \times Fw_i) + (Fw(PE_{alv}) - (Vf \times Fw_i) / (V_i \times Fw_i) + Fw(PE_{alv}) \times 100$$

Fw(PE<sub>alv</sub>) est la fraction en eau de l'équivalent plasma alvéolaire (PE<sub>alv</sub>), qui correspond à la part de liquide alvéolaire issue du secteur vasculaire estimée par la concentration de l'Alb-I<sup>125</sup> mesurée dans l'aspirât.

### 9.2.2) Mouvements liquidiens pulmonaires

La clairance liquidienne pulmonaire (CLP) correspond à la fraction de liquide instillé ayant quitté le poumon, par rapport à la totalité du liquide instillé.

$$CLP = V_i \times Fw_i - E / V_i \times Fw_i \times 100$$

E est l'excès d'eau du poumon instillé par rapport au poumon contrôle. E est calculé selon la formule suivante :

$$E = (Qw_i / (Qd_i - P) - Qw_c / Qd_c) \times (Qd_i - P)$$

Qw<sub>i</sub> : poids du poumon mouillé

Qd<sub>i</sub> : poids du poumon sec

Qw<sub>c</sub> / Qd<sub>c</sub> : ratio M/S du poumon contrôle

P : masse des protéines instillées dans le poumon, c'est-à-dire poids sec de la solution instillée multipliée par la fraction de l'Alb-In<sup>111</sup> restant dans le poumon en fin d'expérience.

De même que pour la clairance alvéolaire, en cas de lésion pulmonaire la CLP devient :

$$CLP = V_i \times Fw_i + Fw(PE_{EVE}) - E / (V_i \times Fw_i + Fw(PE_{EVE})) \times 100$$

Fw(PE<sub>EVE</sub>) étant la fraction en eau de l'équivalent plasma extra-vasculaire.

### 9.2.3) Mesure de la clairance liquidienne alvéolaire *in situ*

Selon une méthodologie précédemment décrite, Les souris étaient anesthésiées par injection de phénobarbital (200 mg/kg par voie intrapéritonéale) puis bénéficiaient d'une exsanguination par section de l'aorte abdominale (243).

Un abord cervical par voie chirurgicale permettait la mise en place d'une canule de trachéotomie de diamètre 20 Gauge et l'administration intratrachéale d'O<sub>2</sub>. L'instillât (10-13 mL/kg d'une solution de Ringer lactate contenant l'albumine bovine à 5% et 0,1 µCi d'Alb-I<sup>131</sup> à 37°C, osmolarité 304 mosm /L) était administré par voie intratrachéale. Une pression positive continue de 7 cmH<sub>2</sub>O était maintenue pendant 30 minutes avec une FiO<sub>2</sub> de 100%. 3 à 5 minutes après l'instillation, un prélèvement de base (50-100 µL) était aspiré des voies aériennes distales en utilisant un cathéter (PE-10). Ce prélèvement correspondait au temps 0. 30 minutes plus tard, un second prélèvement était aspiré des voies aériennes distales. La température corporelle était maintenue à 37°C durant toute la durée de l'expérimentation à l'aide d'une lampe chauffante externe et surveillée en utilisant un thermomètre digital (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) placé dans la cavité abdominale. La clairance liquidienne alvéolaire était exprimée comme le pourcentage du volume du liquide alvéolaire absorbé durant 30 minutes.

La clairance liquidienne alvéolaire était calculée en utilisant l'équation :

$$CLA = 1 - (P_i / P_f) \times 100\%$$

P<sub>i</sub> : activité initiale en cpm en Alb-I<sup>131</sup> au temps 0

P<sub>f</sub> : activité finale en cpm en Alb-I<sup>131</sup> à 30 minutes

#### 10) Recueil du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) et cytologie

Le LBA était recueilli sur des rats sacrifiés (injection intrapéritonéale de 200 mg/kg de sodium pentobarbital). La trachée était disséquée et canulée, puis l'abdomen et le diaphragme ouverts. Le LBA était réalisé par trois lavages de 5 ml de sérum salé physiologique.

Le LBA était centrifugé à 4°C pendant 10 minutes à 2500 x g. Le surnageant obtenu était congelé à -80°C pour le dosage des cytokines. Le culot était remis en suspension dans 1 mL de sérum salé physiologique et le nombre de globules blancs était déterminé dans une cellule de Malassez au microscope optique. Les différentes sous-populations de globules blancs étaient évaluées par cytocentrifugation suivi d'une coloration de May-Grünwald-Giemsa.

Le pourcentage des sous populations était obtenu en comptant 200 cellules par échantillon au microscope optique et en exprimant chaque type cellulaire en pourcentage du nombre total de cellules comptées.

#### 11) Mesures des paramètres de la coagulation

Les paramètres suivants étaient mesurés quatre heures après l'instillation de bactéries, sur des prélèvements sanguins et obtenus par ponction directe de l'aorte des animaux anesthésiés : compte leucocytaire et plaquettaire, temps de prothrombine, fibrinogène et concentration en complexe thrombine-antithrombine (TAT). Les mesures des TAT étaient utilisées comme marqueurs de la formation de thrombine. Les TAT étaient également mesurés dans le liquide des LBA. Les comptes leucocytaires et plaquettaires étaient obtenus sur sang traité par anticoagulant, EDTA. Pour le dosage de la coagulation, le sang (4 parts) était collecté dans du sodium citrate (une part). Le plasma était séparé des plaquettes par centrifugation (15°C à 2500 g pendant 15 minutes). Le temps de prothrombine et la concentration en fibrinogène étaient mesurés immédiatement par des procédures standards. Les complexes TAT étaient mesurés sur des prélèvements citrates par méthode enzymatique immunabsorbant (Enzygnost TAT, Behringwerke AG, Marburg, Allemagne). Les concentrations étaient mesurées dans le sérum et le liquide de LBA des animaux 4 heures après l'instillation intratrachéale des bactéries.

#### 12) Mesure des cytokines

Chez les rats, les concentrations en TNF- $\alpha$  et IL-6 étaient déterminées par une technique ELISA quantitative d'immuno-dosage enzymatique (Quantikine Murine rat TNF- $\alpha$  et IL-6, R&D systems, USA). Les résultats ont été analysés par spectrophotométrie à l'aide d'un lecteur de micro-plaques (Packard Instrument Compagny, Meriden CT USA). Les concentrations des échantillons ont été déterminées à l'aide de la courbe d'étalonnage construite à partir des échantillons standards fournis dans le Kit.

Chez les souris, le dosage plasmatique du *macrophage inflammatory protein-2* (MIP-2) chez la souris était réalisé par un kit de dosage immuno-enzymatique ELISA (Quantikine MIP-2, B&D systems, USA).

### 13) Mesure des catécholamines plasmatiques

Chez les rats, le dosage des catécholamines plasmatiques (épinéphrine et norépinéphrine) était réalisé par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Les résultats étaient exprimés en µg/L.

Les dosages des catécholamines plasmatiques chez la souris étaient réalisés par un kit de dosage immuno-enzymatique par technique ELISA, issu d'un laboratoire immunobiologique (Hambourg, Allemagne). La sensibilité était de 12 pg/ml avec une variabilité intra et inter dosage de 5 et 10% respectivement.

### 14) Histologie

Les souris étaient euthanasiées par inhalation létale d'halothane. Le thorax et l'abdomen étaient ouverts et la base du cœur était clampée pour éviter la perte du volume sanguin pulmonaire. Les organes intra thoraciques étaient extraits en bloc et une solution de formol 10% était instillée par voie intratrachéale à une pression de 25 cm H<sub>2</sub>O. Après 72 heures de fixation, les poumons étaient incorporés dans la paraffine, et des sections de 5 µm d'épaisseur étaient coupées et colorées à l'hématoxyline-éosine.

## B) Les protocoles expérimentaux

1) Protocole expérimental d'évaluation de la PCa humaine recombinante (rhPCa) sur l'équilibre hydrique pulmonaire au cours de l'agression pulmonaire aiguë induite par *P. aeruginosa*

Les animaux étaient randomisés dans un des 4 groupes suivants pour un nombre de 5 animaux par groupe expérimental

- Groupe contrôle (CTR) : recevant 0,5 mL/kg de sérum salé isotonique (SSI) par voie intratrachéale
- Groupe avec une pneumonie à *Pa* (PNP) : recevant par voie intratrachéale 0,5 mL/kg d'un inoculum bactérien à  $1 \times 10^9$  CFU

- Groupe rhPCa recevant une instillation intratrachéale de sérum salé isotonique (0,5 mL/kg) associée à l'administration par voie intraveineuse de la rhPCa à la concentration de 300 µg/kg/h
- Groupe rhPCa avec une pneumonie à *Pa* : (A-PNP) : recevant par voie intratrachéale 0,5 mL/kg d'un inoculum bactérien à  $1 \times 10^9$  CFU et de façon concomitante l'administration par voie intraveineuse de la rhPCa à la concentration de 300 µg/kg/h.

## 2) Evaluation du tonus adrénérgique

### 1.1) Inhibition du tonus adrénérgique endogène

Quatre groupes expérimentaux étaient constitués pour l'étude de l'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénérgique endogène :

- Groupe contrôle (SSI + SSI) : les souris recevaient une injection intrapéritonéale de 100 µL de SSI et une instillation intratrachéale de 50 µL de SSI et 15 minutes après une nouvelle instillation de 30 µL de SSI
- Groupe propranolol + SSI : les souris recevaient une injection intrapéritonéale de 100 µL de propranolol (3 mg/kg de poids corporel) et une instillation intratrachéale de 50 µL d'une solution de SSI contenant  $10^{-4}$  M de propranolol et 15 minutes après une nouvelle instillation de 30 µL de SSI
- Groupe SSI + *E. coli* : les souris recevaient une injection intrapéritonéale de 100 µL de SSI et une instillation intratrachéale de 50 µL de SSI et 15 minutes après une instillation de  $10^7$  CFU d'*E. coli* dans 30 µL de SSI
- Groupe propranolol + *E. coli* : les souris recevaient une injection intrapéritonéale de 100 µL de propranolol (3 mg/kg de poids corporel) et une instillation intratrachéale de 50 µL d'une solution de SSI contenant  $10^{-4}$  M de propranolol et 15 minutes après une instillation de  $10^7$  cfu d'*E. coli* dans 30 µL de SSI

Trois groupes additionnels ont été constitués afin d'étudier l'inhibition du canal apical à sodium :

- Groupe SSI + SSI : les souris recevaient une instillation intratrachéale de 50  $\mu$ L de SSI puis ensuite une nouvelle instillation intratrachéale de 30  $\mu$ L de SSI
- Groupe SSI + *E. coli* : les souris recevaient une instillation intratrachéale de 50  $\mu$ L de SSI puis ensuite une nouvelle instillation de  $10^7$  CFU d'*E. coli* dans 30  $\mu$ L de SSI
- Groupe amiloride + *E. coli* : les souris recevaient une instillation intratrachéale de 50  $\mu$ L d'une solution de SSI contenant  $10^{-4}$  M d'amiloride puis ensuite une nouvelle instillation de  $10^7$  CFU d'*E. coli* dans 30  $\mu$ L de SSI

#### 1.2) Evaluation de l'équilibre hydrique pulmonaire au cours de la stimulation $\beta_2$ -adrénergique exogène

Les animaux étaient randomisés dans l'un des 5 groupes suivants :

- Groupe contrôle SSI + SSI : les rats recevaient une instillation intratrachéale de 0,5 mL/kg de SSI et 30 minutes après une instillation intratrachéale de 1 mL de SSI
- Groupe avec une pneumopathie à *Pa* + SSI : les rats recevaient une instillation intratrachéale de 0,5 mL/kg d'une solution de  $0,5 \times 10^9$  CFU de *Pa* dans du SSI et 30 minutes après une instillation intratrachéale de 1 mL de SSI
- Groupe *Pa* + terbutaline : les rats recevaient une instillation intratrachéale de 0,5 mL/kg d'une solution de  $0,5 \times 10^9$  CFU de *Pa* dans du SSI et 30 minutes après une instillation intratrachéale de 1 mL de SSI contenant  $10^{-4}$  M de terbutaline
- Groupe *Pa* + terbutaline + propranolol : les rats recevaient une instillation intratrachéale de 0,5 mL/kg d'une solution de  $0,5 \times 10^9$  CFU de *Pa* dans du SSI et 30 minutes après une instillation intratrachéale de 1 mL de SSI contenant  $10^{-4}$  M de terbutaline et  $10^{-4}$  M de propranolol
- Groupe *Pa* + propranolol : les rats recevaient une instillation intratrachéale de 0,5 mL/kg d'une solution de  $0,5 \times 10^9$  CFU de *Pa* dans du SSI et 30 minutes après une instillation intratrachéale de 1 mL de SSI contenant  $10^{-4}$  M de propranolol

# **RESULTATS**

1) Article 1: « *Intravenous administration of activated protein C in Pseudomonas-Induced lung injury: impact on lung fluid balance and the inflammatory response* »

1.1) Effets de la rhPCa sur les échanges gazeux

Aucune différence significative n'était mise en évidence pour le rapport PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> entre les groupes CTR, rhPCa et PNP. Cependant l'administration de rhPCa altérait significativement les échanges gazeux en comparaison avec les groupes CTR et PNP (rapport PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> à 215 ± 26 versus 386 ± 33, p < 0,05). Aucune différence significative n'était mise en évidence pour la pression artérielle et les pressions des voies aériennes entre les différents groupes. Les résultats sont rapportés sur le tableau I.

**Tableau I:** pression artérielle systolique (PAS), les pressions des voies aériennes (PVA) et rapport PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> après une période de stabilisation de 30 minutes.

Groupes	PAS (mm Hg)	PVA (cm H <sub>2</sub> O)	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>
CTR	127 ± 5	4,3 ± 0,4	420 ± 37
PCa	118 ± 16	4,8 ± 0,6	483 ± 47
PNP	123 ± 20	4,1 ± 0,3	386 ± 33
A-PNP	104 ± 12	4,1 ± 0,6	215 ± 26 *

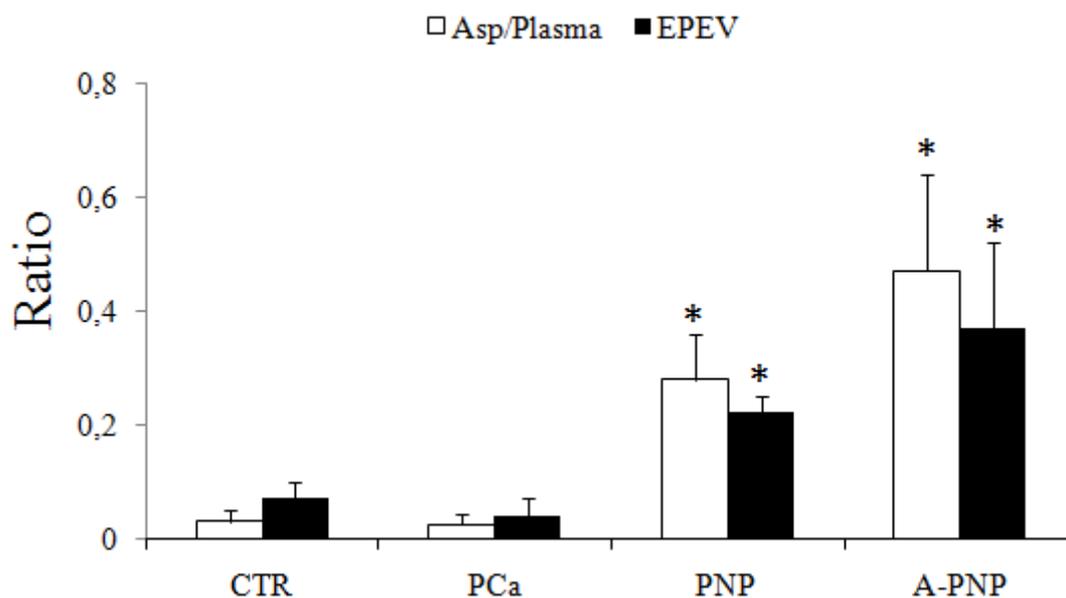
Données représentées sous forme de la moyenne ± l'écart type. \* : p < 0,05 versus CTR et PNP.

1.2) Effets de la rhPCa sur la perméabilité alvéolo-capillaire aux protéines

La perméabilité endothéliale évaluée par le passage du traceur vasculaire vers le compartiment alvéolaire (rapport Asp/Plasma) était significativement augmentée dans le groupe PNP versus les animaux contrôles (0,28 ± 0,08 versus 0,03 ± 0,01, p < 0,05).

L'administration concomitante de rhPCa tendait à augmenter le trouble de la perméabilité comparé au groupe PNP, mais sans différence significative (0,47 ± 0,17 versus 0,28 ± 0,08, p=0,2).

De la même manière, l'instillation bactérienne augmentait les EPEV, en comparaison avec le groupe CTR ( $0,22 \pm 0,03$  versus  $0,07 \pm 0,03$ ,  $p < 0,05$ ). L'administration de rhPCa n'augmentait pas les EPEV de manière significative en comparaison avec le groupe PNP ( $0,37 \pm 0,15$  versus  $0,22 \pm 0,03$ ,  $p=0,33$ ). Les résultats sont représentés sur la figure 2.



**Figure 1:** évaluation de la perméabilité vasculaire *in vivo*. La perméabilité endothéliale évaluée par la fuite du marqueur vasculaire (Alb-In<sup>111</sup>) dans le compartiment alvéolaire mesurée par le rapport de la radioactivité dans l'aspirât sur la radioactivité dans le plasma (Asp/Plasma) (barres blanches) était augmentée dans le groupe PNP versus le groupe contrôle ( $0,28 \pm 0,08$  versus  $0,03 \pm 0,01$ ,  $p < 0,05$ ). L'accumulation du traceur protéique vasculaire dans l'espace extravasculaire pulmonaire (EPEV) (barres noires) était augmentée dans le groupe PNP versus le groupe contrôle. Les données sont représentées sous forme de la moyenne  $\pm$  l'écart type. \* :  $p < 0,05$  versus contrôle.

### 1.3) Evaluation de l'eau extravasculaire pulmonaire et des mouvements liquidiens pulmonaires

Le rapport M/S pulmonaire était significativement augmenté dans le groupe PNP comparé au groupe contrôle ( $4,62 \pm 0,31$  versus  $3,87 \pm 0,22$ ,  $p < 0,05$ ). L'administration concomitante de rhPCa tendait à augmenter le rapport M/S au cours de l'agression pulmonaire aiguë induite par *Pa* ( $5,80 \pm 0,66$ ,  $p = 0,07$ ). Les résultats sont rapportés sur le tableau II.

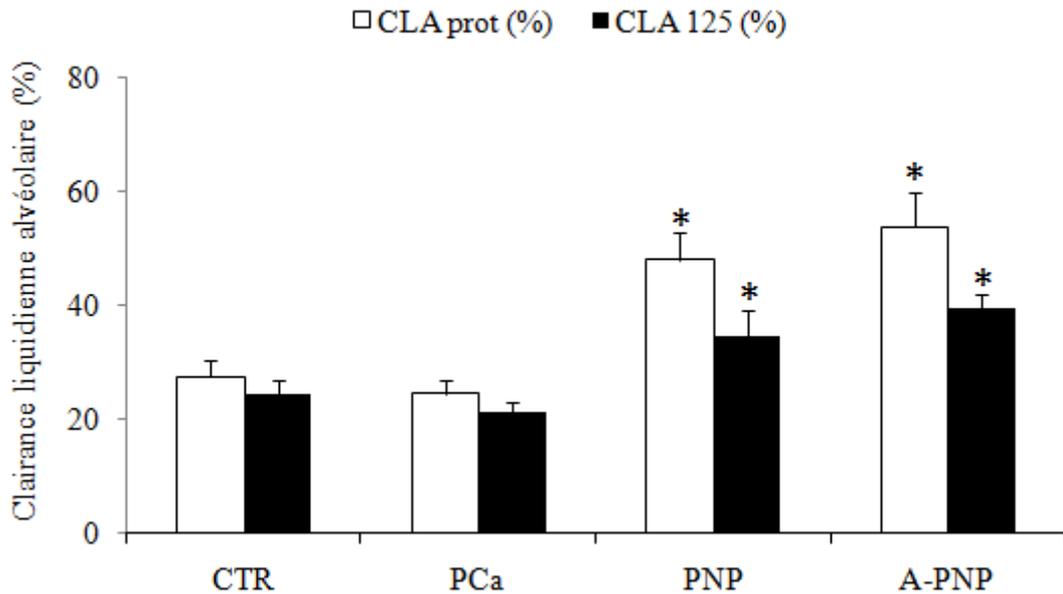
L'agression pulmonaire aiguë induite par *Pa* était associée à une augmentation de la clairance liquidienne pulmonaire en comparaison avec le groupe contrôle ( $33,3 \pm 2,6\%$  versus  $23,5 \pm 2,9\%$ ,  $p < 0,05$ ). L'administration de rhPCa diminuait de manière significative la CLP en comparaison avec le groupe PNP ( $9,1 \pm 4,3\%$  versus  $33,4 \pm 2,6\%$ ,  $p < 0,05$ ) (tableau II).

**Tableau II:** eau extravasculaire pulmonaire (rapport M/S) et clairance liquidienne pulmonaire (CLP) pour chaque groupe.

Groupes	Rapport M/S (g/g)	CLP (%)
CTR	$3,87 \pm 0,22$	$23,5 \pm 2,9$
PCa	$4,16 \pm 0,34$	$20,3 \pm 2,2$
PNP	$4,62 \pm 0,31^*$	$33,4 \pm 2,6^{**}$
A-PNP	$5,80 \pm 0,66^{**}$	$9,1 \pm 4,3^{**\circ}$

Données représentées sous forme de la moyenne  $\pm$  l'écart type. \* :  $p < 0,05$  versus contrôle. \*\* :  $p < 0,05$  versus contrôle. ° :  $p < 0,05$  versus contrôle.

La clairance liquidienne alvéolaire calculée à partir des protéines natives et des protéines radiomarquées était augmentée dans le groupe PNP en comparaison avec le groupe contrôle (respectivement,  $47,9 \pm 4,7\%$  versus  $27,4 \pm 2,8\%$  et  $34,6 \pm 4,5\%$  versus  $24,2 \pm 2,5\%$ ,  $p < 0,05$ ). L'administration de rhPCa ne modifiait pas ce paramètre (figure 2).



**Figure 2:** clairance liquidienne alvéolaire *in vivo*. La CLA était calculée à partir des changements de concentrations, exprimées en pourcentages, des protéines récupérées dans l'aspirât. La CLA était calculée à partir des protéines natives (CLA prot) (barres blanches) et elle était augmentée dans le groupe PNP et A-PNP versus les autres groupes ( $p < 0,05$ ). L'analyse à partir des résultats obtenus des protéines marquées à l'iode radioactif (Alb-I<sup>125</sup>) montrait des résultats similaires (CLA 125) (barres noires) ; les valeurs des groupes PNP et A-PNP différaient statistiquement en comparaison des 2 autres groupes. Données représentées sous forme de la moyenne  $\pm$  l'écart type. \* :  $p < 0,05$  versus contrôle.

#### 1.4) Effets de la rhPCa sur l'infiltration pulmonaire des PNN

La cellularité dans le liquide de LBA était significativement augmentée dans le groupe PNP en comparaison avec le groupe contrôle ( $9,2 \pm 3,5 \times 10^6$  cellules/mL versus  $1,7 \pm 0,7 \times 10^6$  cellules/mL,  $p < 0,05$ ). Cette valeur était augmentée dans le groupe A-PNP ( $38,1 \pm 4,4 \times 10^6$  cellules/mL,  $p < 0,05$ ).

Les macrophages alvéolaires représentaient plus de 90% des cellules dans le groupe contrôle et le groupe rhPCa. Pour les animaux pneumoniques, les PNN représentaient  $85,5 \pm 4,5\%$  des cellules. La rhPCa induisait une augmentation significative des PNN en comparaison avec le groupe PNP ( $95,7 \pm 1,3\%$ ,  $p < 0,05$ ).

### 1.5) Evaluation de la réponse inflammatoire

Dans le liquide de LBA, la concentration en TNF- $\alpha$  n'était pas détectable dans le groupe CTR et rhPCa. Les cytokines TNF- $\alpha$  et IL-6 étaient significativement augmentées dans les groupes PNP et A-PNP ( $p < 0,05$ ).

Dans le sérum, le TNF- $\alpha$  n'était pas détectable, même après l'instillation intratrachéale de *Pa*. L'administration de rhPCa induisait une augmentation significative des concentrations de TNF- $\alpha$  dans le sérum ( $p < 0,05$ ). Le profil évolutif était comparable pour l'IL-6, avec des concentrations obtenues dans le groupe A-PNP, significativement plus élevées que dans le groupe PNP ( $p < 0,05$ ). Les données sont rapportées dans le tableau III.

**Tableau III:** concentrations de TNF- $\alpha$  et IL-6 dans le sérum et le liquide de LBA pour chaque groupe

Groupes	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
	Sérum	LBA	Sérum	LBA
CTR	n.d.	n.d.	172 $\pm$ 18	84 $\pm$ 2
rhPCa	n.d.	n.d.	143 $\pm$ 17 §	90 $\pm$ 14
PNP	n.d.	957 $\pm$ 337 §°	225 $\pm$ 57 §	2706 $\pm$ 1720 §°
A-PNP	19 $\pm$ 14 §°*	1687 $\pm$ 180 §°*	471 $\pm$ 111 *°§	4452 $\pm$ 1283 §°

Données représentées sous forme de la moyenne  $\pm$  l'écart type. n.d. : non détectable. \* :  $p < 0,05$  versus PNP, § :  $p < 0,05$  versus CTR, ° :  $p < 0,05$  versus rhPCa.

### 1.6) Effets de la rhPCa sur les marqueurs de la coagulation

Dans le compartiment plasmatique, une diminution significative des leucocytes plasmatiques était observée dans les groupes inoculés par *Pa* en comparaison du groupe contrôle ( $p < 0,05$ ). Une diminution du compte plaquettaire était observée dans le groupe A-PNP.

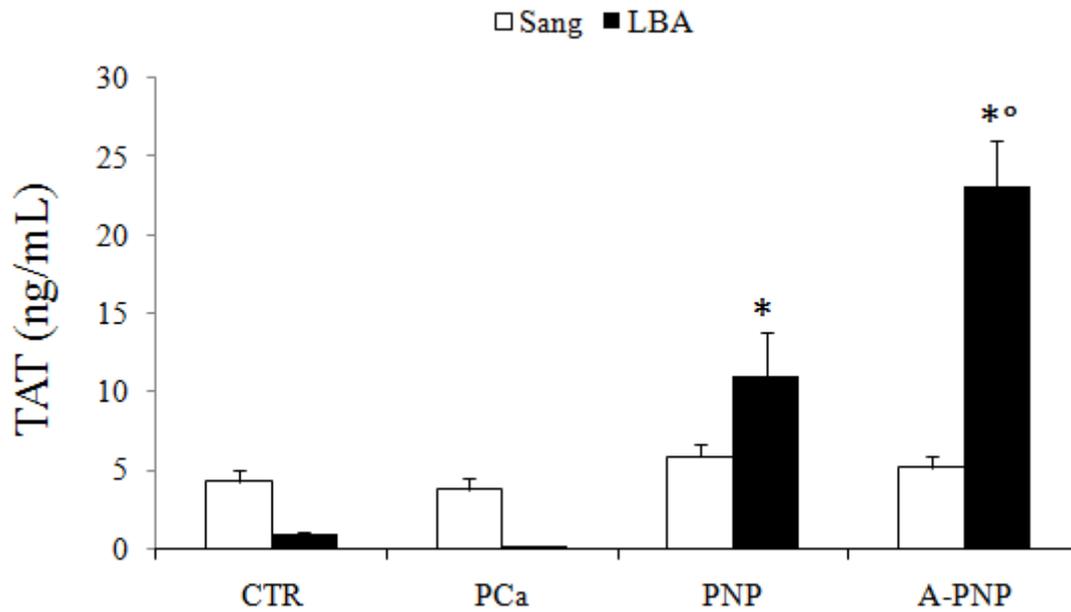
Les concentrations plasmatiques en fibrinogène étaient significativement augmentées dans le groupe PNP par rapport au groupe contrôle ( $p < 0,05$ ) avec une diminution significative observée dans les groupes rhPCa et A-PNP en comparaison avec le groupe contrôle ( $p < 0,05$ ). Les résultats sont représentés dans le tableau IV. Les dosages des complexes TAT plasmatiques étaient comparables entre les groupes (figure 3).

**Tableau IV:** paramètres standards de la coagulation pour chaque groupe

Groupes	GB ( $10^9/L$ )	Pqt ( $10^9/L$ )	TP (%)	Fibrinogène (g/L)
CTR	$6,69 \pm 0,76$	$793 \pm 59$	$52 \pm 3$	$2,38 \pm 0,13$
rhPCa	$5,10 \pm 0,91$	$580 \pm 53$ *	$43 \pm 2$	$1,93 \pm 0,11$
PNP	$3,63 \pm 0,65$ *	$850 \pm 14$ °	$52 \pm 1$	$3,22 \pm 0,36$ *°
A-PNP	$2,77 \pm 0,45$ *	$778 \pm 24$ °	$46 \pm 3$	$2,36 \pm 0,11$ §

GB : globules blancs. Pqt : plaquettes. TP : temps de prothrombine. Données représentées sous forme de la moyenne  $\pm$  l'écart type. \* :  $p < 0,05$  versus CTR, ° :  $p < 0,05$  versus PCa, § :  $p < 0,05$  versus PNP.

Dans le compartiment intraalvéolaire, l'analyse du liquide du LBA montrait une augmentation significative des complexes TAT dans le groupe PNP versus CTR ( $11,06 \pm 2,76$  ng/mL versus  $0,92 \pm 0,18$  ng/mL,  $p < 0,05$ ). De plus, les complexes TAT étaient significativement augmentés dans le groupe A-PNP versus le groupe PNP ( $23,17 \pm 2,89$  ng/mL versus  $11,06 \pm 2,76$  ng/mL,  $p < 0,05$ ). Les résultats sont représentés sur la figure 3.

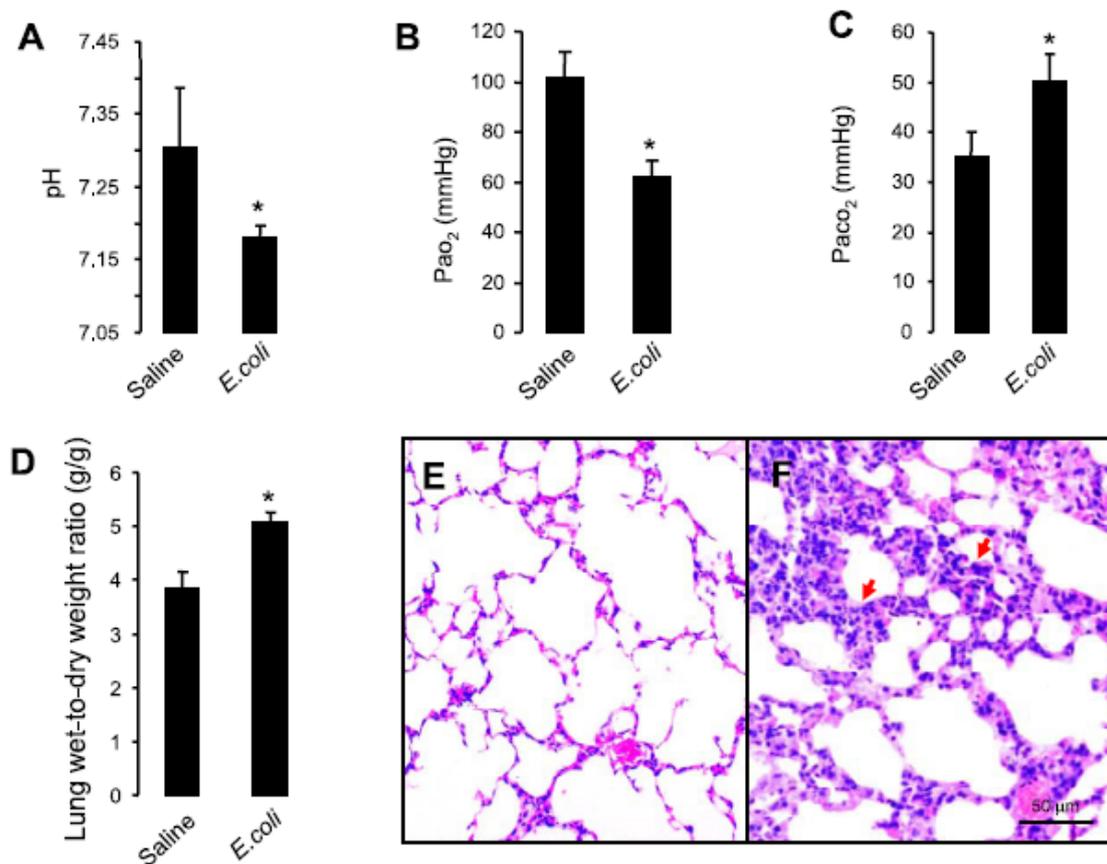


**Figure 3:** dosages des complexes TAT dans le sérum et le liquide de LBA. Aucune différence significative n'était mise en évidence pour les complexes TAT dans le sang (barres blanches). Les complexes TAT dans le LBA étaient significativement augmentés dans le groupe PNP comparé au CTR. L'administration de rhPCa au cours de l'agression pulmonaire aiguë induite par *Pa* augmentait les complexes TAT dans le LBA. Les données sont représentées sous forme de la moyenne  $\pm$  l'écart type. \* :  $p < 0,05$  versus CTR et PCa, ° :  $p < 0,05$  versus PNP.

2) Article 2: « *Protective effect of endogenous  $\beta$ -adrenergic tone on lung fluid balance in acute bacterial pneumonia in mice* »

2.1) Validation du modèle de pneumonie aiguë à *E. coli* :

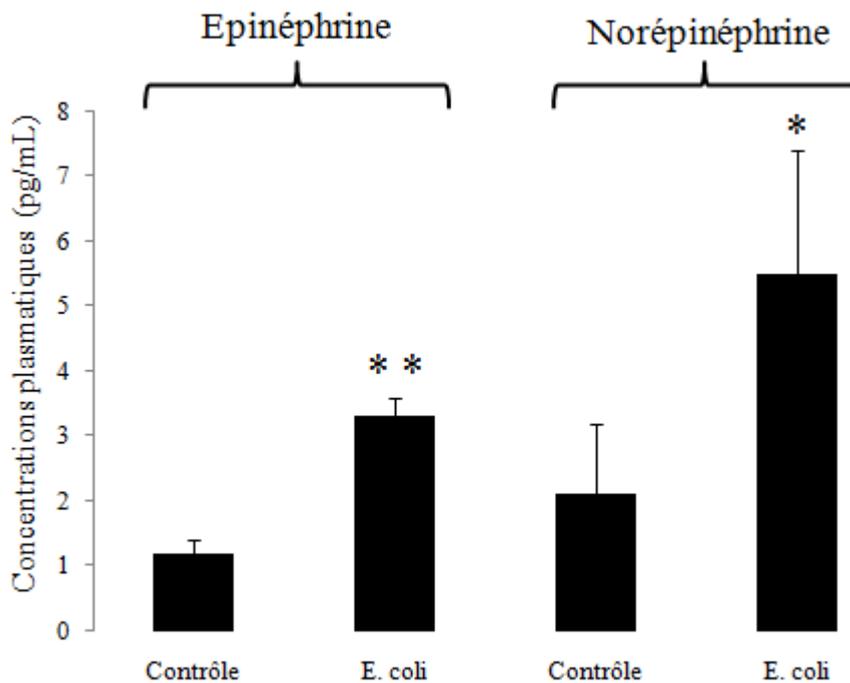
Sur le plan gazométrique, 4 heures après l'instillation intratrachéale d'*E.coli* les souris développaient une acidose respiratoire avec une hypoxémie et une hypercapnie (figure 1 A, B et C). L'eau extravasculaire pulmonaire augmentait de 30% par rapport aux animaux contrôles instillés par du SSI (figure 1 D). L'étude histologique pulmonaire objectivait 4 heures après l'instillation intratrachéale d'*E.coli* un œdème pulmonaire, une infiltration pulmonaire à PNN avec des zones hémorragiques, de congestion et de consolidation pulmonaire. Il n'y avait pas de changement histologique sur le groupe d'animaux contrôles (figure 1 E).



**Figure 1:** validation du modèle de pneumonie aiguë à *E. coli*. Gaz du sang artériels : pH (A),  $PaO_2$  (B) et  $PaCO_2$  (C). Eau extravasculaire pulmonaire (D). \* :  $p < 0,05$ . Histologie : groupe contrôle (E) et groupe d'animaux pneumoniques (F) : œdème alvéolaire et interstitiel avec infiltration par les PNN. Grossissement x 40, coupe de 50  $\mu$ m, n = 4 dans chaque groupe.

## 2.2) Concentrations plasmatiques de catécholamines

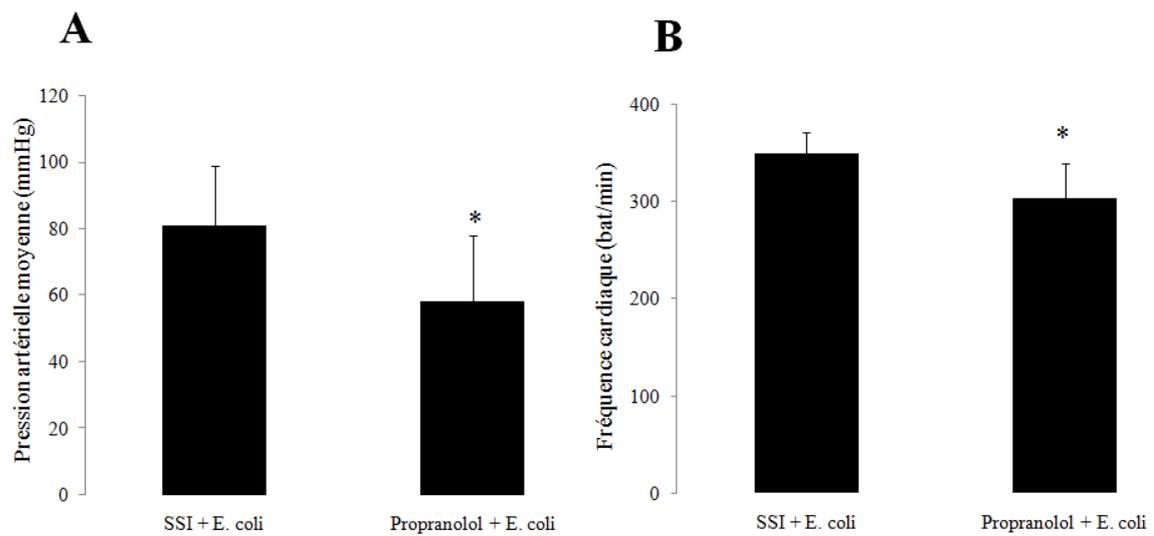
Quatre heures après l'instillation intratrachéale d'*E. coli*, les concentrations plasmatiques en épinéphrine et norépinéphrine étaient significativement augmentées en comparaison avec le groupe contrôle (respectivement  $3,3 \pm 0,4$  pg/mL versus  $1,2 \pm 0,2$  pg/mL et  $5,6 \pm 1,9$  pg/mL versus  $2,1 \pm 1,1$  pg/mL,  $p < 0,05$ ) (figure 2).



**Figure 2:** concentrations plasmatiques en catécholamines (épinéphrine et norépinephrine) 4 heures après l'instillation intratrachéale d'*E. coli*. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  versus contrôle.

## 2.3) Effets de l'inhibition du tonus $\beta$ -adrénergique sur les paramètres hémodynamiques

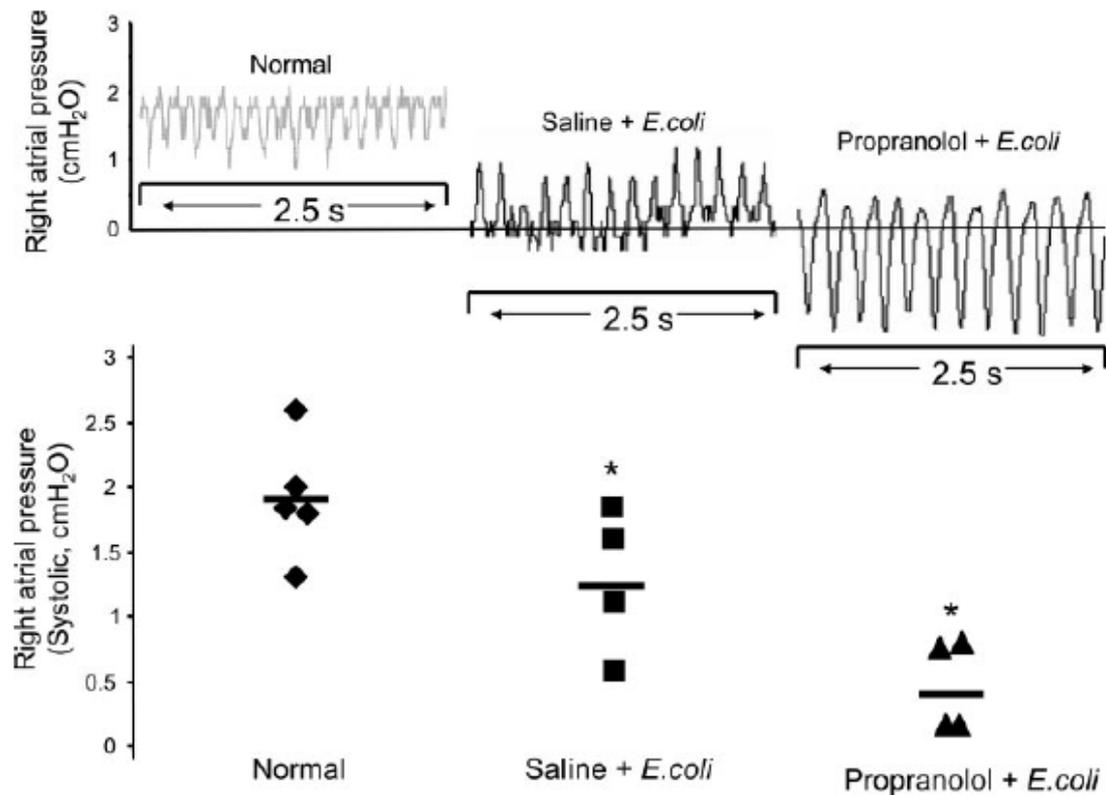
Afin d'évaluer l'effet pharmacologique de l'administration de propranolol, la pression artérielle sanguine et la fréquence cardiaque ont été mesurées 4 heures après l'administration intratrachéale d'*E. coli*. Dans le groupe ayant reçu le propranolol, la pression artérielle et la fréquence cardiaque étaient significativement diminuées en comparaison du groupe ayant reçu le SSI (figure 3 A et B).



**Figure 3:** effets de l'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène sur la pression artérielle moyenne (A) et la fréquence cardiaque (B). \* :  $p < 0,05$  versus SSI et *E. coli*.

#### 2.4) Effet de l'inhibition du tonus $\beta$ -adrénergique endogène sur la pression dans l'oreillette droite

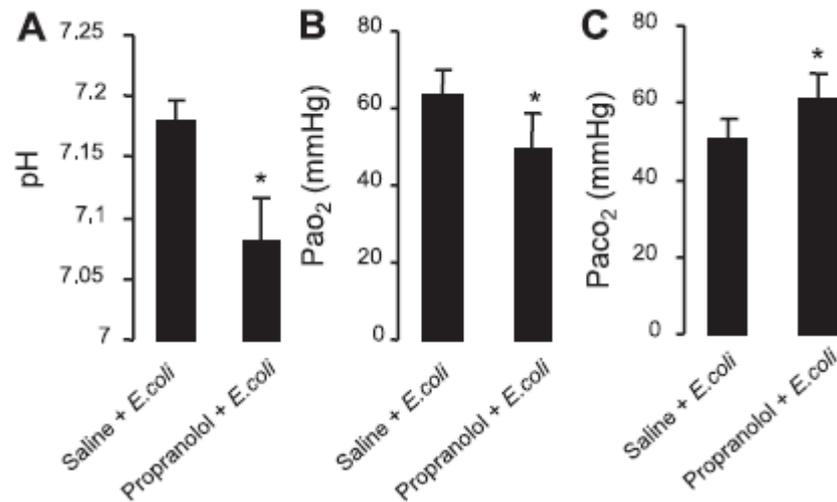
Dans le groupe contrôle, la pression moyenne dans l'oreillette droite était de  $1,9 \pm 0,5$  cm H<sub>2</sub>O. Dans le groupe d'animaux ayant reçu une instillation intra-trachéale d'*E. coli*, les pressions dans l'oreillette droite étaient en moyenne significativement diminuées par rapport au groupe contrôle. Dans le groupe traité par le propranolol, la moyenne des pressions dans l'oreillette droite était inférieure à 1 cm H<sub>2</sub>O (figure 4).



**Figure 4:** effets de l'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène sur les pressions dans l'oreillette droite au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli*. Les tracés des pressions dans l'oreillette droite sont représentés dans les différents groupes. Les données concernant les valeurs des pressions dans l'oreillette droite sont représentées dans le groupe contrôle (n=4), au cours de la pneumonie à *E. coli* (n=4) et dans le groupe *E. coli* et propranolol (n=4). \* p < 0,05.

#### 2.5) Effets de l'inhibition du tonus adrénérgique sur les gaz du sang artériels

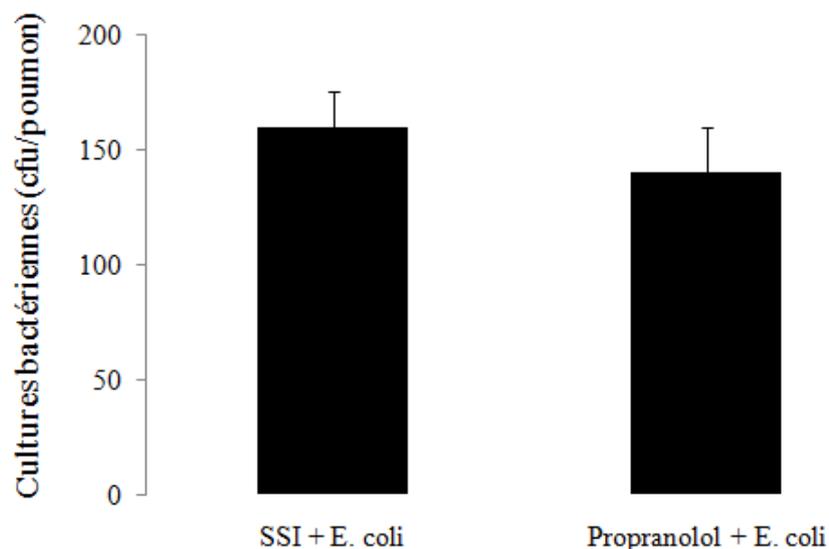
L'administration de propranolol au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli* majorait l'acidose, l'hypoxémie et l'hypercapnie artérielle (figure 5 A, B et C).



**Figure 5:** effets de l'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique sur les gaz du sang artériels au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli*. Ph (A), PaO<sub>2</sub> (B) et PaCO<sub>2</sub> (C). \*  $p < 0,05$  versus le groupe SSI et *E. coli*.

#### 2.6) Effets de l'inhibition du tonus $\beta$ -adrénergique endogène sur les cultures bactériennes pulmonaires d'*E. coli*

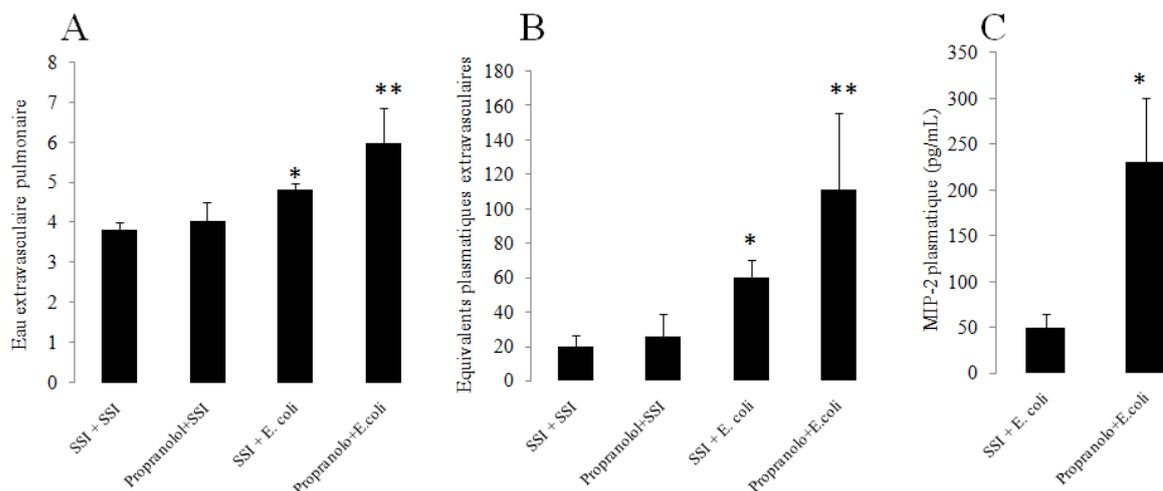
Les cultures bactériennes pulmonaires n'étaient pas significativement différentes entre le groupe ayant reçu le propranolol versus le groupe ayant reçu le SSI (figure 6).



**Figure 6:** effets de l'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène sur la croissance bactérienne d'*E. coli* dans le poumon entre les groupes SSI + *E. coli* et propranolol + *E. coli*. Aucune différence significative n'était mise en évidence.

2.7) Effets de l'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène sur l'eau extravasculaire pulmonaire, la perméabilité vasculaire pulmonaire et la réponse inflammatoire au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli*

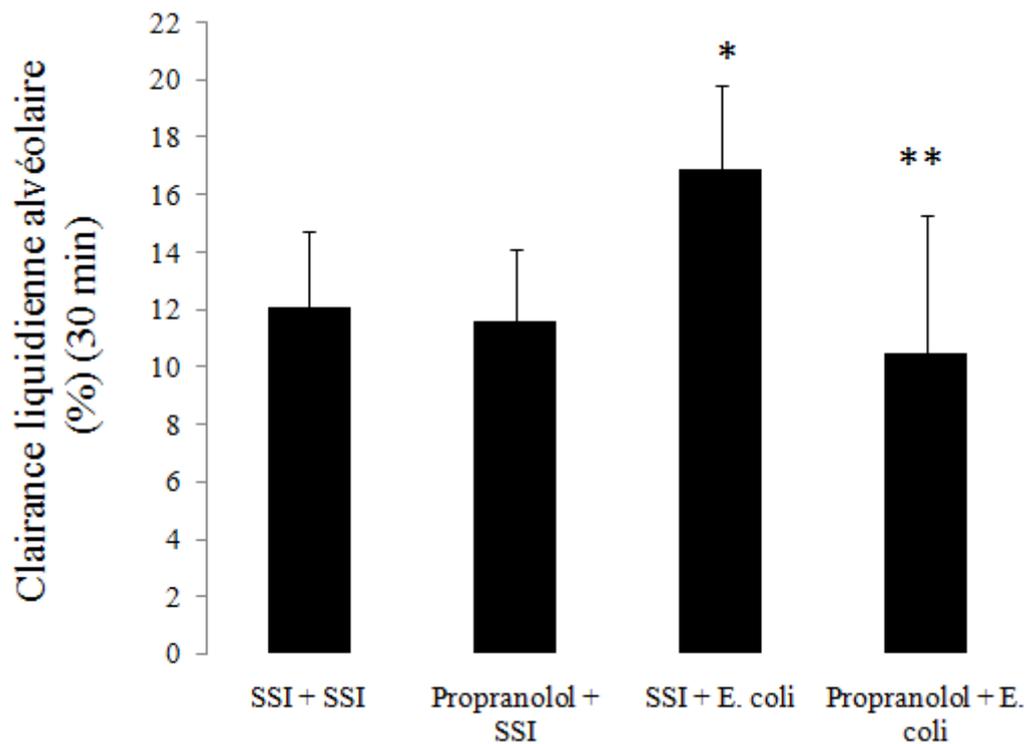
L'eau extravasculaire pulmonaire était significativement augmentée dans le groupe d'animaux pneumoniques en comparaison avec le groupe contrôle ( $4,8 \pm 0,16$  versus  $3,82 \pm 0,17$ ,  $p < 0,05$ ). L'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène par le propranolol augmentait significativement l'eau extravasculaire pulmonaire après instillation intratrachéale d'*E. coli* ( $5,96 \pm 0,88$  versus  $4,8 \pm 0,16$ ,  $p < 0,05$ ) (figure 7 A). La perméabilité vasculaire pulmonaire évaluée par les équivalents plasmatiques extravasculaires (EPEV) était augmentée dans le groupe pneumonique par rapport au groupe contrôle ( $60,3 \pm 10 \mu\text{L}$  versus  $20 \pm 6 \mu\text{L}$ ,  $p < 0,05$ ). L'administration de propranolol dans le groupe d'animaux pneumoniques augmentait de manière significative le trouble de perméabilité vasculaire en comparaison du groupe pneumonique avec l'administration de SSI ( $111 \pm 45 \mu\text{L}$  versus  $60,3 \pm 10 \mu\text{L}$ ,  $p < 0,05$ ) (figure 7 B). Nous avons évalué si l'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique modifiait la réponse inflammatoire. L'administration de propranolol au cours de la pneumonie à *E. coli* augmentait la concentration plasmatique en *macrophage inflammatory protein-2* (MIP-2) en comparaison du groupe pneumonique seul (figure 7 C).



**Figure 7:** effets de l'inhibition  $\beta$ -adrénergique endogène sur l'eau extravasculaire pulmonaire (A), la perméabilité vasculaire pulmonaire (équivalents plasmatiques extravasculaire, EPEV) (B), concentrations plasmatiques en MIP-2 au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli* (C). \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  versus SSI + SSI et propranolol + *E. coli*.

## 2.8) Effets de l'inhibition du tonus $\beta$ -adrénergique endogène sur la clairance liquidienne alvéolaire

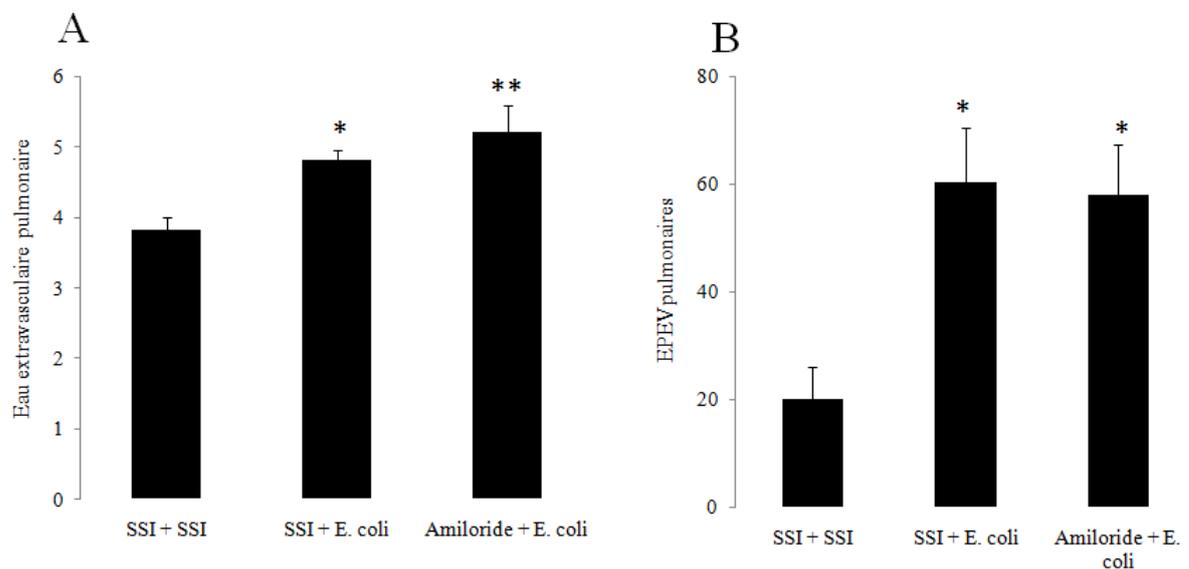
Dans le groupe d'animaux avec une pneumonie à *E. coli*, la clairance liquidienne alvéolaire présentait une augmentation modérée mais significative par rapport au groupe contrôle ( $16,9 \pm 2,8\%$  versus  $12,1 \pm 2,6\%$ ,  $p < 0,05$ ). L'administration de propranolol au cours de la pneumonie inhibait cette augmentation de la clairance liquidienne alvéolaire ( $10,5 \pm 4,8\%$  versus  $16,9 \pm 2,8\%$ ,  $p < 0,05$ ) (figure 8). Aucune différence significative n'était retrouvée entre le groupe propranolol + SSI versus le groupe contrôle (SSI + SSI).



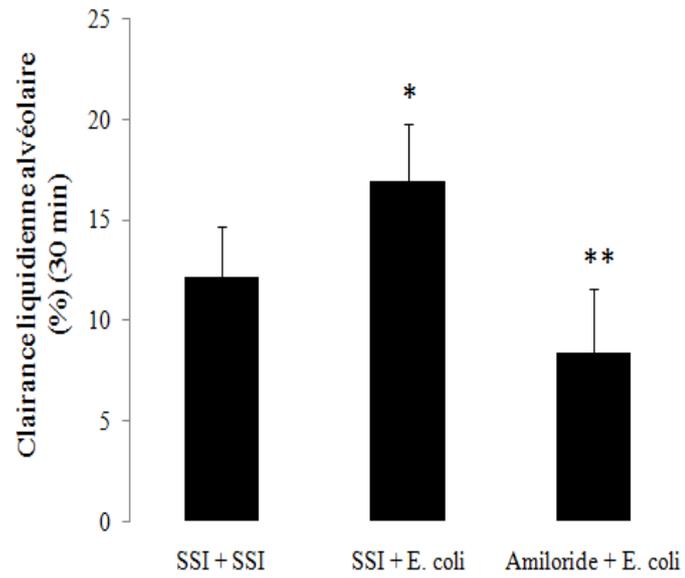
**Figure 8:** l'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène diminuait la clairance liquidienne alvéolaire au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli*. \* :  $p < 0,05$  versus SSI + SSI et SSI + propranolol. \*\* :  $p < 0,05$  versus SSI + *E. coli*.

2.9) Effets de l'inhibition du transport apical de sodium sur l'équilibre hydrique pulmonaire, la perméabilité vasculaire pulmonaire et la clairance liquidienne alvéolaire au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli*

L'eau extravasculaire pulmonaire dans le groupe d'animaux ayant reçu *E. coli* et l'amiloride était significativement augmentée par rapport au groupe ayant reçu *E. coli* et le SSI ( $5,2 \pm 0,38$  versus  $4,8 \pm 0,16$ ,  $p < 0,05$ ) (figure 9 A). Aucune différence significative n'était retrouvée sur la perméabilité vasculaire pulmonaire entre les deux groupes (figure 9 B). L'augmentation de la clairance liquidienne alvéolaire au cours de la pneumonie à *E. coli* était inhibée par l'amiloride (figure 10).



**Figure 9:** effets de l'inhibition du transport apical de sodium sur l'eau extravasculaire pulmonaire (A) et la perméabilité vasculaire pulmonaire (EPEV) (B). \* :  $p < 0,05$  versus SSI + SSI. \*\* :  $p < 0,05$  versus SSI + *E. coli*.



**Figure 10:** effets de l'inhibition du transport apical de sodium sur la clairance liquidienne alvéolaire au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli*. \* :  $p < 0,05$  versus SSI + SSI. \*\* :  $p < 0,05$  versus SSI + *E. coli*.

3) Effets de la stimulation exogène  $\beta_2$ -adrénergique au cours de la pneumopathie aiguë à *P. aeruginosa*

3.1) Effets de la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique sur la sécrétion plasmatique de catécholamines au cours de la pneumonie aiguë à *Pa*

Aucune différence significative n'était retrouvée pour les concentrations plasmatiques en épinéphrine et norépinéphrine, 4,5 heures après l'instillation intratrachéale de *Pa* dans le groupe ayant reçu la terbutaline et le groupe ayant reçu le SSI (tableau I).

**Tableau I:** concentrations en catécholamines plasmatiques (épinéphrine et norépinéphrine) mesurées sur des animaux pneumoniques 4 heures après l'instillation intratrachéale de SSI (n=5) ou de terbutaline (n=5). Aucune différence significative n'était mise en évidence.

	Groupe <i>Pa</i> + SSI	Groupe <i>Pa</i> + terbutaline
Epinéphrine ( $\mu\text{g/L}$ )	0,31 $\pm$ 0,24	0,39 $\pm$ 0,39
Norépinéphrine ( $\mu\text{g/L}$ )	0,34 $\pm$ 0,2	0,32 $\pm$ 0,09

Données représentées sous forme de la moyenne  $\pm$  l'écart type.

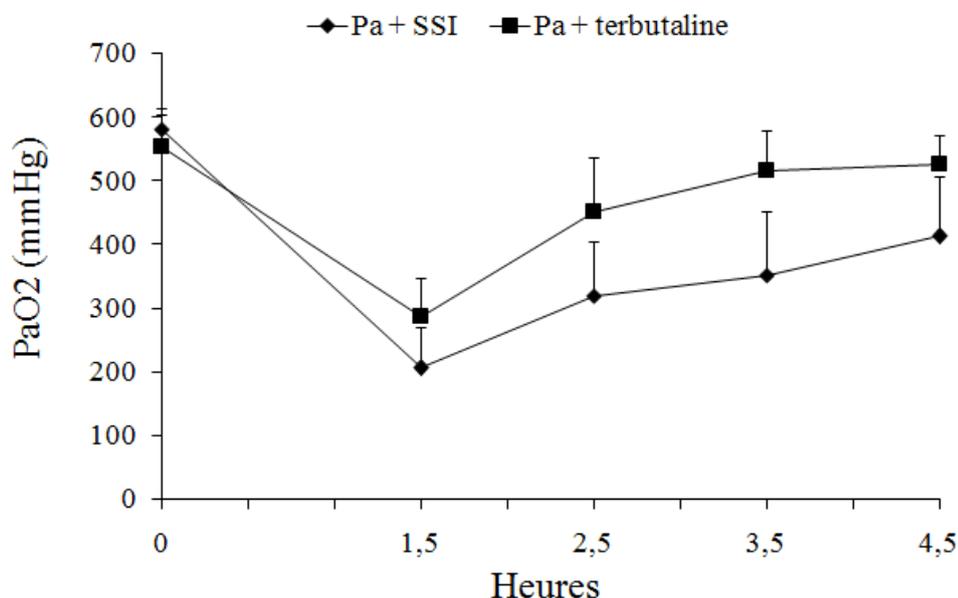
3.2) Effets de la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique exogène sur les paramètres hémodynamiques, les pressions des voies aériennes et l'oxygénation

Aucune différence significative n'était observée pour les pressions artérielles sanguines, les pressions des voies aériennes et les rapports  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  entre les différents groupes. Le rapport  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  4,5 heures après l'instillation de *Pa* tendait à augmenter dans le groupe terbutaline versus le groupe SSI mais sans significativité statistique, (respectivement  $526 \pm 45$  mm Hg versus  $417 \pm 95$  mm Hg,  $p=0.11$ ). Les données sont représentées sur le tableau II et la figure 1.

**Tableau II:** pression artérielle systolique (PAS), pression des voies aériennes (PVA) et rapport PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> en condition basale après une période de stabilisation de 30 minutes. Aucune différence significative n'était observée.

Groupes	PAS (mm Hg)	PVA (cm H <sub>2</sub> O)	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>
SSI + SSI	101 ± 24	3,7 ± 0,5	533 ± 62
Pa + SSI	98 ± 13	3,8 ± 0,6	551 ± 38
Pa + terbutaline	99 ± 20	4,2 ± 0,6	562 ± 79
Pa + terbutaline + propranolol	104 ± 18	3,6 ± 0,3	551 ± 24
Pa + propranolol	100 ± 10	4 ± 0,3	542 ± 62

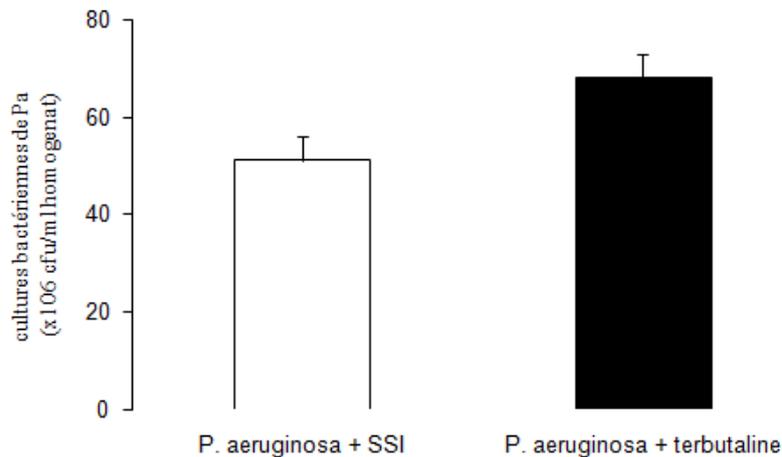
Données représentées sous forme de la moyenne ± l'écart type.



**Figure 1:** évolution de la PaO<sub>2</sub> au cours du temps dans le groupe Pa + terbutaline et Pa + SSI. A 4,5 heures, PaO<sub>2</sub> = 526 ± 45 mm Hg dans le groupe Pa + terbutaline versus 417 ± 95 mm Hg dans le groupe Pa + SSI, p = 0,11. Résultats représentés sous forme de la moyenne ± l'écart type.

### 2.3) Effets de la stimulation $\beta_2$ -adrénergique exogène sur la croissance bactérienne pulmonaire au cours de l'agression pulmonaire induite par *Pa*

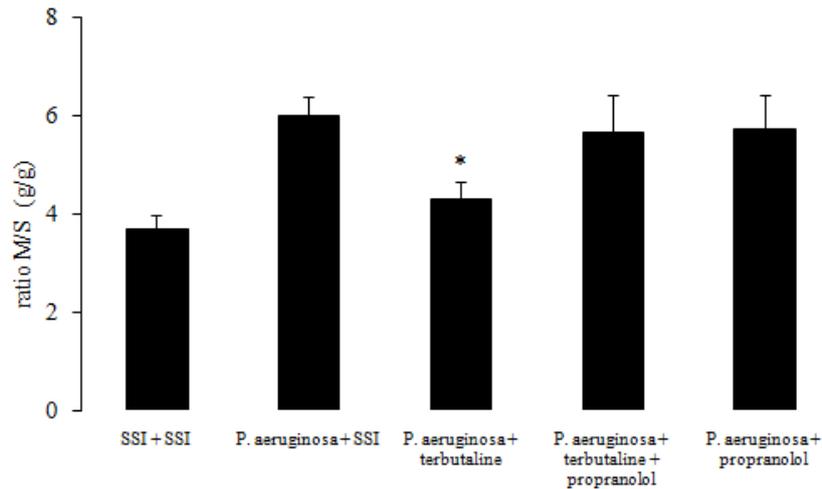
Aucune différence significative n'était mise en évidence sur les cultures bactériennes de l'homogénat pulmonaire entre le groupe *Pa* et terbutaline versus *Pa* et SSI (figure 2).



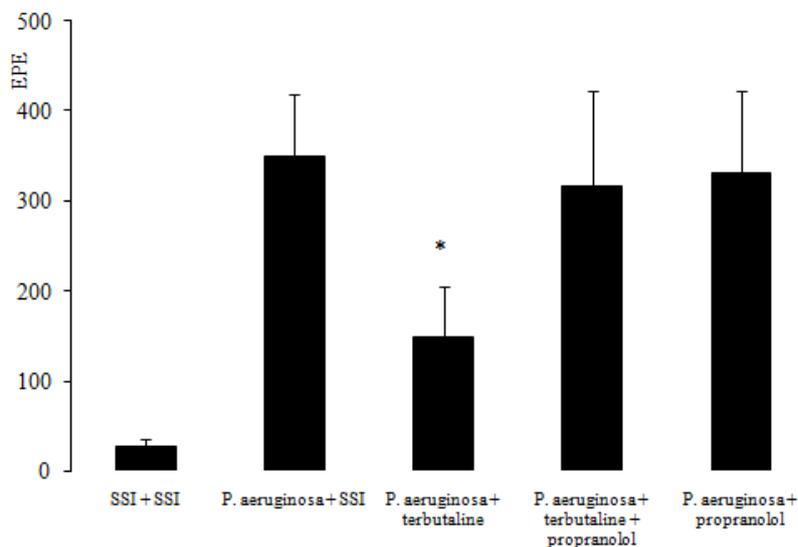
**Figure 2:** cultures bactériennes de l'homogénat pulmonaire dans le groupe *Pa* + terbutaline et *Pa* + SSI (n = 6 dans chaque groupe). Aucune différence significative n'était mise en évidence.

### 2.4) Effets de la stimulation $\beta_2$ -adrénergique exogène sur l'eau extravasculaire pulmonaire, la perméabilité vasculaire et épithéliale pulmonaire

La stimulation  $\beta_2$ -adrénergique induite par la terbutaline au cours de la pneumonie à *Pa* diminuait significativement l'eau extravasculaire en comparaison avec le groupe ayant reçu *Pa* et SSI (respectivement,  $4,31 \pm 0,36$  versus  $5,99 \pm 0,39$ ,  $p < 0,001$ ) (figure 3). La perméabilité vasculaire, évaluée par les EPEV diminuait à  $148 \pm 57 \mu\text{L}$  dans le groupe terbutaline versus  $349 \pm 70 \mu\text{L}$  dans le groupe SSI 4,5 heures après l'agression pulmonaire aiguë induite par *Pa*. L'administration de propranolol inhibait les effets de la terbutaline sur l'eau extravasculaire pulmonaire et la perméabilité vasculaire pulmonaire (figure 4). Aucune différence significative n'était mise en évidence pour la perméabilité épithéliale pulmonaire, évaluée par la mesure de la radioactivité sur le LBA.



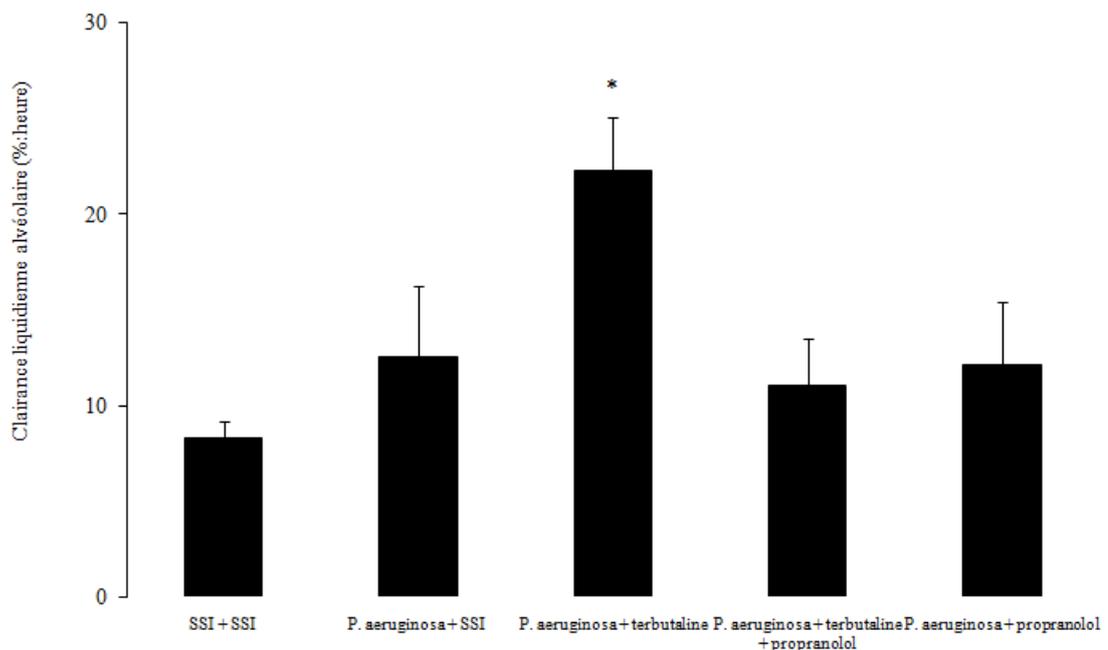
**Figure 3:** effets de la terbutaline sur l'eau extravasculaire pulmonaire au cours de l'agression pulmonaire aiguë induite par *Pa*. Le ratio M/S était significativement diminué dans le groupe *Pa* + terbutaline en comparaison avec les autres groupes. \*  $p < 0,05$  par rapport aux autres groupes.



**Figure 4:** effets de la terbutaline sur la perméabilité vasculaire pulmonaire par la mesure des équivalents plasmatiques extravasculaires (EPEV) au cours de l'agression pulmonaire aiguë induite par *Pa*. Les EPEV ( $\mu\text{L}$ ) étaient significativement diminués dans le groupe *Pa* + terbutaline en comparaison des autres groupes. \*  $p < 0,05$  par rapport aux autres groupes.

## 2.5) Effets de la stimulation $\beta_2$ -adrénergique exogène sur la clairance liquidienne alvéolaire *in situ*

La clairance liquidienne alvéolaire, *in situ*, de base dans le groupe contrôle était de  $8,3 \pm 0,9\%$ . La stimulation  $\beta_2$ -adrénergique exogène induite par la terbutaline au cours de la pneumonie à *Pa* augmentait significativement la clairance liquidienne alvéolaire de base en comparaison avec le groupe ayant reçu *Pa* et SSI, respectivement  $22,3 \pm 2,8\%$  versus  $12,5 \pm 3,7\%$ ,  $p < 0,001$ . L'administration de propranolol inhibait les effets de la terbutaline sur la clairance liquidienne alvéolaire de base (figure 5).



**Figure 5:** clairance liquidienne alvéolaire de base mesurée *in situ* au cours de l'agression pulmonaire aiguë induite par *Pa*. La clairance liquidienne alvéolaire (%/heure) était significativement augmentée dans le groupe *Pa* + terbutaline en comparaison des autres groupes. \*  $p < 0,05$  par rapport aux autres groupes.

# **DISCUSSION**

## A) Effets de la rhPCa au cours de l'agression pulmonaire aiguë induite par *Pa*

### 1) Rôle de la PCa au cours du sepsis et de l'agression pulmonaire aiguë

Le premier objectif de notre travail était d'évaluer l'administration de la rhPCa sur l'équilibre hydrique pulmonaire au cours de la phase précoce de l'agression pulmonaire induite par *Pa*. La rhPCa est un anticoagulant naturel qui possède des propriétés anti-inflammatoires notamment au cours de l'agression pulmonaire aiguë. La rhPCA a montré des effets bénéfiques sur différents modèles expérimentaux. Au cours de l'agression endothéliale induite par le LPS chez le rat, l'administration en prétraitement de la rhPCA prévenait le trouble de la perméabilité vasculaire pulmonaire indépendamment de son action anticoagulante et inhibait l'infiltration pulmonaire leucocytaire (107). La PCa prévenait également l'agression pulmonaire sur des modèles animaux de bactériémie (244). Sur un modèle ovin d'agression pulmonaire induite par l'inhalation de fumée et l'instillation intratrachéale de *P. aeruginosa*, l'administration intraveineuse de la rhPCA une heure après l'agression améliorait l'oxygénation (rapport PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> à 118 ± 20 mm Hg dans le groupe rhPCA versus 74 ± 7 mm Hg dans le groupe contrôle à la 24<sup>ème</sup> heure) et le shunt intrapulmonaire (QS/QT à 0,65 ± 0,08 dans le groupe contrôle versus 0,45 ± 0,02 dans le groupe rhPCA à la 24<sup>ème</sup> heure) (245).

La PCa est aussi le premier agent biologique ayant montré un bénéfice significatif sur la survie des patients présentant un sepsis. En effet, en 2001, une étude multicentrique évaluant l'administration de la rhPCa au cours du sepsis a été publiée (étude PROWESS) (152). Dans cette étude, 1690 patients ont été randomisés pour recevoir pendant quatre jours une perfusion de PCa ou de placebo. La réduction de la mortalité absolue au 28<sup>e</sup> jour était de 6,1% avec une réduction du risque relatif de décès de 19,4% dans la population traitée par rapport au groupe placebo. Bien que le protocole de l'étude ne fût pas conçu pour évaluer le rôle de la PCa au cours de l'agression pulmonaire aiguë, une analyse ultérieure a montré que dans le groupe de patients ayant une dysfonction respiratoire (77,6% des patients dans le groupe placebo, 73,3% des patients traités), beaucoup d'entre eux avaient une agression pulmonaire aiguë ou un SDRA (246). La durée de l'agression pulmonaire aiguë était plus courte dans le groupe de patients traités par PCa en comparaison avec le groupe placebo.

Une étude en double aveugle contre placebo a évalué la rhPCa sur un modèle humain d'inflammation pulmonaire induite par le LPS chez des volontaires sains. L'administration de rhPCa diminuait significativement l'infiltration pulmonaire des PNN et le chémotactisme des PNN (247). Les effets de la rhPCa sur la fonction des PNN représentent le mécanisme potentiel par lequel la rhPCa améliore les patients au cours du sepsis. Cependant, les effets favorables de la PCa n'ont pas été retrouvés dans une étude récente évaluant l'administration de la PCa au cours d'une agression pulmonaire isolée. En effet, Matthay et al ont rapporté une étude contrôlée contre placebo pour évaluer l'administration de la PCa chez 75 patients après exclusion de ceux présentant un sepsis et un score de gravité (APACHE II) supérieur à 25. L'administration de PCa augmentait les concentrations plasmatiques de PC, diminuait l'espace mort pulmonaire mais ne modifiait pas le pronostic des patients (248).

Dans notre travail, nous avons montré que l'administration de la rhPCa aggravait l'oxygénation au cours la pneumonie aiguë à *Pa*. Sur un modèle porcin d'agression pulmonaire induite par l'injection intraveineuse d'acide oléique, Richard et al ont montré que le prétraitement par la rhPCa pouvait également aggraver l'oxygénation (249). Dans cette étude, les rapports ventilation-perfusion étaient mesurés par tomographie par émission de positrons. Leurs résultats étaient similaires aux nôtres avec une aggravation de l'oxygénation (le rapport  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  était à  $303 \pm 171$  mm Hg à la fin de l'expérimentation dans le groupe rhPCA versus  $547 \pm 54$  mm Hg dans le groupe placebo) avec une augmentation de la sécrétion plasmatique d'IL-6 et 8 dans le groupe rhPCA. L'aggravation des échanges gazeux était associée à une modification des rapports ventilation-perfusion avec une augmentation de la perfusion dans les zones pulmonaires œdémateuses et hémorragiques. L'administration de la PCa ne semble pas modifier l'œdème pulmonaire au cours de l'agression pulmonaire aiguë (245). Maybaeuer et al sur leur modèle d'inhalation de fumée et de sepsis n'ont pas mis en évidence de diminution de l'œdème pulmonaire après l'administration de rhPCa malgré l'amélioration observée sur les échanges gazeux. Leur travail a montré que l'amélioration de l'oxygénation était liée au modèle expérimental, en rapport avec une réduction sur le plan histologique de l'obstruction des voies aériennes par les moules bronchiques et une amélioration des rapports ventilation-perfusion plus que par des modifications de la coagulation ou de l'inflammation intraalvéolaire induite par la rhPCa.

Dans notre travail, l'administration de la rhPCa tendait à augmenter l'eau extravasculaire pulmonaire au cours de la pneumonie aiguë à *Pa*. Murakami et al avaient montré que le prétraitement par la PCa pouvait réduire la perméabilité vasculaire et améliorer les lésions histologiques sur un modèle d'agression pulmonaire induite par l'injection intraveineuse de LPS (112). Ces effets étaient liés à l'inhibition de l'infiltration pulmonaire par les PNN. Dans notre travail, l'agression pulmonaire aiguë était très différente de celle de l'étude de Murakami. Dans notre modèle, l'agression pulmonaire était induite par des bactéries vivantes et pas seulement par un composant des bactéries ; de nombreux facteurs de virulence (comme les exotoxines) sont sécrétés par *Pa* et peuvent expliquer la sévérité de l'agression pulmonaire observée dans notre étude. Par ailleurs, dans l'étude de Murakami, l'agression pulmonaire impliquait le versant endothélial de la barrière alvéolo-capillaire alors que notre modèle implique les deux versants. Ensuite, nous avons utilisé la PCa non pas en prétraitement mais de façon concomitante à l'infection bactérienne. Notre travail soulève l'hypothèse suivante : la PCa administrée au stade très précoce de l'agression pulmonaire aiguë peut modifier l'équilibre complexe de la coagulation-fibrinolyse intraalvéolaire et perturber l'effet bénéfique initial qui vise à limiter le trouble de perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire. La déposition locale de fibrine constitue en effet un mécanisme fondamental pour le poumon de limiter le risque de dissémination de l'agression ou de l'infection dans la circulation sanguine. Les effets de la PCa peuvent ainsi dépendre du moment de son administration par rapport à l'agression pulmonaire aiguë. Cependant, la stratégie de l'administration précoce de la rhPCA était indiquée dans notre étude afin de renforcer le paradigme clinique visant à administrer un traitement efficace dès que possible. Cette hypothèse peut être supportée par les résultats d'une autre étude issue de notre laboratoire. En effet, en utilisant le même modèle de pneumonie aiguë à *Pa* chez le rat, l'inhibition précoce de la formation de thrombine par l'antithrombine recombinante aggravait la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire et les lésions morphologiques pulmonaires (102). Ainsi, la modulation thérapeutique de la coagulation ou de la fibrinolyse intraalvéolaire au cours de la phase précoce de l'agression pulmonaire peut être considérée à risque d'aggravation. Au stade tardif de l'agression pulmonaire aiguë, l'administration de la rhPCA pourrait rétablir la fibrinolyse et atténuer l'intensité de la réponse inflammatoire.

## 2) Influence de la PCa sur l'équilibre hydrique pulmonaire

Dans notre travail, la rhPCa réduisait la clairance liquidienne pulmonaire au cours de l'agression pulmonaire aiguë induite par *Pa*. La résorption de l'œdème pulmonaire fait intervenir deux voies principales : vasculaire et lymphatique. La perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire était altérée à la fois dans le groupe PNP et le groupe A-PNP. Le rapport du poids du poumon mouillé sur sec est le résultat de la combinaison de la clairance liquidienne alvéolaire et liquidienne. Dans le groupe pneumonique, la balance hydrique pouvait limiter l'augmentation de l'œdème pulmonaire et ainsi préserver l'oxygénation. Dans le groupe A-PNP, l'altération de la barrière alvéolo-capillaire est probablement responsable de l'augmentation de la clairance liquidienne pulmonaire, avec pour conséquence l'augmentation de l'œdème pulmonaire et l'altération des échanges gazeux. Nos résultats sont en concordance avec d'autres études qui ont montré que l'épithélium alvéolaire est bien plus résistant que l'endothélium vasculaire pulmonaire à l'agression pulmonaire aiguë (19, 250). Nous avons préalablement montré dans un autre modèle expérimental que ces discordances entre la clairance liquidienne alvéolaire et pulmonaire pouvaient être en relation avec la perméabilité de la barrière endothéliale (251). Dans notre travail, l'augmentation de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire dans le groupe A-PNP peut dépasser les capacités de transport alvéolaire à l'origine d'une inondation alvéolaire.

La clairance liquidienne alvéolaire est préservée dans notre travail. Quatre heures après l'instillation intratrachéale de bactéries, la clairance liquidienne alvéolaire était significativement augmentée comparativement au groupe contrôle. Nous avons observé une augmentation de 27% à 48%. Dans un modèle murin comparable, Rezaigui et al ont mis en évidence une augmentation de la clairance liquidienne alvéolaire de 30% à 45% (215). Dans cette étude, l'augmentation de la clairance liquidienne alvéolaire était en rapport avec un mécanisme dépendant du TNF- $\alpha$ . Elle était inhibée par l'amiloride et non influencée par le propranolol. L'administration d'un anticorps anti-TNF- $\alpha$  prévenait l'augmentation de la résorption et celle-ci était reproduite par l'instillation intratrachéale seule du TNF- $\alpha$ . Dans notre étude, nous avons mis en évidence une augmentation du TNF- $\alpha$  dans le liquide du LBA au cours de l'agression pulmonaire induite par *Pa* pouvant expliquer l'augmentation de la clairance liquidienne alvéolaire.

### 3) Interactions entre l'inflammation et la coagulation

Nous avons observé dans notre travail une augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le liquide de LBA dans le groupe PNP comparé au groupe d'animaux contrôles alors que ces cytokines n'étaient quasiment pas détectables dans le sang. Dans le groupe PNP, la sécrétion des cytokines TNF- $\alpha$  et d'IL-6 est essentiellement locale dans l'espace alvéolaire car les concentrations plasmatiques sont inférieures aux concentrations dans le compartiment alvéolaire. Dans le groupe A-PNP, nous avons observé une augmentation significative de la libération des cytokines dans le compartiment sanguin en comparaison du groupe contrôle et PNP suggérant une décompartimentalisation de la réponse inflammatoire avec libération de médiateurs inflammatoires dans le compartiment systémique. Richard et al ont trouvé des résultats similaires avec une augmentation plasmatique du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 après l'administration de la PCa (249).

L'administration de la rhPCa au cours de l'agression pulmonaire aiguë conduit à une augmentation des complexes TAT dans le liquide du LBA, alors que les concentrations plasmatiques n'étaient pas significativement différentes. La PCa est un inhibiteur du facteur Va et VIIIa et régule la formation de thrombine. Dans notre modèle, l'augmentation des TAT dans le LBA peut être le témoin indirect d'une augmentation de la perméabilité alvéolo-capillaire induite par la PCa, conduisant à l'accumulation de complexes TAT dans le compartiment alvéolaire. Cependant, ce mécanisme est peu probable du fait de l'absence d'augmentation des complexes TAT dans le compartiment vasculaire. L'épithélium alvéolaire a la capacité de générer de la thrombine indépendamment d'une activation de la coagulation. Les macrophages alvéolaires sont capables d'exprimer le FT et de synthétiser le facteur V qui peut favoriser la formation de thrombine via le complexe prothrombinase (252). Ainsi l'épithélium alvéolaire a ses propriétés procoagulantes propres. Les cellules épithéliales expriment des glycosaminoglycanes à leurs surfaces cellulaires capables de lier l'AT plasmatique et conduire à la génération de TAT dans le liquide alvéolaire (253). Cependant, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'augmentation des complexes TAT dans le compartiment alvéolaire observée dans notre étude après l'administration de rhPCa soit secondaire à la perturbation de l'équilibre pro et anticoagulant au niveau alvéolaire.

Durant les premières 72 heures du SDRA, l'activité procoagulante est maximale et l'activité antifibrinolytique est diminuée ; ensuite entre le 4<sup>e</sup> et le 15<sup>e</sup> jour l'inhibition de la fibrinolyse persiste alors que l'activité procoagulante est modérément augmentée. Dans ces conditions, l'inhibition de la déposition de fibrine apparait comme une approche thérapeutique intéressante. Cependant, notre travail suggère la possibilité d'induire des effets néfastes lors de l'augmentation de la fibrinolyse et l'inhibition de la coagulation intraalvéolaire au stade précoce du SDRA. L'inhibition précoce de la formation de thrombine par la PCa pourrait ainsi empêcher le « collematage » naturel de la fuite capillaire alvéolaire induite par l'agression bactérienne.

Ce travail a plusieurs limitations. Tout d'abord, des limitations liées au modèle, nous avons utilisé une agression pulmonaire aiguë très précoce alors que les patients en pratique clinique sont vus plus tardivement. Par ailleurs, nous avons utilisé de la PCa recombinante humaine sur un modèle murin, avec des différences d'espèces et de doses possibles. Ensuite, nous avons utilisé la PCa de façon concomitante à l'infection, ce qui est toujours préférable à l'administration en prétraitement mais qui reste très éloigné de la pratique clinique.

#### B) Implication du tonus adrénergique sur l'équilibre hydrique pulmonaire au cours de l'agression pulmonaire aiguë infectieuse

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons évalué une autre stratégie pharmacologique visant à évaluer le tonus  $\beta$ -adrénergique sur l'équilibre hydrique pulmonaire sur un modèle de pneumonie aiguë. Différentes études expérimentales ont montré que les catécholamines pouvaient augmenter les capacités de résorption de l'œdème pulmonaire par l'épithélium alvéolaire au cours du choc septique, du choc hémorragique et au cours de l'agression pulmonaire aiguë d'origine neurogénique (183, 208, 254). Cependant les effets des catécholamines endogènes au cours d'une pneumonie aiguë bactérienne n'avaient pas été caractérisés. Une étude récente avait montré que la pneumopathie à virus influenza pouvait inhiber le transport actif de sodium dépendant du canal ENaC *in vitro* sur des cultures cellulaires épithéliales de type II et aussi *in vivo* avec une diminution de la clairance liquidienne alvéolaire (255).

Les catécholamines endogènes peuvent également avoir un effet favorable sur la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire, notamment au cours de l'état de choc hémorragique (207).

Ainsi dans la première partie de ce travail, nous avons validé un modèle de pneumopathie aiguë à *E. coli* afin d'évaluer le rôle du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène sur l'équilibre hydrique pulmonaire. L'instillation intratrachéale d'*E. coli* induisait à 4 heures une pneumonie sévère qui était confirmée sur le plan histologique par un œdème alvéolaire et interstitiel associé à une infiltration pulmonaire par les cellules inflammatoires. Cet aspect histologique était associé à une augmentation de l'eau extravasculaire pulmonaire et à une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire. Les gaz du sang objectivaient une insuffisance respiratoire aiguë avec une acidose, une hypoxémie et une hypercapnie. L'ensemble de ces données permettait de valider notre modèle de pneumopathie infectieuse aiguë à *E. coli*.

L'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène par le propranolol aggravait les échanges gazeux et augmentait l'eau extravasculaire pulmonaire des animaux présentant une pneumonie aiguë à *E. coli*. La fréquence cardiaque et la pression artérielle étaient diminuées après l'administration de propranolol confirmant ainsi son activité pharmacologique. Après l'administration de propranolol, le trouble de la perméabilité vasculaire pulmonaire était augmenté au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli*. Une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire avait déjà été rapportée au cours du choc hémorragique du fait d'une augmentation de la réponse inflammatoire faisant intervenir l'activation de NF $\kappa$ B et la sécrétion de cytokines (256). Le fait que la stimulation  $\beta$ -adrénergique puisse améliorer la perméabilité endothéliale pulmonaire a été évaluée sur différents modèles expérimentaux et une étude a été réalisée chez l'homme. Sur un modèle expérimental d'ischémie reperfusion de poumons isolés de lapin, l'administration d'isoprotérénol ( $10^{-5}$  M), d'adényl cyclase et d'AMPc atténuait l'augmentation de la perméabilité endothéliale (257). L'isoproténérol ( $10^{-3}$  M) réduisait la perméabilité basale à l'albumine et prévenait l'augmentation de perméabilité induite par la thrombine *in vitro* sur des cultures de cellules endothéliales d'artères pulmonaires (258). La stimulation  $\beta$ -adrénergique peut améliorer la perméabilité endothéliale pulmonaire en modifiant les phénomènes de contractions cellulaires endothéliales et en réduisant les espaces intercellulaires (259, 260).

Liu et al ont en effet démontré que la protéine kinase A (PKA), impliquée dans la transmission de l'activité des récepteurs dépendants du système adényl cyclase-AMPC intervenait dans la régulation de la barrière endothéliale. *In vitro*, sur des cultures de cellules endothéliales, l'inhibition de la PKA induisait un réarrangement du cytosquelette avec la formation de fibres de stress d'actine impliquées dans la motilité cellulaire et l'augmentation des espaces intercellulaires au niveau de l'endothélium. Les auteurs ont montré que cette inhibition de la PKA induisant la formation de fibres de stress et la contraction cellulaire passait par l'activation de la voie de signalisation des protéines kinases activées par des signaux extracellulaires (ERK : *extracellular signal related kinase*) et par son activateur en amont, raf 1. Ainsi, des interactions existent donc entre l'AMPC et la voie de signalisation ERK pour l'organisation du cytosquelette des cellules endothéliales et la régulation de la barrière. Une étude évaluant la perméabilité vasculaire pulmonaire a été réalisée chez l'homme en mesurant l'extravasation pulmonaire d'un traceur radioactif plasmatique (protéines marquées à la transferrine radioactive). Chez 10 patients présentant un SDRA, l'administration de terbutaline sur 30 minutes par voie intraveineuse réduisait la perméabilité vasculaire pulmonaire chez 6 patients (261). Dans notre travail, l'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène augmentait le trouble de perméabilité endothéliale pulmonaire et aggravait l'œdème pulmonaire. Par ailleurs, les catécholamines peuvent moduler l'expression de cytokines pro-inflammatoires. La production de TNF- $\alpha$  induite par la stimulation des macrophages par le LPS bactérien était augmentée par les agonistes  $\alpha$ -adrénergiques (262). La stimulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques diminuait la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 *in vitro*, sur des cultures de macrophages humains (263) et diminuait l'inflammation pulmonaire induite par le LPS (264). Chez des volontaires sains, le prétraitement par l'adrénaline réduisait l'augmentation de la sécrétion sérique de TNF- $\alpha$  induite par le LPS (265). A l'inverse, le prétraitement par adrénaline augmentait les taux circulants de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 chez des volontaires sains ayant reçu une perfusion d'endotoxine. Enfin, toujours chez des volontaires sains, l'inhalation de salmétérol suivie d'une inhalation de LPS bactérien exerçait des effets anti-inflammatoires locaux avec inhibition de l'infiltration pulmonaire par les PNN, et de leurs dégranulations, diminution de la sécrétion intraalvéolaire de TNF- $\alpha$  et de l'expression HLA-DR sur les macrophages alvéolaires (264).

La modulation de la réponse inflammatoire par les catécholamines fait intervenir la voie d'activation du NFkB et d'un facteur régulateur de la transcription, l'élément protéique de liaison à l'AMPC, le CREB (*cAMP response element binding protein*). Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont couplés par l'intermédiaire de la protéine G, à l'adényl cyclase, qui stimule la production d'AMPC et l'activation de la PKA qui conduit à la phosphorylation de CREB et l'activation du NFkB (266). Dans notre travail, nous avons mis en évidence une augmentation des concentrations plasmatiques de MIP-2 dans le groupe traité par le propranolol suggérant une augmentation de la réponse inflammatoire lors de l'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène.

Dans notre étude, l'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène diminuait la clairance liquidienne alvéolaire. Ces résultats montrent que les catécholamines endogènes à la phase initiale de la pneumonie à *E. coli* peuvent induire un effet protecteur visant à réduire la formation de l'œdème pulmonaire. Dans notre travail, nous avons observé une augmentation plasmatique des catécholamines endogènes au cours de la pneumonie aiguë en comparaison des animaux contrôles. La norépinéphrine est une catécholamine non sélective ayant des effets  $\alpha$ -adrénergiques prédominants mais aussi  $\beta$ -adrénergiques (267). L'administration de norépinéphrine sur des poumons de fœtus de moutons et de nouveaux nés de cobayes diminuait la production de liquide pulmonaire via l'activation des récepteurs  $\alpha$ -adrénergiques (268, 269). Ces données ont été confirmées sur un modèle animal murin. La norépinéphrine augmentait la résorption de liquide alvéolaire via l'activation des récepteurs  $\alpha_1$  et  $\beta$ -adrénergiques et non par les récepteurs  $\alpha_2$ -adrénergiques. *In vitro*, sur des cultures de cellules alvéolaires de type II, ces effets étaient secondaires à une stimulation de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase au pôle basolatéral des cellules (270). La stimulation  $\beta_1$ -adrénergique pouvait également augmenter la clairance liquidienne alvéolaire sur des cobayes anesthésiés et ventilés (271). La dénopamine, un agoniste sélectif des récepteurs  $\beta_1$ -adrénergiques pouvait augmenter la clairance liquidienne alvéolaire de façon dose dépendante *ex vivo* sur des poumons de rats et de cobayes. Cette stimulation de clairance survenait sans augmentation de l'AMPC suggérant un effet indépendant de l'AMPC (272) mais faisant intervenir le canal CFTR (273). La stimulation  $\beta_1$ -adrénergique inhibait également la réponse de l'épithélium alvéolaire pour la clairance liquidienne à des concentrations élevées de terbutaline ( $10^{-3}$  M) sur un modèle *ex vivo* de poumons chez le rat (274).

Quant aux  $\beta_2$ -agonistes, ils stimulent la clairance liquidienne alvéolaire en augmentant le transport transépithélial de sodium et le transport de chlore. L'augmentation d'AMPc intracellulaire conduit à une augmentation du transport de sodium par une stimulation de l'expression (186) et de l'activité du canal ENaC sur les cellules épithéliales de type II (275). La phosphorylation de la sous unité  $\alpha$  de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP est augmentée ainsi que la probabilité d'ouverture du canal ENaC. De plus, une augmentation du transport du canal à la membrane apicale et de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase au pôle basolatéral a été mise en évidence. Les  $\beta_2$ -agonistes augmentent l'activité du CFTR (276), son expression sur les cellules épithéliales des voies aériennes (277) et le courant de chlore par le CFTR par un mécanisme dépendant de l'AMPc (192). La stimulation  $\beta$ -adrénergique de la clairance liquidienne alvéolaire peut être inhibée par un antagoniste spécifique  $\beta_2$ -adrénergique suggérant que la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique est le mécanisme prédominant régulant cette activité (278).

Sur des modèles expérimentaux de choc septique et d'état de choc hémorragique de courte durée, la clairance liquidienne alvéolaire pouvait être stimulée par les catécholamines. Cet effet était associé à une augmentation marquée de la concentration plasmatique en épinephrine endogène ( $10^{-8}$  M) et la stimulation de clairance pouvait être inhibée par un antagoniste  $\beta$ -adrénergique (183, 207). A l'inverse, au cours de l'état de choc hémorragique expérimental prolongé la clairance alvéolaire dépendante de l'AMPc était inhibée (279). Cet effet impliquait les PNN et faisait intervenir des radicaux libres de l'oxygène et de l'azote. Les  $\beta_2$ -agonistes peuvent stimuler la clairance liquidienne alvéolaire dans d'autres modèles expérimentaux : l'œdème pulmonaire hydrostatique (228), l'agression pulmonaire induite par l'hyperoxie (280) et l'agression pulmonaire induite par la ventilation mécanique (281). Par ailleurs, les  $\beta_2$ -agonistes peuvent restaurer la diminution de clairance liquidienne alvéolaire induite par l'hypoxie (221). Dans notre travail, l'augmentation de la clairance liquidienne alvéolaire au décours de l'instillation d'*E. coli* était atténuée par l'amiloride, indiquant que cette stimulation était dépendante de la fixation de sodium sur la cellule épithéliale alvéolaire. Cette augmentation de clairance était inhibée par le propranolol, suggérant un mécanisme dépendant des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Ainsi, nos résultats indiquent que la sécrétion de catécholamines endogènes au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli* peut induire une stimulation du transport de sodium à travers l'épithélium alvéolaire, dépendante des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques.

### C) Stimulation $\beta_2$ -adrénergique exogène au cours de la pneumopathie aiguë à *Pa*

Dans la dernière partie de notre travail, nous avons évalué l'équilibre hydrique pulmonaire après l'administration intraalvéolaire de  $\beta_2$ -agonistes au cours de la pneumonie aiguë à *P. aeruginosa*. Dans ce modèle expérimental, les animaux étaient anesthésiés et bénéficiaient d'une ventilation mécanique pour une agression pulmonaire aiguë induite par *Pa*. La stimulation exogène  $\beta_2$ -adrénergique administrée au décours de la pneumonie aiguë réduisait la formation de l'œdème pulmonaire en diminuant le trouble de perméabilité vasculaire pulmonaire et en augmentant la clairance liquidienne alvéolaire. Ces effets étaient inhibés par le propranolol, un  $\beta$ -antagoniste non sélectif. Sur un modèle d'agression pulmonaire aiguë induite par l'instillation intratrachéale d'acide chlorhydrique, McAuley et al avaient trouvé des résultats similaires aux nôtres avec un effet bénéfique de l'administration intratrachéale de salmétérol sur la perméabilité vasculaire et la résorption de l'œdème pulmonaire (282). Une concentration plasmatique de  $10^{-8}$  M d'épinéphrine était requise pour augmenter la clairance liquidienne alvéolaire sur des poumons normaux de chiens (283) et pour la norépinéphrine, la clairance liquidienne alvéolaire maximale était obtenue pour des concentrations de  $10^{-4}$  M chez le rat (270). Les études expérimentales ont démontré que la terbutaline et le salmétérol pouvaient stimuler la clairance liquidienne alvéolaire sur des modèles animaux et *ex vivo* sur des poumons humains lorsque des concentrations de  $10^{-5}$  à  $10^{-6}$  M étaient obtenues dans le liquide alvéolaire (179, 180). Chez des patients présentant une agression pulmonaire aiguë, les dosages d'épinéphrine et de norépinéphrine dans le plasma et le liquide de LBA étaient en moyenne de  $10^{-9}$  M. Sakuma et al ont montré sur un modèle de poumons humains isolés que l'utilisation de ces concentrations d'épinephrine et de norépinéphrine ne stimulait pas la clairance liquidienne alvéolaire (284). Des concentrations plus élevées d'épinéphrine ( $10^{-7}$  M) augmentait la clairance liquidienne alvéolaire de 84% par rapport au contrôle. Cette étude suggère donc que les concentrations en catécholamines endogènes ne sont probablement pas suffisantes pour stimuler la clairance liquidienne alvéolaire chez l'homme au cours de l'agression pulmonaire aiguë. Ainsi, l'administration exogène d'une stimulation dépendante de l'AMPC pourrait probablement accélérer la résorption de l'œdème alvéolaire au cours de l'agression pulmonaire aiguë.

Chez des patients intubés et ventilés pour un SDRA, après l'administration d'un aérosol de 5 mg d'albutérol, la concentration moyenne d'albutérol dans le liquide LBA était de  $10^{-5}$  à  $10^{-6}$  M, une concentration potentiellement efficace pour favoriser la résorption de l'œdème alvéolaire (285). Dans notre travail, l'administration par voie locale de  $10^{-4}$  M de terbutaline au décours de l'instillation intratrachéale de *Pa* réduisait l'œdème pulmonaire en stimulant la clairance liquidienne alvéolaire et en conservant les effets sur la perméabilité endothéliale.

**CONCLUSION**  
**PERSPECTIVES**

Nous avons montré qu'en utilisant des stratégies pharmacologiques différentes, la balance hydrique pulmonaire pouvait être modulée *in vivo* au cours de nos modèles d'agression pulmonaire aiguë secondaire à une pneumonie bactérienne.

L'administration de rhPCa à la phase précoce de l'agression pulmonaire aiguë induite par *Pa* tend à augmenter la formation de l'œdème pulmonaire avec une perte de la compartimentalisation de la réponse inflammatoire. Ces effets peuvent être en rapport avec l'inhibition de la formation de thrombine par la rhPCa, suggérant un bénéfice probable de l'activation précoce de la coagulation au cours de l'agression pulmonaire aiguë pour limiter à la fois l'extension de l'agression et les troubles de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire. A un stade plus tardif de l'agression pulmonaire aiguë, la modulation de l'hémostase par la rhPCa pourrait être utile pour restaurer les capacités fibrinolytiques et limiter l'intensité de la réponse inflammatoire. D'autres études sont indispensables à réaliser afin de mieux comprendre les interactions complexes entre la coagulation et l'inflammation pulmonaire. Ainsi, le mode d'action de la PCa, les voies d'administration possibles et les indications potentielles, notamment à quel moment de l'agression pulmonaire aiguë la PCa doit être administrée, seront à préciser dans l'avenir. La modulation de la coagulation sur le versant de la fibrinolyse reste également un axe de recherche expérimentale à explorer.

Par ailleurs, nous avons montré que la stimulation  $\beta$ -adrénergique jouait un rôle important dans l'équilibre hydrique pulmonaire. En effet, l'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène aggravait l'œdème pulmonaire en augmentant le trouble de perméabilité vasculaire pulmonaire et en diminuant la clairance liquidienne alvéolaire au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli*. Notre étude suggère donc que le tonus  $\beta$ -adrénergique endogène peut avoir un effet bénéfique en limitant le trouble de perméabilité vasculaire et en stimulant la clairance liquidienne alvéolaire à la phase précoce de la pneumonie à *E. coli* afin de limiter l'aggravation de l'œdème pulmonaire. Enfin, la stimulation exogène  $\beta_2$ -adrénergique diminue l'œdème pulmonaire et le trouble de perméabilité endothéliale pulmonaire. Les catécholamines peuvent stimuler la clairance liquidienne alvéolaire, moduler les voies de signalisations intracellulaires et être administrées localement dans les poumons. Ces propriétés confèrent aux catécholamines un intérêt thérapeutique potentiel. L'action immunomodulatrice des catécholamines doit donc continuer à être explorée afin de mieux préciser les effets bénéfiques ou délétères de ces agents au cours du SDRA.

Des études cliniques chez l'homme doivent également être réalisées afin d'évaluer le rôle potentiel des thérapeutiques  $\beta_2$  stimulantes sur la résorption de l'œdème alvéolaire et de préciser leur intérêt sur le pronostic des patients. Enfin, une prise en charge thérapeutique associant un meilleur contrôle de la réponse inflammatoire et une restauration de la fonction épithéliale alvéolaire devrait conduire éventuellement à améliorer le pronostic des patients présentant un œdème pulmonaire lésionnel.

# **COLLABORATIONS**

Ce travail a été réalisé

- Au sein de :

EA 2689

Faculté de Médecine – Pôle Recherche

1, place de Verdun

59045 Lille Cedex

Sous la direction du Professeur Benoît Guery

- Avec les collaborations :

- Locales

Laboratoire de Bactériologie (Dr Micheline Roussel-Delvallez)

Laboratoire de Biophysique, Faculté de Médecine de Lille (Pr Xavier Marchandise)

Département de Recherche Expérimentale (DHURE), faculté de Médecine de Lille

Laboratoire d'hémostase, CHRU de Lille (Dr Antoine Tournoy)

- Internationales :

Cardiovascular Research Institute (Pr Matthay MA), University of California, San Francisco, CA 94143, USA

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine*. 2000 May 4;342(18):1334-49.
2. Idell S, James KK, Coalson JJ. Fibrinolytic activity in bronchoalveolar lavage of baboons with diffuse alveolar damage: trends in two forms of lung injury. *Critical care medicine*. 1992 Oct;20(10):1431-40.
3. van der Poll T, Levi M, Nick JA, Abraham E. Activated protein C inhibits local coagulation after intrapulmonary delivery of endotoxin in humans. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005 May 15;171(10):1125-8.
4. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967 Aug 12;2(7511):319-23.
5. Petty TL, Ashbaugh DG. The adult respiratory distress syndrome. Clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. *Chest*. 1971 Sep;60(3):233-9.
6. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *The American review of respiratory disease*. 1988 Sep;138(3):720-3.
7. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994 Mar;149(3 Pt 1):818-24.
8. Conference report: Mechanisms of acute respiratory failure. *The American review of respiratory disease*. 1977 Jun;115(6):1071-8.
9. Webster NR, Cohen AT, Nunn JF. Adult respiratory distress syndrome--how many cases in the UK? *Anaesthesia*. 1988 Nov;43(11):923-6.
10. Thomsen GE, Morris AH. Incidence of the adult respiratory distress syndrome in the state of Utah. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995 Sep;152(3):965-71.
11. Vincent JL, Sakr Y, Ranieri VM. Epidemiology and outcome of acute respiratory failure in intensive care unit patients. *Critical care medicine*. 2003 Apr;31(4 Suppl):S296-9.
12. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *The New England journal of medicine*. 2005 Oct 20;353(16):1685-93.
13. Roupie E, Lepage E, Wysocki M, Fagon JY, Chastre J, Dreyfuss D, et al. Prevalence, etiologies and outcome of the acute respiratory distress syndrome among hypoxemic ventilated patients. SRLF Collaborative Group on Mechanical Ventilation. *Societe de Reanimation de Langue Francaise. Intensive care medicine*. 1999 Sep;25(9):920-9.
14. Eisner MD, Thompson T, Hudson LD, Luce JM, Hayden D, Schoenfeld D, et al. Efficacy of low tidal volume ventilation in patients with different clinical risk factors for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001 Jul 15;164(2):231-6.
15. Fowler AA, Hamman RF, Good JT, Benson KN, Baird M, Eberle DJ, et al. Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions. *Annals of internal medicine*. 1983 May;98(5 Pt 1):593-7.
16. Bachofen M, Weibel ER. Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. *Clinics in chest medicine*. 1982 Jan;3(1):35-56.
17. Raijmakers PG, Groeneveld AB, Teule GJ, Thijs LG. Diagnostic value of the gallium-67 pulmonary leak index in pulmonary edema. *J Nucl Med*. 1996 Aug;37(8):1316-22.
18. Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR, Matthay MA. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997 Apr;155(4):1187-205.
19. Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Matthay MA. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. *The Journal of clinical investigation*. 1991 Sep;88(3):864-75.
20. Anderson WR, Thielen K. Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light, scanning, and transmission electron microscopy. *Ultrastructural pathology*. 1992 Nov-Dec;16(6):615-28.
21. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Critical care medicine*. 2003 Apr;31(4 Suppl):S195-9.

22. Drost EM, MacNee W. Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis. *European journal of immunology*. 2002 Feb;32(2):393-403.
23. Tanaka H, Nishino M, Dahms TE. Physiologic responses to small emboli and hemodynamic effects of changes in deformability of polymorphonuclear leukocytes in isolated rabbit lung. *Microvascular research*. 2002 Jan;63(1):81-90.
24. Reutershan J, Ley K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Critical care (London, England)*. 2004 Dec;8(6):453-61.
25. Worthen GS, Schwab B, 3rd, Elson EL, Downey GP. Mechanics of stimulated neutrophils: cell stiffening induces retention in capillaries. *Science (New York, NY)*. 1989 Jul 14;245(4914):183-6.
26. Carraway MS, Welty-Wolf KE, Kantrow SP, Huang YC, Simonson SG, Que LG, et al. Antibody to E- and L-selectin does not prevent lung injury or mortality in septic baboons. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998 Mar;157(3 Pt 1):938-49.
27. Burns JA, Issekutz TB, Yagita H, Issekutz AC. The beta2, alpha4, alpha5 integrins and selectins mediate chemotactic factor and endotoxin-enhanced neutrophil sequestration in the lung. *The American journal of pathology*. 2001 May;158(5):1809-19.
28. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *Faseb J*. 1994 May;8(8):504-12.
29. Burns JA, Issekutz TB, Yagita H, Issekutz AC. The alpha 4 beta 1 (very late antigen (VLA)-4, CD49d/CD29) and alpha 5 beta 1 (VLA-5, CD49e/CD29) integrins mediate beta 2 (CD11/CD18) integrin-independent neutrophil recruitment to endotoxin-induced lung inflammation. *J Immunol*. 2001 Apr 1;166(7):4644-9.
30. Mizgerd JP, Meek BB, Kutkoski GJ, Bullard DC, Beaudet AL, Doerschuk CM. Selectins and neutrophil traffic: margination and Streptococcus pneumoniae-induced emigration in murine lungs. *The Journal of experimental medicine*. 1996 Aug 1;184(2):639-45.
31. Motosugi H, Quinlan WM, Bree M, Doerschuk CM. Role of CD11b in focal acid-induced pneumonia and contralateral lung injury in rats. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998 Jan;157(1):192-8.
32. Burns AR, Takei F, Doerschuk CM. Quantitation of ICAM-1 expression in mouse lung during pneumonia. *J Immunol*. 1994 Oct 1;153(7):3189-98.
33. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 1998 Apr 9;392(6676):565-8.
34. Miller EJ, Cohen AB, Nagao S, Griffith D, Maunder RJ, Martin TR, et al. Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality. *The American review of respiratory disease*. 1992 Aug;146(2):427-32.
35. Folkesson HG, Matthay MA, Hebert CA, Broaddus VC. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *The Journal of clinical investigation*. 1995 Jul;96(1):107-16.
36. Sekido N, Mukaida N, Harada A, Nakanishi I, Watanabe Y, Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. *Nature*. 1993 Oct 14;365(6447):654-7.
37. Osman MO, Kristensen JU, Jacobsen NO, Lausten SB, Deleuran B, Deleuran M, et al. A monoclonal anti-interleukin 8 antibody (WS-4) inhibits cytokine response and acute lung injury in experimental severe acute necrotising pancreatitis in rabbits. *Gut*. 1998 Aug;43(2):232-9.
38. Kurdowska AK, Geiser TK, Alden SM, Dziadek BR, Noble JM, Nuckton TJ, et al. Activity of pulmonary edema fluid interleukin-8 bound to alpha(2)-macroglobulin in patients with acute lung injury. *American journal of physiology*. 2002 May;282(5):L1092-8.
39. Kurdowska A, Noble JM, Steinberg KP, Ruzinski JT, Hudson LD, Martin TR. Anti-interleukin 8 autoantibody: interleukin 8 complexes in the acute respiratory distress syndrome. Relationship between the complexes and clinical disease activity. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001 Feb;163(2):463-8.
40. Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Dayer JM. High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors, interleukin-1, interferon, and elastase, in patients

with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *The American review of respiratory disease*. 1992 May;145(5):1016-22.

41. Goodman RB, Strieter RM, Martin DP, Steinberg KP, Milberg JA, Maunder RJ, et al. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996 Sep;154(3 Pt 1):602-11.
42. Goodman RB, Pugin J, Lee JS, Matthay MA. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine & growth factor reviews*. 2003 Dec;14(6):523-35.
43. Millar AB, Foley NM, Singer M, Johnson NM, Meager A, Rook GA. Tumour necrosis factor in bronchopulmonary secretions of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet*. 1989 Sep 23;2(8665):712-4.
44. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F, 2nd, Park DR, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001 Nov 15;164(10 Pt 1):1896-903.
45. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991 Dec 1;147(11):3815-22.
46. Armstrong L, Millar AB. Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax*. 1997 May;52(5):442-6.
47. Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I, et al. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Annals of internal medicine*. 1996 Aug 1;125(3):191-6.
48. Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002 Dec 1;166(11):1475-82.
49. Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*. 2001 Dec 20-27;414(6866):920-4.
50. Donnelly SC, Haslett C, Reid PT, Grant IS, Wallace WA, Metz CN, et al. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nature medicine*. 1997 Mar;3(3):320-3.
51. Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol*. 2000 Sep 15;165(6):2950-4.
52. Hare JM, Stamler JS. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *The Journal of clinical investigation*. 2005 Mar;115(3):509-17.
53. Chabot F, Mitchell JA, Gutteridge JM, Evans TW. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J*. 1998 Mar;11(3):745-57.
54. Batandier C, Fontaine E, Keriell C, Leverve XM. Determination of mitochondrial reactive oxygen species: methodological aspects. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2002 Apr-Jun;6(2):175-87.
55. Ferdinandy P, Danial H, Ambrus I, Rothery RA, Schulz R. Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circulation research*. 2000 Aug 4;87(3):241-7.
56. Tate RM, Vanbenthuyzen KM, Shasby DM, McMurtry IF, Repine JE. Oxygen-radical-mediated permeability edema and vasoconstriction in isolated perfused rabbit lungs. *The American review of respiratory disease*. 1982 Nov;126(5):802-6.
57. Baird BR, Cheronis JC, Sandhaus RA, Berger EM, White CW, Repine JE. O<sub>2</sub> metabolites and neutrophil elastase synergistically cause edematous injury in isolated rat lungs. *J Appl Physiol*. 1986 Dec;61(6):2224-9.
58. Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, Kelly DR, Beckman JS. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995 Apr;151(4):1250-4.
59. Baldwin SR, Simon RH, Grum CM, Ketai LH, Boxer LA, Devall LJ. Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet*. 1986 Jan 4;1(8471):11-4.
60. Gole MD, Souza JM, Choi I, Hertkorn C, Malcolm S, Foust RF, 3rd, et al. Plasma proteins modified by tyrosine nitration in acute respiratory distress syndrome. *American journal of physiology*. 2000 May;278(5):L961-7.

61. Chow CW, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP. Oxidative stress and acute lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2003 Oct;29(4):427-31.
62. Moraes TJ, Chow CW, Downey GP. Proteases and lung injury. *Critical care medicine*. 2003 Apr;31(4 Suppl):S189-94.
63. Tkcalcevic J, Novelli M, Phylactides M, Iredale JP, Segal AW, Roes J. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity*. 2000 Feb;12(2):201-10.
64. Donnelly SC, MacGregor I, Zamani A, Gordon MW, Robertson CE, Steedman DJ, et al. Plasma elastase levels and the development of the adult respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995 May;151(5):1428-33.
65. Delclaux C, d'Ortho MP, Delacourt C, Lebargy F, Brun-Buisson C, Brochard L, et al. Gelatinases in epithelial lining fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *The American journal of physiology*. 1997 Mar;272(3 Pt 1):L442-51.
66. Lacherade JC, Van De Louw A, Planus E, Escudier E, D'Ortho MP, Lafuma C, et al. Evaluation of basement membrane degradation during TNF-alpha-induced increase in epithelial permeability. *American journal of physiology*. 2001 Jul;281(1):L134-43.
67. Van de Louw A, Jean D, Frisdal E, Cerf C, d'Ortho MP, Baker AH, et al. Neutrophil proteinases in hydrochloric acid- and endotoxin-induced acute lung injury: evaluation of interstitial protease activity by in situ zymography. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2002 Feb;82(2):133-45.
68. Amat M, Barcons M, Mancebo J, Mateo J, Oliver A, Mayoral JF, et al. Evolution of leukotriene B4, peptide leukotrienes, and interleukin-8 plasma concentrations in patients at risk of acute respiratory distress syndrome and with acute respiratory distress syndrome: mortality prognostic study. *Critical care medicine*. 2000 Jan;28(1):57-62.
69. Martin TR, Hagimoto N, Nakamura M, Matute-Bello G. Apoptosis and epithelial injury in the lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005;2(3):214-20.
70. Albertine KH, Soulier MF, Wang Z, Ishizaka A, Hashimoto S, Zimmerman GA, et al. Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *The American journal of pathology*. 2002 Nov;161(5):1783-96.
71. Buccellato LJ, Tso M, Akinci OI, Chandel NS, Budinger GR. Reactive oxygen species are required for hyperoxia-induced Bax activation and cell death in alveolar epithelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Feb 20;279(8):6753-60.
72. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, et al. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature medicine*. 2002 Aug;8(8):841-9.
73. Burnham EL, Taylor WR, Quyyumi AA, Rojas M, Brigham KL, Moss M. Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005 Oct 1;172(7):854-60.
74. Bone RC, Francis PB, Pierce AK. Intravascular coagulation associated with the adult respiratory distress syndrome. *The American journal of medicine*. 1976 Nov;61(5):585-9.
75. Glusa E. Vascular effects of thrombin. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1992;18(3):296-304.
76. Brass LF. Thrombin and platelet activation. *Chest*. 2003 Sep;124(3 Suppl):18S-25S.
77. Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S, Mollica JS, Ferrell GL, Esmon CT. The endothelial cell protein C receptor augments protein C activation by the thrombin-thrombomodulin complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996 Sep 17;93(19):10212-6.
78. Faust SN, Heyderman RS, Levin M. Coagulation in severe sepsis: a central role for thrombomodulin and activated protein C. *Critical care medicine*. 2001 Jul;29(7 Suppl):S62-7; discussion S7-8.
79. Rezaie AR. Exosite-dependent regulation of the protein C anticoagulant pathway. *Trends in cardiovascular medicine*. 2003 Jan;13(1):8-15.

80. Ware LB, Camerer E, Welty-Wolf K, Schultz MJ, Matthay MA. Bench to bedside: targeting coagulation and fibrinolysis in acute lung injury. *American journal of physiology*. 2006 Sep;291(3):L307-11.
81. Nakstad B, Boye NP, Lyberg T. Procoagulant activities in human alveolar macrophages. *European journal of respiratory diseases*. 1987 Nov;71(5):459-71.
82. Gross TJ, Simon RH, Sitrin RG. Tissue factor procoagulant expression by rat alveolar epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1992 Apr;6(4):397-403.
83. Bastarache JA, Wang L, Geiser T, Wang Z, Albertine KH, Matthay MA, et al. The alveolar epithelium can initiate the extrinsic coagulation cascade through expression of tissue factor. *Thorax*. 2007 Jul;62(7):608-16.
84. Jesmin S, Gando S, Matsuda N, Sakuma I, Kobayashi S, Sakuraya F, et al. Temporal changes in pulmonary expression of key procoagulant molecules in rabbits with endotoxin-induced acute lung injury: elevated expression levels of protease-activated receptors. *Thrombosis and haemostasis*. 2004 Nov;92(5):966-79.
85. Armstead VE, Opentanova IL, Minchenko AG, Lefler AM. Tissue factor expression in vital organs during murine traumatic shock: role of transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Anesthesiology*. 1999 Dec;91(6):1844-52.
86. Stouthard JM, Levi M, Hack CE, Veenhof CH, Romijn HA, Sauerwein HP, et al. Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans. *Thrombosis and haemostasis*. 1996 Nov;76(5):738-42.
87. Idell S, Peters J, James KK, Fair DS, Coalson JJ. Local abnormalities of coagulation and fibrinolytic pathways that promote alveolar fibrin deposition in the lungs of baboons with diffuse alveolar damage. *The Journal of clinical investigation*. 1989 Jul;84(1):181-93.
88. Idell S, James KK, Levin EG, Schwartz BS, Manchanda N, Maunder RJ, et al. Local abnormalities in coagulation and fibrinolytic pathways predispose to alveolar fibrin deposition in the adult respiratory distress syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 1989 Aug;84(2):695-705.
89. Fuchs-Buder T, de Moerloose P, Ricou B, Reber G, Vifian C, Nicod L, et al. Time course of procoagulant activity and D dimer in bronchoalveolar fluid of patients at risk for or with acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996 Jan;153(1):163-7.
90. Gunther A, Mosavi P, Heinemann S, Ruppert C, Muth H, Markart P, et al. Alveolar fibrin formation caused by enhanced procoagulant and depressed fibrinolytic capacities in severe pneumonia. Comparison with the acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000 Feb;161(2 Pt 1):454-62.
91. Gando S, Nanzaki S, Morimoto Y, Kobayashi S, Kemmotsu O. Systemic activation of tissue-factor dependent coagulation pathway in evolving acute respiratory distress syndrome in patients with trauma and sepsis. *The Journal of trauma*. 1999 Oct;47(4):719-23.
92. Bastarache JA, Wang L, Wang Z, Albertine KH, Matthay MA, Ware LB. Intra-alveolar tissue factor pathway inhibitor is not sufficient to block tissue factor procoagulant activity. *American journal of physiology*. 2008 May;294(5):L874-81.
93. Enkhbaatar P, Okajima K, Murakami K, Uchiba M, Okabe H, Okabe K, et al. Recombinant tissue factor pathway inhibitor reduces lipopolysaccharide-induced pulmonary vascular injury by inhibiting leukocyte activation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000 Nov;162(5):1752-9.
94. Miller DL, Welty-Wolf K, Carraway MS, Ezban M, Ghio A, Suliman H, et al. Extrinsic coagulation blockade attenuates lung injury and proinflammatory cytokine release after intratracheal lipopolysaccharide. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2002 Jun;26(6):650-8.
95. Carraway MS, Welty-Wolf KE, Miller DL, Ortel TL, Idell S, Ghio AJ, et al. Blockade of tissue factor: treatment for organ injury in established sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003 May 1;167(9):1200-9.
96. Abraham E, Reinhart K, Opal S, Demeyer I, Doig C, Rodriguez AL, et al. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *Jama*. 2003 Jul 9;290(2):238-47.

97. Laterre PF, Wittebole X, Dhainaut JF. Anticoagulant therapy in acute lung injury. *Critical care medicine*. 2003 Apr;31(4 Suppl):S329-36.
98. Uchiba M, Okajima K, Murakami K. Effects of various doses of antithrombin III on endotoxin-induced endothelial cell injury and coagulation abnormalities in rats. *Thrombosis research*. 1998 Mar 1;89(5):233-41.
99. Stangl K, Laule M, Richter C, Stangl V, Koch J, Goktas O, et al. Pulmonary adrenomedullin counteracts deterioration of coronary flow and myocardial performance evoked by pulmonary endothelins in experimental acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine*. 2001 May;29(5):1027-32.
100. Giebler R, Schmidt U, Koch S, Peters J, Scherer R. Combined antithrombin III and C1-esterase inhibitor treatment decreases intravascular fibrin deposition and attenuates cardiorespiratory impairment in rabbits exposed to *Escherichia coli* endotoxin. *Critical care medicine*. 1999 Mar;27(3):597-604.
101. Murakami K, McGuire R, Cox RA, Jodoin JM, Schmalstieg FC, Traber LD, et al. Recombinant antithrombin attenuates pulmonary inflammation following smoke inhalation and pneumonia in sheep. *Critical care medicine*. 2003 Feb;31(2):577-83.
102. Kipnis E, Guery BP, Tournoy A, Leroy X, Robriquet L, Fialdes P, et al. Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury. *Shock* (Augusta, Ga. 2004 May;21(5):444-51.
103. Bajzar L, Nesheim ME, Tracy PB. The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent. *Blood*. 1996 Sep 15;88(6):2093-100.
104. Dhainaut JF, Yan SB, Cariou A, Mira JP. Soluble thrombomodulin, plasma-derived unactivated protein C, and recombinant human activated protein C in sepsis. *Critical care medicine*. 2002 May;30(5 Suppl):S318-24.
105. Yamamoto K, Loskutoff DJ. Extrahepatic expression and regulation of protein C in the mouse. *The American journal of pathology*. 1998 Aug;153(2):547-55.
106. Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Nawa K, Okabe H, Takatsuki K. Recombinant human soluble thrombomodulin reduces endotoxin-induced pulmonary vascular injury via protein C activation in rats. *Thrombosis and haemostasis*. 1995 Nov;74(5):1265-70.
107. Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Nakagaki T, Okabe H, et al. Activated protein C attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting activated leukocytes in rats. *Blood*. 1996 Jan 15;87(2):642-7.
108. Grey ST, Tsuchida A, Hau H, Orthner CL, Salem HH, Hancock WW. Selective inhibitory effects of the anticoagulant activated protein C on the responses of human mononuclear phagocytes to LPS, IFN-gamma, or phorbol ester. *J Immunol*. 1994 Oct 15;153(8):3664-72.
109. White B, Schmidt M, Murphy C, Livingstone W, O'Toole D, Lawler M, et al. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *British journal of haematology*. 2000 Jul;110(1):130-4.
110. Sturn DH, Kaneider NC, Feistritz C, Djanani A, Fukudome K, Wiedermann CJ. Expression and function of the endothelial protein C receptor in human neutrophils. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1499-505.
111. Yoshikawa A, Kaido T, Seto S, Katsuura Y, Imamura M. Activated protein C prevents multiple organ injury following extensive hepatectomy in cirrhotic rats. *Journal of hepatology*. 2000 Dec;33(6):953-60.
112. Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Nakagaki T, Okabe H, et al. Activated protein C prevents LPS-induced pulmonary vascular injury by inhibiting cytokine production. *The American journal of physiology*. 1997 Feb;272(2 Pt 1):L197-202.
113. Ware LB, Matthay MA, Parsons PE, Thompson BT, Januzzi JL, Eisner MD. Pathogenetic and prognostic significance of altered coagulation and fibrinolysis in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome\*. *Critical care medicine*. 2007 Jun 19.
114. Wang L, Bastarache JA, Wickersham N, Fang X, Matthay MA, Ware LB. Novel role of the human alveolar epithelium in regulating intra-alveolar coagulation. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2007 Apr;36(4):497-503.

115. Cheng T, Liu D, Griffin JH, Fernandez JA, Castellino F, Rosen ED, et al. Activated protein C blocks p53-mediated apoptosis in ischemic human brain endothelium and is neuroprotective. *Nature medicine*. 2003 Mar;9(3):338-42.
116. Esmon CT. Protein C pathway in sepsis. *Annals of medicine*. 2002;34(7-8):598-605.
117. Zeng W, Matter WF, Yan SB, Um SL, Vlahos CJ, Liu L. Effect of drotrecogin alfa (activated) on human endothelial cell permeability and Rho kinase signaling. *Critical care medicine*. 2004 May;32(5 Suppl):S302-8.
118. Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU. Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *The Journal of clinical investigation*. 1987 Jan;79(1):124-30.
119. Gomi K, Zushi M, Honda G, Kawahara S, Matsuzaki O, Kanabayashi T, et al. Antithrombotic effect of recombinant human thrombomodulin on thrombin-induced thromboembolism in mice. *Blood*. 1990 Apr 1;75(7):1396-9.
120. Hasegawa N, Kandra TG, Husari AW, Veiss S, Hart WT, Hedgpeth J, et al. The effects of recombinant human thrombomodulin on endotoxin-induced multiple-system organ failure in rats. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1996 Jun;153(6 Pt 1):1831-7.
121. Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Johnno M, Okabe H, Takatsuki K. Recombinant thrombomodulin prevents endotoxin-induced lung injury in rats by inhibiting leukocyte activation. *The American journal of physiology*. 1996 Sep;271(3 Pt 1):L470-5.
122. Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Johnno M, Mohri M, Okabe H, et al. rhs-TM prevents ET-induced increase in pulmonary vascular permeability through protein C activation. *The American journal of physiology*. 1997 Oct;273(4 Pt 1):L889-94.
123. Ikeguchi H, Maruyama S, Morita Y, Fujita Y, Kato T, Natori Y, et al. Effects of human soluble thrombomodulin on experimental glomerulonephritis. *Kidney international*. 2002 Feb;61(2):490-501.
124. Hou B, Eren M, Painter CA, Covington JW, Dixon JD, Schoenhard JA, et al. Tumor necrosis factor alpha activates the human plasminogen activator inhibitor-1 gene through a distal nuclear factor kappaB site. *The Journal of biological chemistry*. 2004 Apr 30;279(18):18127-36.
125. Chapman HA, Jr., Stone OL, Vavrin Z. Degradation of fibrin and elastin by intact human alveolar macrophages in vitro. Characterization of a plasminogen activator and its role in matrix degradation. *The Journal of clinical investigation*. 1984 Mar;73(3):806-15.
126. Chapman HA, Yang XL, Sailor LZ, Sugarbaker DJ. Developmental expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human alveolar macrophages. Possible role in lung injury. *J Immunol*. 1990 Nov 15;145(10):3398-405.
127. Wygrecka M, Markart P, Ruppert C, Kuchenbuch T, Fink L, Bohle RM, et al. Compartment- and cell-specific expression of coagulation and fibrinolysis factors in the murine lung undergoing inhalational versus intravenous endotoxin application. *Thrombosis and haemostasis*. 2004 Sep;92(3):529-40.
128. Ts'ao C, Ward WF. Plasminogen activator activity in lung and alveolar macrophages of rats exposed to graded single doses of gamma rays to the right hemithorax. *Radiation research*. 1985 Sep;103(3):393-402.
129. Hardaway RM, Williams CH, Marvasti M, Farias M, Tseng A, Pinon I, et al. Prevention of adult respiratory distress syndrome with plasminogen activator in pigs. *Critical care medicine*. 1990 Dec;18(12):1413-8.
130. Carley WW, Niedbala MJ, Gerritsen ME. Isolation, cultivation, and partial characterization of microvascular endothelium derived from human lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1992 Dec;7(6):620-30.
131. Grau GE, de Moerloose P, Bulla O, Lou J, Lei Z, Reber G, et al. Haemostatic properties of human pulmonary and cerebral microvascular endothelial cells. *Thrombosis and haemostasis*. 1997 Mar;77(3):585-90.
132. Prabhakaran P, Ware LB, White KE, Cross MT, Matthay MA, Olman MA. Elevated levels of plasminogen activator inhibitor-1 in pulmonary edema fluid are associated with mortality in acute lung injury. *American journal of physiology*. 2003 Jul;285(1):L20-8.
133. Moalli R, Doyle JM, Tahhan HR, Hasan FM, Braman SS, Saldeen T. Fibrinolysis in critically ill patients. *The American review of respiratory disease*. 1989 Aug;140(2):287-93.

134. Groeneveld AB, Kindt I, Raijmakers PG, Hack CE, Thijs LG. Systemic coagulation and fibrinolysis in patients with or at risk for the adult respiratory distress syndrome. *Thrombosis and haemostasis*. 1997 Dec;78(6):1444-9.
135. Levi M, van der Poll T, ten Cate H, van Deventer SJ. The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. *European journal of clinical investigation*. 1997 Jan;27(1):3-9.
136. van der Poll T, Levi M, Hack CE, ten Cate H, van Deventer SJ, Eerenberg AJ, et al. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *The Journal of experimental medicine*. 1994 Apr 1;179(4):1253-9.
137. van der Poll T, Buller HR, ten Cate H, Wortel CH, Bauer KA, van Deventer SJ, et al. Activation of coagulation after administration of tumor necrosis factor to normal subjects. *The New England journal of medicine*. 1990 Jun 7;322(23):1622-7.
138. van der Poll T, Levi M, van Deventer SJ, ten Cate H, Haagsmans BL, Biemond BJ, et al. Differential effects of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies on systemic inflammatory responses in experimental endotoxemia in chimpanzees. *Blood*. 1994 Jan 15;83(2):446-51.
139. Conway EM, Rosenberg RD. Tumor necrosis factor suppresses transcription of the thrombomodulin gene in endothelial cells. *Molecular and cellular biology*. 1988 Dec;8(12):5588-92.
140. van der Poll T, Levi M, Buller HR, van Deventer SJ, de Boer JP, Hack CE, et al. Fibrinolytic response to tumor necrosis factor in healthy subjects. *The Journal of experimental medicine*. 1991 Sep 1;174(3):729-32.
141. Faust SN, Levin M, Harrison OB, Goldin RD, Lockhart MS, Kondaveeti S, et al. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *The New England journal of medicine*. 2001 Aug 9;345(6):408-16.
142. Nawroth PP, Handley DA, Esmon CT, Stern DM. Interleukin 1 induces endothelial cell procoagulant while suppressing cell-surface anticoagulant activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986 May;83(10):3460-4.
143. Takano S, Kimura S, Ohdama S, Aoki N. Plasma thrombomodulin in health and diseases. *Blood*. 1990 Nov 15;76(10):2024-9.
144. Glaser CB, Morser J, Clarke JH, Blasko E, McLean K, Kuhn I, et al. Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. A potential rapid mechanism for modulation of coagulation. *The Journal of clinical investigation*. 1992 Dec;90(6):2565-73.
145. Camerer E, Gjernes E, Wiiger M, Pringle S, Prydz H. Binding of factor VIIa to tissue factor on keratinocytes induces gene expression. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Mar 3;275(9):6580-5.
146. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *British journal of haematology*. 2005 Nov;131(4):417-30.
147. Idell S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Critical care medicine*. 2003 Apr;31(4 Suppl):S213-20.
148. Altieri DC, Etingin OR, Fair DS, Brunck TK, Geltosky JE, Hajjar DP, et al. Structurally homologous ligand binding of integrin Mac-1 and viral glycoprotein C receptors. *Science (New York, NY)*. 1991 Nov 22;254(5035):1200-2.
149. Yamauchi T, Umeda F, Inoguchi T, Nawata H. Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1989 Sep 29;163(3):1404-11.
150. Souter PJ, Thomas S, Hubbard AR, Poole S, Romisch J, Gray E. Antithrombin inhibits lipopolysaccharide-induced tissue factor and interleukin-6 production by mononuclear cells, human umbilical vein endothelial cells, and whole blood. *Critical care medicine*. 2001 Jan;29(1):134-9.
151. Oelschlager C, Romisch J, Staubitz A, Stauss H, Leithauser B, Tillmanns H, et al. Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells. *Blood*. 2002 Jun 1;99(11):4015-20.
152. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *The New England journal of medicine*. 2001 Mar 8;344(10):699-709.

153. Yuksel M, Okajima K, Uchiba M, Horiuchi S, Okabe H. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by inhibiting activation of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in human monocytes. *Thrombosis and haemostasis*. 2002 Aug;88(2):267-73.
154. Myles T, Nishimura T, Yun TH, Nagashima M, Morser J, Patterson AJ, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, a potential regulator of vascular inflammation. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Dec 19;278(51):51059-67.
155. Campbell W, Okada N, Okada H. Carboxypeptidase R is an inactivator of complement-derived inflammatory peptides and an inhibitor of fibrinolysis. *Immunological reviews*. 2001 Apr;180:162-7.
156. Fourrier F, Chopin C, Huart JJ, Runge I, Caron C, Goudemand J. Double-blind, placebo-controlled trial of antithrombin III concentrates in septic shock with disseminated intravascular coagulation. *Chest*. 1993 Sep;104(3):882-8.
157. Inthorn D, Hoffmann JN, Hartl WH, Muhlbayer D, Jochum M. Antithrombin III supplementation in severe sepsis: beneficial effects on organ dysfunction. *Shock (Augusta, Ga)*. 1997 Nov;8(5):328-34.
158. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *Jama*. 2001 Oct 17;286(15):1869-78.
159. Wiedermann CJ, Hoffmann JN, Juers M, Ostermann H, Kienast J, Briegel J, et al. High-dose antithrombin III in the treatment of severe sepsis in patients with a high risk of death: efficacy and safety. *Critical care medicine*. 2006 Feb;34(2):285-92.
160. Walters DV, Olver RE. The role of catecholamines in lung liquid absorption at birth. *Pediatric research*. 1978 Mar;12(3):239-42.
161. Matthay MA, Landolt CC, Staub NC. Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep. *J Appl Physiol*. 1982 Jul;53(1):96-104.
162. Goodman BE, Crandall ED. Dome formation in primary cultured monolayers of alveolar epithelial cells. *The American journal of physiology*. 1982 Jul;243(1):C96-100.
163. Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiological reviews*. 2002 Jul;82(3):569-600.
164. Matalon S, Benos DJ, Jackson RM. Biophysical and molecular properties of amiloride-inhibitable Na<sup>+</sup> channels in alveolar epithelial cells. *The American journal of physiology*. 1996 Jul;271(1 Pt 1):L1-22.
165. Matthay MA, Folkesson HG, Verkman AS. Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung. *The American journal of physiology*. 1996 Apr;270(4 Pt 1):L487-503.
166. Basset G, Crone C, Saumon G. Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium. *The Journal of physiology*. 1987 Mar;384:325-45.
167. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, et al. Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channel is made of three homologous subunits. *Nature*. 1994 Feb 3;367(6462):463-7.
168. Hummler E, Barker P, Gatzky J, Beerhmann F, Verdumo C, Schmidt A, et al. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. *Nature genetics*. 1996 Mar;12(3):325-8.
169. Mutlu GM, Sznajder JI. Mechanisms of pulmonary edema clearance. *American journal of physiology*. 2005 Nov;289(5):L685-95.
170. Song Y, Fukuda N, Bai C, Ma T, Matthay MA, Verkman AS. Role of aquaporins in alveolar fluid clearance in neonatal and adult lung, and in oedema formation following acute lung injury: studies in transgenic aquaporin null mice. *The Journal of physiology*. 2000 Jun 15;525 Pt 3:771-9.
171. Dobbs LG, Gonzalez R, Matthay MA, Carter EP, Allen L, Verkman AS. Highly water-permeable type I alveolar epithelial cells confer high water permeability between the airspace and vasculature in rat lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Mar 17;95(6):2991-6.

172. Ridge KM, Rutschman DH, Factor P, Katz AI, Bertorello AM, Sznajder JL. Differential expression of Na-K-ATPase isoforms in rat alveolar epithelial cells. *The American journal of physiology*. 1997 Jul;273(1 Pt 1):L246-55.
173. Matthay MA, Berthiaume Y, Staub NC. Long-term clearance of liquid and protein from the lungs of unanesthetized sheep. *J Appl Physiol*. 1985 Sep;59(3):928-34.
174. Serikov VB, Grady M, Matthay MA. Effect of temperature on alveolar liquid and protein clearance in an in situ perfused goat lung. *J Appl Physiol*. 1993 Aug;75(2):940-7.
175. Rutschman DH, Olivera W, Sznajder JI. Active transport and passive liquid movement in isolated perfused rat lungs. *J Appl Physiol*. 1993 Oct;75(4):1574-80.
176. Sakuma T, Okaniwa G, Nakada T, Nishimura T, Fujimura S, Matthay MA. Alveolar fluid clearance in the resected human lung. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1994 Aug;150(2):305-10.
177. Goodman BE, Brown SE, Crandall ED. Regulation of transport across pulmonary alveolar epithelial cell monolayers. *J Appl Physiol*. 1984 Sep;57(3):703-10.
178. Norlin A, Folkesson HG. Alveolar fluid clearance in late-gestational guinea pigs after labor induction: mechanisms and regulation. *American journal of physiology*. 2001 Apr;280(4):L606-16.
179. Berthiaume Y, Staub NC, Matthay MA. Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep. *The Journal of clinical investigation*. 1987 Feb;79(2):335-43.
180. Sakuma T, Folkesson HG, Suzuki S, Okaniwa G, Fujimura S, Matthay MA. Beta-adrenergic agonist stimulated alveolar fluid clearance in ex vivo human and rat lungs. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997 Feb;155(2):506-12.
181. Goodman BE, Anderson JL, Clemens JW. Evidence for regulation of sodium transport from airspace to vascular space by cAMP. *The American journal of physiology*. 1989 Aug;257(2 Pt 1):L86-93.
182. Mutlu GM, Dumasius V, Burhop J, McShane PJ, Meng FJ, Welch L, et al. Upregulation of alveolar epithelial active Na<sup>+</sup> transport is dependent on beta2-adrenergic receptor signaling. *Circulation research*. 2004 Apr 30;94(8):1091-100.
183. Pittet JF, Wiener-Kronish JP, McElroy MC, Folkesson HG, Matthay MA. Stimulation of lung epithelial liquid clearance by endogenous release of catecholamines in septic shock in anesthetized rats. *The Journal of clinical investigation*. 1994 Aug;94(2):663-71.
184. Laffon M, Jayr C, Barbry P, Wang Y, Folkesson HG, Pittet JF, et al. Lidocaine induces a reversible decrease in alveolar epithelial fluid clearance in rats. *Anesthesiology*. 2002 Feb;96(2):392-9.
185. Yue G, Russell WJ, Benos DJ, Jackson RM, Olman MA, Matalon S. Increased expression and activity of sodium channels in alveolar type II cells of hyperoxic rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995 Aug 29;92(18):8418-22.
186. Minakata Y, Suzuki S, Grygorczyk C, Dagenais A, Berthiaume Y. Impact of beta-adrenergic agonist on Na<sup>+</sup> channel and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase expression in alveolar type II cells. *The American journal of physiology*. 1998 Aug;275(2 Pt 1):L414-22.
187. Snyder PM. Liddle's syndrome mutations disrupt cAMP-mediated translocation of the epithelial Na<sup>(+)</sup> channel to the cell surface. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Jan;105(1):45-53.
188. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science (New York, NY)*. 1995 Aug 11;269(5225):847-50.
189. Jiang X, Ingbar DH, O'Grady SM. Adrenergic stimulation of Na<sup>+</sup> transport across alveolar epithelial cells involves activation of apical Cl<sup>-</sup> channels. *The American journal of physiology*. 1998 Dec;275(6 Pt 1):C1610-20.
190. Reddy MM, Light MJ, Quinton PM. Activation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) requires CFTR Cl<sup>-</sup> channel function. *Nature*. 1999 Nov 18;402(6759):301-4.
191. Engelhardt JF, Zepeda M, Cohn JA, Yankaskas JR, Wilson JM. Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *The Journal of clinical investigation*. 1994 Feb;93(2):737-49.
192. Fang X, Fukuda N, Barbry P, Sartori C, Verkman AS, Matthay MA. Novel role for CFTR in fluid absorption from the distal airspaces of the lung. *The Journal of general physiology*. 2002 Feb;119(2):199-207.

193. Lei J, Nowbar S, Mariash CN, Ingbar DH. Thyroid hormone stimulates Na-K-ATPase activity and its plasma membrane insertion in rat alveolar epithelial cells. *American journal of physiology*. 2003 Sep;285(3):L762-72.
194. Guery BP, Mason CM, Dobard EP, Beaucaire G, Summer WR, Nelson S. Keratinocyte growth factor increases transalveolar sodium reabsorption in normal and injured rat lungs. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997 May;155(5):1777-84.
195. Guo Y, DuVall MD, Crow JP, Matalon S. Nitric oxide inhibits Na<sup>+</sup> absorption across cultured alveolar type II monolayers. *The American journal of physiology*. 1998 Mar;274(3 Pt 1):L369-77.
196. Sloniewsky DE, Ridge KM, Adir Y, Fries FP, Briva A, Sznajder JI, et al. Leukotriene D4 activates alveolar epithelial Na,K-ATPase and increases alveolar fluid clearance. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004 Feb 1;169(3):407-12.
197. Planes C, Leyvraz C, Uchida T, Angelova MA, Vuagniaux G, Hummler E, et al. In vitro and in vivo regulation of transepithelial lung alveolar sodium transport by serine proteases. *American journal of physiology*. 2005 Jun;288(6):L1099-109.
198. Barnard ML, Olivera WG, Rutschman DM, Bertorello AM, Katz AI, Sznajder JI. Dopamine stimulates sodium transport and liquid clearance in rat lung epithelium. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997 Sep;156(3 Pt 1):709-14.
199. Tibayan FA, Chesnutt AN, Folkesson HG, Eandi J, Matthay MA. Dobutamine increases alveolar liquid clearance in ventilated rats by beta-2 receptor stimulation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997 Aug;156(2 Pt 1):438-44.
200. Tohda H, Marunaka Y. Insulin-activated amiloride-blockable nonselective cation and Na<sup>+</sup> channels in the fetal distal lung epithelium. *General pharmacology*. 1995 Jul;26(4):755-63.
201. Wu BJ, Hulbert AJ, Storlien LH, Else PL. Membrane lipids and sodium pumps of cattle and crocodiles: an experimental test of the membrane pacemaker theory of metabolism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004 Sep;287(3):R633-41.
202. Pierre M, Husson MO, Le Berre R, Desseyn JL, Galabert C, Beghin L, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acids improve host response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *American journal of physiology*. 2007 Jun;292(6):L1422-31.
203. Else PL, Wu BJ, Storlien LH, Hulbert AJ. Molecular activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase relates to the packing of membrane lipids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003 Apr;986:525-6.
204. Hulbert AJ, Else PL. Membranes as possible pacemakers of metabolism. *Journal of theoretical biology*. 1999 Aug 7;199(3):257-74.
205. Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *The American review of respiratory disease*. 1986 May;133(5):913-27.
206. Brigham KL, Woolverton WC, Blake LH, Staub NC. Increased sheep lung vascular permeability caused by pseudomonas bacteremia. *The Journal of clinical investigation*. 1974 Oct;54(4):792-804.
207. Pittet JF, Brenner TJ, Modelska K, Matthay MA. Alveolar liquid clearance is increased by endogenous catecholamines in hemorrhagic shock in rats. *J Appl Physiol*. 1996 Aug;81(2):830-7.
208. Lane SM, Maender KC, Awender NE, Maron MB. Adrenal epinephrine increases alveolar liquid clearance in a canine model of neurogenic pulmonary edema. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1998 Sep;158(3):760-8.
209. Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, Pittet JF, Frank D, Dobbs L, et al. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol*. 1993 Oct;75(4):1661-9.
210. Pittet JF, Matthay MA, Pier G, Grady M, Wiener-Kronish JP. *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung and pleural injury in sheep. Differential protective effect of circulating versus alveolar immunoglobulin G antibody. *The Journal of clinical investigation*. 1993 Sep;92(3):1221-8.
211. Sawa T, Yahr TL, Ohara M, Kurahashi K, Gropper MA, Wiener-Kronish JP, et al. Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nature medicine*. 1999 Apr;5(4):392-8.

212. Hickman-Davis JM, McNicholas-Bevensee C, Davis IC, Ma HP, Davis GC, Bosworth CA, et al. Reactive species mediate inhibition of alveolar type II sodium transport during mycoplasma infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006 Feb 1;173(3):334-44.
213. Pittet JF, Hashimoto S, Pian M, McElroy MC, Nitenberg G, Wiener-Kronish JP. Exotoxin A stimulates fluid reabsorption from distal airspaces of lung in anesthetized rats. *The American journal of physiology*. 1996 Feb;270(2 Pt 1):L232-41.
214. Garat C, Rezaiguia S, Meignan M, D'Ortho MP, Harf A, Matthay MA, et al. Alveolar endotoxin increases alveolar liquid clearance in rats. *J Appl Physiol*. 1995 Dec;79(6):2021-8.
215. Rezaiguia S, Garat C, Delclaux C, Meignan M, Fleury J, Legrand P, et al. Acute bacterial pneumonia in rats increases alveolar epithelial fluid clearance by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation*. 1997 Jan 15;99(2):325-35.
216. Berthiaume Y. Tumor necrosis factor and lung edema clearance: the tip of the iceberg? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2003 Nov 1;168(9):1022-3.
217. Fukuda N, Jayr C, Lazrak A, Wang Y, Lucas R, Matalon S, et al. Mechanisms of TNF-alpha stimulation of amiloride-sensitive sodium transport across alveolar epithelium. *American journal of physiology*. 2001 Jun;280(6):L1258-65.
218. Dehler M, Zessin E, Bartsch P, Mairbaur H. Hypoxia causes permeability oedema in the constant-pressure perfused rat lung. *Eur Respir J*. 2006 Mar;27(3):600-6.
219. Planes C, Friedlander G, Loiseau A, Amiel C, Clerici C. Inhibition of Na-K-ATPase activity after prolonged hypoxia in an alveolar epithelial cell line. *The American journal of physiology*. 1996 Jul;271(1 Pt 1):L70-8.
220. Suzuki S, Noda M, Sugita M, Ono S, Koike K, Fujimura S. Impairment of transalveolar fluid transport and lung Na(+)-K(+)-ATPase function by hypoxia in rats. *J Appl Physiol*. 1999 Sep;87(3):962-8.
221. Vivona ML, Matthay M, Chabaud MB, Friedlander G, Clerici C. Hypoxia reduces alveolar epithelial sodium and fluid transport in rats: reversal by beta-adrenergic agonist treatment. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001 Nov;25(5):554-61.
222. Lecuona E, Saldias F, Comellas A, Ridge K, Guerrero C, Sznajder JJ. Ventilator-associated lung injury decreases lung ability to clear edema in rats. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999 Feb;159(2):603-9.
223. Frank JA, Gutierrez JA, Jones KD, Allen L, Dobbs L, Matthay MA. Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-injured rat lungs. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002 Jan 15;165(2):242-9.
224. Frank JA, Pittet JF, Lee H, Godzich M, Matthay MA. High tidal volume ventilation induces NOS2 and impairs cAMP- dependent air space fluid clearance. *American journal of physiology*. 2003 May;284(5):L791-8.
225. Frank JA, Wray CM, McAuley DF, Schwendener R, Matthay MA. Alveolar macrophages contribute to alveolar barrier dysfunction in ventilator-induced lung injury. *American journal of physiology*. 2006 Dec;291(6):L1191-8.
226. Vadasz I, Morty RE, Olschewski A, Konigshoff M, Kohstall MG, Ghofrani HA, et al. Thrombin impairs alveolar fluid clearance by promoting endocytosis of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2005 Oct;33(4):343-54.
227. Khimenko PL, Barnard JW, Moore TM, Wilson PS, Ballard ST, Taylor AE. Vascular permeability and epithelial transport effects on lung edema formation in ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol*. 1994 Sep;77(3):1116-21.
228. Frank JA, Wang Y, Osorio O, Matthay MA. Beta-adrenergic agonist therapy accelerates the resolution of hydrostatic pulmonary edema in sheep and rats. *J Appl Physiol*. 2000 Oct;89(4):1255-65.
229. McGraw DW, Fukuda N, James PF, Forbes SL, Woo AL, Lingrel JB, et al. Targeted transgenic expression of beta(2)-adrenergic receptors to type II cells increases alveolar fluid clearance. *American journal of physiology*. 2001 Oct;281(4):L895-903.
230. Sartori C, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights. *Eur Respir J*. 2002 Nov;20(5):1299-313.

231. Matthay MA, Wiener-Kronish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *The American review of respiratory disease*. 1990 Dec;142(6 Pt 1):1250-7.
232. Verghese GM, Ware LB, Matthay BA, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport and the resolution of clinically severe hydrostatic pulmonary edema. *J Appl Physiol*. 1999 Oct;87(4):1301-12.
233. Ware LB, Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2001 May;163(6):1376-83.
234. Pugin J, Verghese G, Widmer MC, Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine*. 1999 Feb;27(2):304-12.
235. Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999 Mar;159(3):980-8.
236. Sartori C, Allemann Y, Duplain H, Lepori M, Egli M, Lipp E, et al. Salmeterol for the prevention of high-altitude pulmonary edema. *The New England journal of medicine*. 2002 May 23;346(21):1631-6.
237. Perkins GD, McAuley DF, Thickett DR, Gao F. The beta-agonist lung injury trial (BALTI): a randomized placebo-controlled clinical trial. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006 Feb 1;173(3):281-7.
238. Olivera W, Ridge K, Wood LD, Sznajder JJ. ANF decreases active sodium transport and increases alveolar epithelial permeability in rats. *J Appl Physiol*. 1993 Oct;75(4):1581-6.
239. Mutlu GM, Adir Y, Jameel M, Akhmedov AT, Welch L, Dumasius V, et al. Interdependency of beta-adrenergic receptors and CFTR in regulation of alveolar active Na<sup>+</sup> transport. *Circulation research*. 2005 May 13;96(9):999-1005.
240. Dagenais A, Frechette R, Clermont ME, Masse C, Prive A, Brochiero E, et al. Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity. *American journal of physiology*. 2006 Dec;291(6):L1220-31.
241. Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature*. 1962 May 5;194:495-6.
242. Ernst EJ, Hashimoto S, Guglielmo J, Sawa T, Pittet JF, Kropp H, et al. Effects of antibiotic therapy on *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury in a rat model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999 Oct;43(10):2389-94.
243. Fukuda N, Folkesson HG, Matthay MA. Relationship of interstitial fluid volume to alveolar fluid clearance in mice: ventilated vs. in situ studies. *J Appl Physiol*. 2000 Aug;89(2):672-9.
244. Taylor FB, Jr. Studies on the inflammatory-coagulant axis in the baboon response to *E. coli*: regulatory roles of proteins C, S, C4bBP and of inhibitors of tissue factor. *Progress in clinical and biological research*. 1994;388:175-94.
245. Maybauer MO, Maybauer DM, Fraser JF, Traber LD, Westphal M, Enkhbaatar P, et al. Recombinant human activated protein C improves pulmonary function in ovine acute lung injury resulting from smoke inhalation and sepsis. *Critical care medicine*. 2006 Sep;34(9):2432-8.
246. Dhainaut JF, Laterre PF, Janes JM, Bernard GR, Artigas A, Bakker J, et al. Drotrecogin alfa (activated) in the treatment of severe sepsis patients with multiple-organ dysfunction: data from the PROWESS trial. *Intensive care medicine*. 2003 Jun;29(6):894-903.
247. Nick JA, Coldren CD, Geraci MW, Poch KR, Fouty BW, O'Brien J, et al. Recombinant human activated protein C reduces human endotoxin-induced pulmonary inflammation via inhibition of neutrophil chemotaxis. *Blood*. 2004 Dec 15;104(13):3878-85.
248. Liu KD, Levitt J, Zhuo H, Kallet RH, Brady S, Steingrub J, et al. Randomized clinical trial of activated protein C for the treatment of acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008 Sep 15;178(6):618-23.
249. Richard JC, Bregeon F, Leray V, Le Bars D, Costes N, Tourvieille C, et al. Effect of activated protein C on pulmonary blood flow and cytokine production in experimental acute lung injury. *Intensive care medicine*. 2007 Dec;33(12):2199-206.

250. Pittet JF, Wiener-Kronish JP, Serikov V, Matthay MA. Resistance of the alveolar epithelium to injury from septic shock in sheep. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1995 Apr;151(4):1093-100.
251. Le Berre R, Faure K, Fauvel H, Viget NB, Ader F, Prangere T, et al. Apoptosis inhibition in *P. aeruginosa*-induced lung injury influences lung fluid balance. *Intensive care medicine*. 2004 Jun;30(6):1204-11.
252. McGee MP, Rothberger H. Tissue factor in bronchoalveolar lavage fluids. Evidence for an alveolar macrophage source. *The American review of respiratory disease*. 1985 Mar;131(3):331-6.
253. Chan AK, Berry L, Mitchell L, Baranowski B, O'Brodovich H, Andrew M. Effect of a novel covalent antithrombin-heparin complex on thrombin generation on fetal distal lung epithelium. *The American journal of physiology*. 1998 Jun;274(6 Pt 1):L914-21.
254. Modelska K, Matthay MA, McElroy MC, Pittet JF. Upregulation of alveolar liquid clearance after fluid resuscitation for hemorrhagic shock in rats. *The American journal of physiology*. 1997 Aug;273(2 Pt 1):L305-14.
255. Chen XJ, Seth S, Yue G, Kamat P, Compans RW, Guidot D, et al. Influenza virus inhibits ENaC and lung fluid clearance. *American journal of physiology*. 2004 Aug;287(2):L366-73.
256. Abraham E, Arcaroli J, Shenkar R. Activation of extracellular signal-regulated kinases, NF-kappa B, and cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding protein in lung neutrophils occurs by differing mechanisms after hemorrhage or endotoxemia. *J Immunol*. 2001 Jan 1;166(1):522-30.
257. Adkins WK, Barnard JW, May S, Seibert AF, Haynes J, Taylor AE. Compounds that increase cAMP prevent ischemia-reperfusion pulmonary capillary injury. *J Appl Physiol*. 1992 Feb;72(2):492-7.
258. Minnear FL, DeMichele MA, Moon DG, Rieder CL, Fenton JW, 2nd. Isoproterenol reduces thrombin-induced pulmonary endothelial permeability in vitro. *The American journal of physiology*. 1989 Nov;257(5 Pt 2):H1613-23.
259. Liu F, Verin AD, Borbiev T, Garcia JG. Role of cAMP-dependent protein kinase A activity in endothelial cell cytoskeleton rearrangement. *American journal of physiology*. 2001 Jun;280(6):L1309-17.
260. Patterson CE, Lum H, Schaphorst KL, Verin AD, Garcia JG. Regulation of endothelial barrier function by the cAMP-dependent protein kinase. *Endothelium*. 2000;7(4):287-308.
261. Basran GS, Hardy JG, Woo SP, Ramasubramanian R, Byrne AJ. Beta-2-adrenoceptor agonists as inhibitors of lung vascular permeability to radiolabelled transferrin in the adult respiratory distress syndrome in man. *European journal of nuclear medicine*. 1986;12(8):381-4.
262. Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1990 Sep 1;145(5):1430-4.
263. Izeboud CA, Monshouwer M, van Miert AS, Witkamp RF. The beta-adrenoceptor agonist clenbuterol is a potent inhibitor of the LPS-induced production of TNF-alpha and IL-6 in vitro and in vivo. *Inflamm Res*. 1999 Sep;48(9):497-502.
264. Maris NA, de Vos AF, Dessing MC, Spek CA, Lutter R, Jansen HM, et al. Antiinflammatory effects of salmeterol after inhalation of lipopolysaccharide by healthy volunteers. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005 Oct 1;172(7):878-84.
265. van der Poll T, Coyle SM, Barbosa K, Braxton CC, Lowry SF. Epinephrine inhibits tumor necrosis factor-alpha and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *The Journal of clinical investigation*. 1996 Feb 1;97(3):713-9.
266. Lalli E, Sassone-Corsi P. Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *The Journal of biological chemistry*. 1994 Jul 1;269(26):17359-62.
267. Lefkowitz RJ, Caron MG, Stiles GL. Mechanisms of membrane-receptor regulation. Biochemical, physiological, and clinical insights derived from studies of the adrenergic receptors. *The New England journal of medicine*. 1984 Jun 14;310(24):1570-9.
268. Doe S, Woods B, Perks AM. Effects of norepinephrine on lung liquid production by in vitro lungs from fetal guinea pigs. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1998 Oct-Nov;76(10-11):967-74.

269. Higuchi M, Murata Y, Miyake Y, Hesser J, Tyner J, Keegan KA, et al. Effects of norepinephrine on lung fluid flow rate in the chronically catheterized fetal lamb. *American journal of obstetrics and gynecology*. 1987 Oct;157(4 Pt 1):986-90.
270. Azzam ZS, Adir Y, Crespo A, Comellas A, Lecuona E, Dada LA, et al. Norepinephrine increases alveolar fluid reabsorption and Na,K-ATPase activity. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2004 Oct 1;170(7):730-6.
271. Norlin A, Finley N, Abedinpour P, Folkesson HG. Alveolar liquid clearance in the anesthetized ventilated guinea pig. *The American journal of physiology*. 1998 Feb;274(2 Pt 1):L235-43.
272. Sakuma T, Tuchihara C, Ishigaki M, Osanai K, Nambu Y, Toga H, et al. Denopamine, a beta(1)-adrenergic agonist, increases alveolar fluid clearance in ex vivo rat and guinea pig lungs. *J Appl Physiol*. 2001 Jan;90(1):10-6.
273. Gu X, Wang Z, Xu J, Maeda S, Sugita M, Sagawa M, et al. Denopamine stimulates alveolar fluid clearance via cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat lungs. *Respirology (Carlton, Vic)*. 2006 Sep;11(5):566-71.
274. Sakuma T, Tuchihara C, Ishigaki M, Osanai K, Nambu Y, Toga H, et al. Beta1-adrenoceptor stimulation by high-dose terbutaline downregulates terbutaline-stimulated alveolar fluid clearance in ex vivo rat lung. *Experimental lung research*. 2001 Jul-Aug;27(5):453-68.
275. Suzuki S, Zuege D, Berthiaume Y. Sodium-independent modulation of Na(+)-K(+)-ATPase activity by beta-adrenergic agonist in alveolar type II cells. *The American journal of physiology*. 1995 Jun;268(6 Pt 1):L983-90.
276. Naren AP, Cobb B, Li C, Roy K, Nelson D, Heda GD, et al. A macromolecular complex of beta 2 adrenergic receptor, CFTR, and ezrin/radixin/moesin-binding phosphoprotein 50 is regulated by PKA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003 Jan 7;100(1):342-6.
277. Taouil K, Hinrasky J, Hologne C, Corlieu P, Klossek JM, Puchelle E. Stimulation of beta 2-adrenergic receptor increases cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in human airway epithelial cells through a cAMP/protein kinase A-independent pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2003 May 9;278(19):17320-7.
278. Charron PD, Fawley JP, Maron MB. Effect of epinephrine on alveolar liquid clearance in the rat. *J Appl Physiol*. 1999 Aug;87(2):611-8.
279. Modelska K, Matthay MA, Brown LA, Deutch E, Lu LN, Pittet JF. Inhibition of beta-adrenergic-dependent alveolar epithelial clearance by oxidant mechanisms after hemorrhagic shock. *The American journal of physiology*. 1999 May;276(5 Pt 1):L844-57.
280. Lasnier JM, Wangenstein OD, Schmitz LS, Gross CR, Ingbar DH. Terbutaline stimulates alveolar fluid resorption in hyperoxic lung injury. *J Appl Physiol*. 1996 Oct;81(4):1723-9.
281. Saldias FJ, Lecuona E, Comellas AP, Ridge KM, Rutschman DH, Sznajder JI. beta-adrenergic stimulation restores rat lung ability to clear edema in ventilator-associated lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2000 Jul;162(1):282-7.
282. McAuley DF, Frank JA, Fang X, 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. *Critical care medicine*. 2004 Jul;32(7):1470-6.
283. Maron MB. Dose-response relationship between plasma epinephrine concentration and alveolar liquid clearance in dogs. *J Appl Physiol*. 1998 Nov;85(5):1702-7.
284. Sakuma T, Gu X, Wang Z, Maeda S, Sugita M, Sagawa M, et al. Stimulation of alveolar epithelial fluid clearance in human lungs by exogenous epinephrine. *Critical care medicine*. 2006 Mar;34(3):676-81.
285. Atabai K, Ware LB, Snider ME, Koch P, Daniel B, Nuckton TJ, et al. Aerosolized beta(2)-adrenergic agonists achieve therapeutic levels in the pulmonary edema fluid of ventilated patients with acute respiratory failure. *Intensive care medicine*. 2002 Jun;28(6):705-11.

# ARTICLES

Research

Open Access

## Intravenous administration of activated protein C in *Pseudomonas*-induced lung injury: impact on lung fluid balance and the inflammatory response

Laurent Robriquet<sup>1</sup>, François Collet<sup>1</sup>, Antoine Tournoys<sup>2</sup>, Thierry Prangère<sup>3</sup>, Rémi Nevière<sup>1</sup>, François Fourrier<sup>1</sup> and Benoît P Guery\*<sup>1</sup>

Address: <sup>1</sup>EA 2689, Faculté de Médecine-Université de Lille 2- 1 place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France, <sup>2</sup>Laboratoire d'Hématologie CHRU Lille, Hôpital Salengro, Bd Pr Lecleq, 59037 Lille Cedex, France and <sup>3</sup>Laboratoire de Biophysique- Service de Médecine Nucléaire-Faculté de Médecine/CHRU de Lille- 1 place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

Email: Laurent Robriquet - l-robriquet@chru-lille.fr; François Collet - francoiscollet@club-internet.fr; Antoine Tournoys - a-tournoys@chru-lille.fr; Thierry Prangère - t-prangere@chru-lille.fr; Rémi Nevière - r-neviere@chru-lille.fr; François Fourrier - f-fourrier@chru-lille.fr; Benoît P Guery\* - bguery@invivo.edu

\* Corresponding author

Published: 22 March 2006

Received: 03 January 2006

*Respiratory Research* 2006, 7:41 doi:10.1186/1465-9921-7-41

Accepted: 22 March 2006

This article is available from: <http://respiratory-research.com/content/7/1/41>

© 2006 Robriquet et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** Acute lung injury (ALI) induces a coagulation/fibrinolysis imbalance and leads to fibrin deposition. The protein C pathway is an important regulator of the coagulation system and reduces the inflammatory response. The aim of the study was to examine the effects of recombinant human activated protein C (rhAPC) in the early phase of *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*)-induced lung injury.

**Methods:** The study was conducted in vivo on a rat model of *Pa*-induced ALI. Continuous intravenous (IV) rhAPC was administered simultaneously with intratracheal (IT) *Pa*. We instilled into the airspaces a 5% bovine albumin solution with 1  $\mu$ (Ci of <sup>125</sup>I-albumin and injected IV 1  $\mu$ (Ci of <sup>111</sup>In-albumin to measure lung liquid clearance (LLC) and endothelial injury. Cytokines levels (TNF $\alpha$  and IL-6) and thrombin-antithrombin (TAT) complexes were measured in blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) at 4 hours. Four groups were compared: control (CTR), pneumonia (PNP) receiving IT *Pa* (0.5 ml/kg of  $1 \times 10^9$  cfu), APC: IV rhAPC (300  $\mu$ g/kg/h), A-PNP: IT *Pa* /IV rhAPC.

**Results:** Alveolar-capillary permeability was increased in the PNP versus the CTR group ( $0.28 \pm 0.08$  vs.  $0.03 \pm 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). IV rhAPC in *Pa*-induced ALI led to further injury ( $0.47 \pm 0.17$  vs.  $0.28 \pm 0.08$ ,  $p = 0.2$ ). The LLC was significantly decreased in the A-PNP group compared to PNP group ( $9.1 \pm 4.3\%$  vs.  $33.4 \pm 2.6\%$ ,  $p < 0.05$ ). The lung wet to dry weight ratio was significantly increased in the PNP group ( $4.62 \pm 0.31$ ) compared to the CTR group ( $3.87 \pm 0.22$ ,  $p < 0.05$ ). IV rhAPC administration tends to increase this parameter in *Pa*-induced ALI ( $5.80 \pm 0.66$ ,  $p = 0.07$ ). These findings were associated with a loss of inflammatory response compartmentalization measured by TNF $\alpha$  and IL-6 systemic levels. TAT complexes in BALF were increased in the A-PNP group ( $23.17 \pm 2.89$  ng/ml) compared to the CTR group ( $0.92 \pm 0.17$  ng/ml,  $p < 0.05$ ) and the PNP group ( $11.06 \pm 2.76$  ng/ml,  $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** rhAPC reduces LLC following *Pa*-induced ALI and may influence pulmonary edema formation. The early massive fibrin formation is probably beneficial in ALI limiting both the extent of injury and permeability disorders.

## Background

*Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*) is one of the most frequent pathogens involved in nosocomial pneumonia [1]. This Gram-negative bacillus is associated with a mortality rate reaching 70% in some studies and an attributable mortality approaching 40% [2]. Instillation of this pathogen into the air spaces increases the protein permeability of the lung barrier to induce both interstitial and alveolar edema [3]. Active ion transport is the primary mechanism driving alveolar liquid clearance in the normal lung [4]. The maintenance of active ion transport is critical for the resolution of alveolar edema [5,6]. Moreover, improvement of fluid reabsorption from the air spaces in the *Pa*-induced lung injury in an experimental rat model of pneumonia is associated with a decrease in mortality [7].

Despite the improvement of ventilatory strategies, Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), the most severe form of acute lung injury (ALI), is associated with a mortality estimated to 35 % [8]. ALI is characterized by a sequence of pathological events which can be subdivided into three phases: the acute or exsudative phase, a sub-acute or proliferative phase, and finally a chronic or fibrotic phase [9,10]. During the exsudative phase, extensive epithelial and endothelial damages result in intra-alveolar deposition of fibrin [11], which is the hallmark of a shift in the coagulation/fibrinolysis balance.

Several studies focused on this pro-coagulative imbalance during ALI: an increase in bronchoalveolar pro-coagulant activity associated with a depressed bronchoalveolar fibrinolysis activity has been found in animal models as well as humans [12-14]. In fact, depressed bronchoalveolar urokinase plasminogen activator activity was found in clinical ARDS [15], this decreased bronchoalveolar fibrinolysis activity was associated with an increased fibrinolysis inhibition related to plasminogen activator inhibitor (PAI-1) [14]. As a consequence to this procoagulant activity associated with decreased fibrinolysis activity, a fibrotic evolution could be triggered [14,16] and influence patient's outcome [17]. From these data, the modulation of the lung coagulation/fibrinolysis balance appears to be a potential therapeutic approach in ALI and ARDS [18].

Protein C is a natural anticoagulant with an important role in coagulation homeostasis through proteolytic cleavage and inactivation of factors Va and VIIIa [19]. Activated protein C has also been shown to restore a pro-fibrinolytic activity by inhibiting PAI-1, and to reduce the inflammatory response through a limitation of thrombin generation and a modulation of nuclear factor-(B translocation [19]. In vivo, activated protein C reduces pulmonary injury in a model of LPS-induced ALI [20]. Moreover, a therapeutic effect was observed in septic baboons [21]

and in humans severe sepsis with a major decrease in mortality [22].

The aim of our study was therefore to evaluate, in a rat model, the effects of recombinant human activated protein C (rhAPC) in the early phase of *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury. We evaluated the effect of rhAPC co-administration in a rat model of *Pa*-induced lung injury on lung permeability and lung fluid movement. Finally, alveolar and systemic cytokines were measured along with coagulation parameters to complete these functional studies.

## Methods

### 1. Animals

Specific pathogen-free Sprague Dawley rats (n = 50) (280–320 g, Charles River Laboratoires France, St Germain/l'Arbresle, France) were housed in the Lille University Animal Care Facility and allowed food and water ad lib. All experiments were performed with approval of the Lille Institutional Animal Care and Use Committee.

### 2. In vivo study

#### 2.1. Surgical preparation

Sprague-Dawley male rats were anesthetized with pentobarbital (Sanofi, Libourne, France). An endotracheal tube (PE-220) was inserted through a tracheotomy. The rats were ventilated with a constant volume pump (Harvard Apparatus, South Natick, MA), with an inspired O<sub>2</sub> fraction of 1.0, a respiratory rate of 60/min and a positive end expiratory pressure of 2 cmH<sub>2</sub>O. A catheter (PE-50) was inserted into the left carotid artery to monitor systemic arterial pressure and obtain blood samples. Low molecular weight heparin was injected into the catheter (100 UI/kg). Pancuronium bromide (0.3 mg/kg/h iv) was administered to achieve neuromuscular blockade.

#### 2.2. General protocol

For all experiments, the following general protocol was used. After the surgical preparation, heart rate and blood pressure were allowed to stabilize. The rat was then placed in left lateral decubitus to facilitate liquid deposition into the left lung.

To calculate the flux of plasma protein into the lung interstitium, a vascular tracer, 1 μCi of <sup>111</sup>In-labeled human serum albumin (HSA), was injected into the bloodstream [7,23]. <sup>111</sup>In-HSA was prepared in our institution according to a standardized technique [24]. To calculate the alveolar liquid clearance, 3 ml/kg of a 5% bovine albumin solution containing 1 μCi of <sup>125</sup>I-albumin were instilled 30 min later into the left lung over a 2-min period, using a 1-ml syringe and polypropylene tube (0.5 mm internal diameter) [7,23].

One hour after the beginning of albumin instillation, the abdomen was opened, and the rat was exsanguinated. Urine was sampled for radioactivity levels. The lungs were removed through a sternotomy, and fluid from the distal airspaces was obtained by passing a propylene tube (0.5 mm internal diameter) into a wedged position in the left lower lobe. The total protein concentration and the radioactivity of the liquid sampled were measured. Right and left lungs were homogenized separately for water to dry weight ratio measurements and radioactivity levels.

### 2.3. Preparation of albumin instillate

The test solution used for albumin instillation was prepared as follows: briefly, a 5% bovine albumin solution was prepared using Ringer lactate and adjusted with NaCl to be isoosmolar with the rat circulating plasma [7,23]. We added 1  $\mu$ Ci of  $^{125}$ I-labeled human serum albumin ( $^{125}$ I-HSA; CIS biointernational, Gif sur Yvette, France) to the 5% albumin solution. Anhydrous Evan's blue dye (0.5 mg) was added to confirm the location of the instillate at the end of the study. A sample of the instilled solution was saved for total protein measurement, radioactivity counts, and water to dry weight ratio measurements so that the dry weight of the protein solution could be subtracted from the final lung water calculation.

### 2.4. Measurements

**Hemodynamics, pulmonary gas exchange, and protein concentration**  
Systemic arterial pressure and airway pressures were measured continuously (Acknowledge Software v3.7.1, Biopac Systems, Santa Barbara, CA, USA). Arterial blood gases were measured at one-hour intervals (ABL 520, Radiometer, Copenhagen). The arterial  $PO_2$  was used to quantify the oxygenation deficit [25]. Samples from instilled protein solution, final distal airspace fluid, initial and final blood were collected to measure total protein concentration with an automated analyzer (Hitachi 917, Japan).

### Lung barrier function study

Permeability of the alveolar-capillary barrier was assessed with the measure of the albumin flux.  $^{111}$ In-albumin counts in the final airspace sample were compared to plasma  $^{111}$ In-albumin counts averaged over the course of the experiment; permeability to the tracer was expressed as a ratio of airspace to plasma counts (Asp/Plasma). As previously shown [3], this ratio provides a good index of equilibration of the vascular protein tracer into the alveolar compartment.

Accumulation of the vascular protein tracer into the extravascular space of the lung was calculated by determining the total extravascular count of  $^{111}$ In-albumin in the lung divided by the average counts in the plasma over the study period and was expressed as total plasma equivalents (TPE) in microliters [26].

### Lung liquid clearance

The extravascular lung water (EVLW) was measured by the gravimetric method [7,25]. For each animal, the noninstilled lung was used to calculate EVLW and estimate lung liquid clearance (LLC) [25,25].

### Alveolar fluid movement

Changes of native bovine albumin concentration over the study period (1 h) were used to measure alveolar fluid movement. The term "alveolar" does not imply that all fluid reabsorption occurred at the alveolar level, since some reabsorption may have occurred across distal bronchial epithelium.

The alveolar liquid clearance (ALC) was measured by the ratio of the final unlabeled alveolar protein concentration, compared to the initial instilled alveolar protein concentration ( $ALC_{prot}$ ) [23,27]. The concentrations of alveolar  $^{125}$ I-albumin were also used to estimate alveolar liquid clearance ( $ALC_{125}$ ) [27].

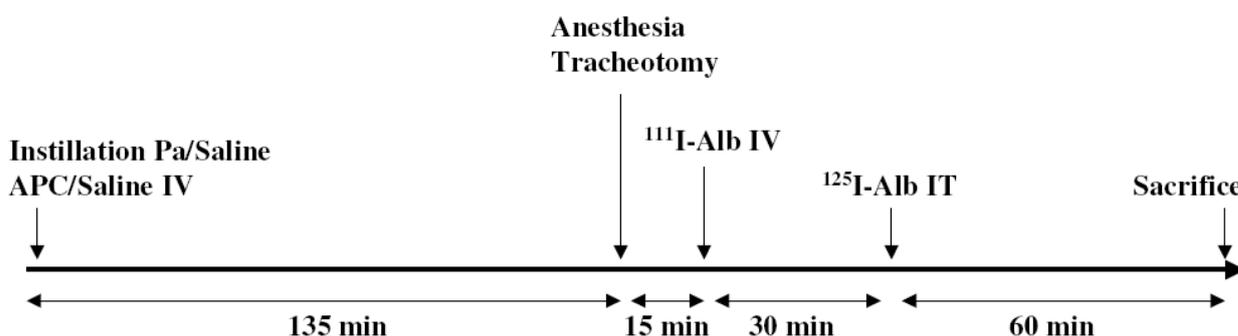
Measuring alveolar liquid clearance with this methodology relies mainly on the calculation of the alveolar volume, which may, in the context of ALI, be falsely evaluated. We therefore had to validate this method in this particular situation. Five percent albumin solution with  $^{125}$ I-albumin was sampled one minute after albumin instillation into the airspaces of the rats with ALI. This early sampling allowed to the measurement of the change in the concentration of labeled and unlabeled protein related dilution by non-labeled protein-rich alveolar edema fluid [27]. We performed the experiments in three animals and observed no change in labeled and unlabeled protein (data not shown).

### 3. P. aeruginosa-induced lung injury

*Pseudomonas aeruginosa* (PaO1 strain) was incubated in 125 ml of tryptic soy broth at 37°C in a rotating shaking water bath for 8 hours. The culture was then washed twice with phosphate-buffered saline, and resuspended in phosphate-buffered saline. The resulting bacterial suspension was at  $1 \times 10^9$  CFU/ml. ALI was produced according to the method described by Pennington and Ehrie [28]. Under short ether anesthesia, a small midline incision was made on the neck ventral surface after swabbing it with ethanol. The trachea was exposed by blunt dissection. Using a 28-gauge needle, 0.5 ml/kg of bacterial suspension was instilled into the trachea, followed by injection of 0.5 ml of air. The animals were studied in vivo 4 hours after instillation of bacteria.

### 4. Recombinant human activated protein C

Recombinant human activated protein C (rhAPC) was generously provided by Lilly SAS (Saint-Cloud, France). Animals were anesthetized with 60 mg/kg of ketamine



**Figure 1**

Experimental protocol over time. The animals are followed during a four hours period. After the instillation of *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) or isotonic saline, rhAPC (APC) or saline is injected continuously during the next four hours of the experiment. After anesthesia and tracheotomy,  $^{111}\text{I}$ -labeled albumin is injected intravenously (IV), 150 minutes after the beginning of the experiment. Sixty minutes prior to sacrifice,  $^{125}\text{I}$ -labeled albumin is instilled intratracheally (IT). The animals are then sacrificed for each of the functional studies described in the method section.

associated with 1 mg/kg of chlorpromazine chlorhydrate intra-muscularly. A Silastic catheter (Dow coming Corporation, Milland, MI) was inserted into the superior vena cava via the right external jugular vein. The catheter was tunneled subcutaneously to the interscapular region. Resuspended rhAPC was then continuously administered at 300 ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ ) during 4 hours intravenously. This dosage regimen was chosen according to manufacturer's recommendation, taking into account the species differences in rhAPC activity.

#### 5. Bronchoalveolar lavage (BAL)

Lungs from each experimental group were lavaged with a total of 20 ml in 5-ml aliquots of PBS with 3 mM EDTA. The returned fluid was pooled and centrifuged (200 g for 10 min), and the cellular pellet was washed two times in PBS. A cell count was performed directly with a hemocytometer, and the total number of cells was calculated. Cellular monolayers were prepared with a cytocentrifuge and stained with Wright-Giemsa stain. Cellular morphotype differential was obtained by counting 200 cells/sample and expressing each type of cell as a percentage of the total number counted.

#### 6. Cytokines assays

Levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$  and interleukin 6 (IL-6) were determined after treatment by use of commercially immunoassay kits (ELISA) specific for rat cytokines (respectively, Quantikine Murine rat TNF $\alpha$  and Quantikine Murine rat IL-6, R&D Systems, Abingdon OX, UK). The reading was performed with a microplate reader Digiscan (Spectracount Packard Instrument Company; Meriden CT USA). Levels were measured in the serum and

in BAL fluids of animals from each group 4 hours post-instillation of bacteria.

#### 7. Coagulation

The following parameters were measured 4 hours post-instillation of bacteria in blood samples obtained through direct aortic catheterization of anesthetized rats from each group: leukocyte and platelet counts, prothrombin time, fibrinogen and thrombin-antithrombin (TAT) complex concentrations. Measurements of TAT complexes were used as markers of thrombin formation [33]. TAT complexes were also measured in BAL fluids. Platelet and leukocyte counts were obtained on EDTA-treated uncoagulated blood. For coagulation assays, blood (four parts) was collected into sodium citrate 3.8% (one part). Platelet depleted plasma was separated by centrifugation (15°C at 2500 g for 15 min). Prothrombin time, fibrinogen concentration (Clauss' method) were measured immediately by standard procedures. These two parameters were measured to detect the occurrence of an overt intravascular coagulation leading to a consumptive coagulopathy and fibrinogen depletion. Other assays were performed on frozen plasma or BAL fluid stored at -80°C. TAT complexes were measured on citrated samples by an enzyme-linked immunosorbent assay method (Enzygnost® TAT, Behringwerke AG, Marburg, Germany).

#### 8. Experimental groups

Animals were randomized to one of four groups with a sample size of 5 animals per group in each series of experiments (in vivo permeability, alveolar liquid clearance, BAL, cytokines, histology and coagulation studies):

**Table 1: In-vivo systolic arterial pressure (SAP), airway pressure (AWP) and PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio after a 30 minutes stabilization period.**

Group	SAP (mm Hg)	AWP (cm H <sub>2</sub> O)	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>
CTR	127 ± 5	4.3 ± 0.4	420 ± 37
APC	118 ± 16	4.8 ± 0.6	483 ± 47
PNP	123 ± 20	4.1 ± 0.3	386 ± 33
A-PNP	104 ± 12	4.1 ± 0.6	215 ± 26†‡

Data are means ± SEM. †p < 0.05 vs. CTR, ‡p < 0.05 vs. PNP.

- Control group (CTR): saline (0.5 ml/kg intratracheal injection)

- Pa (PNP): Pa (0.5 ml/kg of 1 × 10<sup>9</sup> cfu intratracheal inoculum)

- rhAPC group (APC): saline (0.5 ml/kg intratracheal injection), treated (300 µg/kg/h IV rhAPC)

- rhAPC/Pa group (A-PNP): Pa (0.5 ml/kg of 1 × 10<sup>9</sup> cfu intratracheal inoculum), treated (300 µg/kg/h IV rhAPC).

For each protocol the timing was similar as represented on Figure 1

### 9. Statistical analysis

Results are presented as mean ± SEM. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis test and the Mann Whitney test where appropriate. P values less than 0.05 were regarded as statistically significant. StatView 4.57 (Abacus Concept, Berkeley, CA, USA) software was used. A Bonferroni correction was used for multiple analysis.

## Results

### **rhAPC administration worsens oxygenation impairment in P.aeruginosa lung injury**

Systemic arterial and airway pressures showed no significant differences between the different groups in any series of experiments (Table 1). PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio showed no statistically significant differences between CTR, APC and PNP groups. However, rhAPC administration significantly impaired oxygenation compared to CTR and PNP groups (Table 1).

### **rhAPC does not further increase alveolar-capillary protein permeability in early P. aeruginosa-induced lung injury**

Endothelial permeability, evaluated by the leakage of the vascular marker into the alveoli (Asp/Plasma ratio), was significantly increased in the PNP group versus control animals (0.28 ± 0.08 vs. 0.03 ± 0.01, p < 0.05). Concomitant administration of rhAPC further increased this leakage compared to the PNP group, but the difference did not reach a statistical significance (0.47 ± 0.17 vs. 0.28 ± 0.08, p = 0.2) (Figure 2). Consistent with this finding, bacterial instillation led to a significant increase in total plasma

equivalents (TPE) compared to the CTR group (0.22 ± 0.03 vs. 0.07 ± 0.03, p < 0.05). rhAPC administration increased TPE in the A-PNP group compared to the PNP group, but this increase remained below a statistical significance (0.37 ± 0.15 vs. 0.22 ± 0.03, p = 0.33) (Figure 2).

### **rhAPC administration induces an increase in extra-vascular lung water and a decrease in LLC**

The lung wet to dry weight (W/D) ratio was significantly increased in the PNP group (4.62 ± 0.31) compared with the CTR group (3.87 ± 0.22, p < 0.05). Concomitant administration of rhAPC tended to increase the W/D ratio following Pa-induced ALI (5.80 ± 0.66, p = 0.07) (Table 2).

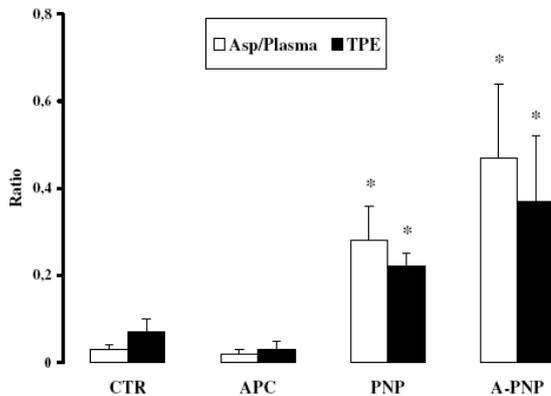
Pa-induced ALI was associated with a significant increase in LLC versus control animals. In contrast, rhAPC co-administration decreased significantly LLC compared with PNP animals (Table 2).

Alveolar fluid clearance calculated from native proteins as well as labeled proteins showed increased values in the PNP group versus the CTR group (respectively, 47.9 ± 4.7 % vs. 27.4 ± 2.8 %, p < 0.05 and 34.6 ± 4.5 % vs. 24.2 ± 2.5 %, p < 0.05). Administration of rhAPC did not influence this parameter (Figure 3).

### **rhAPC increases lung inflammatory cell recruitment in Pa-induced lung injury**

The number of inflammatory cells recovered from the BAL fluid was significantly increased in the PNP group compared with the CTR group (9.2 ± 3.5 × 10<sup>6</sup> cells/ml vs. 1.7 ± 0.7 × 10<sup>6</sup> cells/ml, p < 0.05). This value was further increased in the A-PNP group (38.1 ± 4.4 × 10<sup>6</sup> cells/ml, p < 0.05).

More than 90% of the cells were alveolar macrophages in control and APC animals. For PNP animals, neutrophils represented 85.5 ± 4.5 % of the cells. rhAPC administration induced a significant increase of neutrophils compared to the PNP group (95.7 ± 1.3 %, p < 0.05).



**Figure 2**

In-vivo alveolar-capillary protein permeability. Endothelial permeability, evaluated by determining leakage of the vascular marker ( $^{111}\text{In}$  labeled albumin) into the alveoli as assessed by the aspirate radioactivity ratio (Asp/Plasma) (white bars), was significantly increased in PNP group versus control animals ( $0.28 \pm 0.08$  vs.  $0.03 \pm 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). Concomitant rhAPC administration further increased this leakage compared to PNP animals. The accumulation of the vascular protein tracer into the extravascular space of the lung (TPE) (black bars) was increased in the PNP group versus CTR. Concomitant rhAPC administration increased TPE compared to PNP animals. Data are means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. CTR.

#### **rhAPC administration induces a loss of compartmentalization of the inflammatory response**

In the BAL fluid, TNF $\alpha$  was non detectable in CTR and APC groups. These cytokines were significantly increased in both the PNP and the A-PNP groups ( $p < 0.05$ ) (Table 3). Interestingly, in the serum, TNF $\alpha$  was non detectable, even after *Pa* instillation. rhAPC co-administration led to a significant increase in TNF $\alpha$  systemic levels ( $p < 0.05$ ). A comparable pattern was observed with IL-6, major levels were obtained in the A-PNP group ( $p < 0.05$ ), significantly higher than in the PNP group (Table 3).

#### **The levels of alveolar coagulation biomarkers are majored by rhAPC administration in *P.aeruginosa*-induced lung injury**

A significant decrease in white blood cell count was observed in *Pa* inoculated groups compared with the control group ( $p < 0.05$ ). A decreased platelet count was observed in the APC group (Table 4). Concerning plasma fibrinogen levels, a significant increase was observed in the PNP group compared with control animals ( $p < 0.05$ ), whereas a significant decrease was observed in the APC and the A-PNP groups compared with controls ( $p < 0.05$ ) (Table 4). Plasma TAT complexes were comparable between all the groups.

**Table 2: Lung wet to dry weight (W/D) ratio and lung liquid clearance (LLC) for each group.**

Group	W/D ratio	LLC (%)
CTR	$3.87 \pm 0.22$	$23.5 \pm 2.9$
APC	$4.16 \pm 0.34$	$20.3 \pm 2.2$
PNP	$4.62 \pm 0.31^*$	$33.4 \pm 2.6^\dagger$
A-PNP	$5.80 \pm 0.66^\ddagger$	$9.1 \pm 4.3^\ddagger$

Data are means  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$  versus CTR,  $^\dagger p < 0.05$  vs. CTR,  $^\ddagger p < 0.05$  vs. PNP.

In the alveoli, analysis of the BAL fluid showed a statistically significant increase in TAT complexes in the PNP group versus CTR group ( $11.06 \pm 2.76$  vs.  $0.92 \pm 0.18$  ng/ml,  $p < 0.05$ ). Moreover, TAT complexes in the BAL fluid were significantly increased in the A-PNP group, compared with the PNP group ( $23.17 \pm 2.89$  vs  $11.06 \pm 2.76$  ng/ml,  $p < 0.05$ ) (Figure 4).

#### **Discussion**

In our study, *Pa*-induced lung injury led to an increase in alveolar-capillary barrier permeability and rhAPC administration tended to increase extra-vascular lung water in the A-PNP group. Analysis of lung fluid movement showed an increase in alveolar lung clearance in pneumonic animals. If the epithelial transport was relatively preserved in our model, endothelial function alterations were observed with a decrease of lung liquid clearance after rhAPC administration in pneumonic animals. Consistent with these findings, rhAPC treated animals had a loss of lung cytokines compartmentalization as assessed with TNF $\alpha$  and IL-6 systemic levels. The analysis of coagulation parameters showed a major increase of TAT complexes in the BAL fluid associated with the increased permeability.

In the first part of our study, we showed an increase in the alveolar-capillary barrier permeability after instillation of the bacteria. Our results are consistent with previous findings, we showed a leak of the vascular tracer into the alveoli (Asp/Plasma ratio) [7,27] associated with an increase in the total plasma equivalents (TPE) [26].

Concomitant administration of rhAPC in *Pa*-induced lung injury group further tended to increase extra-vascular lung water in the A-PNP group. Murakami et al. showed that APC pretreatment could reduce permeability disorders and histological damages in a model of LPS-induced pulmonary vascular injury [29]. These effects were related to APC ability to inhibit pulmonary accumulation of leukocytes. Our results are not consistent with these findings; however, the type of injury induced in our model differs from that of Murakami et al. First, in our model, the lung injury was induced by a living bacteria instillation and not only by a component of this bacteria; toxic substances

**Table 3: TNF $\alpha$ , and IL-6 levels in blood serum and BAL fluid for each group.**

Group	TNF $\alpha$ (pg/ml)		IL-6 (pg/ml)	
	Blood serum	BAL fluid	Blood serum	BAL fluid
CTR	n.d.	n.d.	171.6 $\pm$ 17.7	83.9 $\pm$ 2.1
APC	n.d.	n.d.	142.9 $\pm$ 16.9 <sup>†</sup>	90.4 $\pm$ 14.5
PNP	n.d.	957.2 $\pm$ 337.2 <sup>†°</sup>	225.4 $\pm$ 57.0 <sup>†</sup>	2706.0 $\pm$ 1720.1 <sup>†°</sup>
A-PNP	19.3 $\pm$ 14.1 <sup>†°‡</sup>	1697.0 $\pm$ 180.8 <sup>†°‡</sup>	470.7 $\pm$ 111.5 <sup>†°‡</sup>	4452.4 $\pm$ 1283.4 <sup>†°‡</sup>

n.d.: non detectable.

Data are means  $\pm$  SEM. <sup>†</sup>p < 0.05 vs. CTR, <sup>°</sup>p < 0.05 vs. APC, <sup>‡</sup>p < 0.05 vs. PNP.

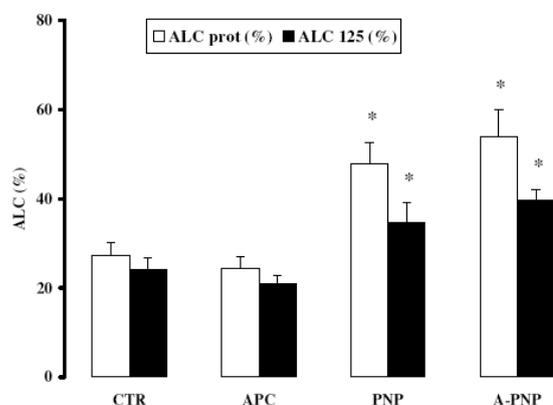
(such as exotoxins) released by living *P. aeruginosa* could explain the severity of the injury observed in our study. Second, in the study of Murakami et al., the injury only involved the endothelial side of the alveolar-capillary barrier, when our model involves both sides [3]. Finally, in our model, rhAPC administration was concomitant with the *Pa*-induced lung injury; animals were pre-treated in the study of Murakami et al.

An important and unexpected finding of this study was that rhAPC reduced LLC in the A-PNP group. LLC, *i.e.* the portion of the instillate which left not only the alveoli but also the lung, was increased by the bacterial insult in the PNP group. Concomitant rhAPC administration was responsible for a significant alteration of this parameter. Pulmonary edema resorption involves two main path-

ways: vascular and lymphatic [30]. The alveolar-capillary barrier permeability was altered in both the A-PNP and the PNP groups. The lung W/D weight ratio is the result of the combination of ALC and LLC. In the PNP group, the balance between alveolar liquid clearance and lung liquid clearance could limit the increase in the lung W/D weight ratio and therefore preserve gas exchange. In the A-PNP group, the alteration of the endothelial barrier was probably responsible for the decrease in the lung liquid clearance, as a consequence, lung W/D weight ratio increased and gas exchange was altered. In this hypothesis, the worsening of the oxygenation was not related to alveolar flooding but to mismatched of V/Q. Our findings are consistent with previous results of others indicating that alveolar epithelium is more resistant than the lung endothelium to acute lung injury [31-33]. We have also previously shown in another model that this discrepancy between ALC and LLC could be related to the endothelial barrier [34]. Here, the increase in endothelial permeability in the A-PNP group seems to overwhelm alveolar transport and as a consequence be responsible for alveolar flooding.

We found a preservation of alveolar liquid clearance (ALC) assessed by native and labeled albumin concentration variations. Four hours after bacterial instillation, ALC was significantly increased compared to the control group. We observed an increase from 27% to 48%, consistent with previously published studies which showed an increase from 30% to 45% in a comparable model [27]. In these studies, the increase in ALC was related to a TNF $\alpha$ -dependent mechanism [27] since it was completely prevented by anti-TNF $\alpha$  antibody pretreatment and reproduced by TNF $\alpha$  instillation alone. In our study, we found a high BAL fluid TNF $\alpha$  level in *Pa*-induced lung injury groups, which can explain, at least partially, ALC increase.

A large number of studies has demonstrated the relationship between systemic inflammation and the coagulation system [35]. With inflammation, many cytokines are produced, among them TNF has been shown to inactivate natural inhibitors of coagulation and attenuates fibrinolysis, and IL-6 to activate coagulation [36]. We observed a major increase in BAL fluid pro-inflammatory cytokines levels in the PNP group compared to control animals,

**Figure 3**

In-vivo alveolar liquid clearance (ALC). ALC was calculated from the changes in concentration, expressed in percentages, of both labeled and unlabeled protein recovered in the aspirate. ALC calculated from native protein (ALC prot) (white bars), showed increased values in the PNP and the A-PNP groups versus the CTR group (p < 0.05). Analysis of the results obtained from labeled proteins (ALC 125) (black bars) showed comparable values; both of the values in the PNP and A-PNP groups differed statistically from the CTR group (p < 0.05). Data are means  $\pm$  SEM. \* p < 0.05 vs. CTR.

**Table 4: Standard coagulation parameters for each group at 4 hours**

Group	WBC (10 <sup>9</sup> /l)	Plt (10 <sup>9</sup> /l)	PT (%)	Fibrinogen (g/l)
CTR	6.69 ± 0.76	793 ± 59	52 ± 3	2.38 ± 0.13
APC	5.10 ± 0.91	580 ± 53 <sup>†</sup>	43 ± 2	1.93 ± 0.11
PNP	3.63 ± 0.65 <sup>†</sup>	850 ± 14 <sup>°</sup>	52 ± 1	3.22 ± 0.36 <sup>°</sup>
A-PNP	2.77 ± 0.45 <sup>†</sup>	778 ± 24 <sup>°</sup>	46 ± 3	2.36 ± 0.11 <sup>‡</sup>

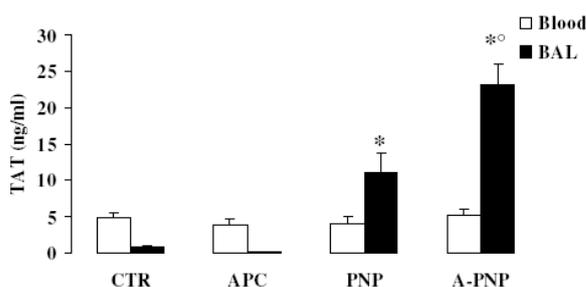
WBC: white blood cells, Plt : Platelets, PT : Prothrombin time

Data are means ± SEM. <sup>†</sup>p < 0.05 vs. CTR, <sup>°</sup>p < 0.05 vs. APC, <sup>‡</sup>p < 0.05 vs. PNP.

whereas these cytokines were non detectable or only slightly increased in the blood. TNF $\alpha$  and IL-6 are mainly released from macrophages and neutrophils both activated by different products from *P.aeruginosa* [37]. In the PNP group, locally released cytokines remained within the alveolar space [38], and blood serum cytokines levels were lower than in the alveolar compartment. In the A-PNP group, we observed a significant increase in both blood serum TNF $\alpha$  and IL-6 levels compared to CTR and PNP groups standing for a loss of compartmentalization of the inflammatory response associated with systemic mediators release [38,39].

rhAPC administration in *Pa*-induced lung injury led to a 4-fold increase in TAT complexes in the BAL fluid, whereas blood serum values were not significantly different between groups. Activated PC is a strong inhibitor of factors Va and VIIIa and downregulates thrombin formation. In our model of experimental lung injury, the increased TAT levels in the BAL fluid could represent an indirect witness of the APC induced-increase in capillary-alveolar permeability, leading to the migration and accumulation of TAT complexes at the alveolar side. The lack

of a concomitant increase in plasma TAT levels is poorly consistent with this mechanism. It is also well documented that alveolar epithelial cells are able to generate a substantial amount of thrombin independently of any intravascular coagulation activation. Alveolar macrophages are able to express tissue factor-dependent pro-coagulant activity and synthesize factor V that accelerates thrombin formation via the prothrombinase complex [40]. The rat fetal distal lung epithelium has been used in vitro to study epithelial thrombin formation and it has been shown, by Chan et al, that lung epithelial cells promote thrombin generation via the expression of factor VII dependent tissue factor activity [41]. On the other side, these epithelial cells have also significant anticoagulant properties. Bacterial LPS increases the expression of thrombomodulin in alveolar macrophages and this effect could enhance the activation of Protein C in the thrombin-thrombomodulin complex. Epithelial cells express on their cell surface glycoaminoglycans able to bind to plasma Antithrombin (AT) and leading to the generation of TAT complexes in the alveolar fluid [41]. We could document in a previous study that the levels of alveolar TAT complexes were greatly enhanced when recombinant human AT was infused intravenously in the same *Pa* model, showing that a substantial amount of thrombin had been generated in the alveolar fluid [42]. Therefore, the possibility must be considered that the increase in TAT alveolar levels observed in the present study after intravenous APC infusion, might reflect the perturbation of the complex pro and anti coagulation balance at the alveolar level. Additionally, the effects of rhAPC on endothelial permeability and epithelial cells are not uniform. Experimental studies have shown that they may differ according to the animal model, the dosage regimen, and the infusion route. For instance, Zeng and al. have shown that contrasting with a lack of effect at low dose, higher dose ( $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ ) of rhAPC could induce an early endothelial cell leakage [43]. These data suggest that interpretation of the published in vitro and in vivo data of rhAPC and endothelial permeability should take into consideration the concentrations of rhAPC used or achieved. In the present study we used the dosage of rhAPC recommended by the manufacturer, taking into account that species differences in APC activity require higher dose in the rat model. Nevertheless we consider that our results support

**Figure 4**

Serum and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid Thrombin-Antithrombin complexes (TAT). There was no significant variation between groups in blood serum TAT complexes (white bars). However, there was a significantly increase in BAL fluid TAT complexes (black bars) in the PNP group compared to the CTR group. rhAPC administration in *Pa*-induced lung injury animals further increased BAL fluid TAT complexes. Data are means ± SEM. \* p < 0.05 vs. CTR and APC, <sup>°</sup>p < 0.05 vs. PNP.

the possibility that the infusion of rhAPC at the early stage of bacterial pneumonia might disturb the complex coagulation balance at the alveolar level and impede the initial favorable effect of coagulation activation.

Indeed, during the earliest phase of acute lung injury, the epithelial as well as the endothelial side of the alveolar-capillary barrier are involved with a fibrin deposition on both sides reflecting the shift in the alveolar coagulation/fibrinolysis balance [10]. During the first 72 hours of human ARDS, the procoagulant activity is maximal and fibrinolytic activity is decreased; then, from the fourth to the fifteenth day, fibrinolysis inhibition persists whereas the procoagulant activity is moderately increased [12,15,44,45]. In such a situation, the inhibition of fibrin formation appears to be an attractive therapeutic approach. However, the possibility of deleterious effects of enhancing fibrinolysis or inhibiting intra-alveolar coagulation in the early stages of ARDS has to be considered. The early inhibition of thrombin formation by activated PC at the endothelial side might impede the natural plugging of the capillary alveolar leak induced by the bacterial insult. This possibility is further supported by recent results from our laboratory showing in the same rat model that inhibition of thrombin formation by recombinant AT also increases lung permeability and aggravates lung damage [42]. Consistent with this hypothesis, rhAPC administration in *Pa*-induced lung injury tends to increase extravascular lung water with a loss of compartmentalization of the inflammatory response. This finding underlines the importance of early fibrin formation to limit the extent of injury.

This study has several limitations before the extrapolation of the results to clinical situations. Concerning the design of the study, we used a model of acute lung injury in the rat at the very early phase of the injury; patients are usually seen at a later phase. We used recombinant human activated C protein in a rat model, the species difference can explain the higher dose used in our study, however, the dose was chosen according to the manufacturer's recommendations at the time of the study. Finally, APC was administered concomitantly, which is better than in pre-treatment, but still far from the clinical use.

On the results obtained, we only have a limited number of animals in each group and the measure of the alveolar liquid clearance is always difficult with an increase of the alveolar barrier permeability, however, we used the classical corrections to obtain a reliable parameter [27]. Finally, the measure of the endothelial and epithelial permeability relies on the study of a double flux of markers. The results obtained reflect a combination of these two barriers permeabilities, a fine distinction could only be studied through morphological data.

## Conclusion

Our results show that administration of 300 µg/kg/h of rhAPC in the early stage of *Pa*-induced lung injury tends to increase lung edema formation with a loss of the inflammatory response compartmentalization. These effects could be related to the inhibition of thrombin formation by rhAPC, suggesting a probable beneficial role of early coagulation activation in ALI limiting both extents of injury and permeability disorders. In a later stage of ALI, the modulation of haemostasis by rhAPC could be of value to restore the fibrinolytic capacities and limit the intensity of inflammatory reaction [46].

## Authors' contributions

LR and FC were responsible for the acquisition of the data. AT performed all the measurements related to the coagulation system. TP performed the radioactive labelling of the albumin ( $I^{131}$ ). RN made substantial contributions to the drafting of the manuscript and the analysis of the data. FF and BG were involved in the acquisition of the data, the design and the conception of the study as well as the drafting of the article. All the authors read and approved the final manuscript.

## References

1. Fagon JY, Chastre J, Vuagnat A, Trouillet JL, Novara A, Gibert C: **Nosocomial pneumonia and mortality among patients in intensive care units.** *JAMA* 1996, **275**:866-869.
2. Brewer SC, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV: **Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*.** *Chest* 1996, **109**:1019-1029.
3. Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, Pittet J, Frank D, Dobbs L, Vasil ML, Matthay MA: **Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits.** *J Appl Physiol* 1993, **75**:1661-1669.
4. Sakuma T, Okaniwa G, Nakada T, Nishimura T, Fujimura S, Matthay MA: **Alveolar fluid clearance in the resected human lung.** *Am J Respir Crit Care Med* 1994, **150**:305-310.
5. Matthay MA, Wiener-Kronish JP: **Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans.** *Am Rev Respir Dis* 1990, **142**:1250-1257.
6. Ware LB, Matthay MA: **Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**:1376-1383.
7. Viget N, Guery B, Ader F, Nevière R, Alfandari S, Creusy C, Roussel-Delvallez M, Foucher C, Mason CM, Beaucaire G, Pittet JF: **Keratinocyte Growth Factor protects against *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **279**:L1199-L1209.
8. **Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network.** *N Engl J Med* 2000, **342**:1301-1308.
9. Anderson WR, Thielen K: **Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light, scanning, and transmission electron microscopy.** *Ultrastruct Pathol* 1992, **16**:615-628.
10. Tomaszewski JFJ: **Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome.** *Clin Chest Med* 2000, **21**:435-466.
11. Levi M, van Der POLL, ten CATE H, Kuipers B, Biemond BJ, Jansen HM, ten CATE JW: **Differential effects of anti-cytokine treatment on bronchoalveolar hemostasis in endotoxemic chimpanzees.** *Am J Respir Crit Care Med* 1998, **158**:92-98.
12. Idell S, James KK, Levin EG, Schwartz BS, Manchanda N, Maunder RJ, Martin TR, McLarty J, Fair DS: **Local abnormalities in coagulation and fibrinolytic pathways predispose to alveolar fibrin depo-**

- sition in the adult respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1989, **84**:695-705.
13. Idell S, James KK, Coalson JJ: Fibrinolytic activity in bronchoalveolar lavage of baboons with diffuse alveolar damage: trends in two forms of lung injury. *Crit Care Med* 1992, **20**:1431-1440.
  14. Idell S: Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003, **31**:S213-S220.
  15. Bertozzi P, Astedt B, Zenzius L, Lynch K, LeMaire F, Zapol W, Chapman HA: Depressed bronchoalveolar urokinase activity in patients with adult respiratory distress syndrome [see comments]. *N Engl J Med* 1990, **322**:890-897.
  16. Marshall R, Belling G, Laurent G: The acute respiratory distress syndrome: fibrosis in the fast lane. *Thorax* 1998, **53**:815-817.
  17. Martin C, Papazian L, Payan MJ, Saux P, Gouin F: Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome. A study in mechanically ventilated patients. *Chest* 1995, **107**:196-200.
  18. Idell S: Anticoagulants for acute respiratory distress syndrome: can they work? *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **164**:517-520.
  19. Dahlback B, Villoutreix BO: The anticoagulant protein C pathway. *FEBS Lett* 2005, **579**:3310-3316.
  20. Joyce DE, Grinnell BW: Recombinant human activated protein C attenuates the inflammatory response in endothelium and monocytes by modulating nuclear factor-kappaB. *Crit Care Med* 2002, **30**:S288-S293.
  21. Taylor FB, Chang A, Esmon CT, D'Angelo A, Vigano-D'Angelo S, Blick KE: Protein C prevents the coagulopathic and lethal effects of *Escherichia coli* infusion in the baboon. *J Clin Invest* 1987, **79**:918-925.
  22. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001, **344**:699-709.
  23. Pittet J, Wiener-Kronish JP, McElroy MC, Folkesson HG, Matthay MA: Stimulation of lung epithelial liquid clearance by endogenous release of catecholamines in septic shock in anesthetized rats. *J Clin Invest* 1994, **94**:663-671.
  24. Hnatowich DJ, Childs RL, Lanteigne D, Najafi A: The preparation of DTPA-coupled antibodies radiolabeled with metallic radioisotopes: an improved method. *J Immunol Methods* 1983, **65**:147-157.
  25. Pittet J, Hashimoto S, Pian M, McElroy MC, Nitenberg G, Wiener-Kronish JP: Exotoxin A stimulates fluid reabsorption from distal airspaces of lung in anesthetized rats. *Am J Physiol* 1996, **270**:L232-L241.
  26. Ernst EJ, Hashimoto S, Guglielmo J, Sawa T, Pittet JF, Kropp H, Jackson JJ, Wiener-Kronish JP: Effects of antibiotic therapy on pseudomonas aeruginosa-induced lung injury in a rat model [In Process Citation]. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, **43**:2389-2394.
  27. Rezaiguia S, Garat C, Delclaux C, Fleury J, Legrand P, Matthay MA, Jayr C: Acute bacterial pneumonia in rats increases alveolar epithelial fluid clearance by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *J Clin Invest* 1997, **99**:325-335.
  28. Pennington JE, Ehrie MG: Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia during immunosuppression. *J Infect Dis* 1978, **137**:764-774.
  29. Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Nakagaki T, Okabe H, Takatsuki K: Activated protein C attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting activated leukocytes in rats. *Blood* 1996, **87**:642-647.
  30. Berthiaume Y: Mechanisms of edema clearance. In *Mechanisms of edema clearance* Edited by: Weir and Reeves. Armonk, NY, Pulmonary Edema Futura Publishing Company Inc: 1998:77-94.
  31. Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Matthay MA: Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. *J Clin Invest* 1991, **88**:864-875.
  32. Pittet J, Wiener-Kronish JP, Serikov V, Matthay MA: Resistance of the alveolar epithelium to injury from septic shock in sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, **151**:1093-1100.
  33. Pittet JF, Kudoh I, Wiener-Kronish JP: Endothelial exposure to *Pseudomonas aeruginosa* proteases increases the vulnerability of the alveolar epithelium to a second injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, **18**:129-135.
  34. LeBerre R, Faure K, FAUVEL H, Viget NB, Ader F, Prangere T, Thomas AM, Leroy X, Pittet JF, Marchetti P, Guery BP: Apoptosis inhibition in *P. aeruginosa*-induced lung injury influences lung fluid balance. *Intensive Care Med* 2004.
  35. Levi M, ten CATE H: Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med* 1999, **341**:586-592.
  36. Schultz MJ, Haitsma JJ, Zhang H, Slutsky AS: Pulmonary coagulopathy as a new target in therapeutic studies of acute lung injury or pneumonia-A review. *Crit Care Med* 2006, Publish Ahead of Print.
  37. Wieland CW, Siegmund B, Senaldi G, Vasil ML, Dinarello CA, Fantuzzi G: Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* 2002, **70**:1352-1358.
  38. Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, Ohara M, Gropper MA, Frank DW, Martin TR, Wiener-Kronish JP: Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 1999, **104**:743-750.
  39. Tutor J, Mason CM, Dobard E, Beckerman R, Summer WR, Nelson S: Loss of compartmentalization of alveolar tumor necrosis factor after lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, **149**:1107-1111.
  40. McGee MP, Rothberger H: Tissue factor in bronchoalveolar lavage fluids. Evidence for an alveolar macrophage source. *Am Rev Respir Dis* 1985, **131**:331-336.
  41. Chan AK, Berry L, Mitchell L, Baranowski B, O'Brodovich H, Andrew M: Effect of a novel covalent antithrombin-heparin complex on thrombin generation on fetal distal lung epithelium. *Am J Physiol* 1998, **274**:L914-L921.
  42. Kipnis E, Guery BP, Tournays A, Leroy X, Robriquet L, Fialdes P, Neviere R, Fournier F: Massive alveolar thrombin activation in pseudomonas aeruginosa-induced acute lung injury. *Shock* 2004, **21**:444-451.
  43. Zeng W, Matter WF, Yan SB, Um SL, Vlahos CJ, Liu L: Effect of drotrecogin alfa (activated) on human endothelial cell permeability and Rho kinase signaling. *Crit Care Med* 2004, **32**:S302-S308.
  44. Fuchs-Buder T, de Moerloose P, Ricou B, Reber G, Vifian C, Nicod L, Romand JA, 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* 1996, **153**:163-167.
  45. Gunther A, Mosavi P, Heinemann S, Ruppert C, Muth H, Markart P, Grimminger F, Walrath D, Temmesfeld-Wollbruck B, Seeger W: Alveolar Fibrin Formation Caused by Enhanced Procoagulant and Depressed Fibrinolytic Capacities in Severe Pneumonia. Comparison with the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **161**:454-462.
  46. Yasui H, Gabazza EC, Tamaki S, Kobayashi T, Hatagi O, Yuda H, Shimizu S, Suzuki K, Adachi Y, Taguchi O: Intratracheal administration of activated protein C inhibits bleomycin-induced lung fibrosis in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**:1660-1668.

Publish with **Bio Med Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



## Protective effect of endogenous $\beta$ -adrenergic tone on lung fluid balance in acute bacterial pneumonia in mice

Xiao Su,<sup>1\*</sup> Laurent Robriquet,<sup>1\*</sup> Hans G. Folkesson,<sup>2</sup> and Michael A. Matthay<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cardiovascular Research Institute, University of California, San Francisco, California; and <sup>2</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Northeastern Ohio Universities College of Medicine, Rootstown, Ohio

Submitted 29 July 2005; accepted in final form 3 November 2005

**Su, Xiao, Laurent Robriquet, Hans G. Folkesson, and Michael A. Matthay.** Protective effect of endogenous  $\beta$ -adrenergic tone on lung fluid balance in acute bacterial pneumonia in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L769–L776, 2006. First published November 11, 2005; doi:10.1152/ajplung.00334.2005.—Some investigators have reported that endogenous  $\beta$ -adrenoceptor tone can provide protection against acute lung injury. Therefore, we tested the effects of  $\beta$ -adrenoceptor inhibition in mice with acute *Escherichia coli* pneumonia. Mice were pretreated with propranolol or saline and then intratracheally instilled with live *E. coli* ( $10^7$  colony-forming units). Hemodynamics, arterial blood gases, plasma catecholamines, extravascular lung water, lung permeability to protein, bacterial counts, and alveolar fluid clearance were measured. Acute *E. coli* pneumonia was established after 4 h with histological evidence of acute pulmonary inflammation, arterial hypoxemia, a threefold increase in lung vascular permeability, and a 30% increase in extravascular lung water as an increase in plasma catecholamine levels.  $\beta$ -Adrenoceptor inhibition resulted in a marked increase in extravascular lung water that was explained by both an increase in lung vascular permeability and a reduction in net alveolar fluid clearance. The increase in extravascular lung water with propranolol pretreatment was not explained by an increase in systemic or vascular pressures. The increase in lung vascular permeability was explained in part by anti-inflammatory effects of  $\beta$ -adrenoceptor stimulation because plasma macrophage inflammatory protein-2 levels were higher in the propranolol pretreatment group compared with controls. The decrease in alveolar fluid clearance with propranolol was explained by a decrease in catecholamine-stimulated fluid clearance. Together, these results indicate that endogenous  $\beta$ -adrenoceptor tone has a protective effect in limiting accumulation of extravascular lung water in acute severe *E. coli* pneumonia in mice by two mechanisms: 1) reducing lung vascular injury and 2) upregulating the resolution of alveolar edema.

*Escherichia coli*; alveolar fluid clearance; pulmonary edema;  $\beta$ -adrenoceptor inhibition; sodium channel

EARLIER EXPERIMENTAL WORK established that elevated endogenous epinephrine levels can increase the capacity of the alveolar epithelium to remove alveolar edema fluid in the setting of septic or hemorrhagic shock (29, 35, 36) or after an acute neurogenic insult (18). However, the effects of endogenous  $\beta$ -adrenoceptor tone on lung fluid balance have not been studied in acute severe bacterial pneumonia, the most common cause of clinical acute lung injury (10). We would predict that an acute elevation in endogenous epinephrine and norepinephrine levels during acute bacterial pneumonia might elevate alveolar fluid clearance by cAMP-dependent mechanisms (3, 7, 8, 16, 22–24, 33, 37), providing the alveolar epithelial barrier

has not been severely damaged by the bacteria or their products. Some investigations have suggested that endogenous  $\beta$ -adrenoceptor stimulation may downregulate inflammatory responses and potentially protect against the development of acute lung injury (2, 32, 34).

In this study, we selected *Escherichia coli* because it is a common cause of gram-negative bacterial pneumonia (6, 11). The primary objective was to determine whether an acute increase in endogenous catecholamine levels favorably affected lung fluid balance and arterial blood gases during the acute phase of *E. coli* pneumonia. We measured plasma epinephrine levels and examined whether  $\beta$ -adrenoceptor inhibition by propranolol, a  $\beta$ -adrenoceptor antagonist, would affect the extent of pulmonary edema. Because propranolol increased extravascular lung water by both increasing lung vascular permeability and decreasing alveolar fluid clearance, we then used amiloride to inhibit epithelial sodium channels (ENaC) to determine the quantitative contribution of a decrease in alveolar fluid clearance in the absence of any effect on lung vascular permeability.

### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and reagents.** Propranolol and amiloride were purchased from Sigma (St. Louis, MO). They were dissolved in 0.9% saline before each experiment. The catecholamine ELISA kit was from ImmunoBiological Laboratories (Hamburg, Germany).

**Animals.** For these studies, the mice (weighing 25–35 g) were housed in air-filtered, temperature-controlled units ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with food and water ad libitum. Anesthesia was induced with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The Committee on Animal Research of the University of California, San Francisco approved all the protocols.

***E. coli* preparation.** *E. coli* serotype K1 was originally isolated from the blood of a patient with biliary sepsis. The methods used to passage, store, and amplify the bacteria have been described elsewhere (25). To count *E. coli*, we measured the optical density (OD) of the diluted *E. coli* solutions using a spectrophotometer. An equation  $Y = 4.2 \times 10^8 X^{0.864}$  was used to calculate the numbers of *E. coli* ( $Y$  represents the counted number of *E. coli*, and  $X$  is the OD value of the diluted *E. coli* solution).

**Acute *E. coli* pneumonia mouse model.** A previously developed direct visualization instillation method was used to instill  $10^7$  colony-forming units (cfu) of *E. coli* into the air spaces of the lung (38). Briefly, the mouse was suspended with incisors attached to an  $\sim 60^\circ$  wood support with 3/0 suture. A cold-light source (Dolan-Jenner Industries, Lawrence, MA) with two 25-in. flexible fiber-optic arms allowed transillumination to visualize the glottis and vocal cords to deliver the 30- $\mu\text{l}$  *E. coli* solution via a PE-10 catheter. For an even

\* X. Su and L. Robriquet contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: X. Su, Cardiovascular Research Institute, Univ. of California, San Francisco, HSW 825, 505 Parnassus Ave., San Francisco, CA 94143-0130 (e-mail: xiao.su@ucsf.edu).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

distribution of the *E. coli* solution in the lung, the fluid instillate with *E. coli* was followed by 2 cmH<sub>2</sub>O pressure air inflation.

***β-Adrenoceptor inhibition.*** To achieve significant  $\beta$ -adrenoceptor inhibition, we gave the mice an intraperitoneal bolus (3 mg/kg body wt) combined with an intratracheal instillation of 50  $\mu$ l of 10<sup>-4</sup> M propranolol. The control groups were given the same amount of saline. Fifteen minutes after administration of propranolol or vehicle, the mice were intratracheally instilled with either saline or *E. coli*.

***Sodium channel inhibition.*** To reduce active sodium uptake in lung epithelia, mice were intratracheally instilled with 50  $\mu$ l of (10<sup>-4</sup> and 10<sup>-3</sup> M) amiloride. Control groups were given the same amount of saline. Immediately after instillation with amiloride or saline, the mice were intratracheally instilled with either saline or *E. coli*.

***Histology.*** After death by halothane inhalation, the chest and abdomen were rapidly opened, and the base of the heart was clamped to prevent escape of the pulmonary blood volume. The thoracic organs were removed en bloc, and 10% formalin in was intratracheally instilled at a pressure of 25 cmH<sub>2</sub>O. After 72 h of fixation, lungs were paraffin-embedded, and 5- $\mu$ m-thick sections were cut and stained with hematoxylin-eosin.

***Measurement of lung wet-to-dry weight ratio.*** Four hours after *E. coli* instillation, the mice were killed by halothane inhalation. The lungs were removed, counted in a gamma counter (Packard, Meriden, CT), weighed, and homogenized. Blood was collected through right ventricle puncture. The lung homogenate was weighed, and a portion was centrifuged (12,000 rpm, 8 min) for hemoglobin concentration in lung homogenate supernatant. Another portion of homogenate, supernatant, and blood was weighed and desiccated in an oven (60°C for 24 h) for gravimetric determination of extravascular lung water. The lung wet-to-dry weight ratio was calculated as done previously (12, 31).

***Measurement of lung vascular permeability.*** The mice were given an intraperitoneal injection of 0.05  $\mu$ Ci <sup>125</sup>I-labeled albumin immediately after intratracheal *E. coli* instillation to determine the portion of <sup>125</sup>I-albumin in the lung and plasma. Lung extravascular plasma equivalents (an index of lung vascular permeability) were calculated as counts of <sup>125</sup>I-albumin in lung tissue divided by counts of <sup>125</sup>I-albumin in plasma as performed previously (12, 31).

***Measurement of blood pressure, heart rate, right atrial pressure, and arterial blood gases.*** Fifteen minutes before the end of the experiment, two groups of spontaneously breathing mice (saline + *E. coli* and propranolol + *E. coli*) were lightly anesthetized. Afterward, under a microscope, a PE-10 catheter (filled with heparinized saline) was inserted into the right carotid artery and connected to a Biopac data collection system (Biopac Systems, Santa Barbara, CA) via a calibrated pressure transducer to record blood pressure. Arterial blood (50  $\mu$ l) was withdrawn to measure arterial blood gases with a blood gas analyzer (Diamond Diagnostics, Holliston, MA). To measure right atrial pressure, a sharpened 23-gauge plastic tubing connected with a PE-50 catheter was inserted into the isolated right jugular vein, further advanced ~1–1.5 cm, and then connected to the BIOPAC data collection system via a pressure transducer. A 3/0 suture attached to the skin was used to secure the catheter in the position. The right atrium of mice was set at the same level with the transducer.

***Measurement of alveolar fluid clearance.*** Alveolar fluid clearance measurements were obtained 4 h after either saline or *E. coli* intratracheal instillation. As in our previous studies, we determined alveolar fluid clearance by measuring the increase in the protein tracer concentration (<sup>131</sup>I-albumin, 0.1  $\mu$ Ci) over 30 min after instillation of a 5% albumin-Ringer lactate solution (osmolality 304 mosmol/l) into the trachea using an *in situ* model as previously described (13). The increase in protein concentration provides a good estimate of fluid volume removed from distal air spaces of the lung (24). Briefly, mice were anesthetized with pentobarbital sodium (200 mg/kg ip) and then exsanguinated by transection of the abdominal aorta. The instillate (10–13 ml/kg, 37°C) was then instilled into the trachea. An airway pressure of 7 cmH<sub>2</sub>O was maintained for 30 min with 100% oxygen.

Approximately 3–5 min after instillation, a baseline sample (50–100  $\mu$ l) was aspirated from the distal airways using PE-10 tubing (*time 0* sample). Thirty minutes later, a second sample was aspirated from the distal airways. Body temperature was carefully maintained at 37°C throughout the experiment with an external heating lamp and warming blanket and was monitored using a digital thermometer (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) placed in the abdominal cavity. Alveolar fluid clearance, expressed as a percentage of alveolar fluid volume absorbed during 30 min, was calculated using the equation:

$$\text{Alveolar fluid clearance} = 1 - (P_i/P_f) \times 100\%$$

where  $P_i$  is initial <sup>131</sup>I-albumin activity per gram at *time 0* and  $P_f$  is <sup>131</sup>I-albumin activity per gram at 30 min.

***Measurement of plasma catecholamine and macrophage inhibitory protein-2.*** Blood was collected via puncture of the right ventricle. The plasma was stored at minus 80°C for later analysis after centrifugation (3,000 g, 5 min). Plasma epinephrine concentrations were measured using a commercial radioimmunoassay with a sensitivity of 12 pg/ml and intra- and interassay variabilities of 5 and 12%, respectively. Anti-mouse enzyme-linked immunosorbent assay kit (B&D Systems) was used for measurement of plasma macrophage inhibitory protein (MIP)-2 (interleukin 8, mouse homolog).

***Lung bacterial cultures.*** To monitor *E. coli* growth, we collected and homogenized lungs from the *E. coli* group and propranolol + *E. coli* group in 1 ml of PBS. For each sample, 0.1 ml of serially diluted homogenate was inoculated on a Luria-Bertani agar plate. After 24 h of incubation at 37°C, the colonies of *E. coli* were counted.

***Specific study groups.*** Specific groups were included in these studies. There were four groups in the  $\beta$ -adrenoceptor inhibition studies. 1) Mice in the saline + saline group were first injected intraperitoneally with 100  $\mu$ l of 0.9% saline and intratracheally instilled with 50  $\mu$ l of 0.9% saline, and then 15 min later, they were intratracheally instilled with 0.9% saline again. 2) Mice in the propranolol + saline group were injected intraperitoneally with 100  $\mu$ l of propranolol (3 mg/kg body wt) and intratracheally instilled with 50  $\mu$ l of 10<sup>-4</sup> M propranolol, and then 15 min later, they were intratracheally instilled with 0.9% saline. 3) Mice in the saline + *E. coli* group were first injected intraperitoneally with 100  $\mu$ l of 0.9% saline and intratracheally instilled with 50  $\mu$ l of 0.9% saline, and then 15 min later, they were intratracheally instilled with 10<sup>7</sup> cfu of *E. coli* in 30  $\mu$ l of 0.9% saline. 4) Mice in the propranolol + *E. coli* group were injected intraperitoneally with 100  $\mu$ l of propranolol (3 mg/kg body wt) and intratracheally instilled with 50  $\mu$ l of 10<sup>-4</sup> M propranolol, and then 15 min later, they were intratracheally instilled with 10<sup>7</sup> cfu of *E. coli* in 30  $\mu$ l of 0.9% saline.

There were three groups in the apical sodium channel inhibition studies. 1) Mice in the saline + saline group were intratracheally instilled with 50  $\mu$ l of 0.9% saline and then intratracheally instilled with 30  $\mu$ l of 0.9% saline. 2) Mice in the saline + *E. coli* group were first intratracheally instilled with 50  $\mu$ l of 0.9% saline and then intratracheally instilled with 10<sup>7</sup> cfu of *E. coli* in 30  $\mu$ l of 0.9% saline. 3) Mice in the amiloride + *E. coli* group were first intratracheally instilled with 50  $\mu$ l of 10<sup>-4</sup> M amiloride and then intratracheally instilled with 10<sup>7</sup> cfu of *E. coli* in 30  $\mu$ l of 0.9% saline.

***Statistical analysis.*** Statistics were analyzed using SPSS software (SPSS, Chicago, IL), and results are presented as means  $\pm$  SD. One-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc test or Student's *t*-test was used (level set at  $P < 0.05$ ).

## RESULTS

***Acute *E. coli* pneumonia in mice.*** Mice instilled with *E. coli* developed respiratory acidosis (Fig. 1A), hypoxemia (Fig. 1B), and hypercapnia (Fig. 1C). Lung wet-to-dry weight ratio increased by 30% compared with saline-instilled controls (Fig. 1D). Lung histology from the *E. coli*-instilled group displayed

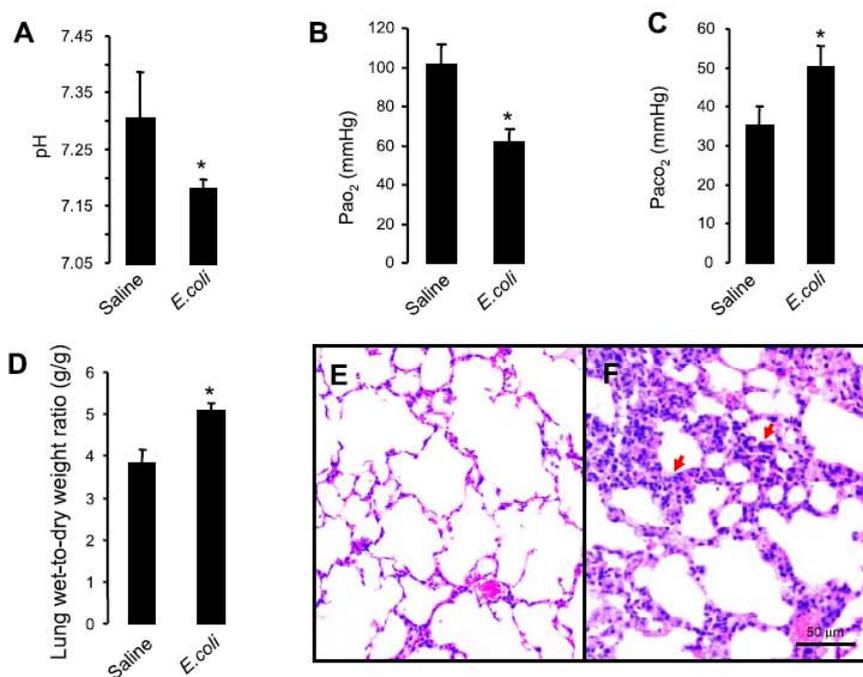


Fig. 1. Confirmation of established acute *Escherichia coli* pneumonia in mice. Arterial blood gases: pH (A), arterial O<sub>2</sub> partial pressure (PaO<sub>2</sub>; B), and arterial CO<sub>2</sub> partial pressure (Paco<sub>2</sub>; C). \**P* < 0.05 vs. saline group. D: lung wet-to-dry weight ratio. \**P* < 0.05 vs. saline group. Values are presented as means ± SD; *n* = 5 in each group. Data are pooled from 3 experiments. Representative histological changes of acute *E. coli* pneumonia are shown in saline-instilled mice (E) and in mice intratracheally instilled with 10<sup>7</sup> colony-forming units (cfu) of *E. coli* (F). Arrows indicate edematous alveolar septa and neutrophil infiltration. Magnification, ×40; scale bar, 50 μm; *n* = 4.

pulmonary edema, neutrophil infiltration, hemorrhage, congestion, and consolidation (Fig. 1F). There were no pathological changes observed in the saline-instilled group (Fig. 1E).

**Plasma catecholamine levels in acute *E. coli* pneumonia.** There was a significant increase in plasma epinephrine levels 4 h after *E. coli* intratracheal instillation. There also was a significant increase in plasma norepinephrine levels in the *E. coli*-instilled group compared with the saline-instilled group (Fig. 2).

**Effect of β-adrenoceptor inhibition on hemodynamic parameters.** We measured systemic blood pressure and heart rate to be certain that there was a pharmacological effect of propranolol. At 4 h in the propranolol + *E. coli* group, blood pressure

and heart rate were significantly lower compared with that in the saline + *E. coli* group (Fig. 3, A and B).

**Effect of β-adrenoceptor inhibition on right atrial pressure.** To be certain that cardiogenic mechanisms did not contribute to the greater quantity of lung edema in the *E. coli* group with β-adrenoceptor inhibition, we measured right atrial pressure. In control mice, mean right atrial pressure was 1.9 ± 0.5 cmH<sub>2</sub>O. In mice with *E. coli* pneumonia, the mean right atrial pressures were significantly lower than in control mice. In mice treated with propranolol, right atrial pressure was lower by another 1

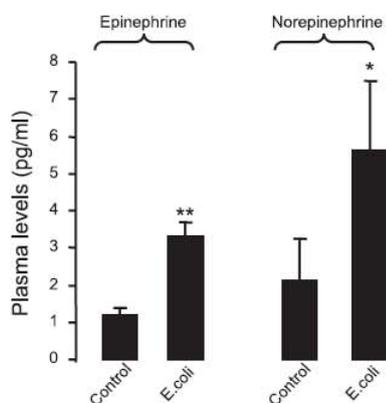


Fig. 2. Plasma levels of catecholamines (epinephrine, norepinephrine) at 4 h after intratracheal instillation with saline (*n* = 4) or *E. coli* (*n* = 4). \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01 vs. control.

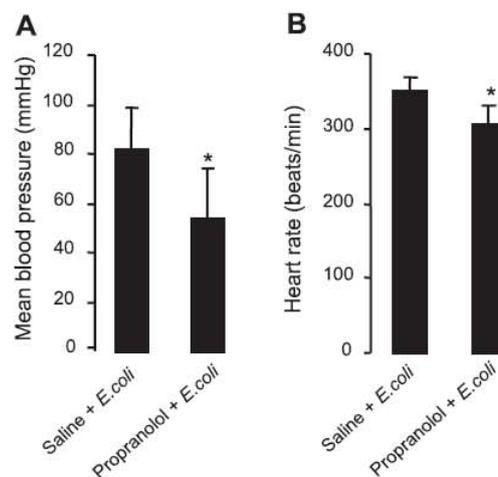


Fig. 3. Effects of β-adrenoceptor inhibition on mean arterial blood pressure (A) and heart rate (B); *n* = 6 in each group. Data are pooled from 3 experiments. \**P* < 0.05 vs. saline + *E. coli* group.

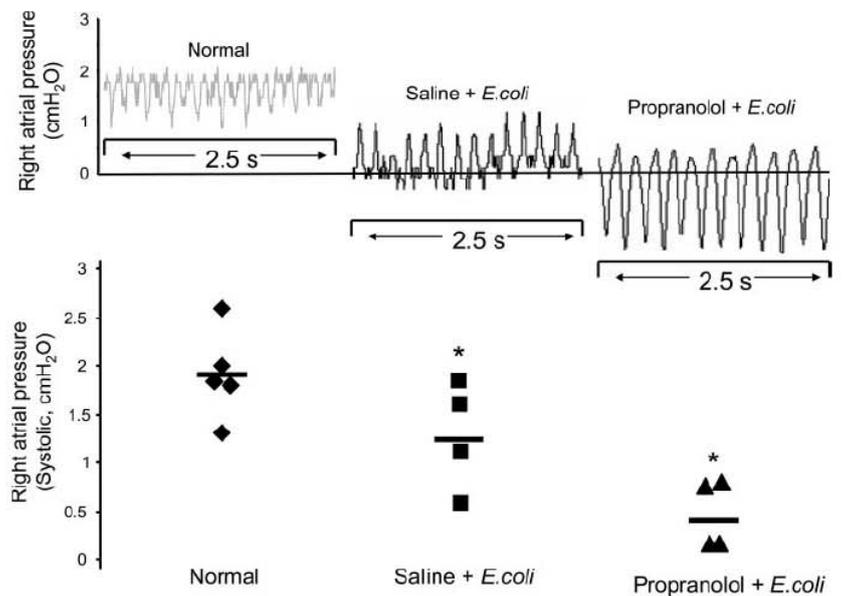


Fig. 4. Effects of  $\beta$ -adrenoceptor inhibition on right atrial pressure in *E. coli* pneumonia. *Top*: right atrial pressure tracings. *Bottom*: values of right atrial pressure in normal mice ( $n = 4$ ), mice with *E. coli* pneumonia ( $n = 4$ ), and mice with *E. coli* pneumonia ( $n = 4$ ) with  $\beta$ -adrenoceptor inhibition. Data are pooled from 3 experiments.

cmH<sub>2</sub>O, indicating that  $\beta$ -adrenoceptor inhibition did not elevate atrial pressure (Fig. 4).

**Effect of  $\beta$ -adrenoceptor inhibition on arterial blood gases in acute *E. coli* pneumonia.** At 4 h after *E. coli* instillation, there was an increased acidosis (Fig. 5A), hypoxemia (Fig. 5B), and hypercapnia (Fig. 5C) in the propranolol + *E. coli* group compared with the saline + *E. coli* group.

**Effects of  $\beta$ -adrenoceptor inhibition on *E. coli* growth in the lung.** Because a change in the number of *E. coli* organisms in the two groups could potentially account for a difference in extravascular lung water, we measured *E. coli* counts in control and propranolol-treated mice. There were no differences in *E. coli* counts in lung homogenate between the propranolol + *E. coli* group and the saline + *E. coli* group (Fig. 6).

**Effects of  $\beta$ -adrenoceptor inhibition on lung edema, lung vascular permeability, and inflammatory response in acute *E. coli* pneumonia.** After 4 h, lung wet-to-dry weight ratio in the *E. coli*-instilled group was significantly increased compared with that in the saline-instilled group.  $\beta$ -Adrenoceptor inhibi-

tion by propranolol in the *E. coli*-instilled group further increased the lung wet-to-dry weight ratio compared with that in the saline + *E. coli* group (Fig. 7A). Because  $\beta$ -adrenoceptor inhibition increased lung water, we first tested the hypothesis that  $\beta$ -adrenoceptor inhibition adversely affects lung vascular permeability. At 4 h, lung vascular permeability in the *E. coli*-instilled group was significantly increased compared with that in the saline-instilled group. Addition of  $\beta$ -adrenoceptor inhibition with propranolol in the *E. coli*-instilled group resulted in a further increase in lung vascular permeability compared with the saline + *E. coli* group (Fig. 7B). To determine whether inhibition of  $\beta$ -adrenergic tone had affected the inflammatory response, we measured plasma levels of MIP-2. Treatment with propranolol in the *E. coli*-instilled

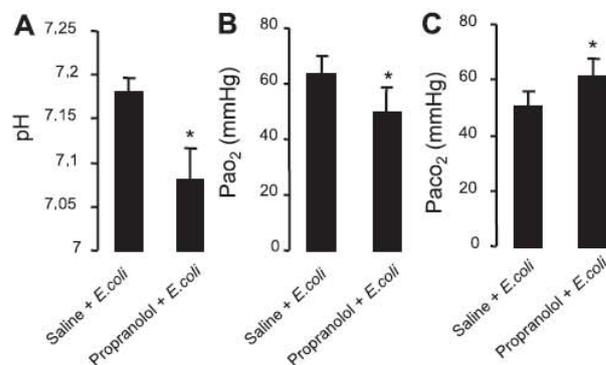


Fig. 5. Effects of  $\beta$ -adrenoceptor inhibition on arterial blood gases in *E. coli* pneumonia: pH (A), PaO<sub>2</sub> (B), and PaCO<sub>2</sub> (C);  $n = 6$  in each group. Data are pooled from 2 experiments. \* $P < 0.05$  vs. saline + *E. coli* group.

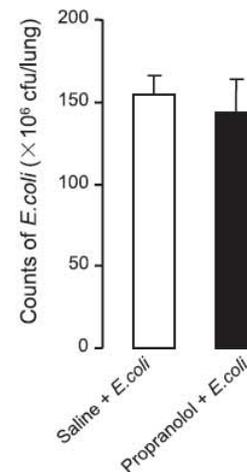


Fig. 6. Effects of  $\beta$ -adrenoceptor inhibition on growth of *E. coli* in the lung between the saline + *E. coli* and propranolol + *E. coli* group;  $n = 5$  in each group. Data are pooled from 2 experiments.

amine release induces  $\beta$ -adrenoceptor stimulation of active sodium uptake that depends in part on ENaC in the distal airway and alveolar epithelium (9). The effect of amiloride was midway between propranolol and placebo treatment with saline, indicating that ~50% of the benefit of  $\beta$ -adrenoceptor tone was mediated by upregulated alveolar fluid clearance, whereas the other 50% was mediated by a reduction in lung endothelial permeability.

What are the clinical implications of these studies? Do these results mean that exogenous administration of aerosolized  $\beta_2$ -adrenoceptor agonists would not be necessary in critically ill patients? Because plasma catecholamine levels in ventilated patients with acute lung injury show that more than 90% of the patients have normal or only minimally elevated epinephrine and norepinephrine levels (39), it is unlikely that there would be sufficient endogenous stimulation of the  $\beta$ -adrenoceptor pathway in ventilated human patients. In the usual case of acute respiratory failure from severe bacterial pneumonia, critically ill patients are sedated and given analgesics to facilitate supportive care with positive pressure ventilation in the intensive care unit (5). In fact, the data in the current study support the concept of a potential therapeutic benefit of administering exogenous  $\beta$ -adrenoceptor stimulation to provide a sustained treatment of patients with acute lung injury from bacterial pneumonia. Also, one study (26) from our research group demonstrated that salmeterol treatment could reduce lung water in rats with a noninfectious cause of acute lung injury, namely, acid-induced lung injury, by both attenuating lung endothelial permeability and upregulating alveolar fluid clearance. The data in this study also suggest that in the spontaneously breathing patient who is severely ill with acute bacterial pneumonia, elevated catecholamine levels may attenuate the severity of their lung injury and pulmonary edema. However, once these critically ill patients are treated with endotracheal intubation and positive pressure ventilation, physicians use sedatives and narcotics in the vast majority of patients with acute lung injury (5). Thus the potential benefits of elevated levels of endogenous catecholamines on lung fluid balance will not persist. It is at this point in time that the patients may benefit from exogenous  $\beta_2$ -adrenoceptor agonist therapy, either by aerosol or by the intravenous route, although this possibility will require prospective randomized clinical trials to evaluate the potential clinical benefit.

In conclusion, this study demonstrates that acute *E. coli* pneumonia in mice results in a marked increase in extravascular lung water, lung vascular permeability, arterial hypoxemia, and histological evidence of acute bacterial pneumonia. Because  $\beta$ -adrenoceptor inhibition by propranolol worsened pulmonary edema by both increasing lung vascular permeability and decreasing alveolar fluid clearance, we conclude that the acute increase in endogenous  $\beta$ -adrenoceptor tone may have a short-term beneficial effect on limiting the severity of lung vascular permeability as well as upregulating alveolar fluid clearance in acute *E. coli* pneumonia, thus limiting the extent of pulmonary edema formation.

#### GRANTS

This study was supported by National Heart, Lung, and Blood Institute Grants HL-51854 and HL-51856 (to M. A. Matthay).

#### REFERENCES

1. Abraham E, Arcaroli J, and Shenkar R. Activation of extracellular signal-regulated kinases, NF- $\kappa$ B, and cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding protein in lung neutrophils occurs by differing mechanisms after hemorrhage or endotoxemia. *J Immunol* 166: 522–530, 2001.
2. Abraham E, Kaneko DJ, and Shenkar R. Effects of endogenous and exogenous catecholamines on LPS-induced neutrophil trafficking and activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 276: L1–L8, 1999.
3. Basset G, Crone C, and Saumon G. Significance of active ion transport in transalveolar water absorption: a study on isolated rat lung. *J Physiol* 384: 311–324, 1987.
4. Chen XJ, Seth S, Yue G, Kamat P, Compans RW, Guidot D, Brown LA, Eaton DC, and Jain L. Influenza virus inhibits ENaC and lung fluid clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L366–L373, 2004.
5. Cheng IW, Eisner MD, Thompson BT, Ware LB, and Matthay MA. Acute effects of tidal volume strategy on hemodynamics, fluid balance, and sedation in acute lung injury. *Crit Care Med* 33: 63–70, 2005.
6. Cordero L, Rau R, Taylor D, and Ayers LW. Enteric gram-negative bacilli bloodstream infections: 17 years' experience in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control* 32:189–195, 2004.
7. Cott GR, Sugahara K, and Mason RJ. Stimulation of net active ion transport across alveolar type II cell monolayers. *Am J Physiol Cell Physiol* 250: C222–C227, 1986.
8. Effros RM, Hacker A, Silverman P, and Hukkanen J. Protein concentrations have little effect on reabsorption of fluid from isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 70: 416–422, 1991.
9. Effros RM, Mason GR, Hukkanen J, and Silverman P. New evidence for active sodium transport from fluid-filled rat lungs. *J Appl Physiol* 66: 906–919, 1989.
10. Eisner MD, Thompson T, Hudson LD, Luce JM, Hayden D, Schoenfeld D, and Matthay MA. Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Efficacy of low tidal volume ventilation in patients with different clinical risk factors for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 231–236, 2001.
11. Emori TG and Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 6: 428–442, 1993.
12. Folkesson HG, Matthay MA, Hebert CA, and Broaddus VC. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J Clin Invest* 96: 107–116, 1995.
13. Frank J, Roux J, Kawakatsu H, Su G, Dagenais A, Berthiaume Y, Howard M, Canessa CM, Fang X, Sheppard D, Matthay MA, and Pittet JF. Transforming growth factor- $\beta$ 1 decreases expression of the epithelial sodium channel  $\alpha$ ENaC and alveolar epithelial vectorial sodium and fluid transport via an ERK1/2-dependent mechanism. *J Biol Chem* 278: 43939–43950, 2003.
14. Henry PJ, Rigby PJ, and Goldie RG. Distribution of  $\beta_1$ - and  $\beta_2$ -adrenoceptors in mouse trachea and lung: a quantitative autoradiographic study. *Br J Pharmacol* 99: 136–144, 1990.
15. Izeboud CA, Monshouwer M, van Miert AS, and Witkamp RF. The  $\beta$ -adrenoceptor agonist clenbuterol is a potent inhibitor of the LPS-induced production of TNF- $\alpha$  and IL-6 in vitro and in vivo. *Inflamm Res* 48: 497–502, 1999.
16. 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–L658, 2001.
17. Khimenko PL, Barnard JW, Moore TM, Wilson PS, Ballard ST, and Taylor AE. Vascular permeability and epithelial transport effects on lung edema formation in ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 77: 1116–1121, 1994.
18. Lane SM, Maender KC, Awender NE, and Maron MB. Adrenal epinephrine increases alveolar liquid clearance in a canine model of neurogenic pulmonary edema. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 760–768, 1998.
19. Liu F, Verin AD, Borbiev T, and Garcia JG. Role of cAMP-dependent protein kinase A activity in endothelial cell cytoskeleton rearrangement. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L1309–L1317, 2001.
20. Maris NA, de Vos AF, Dessing MC, Spek CA, Lutter R, Jansen HM, van der Zee JS, Bresser P, and van der Poll T. Anti-inflammatory effects of salmeterol after inhalation of lipopolysaccharide by healthy volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 878–884, 2005.

# Alveolar Epithelium

## Role in Lung Fluid Balance and Acute Lung Injury

Michael A. Matthay, Laurent Robriquet, and Xiaohui Fang

Cardiovascular Research Institute, University of California–San Francisco, San Francisco, California

The resolution of alveolar edema is regulated by active sodium and chloride transport across the pulmonary epithelium, including alveolar epithelial type I and II cells as well as distal airway epithelia. Catecholamine-dependent mechanisms can markedly upregulate alveolar fluid clearance even under pathological conditions, an effect that is mediated by both epithelial sodium channel (ENaC) and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Under pathological conditions, impaired alveolar fluid clearance is associated with worse survival in patients with acute lung injury. However, there is some experimental and clinical evidence that cAMP stimulation could accelerate the resolution of pulmonary edema in the presence of acute lung injury. Clinical trials are needed to test this potential therapeutic strategy in patients with acute lung injury.

**Keywords:** pulmonary edema; acute respiratory distress syndrome; alveolar fluid clearance; cystic fibrosis

The mechanisms that regulate active salt and water transport by the alveolar and distal airway epithelium of the lung have emerged as an area of research with important implications for understanding lung fluid balance under both normal and pathological conditions. Studies of epithelial fluid transport by the distal pulmonary epithelium have provided important new concepts regarding the resolution of pulmonary edema, a common clinical problem that has direct relevance to the pathophysiology of acute lung injury. This article provides a summary of the major issues discussed by Dr. Matthay at the University of Pittsburgh Acute Lung Injury Conference in October 2004. It is not meant to be a comprehensive review article of the field of alveolar epithelial fluid clearance. There are several reviews of this field (1–4). The first section of this article reviews some of the mechanisms that regulate reabsorption of alveolar edema fluid in the lung with an emphasis on studies of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and fluid transport, an area of new interest in this field. The second section considers examples of alveolar fluid transport in the presence of acute lung injury, based on both experimental and clinical studies. The final section of the article briefly discusses the role of  $\beta_2$  adrenergic agonists as a possible treatment for patients with acute lung injury. Some of the information in this article has been reviewed in another publication (1).

### RESOLUTION OF ALVEOLAR EDEMA: BASIC MECHANISMS

Prior to 1982, there was no information on how lung fluid balance was regulated across the distal airway and alveolar epithelial barriers of the mature lung. Some work had been done on secre-

tion and absorption of alveolar fluid in the fetal and newborn lung (5). In 1982, new research provided evidence that fluid balance in the lung was regulated by active ion transport mechanisms (6, 7). For many years, it had been generally believed that differences in hydrostatic and protein osmotic pressures (Starling forces) accounted for the removal of excess fluid from the airspaces of the lung. This misconception persisted in part because some experiments that measured solute flux across the epithelial and endothelial barriers of the lung were done at room temperature and the studies were done in dogs, a species that turned out to have a very low rate of active sodium and fluid transport (1). Also, until the early 1980s, there were no satisfactory animal models to study the resolution of alveolar edema, and the isolation and culture of alveolar epithelial type II cells was just becoming a useful experimental method. Although the removal of interstitial pulmonary edema by lung lymphatics and the lung microcirculation was discussed by Staub (8) in 1974 in his review of pulmonary edema, there was no information on how pulmonary edema was removed from the distal airspaces of the lung. On the basis of both *in vivo* and *in vitro* studies, there is convincing evidence that the vectorial transport of salt and water across the alveolar and distal airway epithelium is the primary determinant of fluid clearance, thus accounting for the ability of the lung to remove alveolar fluid at the time of birth as well as in the mature lung when pathologic conditions lead to the development of pulmonary edema.

### Active Ion Transport Drives Alveolar Fluid Clearance

With few exceptions, the general model for transepithelial fluid movement is that active salt transport drives osmotic water transport. This paradigm is probably correct for removal of alveolar edema fluid across the distal lung epithelium (1). The results of several *in vivo* studies have demonstrated that changes in hydrostatic or protein osmotic pressures cannot account for the removal of excess fluid from the distal airspaces. Furthermore, pharmacologic inhibitors of sodium transport can reduce the rate of fluid clearance in the lungs of several different species, including the human lung. In addition, there is convincing evidence that isolated epithelial cells from the distal airspaces of the lung actively transport sodium and other ions.

### Pulmonary Surface Area for Alveolar Fluid Reabsorption

Although the large surface area of the alveoli seems to favor the hypothesis that most fluid reabsorption occurs at the alveolar level, active fluid reabsorption could occur across all of the different segments of the pulmonary epithelium of the distal airspaces of the lung. The precise contribution of each of the anatomic segments of the distal airspaces to fluid reabsorption is not firmly established. The distal airway epithelium is composed of terminal respiratory and bronchiolar units with polarized epithelial cells that have the capacity to transport sodium and chloride, including ciliated Clara cells and nonciliated cuboidal cells. The alveoli themselves are composed of a thin alveolar epithelium (0.1–0.2  $\mu\text{m}$ ) that covers 99% of the airspace surface area in the lung and contains thin, squamous, type I cells and cuboidal type II cells. The alveolar type I cell covers 95% of the alveolar surface.

(Received in original form January 27, 2005; accepted in final form April 14, 2005)

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Michael A. Matthay, M.D., 505 Parnassus Avenue, M-917, San Francisco, CA 94143-0624. E-mail: mmatt@itsa.ucsf.edu

Proc Am Thorac Soc Vol 2, pp 206–213, 2005  
DOI: 10.1513/pats.200501-009AC  
Internet address: www.atsjournals.org

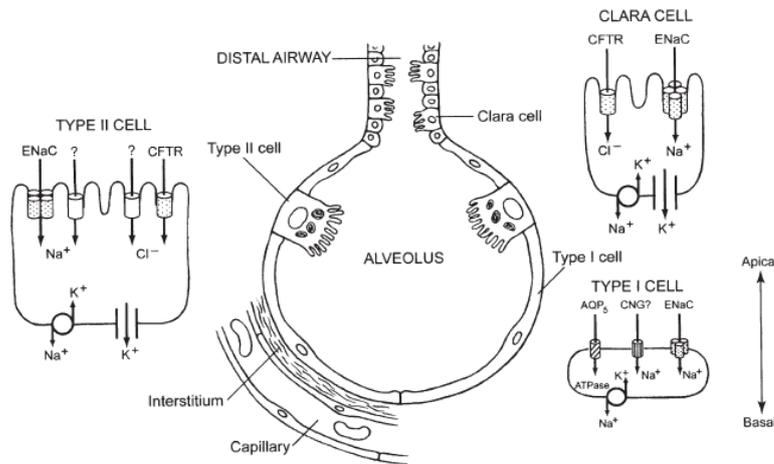


Figure 1. A schematic diagram of the distal pulmonary epithelium that is relevant for salt and water transport. AQP<sub>5</sub> = aquaporin 5; CNG = cyclic nucleotide-gated channel; ENaC = epithelial sodium channel. Reprinted by permission from Reference 1.

The close apposition between the alveolar epithelium and the vascular endothelium facilitates efficient exchange of gases, but also forms a tight barrier to movement of liquid and proteins from the interstitial and vascular spaces, thus assisting in maintaining relatively dry alveoli (1). All of the cells in the alveoli and the distal airway epithelia contain ion transporters and may contribute to vectorial salt and water clearance from the distal airspaces of the lung (Figure 1).

#### Alveolar Epithelial Type II Cells

The most extensively studied cell in the distal pulmonary epithelium is the alveolar type II cell, partly because type II cells can be readily isolated from the lung and studied *in vitro*. The alveolar type II cell is responsible for the secretion of surfactant (9) as well as vectorial transport of sodium from the apical to the basolateral surface (10–15). The active transport of sodium by type II cells provides a major driving force for removal of fluid from the alveolar space. Sodium uptake occurs on the apical surface, partly through amiloride-sensitive and -insensitive channels. Subsequently, sodium is pumped actively from the basolateral surface into the lung interstitium by Na,K-ATPase. An epithelial sodium channel (ENaC), which participates in sodium movement across the cell apical membrane, was cloned and characterized in 1994 (16), and work by other investigators has provided new insight into the molecular and biochemical basis for sodium uptake in alveolar epithelial cells (17, 18).

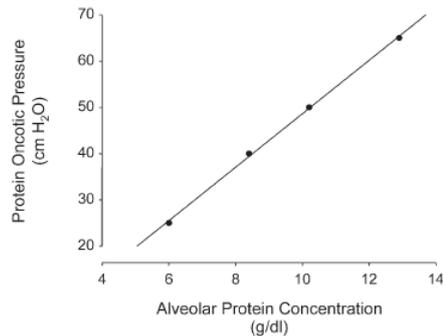
#### Alveolar Epithelial Type I Cells

Some investigators have assessed the potential contribution of the alveolar type I cell to vectorial fluid transport. On the basis of studies in freshly isolated type I cells, it is known that these cells have a high osmotic permeability to water with expression of aquaporin 5 on the apical surface (19). Recent studies have reported the presence of the  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  subunits of Na,K-ATPase in both type I-like cells *in vitro* (20). The presence of the Na,K-ATPase could be consistent with a role for this cell in vectorial fluid transport, although it is not conclusive because the Na,K-ATPase may be needed to maintain cell volume. Also, recent studies of freshly isolated alveolar type I cells from rats demonstrated that these cells express the Na,K-ATPase  $\alpha_1$  and  $\beta_1$  subunit isoforms (21). In the same study, there was evidence for  $\alpha_1$  Na,K-ATPase expression on the basolateral surface of the alveolar epithelial type I cells *in situ* in the rat lung. In addition, there is evidence for expression of all the subunits of ENaC in

freshly isolated alveolar type I cells from two laboratories (21, 22) as well as *in situ* in the rat lung (22). Finally, there is some evidence that  $^{22}\text{Na}$  uptake can be partially inhibited by amiloride in the freshly isolated rat alveolar type I cells (22), although definitive studies of cultured, polarized, type I cells have not yet been achieved. Additional data demonstrate that the  $\alpha_2$  subunit is located on alveolar type I cells and plays an important role in alveolar fluid reabsorption (23). There is also evidence that  $\beta$ -receptors are expressed on type I cells and there is also evidence they are present on type II cells (24). There is also new preliminary evidence that highly selective cation channels are present by patch clamp on alveolar type I cells (25). Although the inability to study alveolar type I cells in culture has slowed progress in assessing their capacity for ion transport and the role they may play in vectorial fluid transport across the alveolar epithelium, the new data provide suggestive evidence that alveolar type I cells may participate in vectorial salt transport in the lung.

#### *In Vivo* Evidence for Active Ion Transport

The first *in vivo* evidence that active ion transport could account for the removal of alveolar edema fluid across the distal pulmonary epithelium of the mature lung was obtained in studies of anesthetized, ventilated sheep (6). In those studies, the critical discovery was that isosmolar fluid clearance of salt and water occurred in the face of a rising concentration of protein in the airspaces of the lung, whether the instilled solution was autologous serum or an isosmolar protein solution. The initial protein concentration of the instilled protein solution was the same as the circulating plasma. After 4 h, the concentration of the protein had risen from approximately 6.5 g/100 ml to 8.4 g/100 ml, whereas the plasma protein concentration was unchanged. In longer term studies in unanesthetized, spontaneously breathing sheep, alveolar protein concentrations increased to very high levels. After 12 and 24 h, the alveolar protein concentration increased to 10.2 and 12.9 g/100 ml, respectively (26). The overall rise in protein concentration was equivalent to an increase in distal airspace protein osmotic pressure from 25 to 65 cm H<sub>2</sub>O (Figure 2). The concentration of protein in the lung lymph draining the lung interstitium declined, providing further evidence that protein-free fluid was being reabsorbed from the distal airspaces into the lung interstitium (6). Also, morphologic studies showed that the interstitial fluid did not contain the Evans blue dye-labeled alveolar protein (27). These data provided convinc-



**Figure 2.** In spontaneously breathing, unanesthetized sheep, alveolar fluid protein concentration increased from 6.0 g/dl to a maximum of 13.8 g/dl (*x axis*) after 24 h. This increase in protein concentration was paralleled by a marked increase in protein oncotic pressure (*y axis*). Reprinted by permission from Reference 1.

ing evidence that active ion transport must be responsible for the fluid clearance, especially in the face of a rising alveolar protein osmotic pressure that was approximately 40 cm H<sub>2</sub>O greater than the protein osmotic pressure in the vascular or interstitial spaces of the lung (6, 26).

Other studies in the intact lung have supported the hypothesis that removal of alveolar fluid requires active transport processes. For example, elimination of ventilation to one lung did not change the rate of fluid clearance in sheep, thus ruling out changes in transpulmonary airway pressure as a major determinant of fluid clearance, at least in the uninjured lung (28). Furthermore, if active ion transport were responsible for fluid clearance, then fluid clearance should be temperature dependent. In an *in situ* perfused goat lung preparation, the rate of fluid clearance progressively declined as temperature was lowered from 37 to 18°C (29). Similar results were obtained in perfused rat lungs (30) and *ex vivo* human lung studies (31) in which hypothermia inhibited sodium and fluid transport.

Additional evidence for active ion transport was obtained in intact animals with the use of amiloride, an inhibitor of sodium uptake by the apical membrane of alveolar epithelium and distal airway epithelium. Amiloride inhibited 40 to 70% of basal fluid clearance in sheep, rabbits, rats, guinea pigs, mice, and in the human lung (1). Amiloride also inhibited sodium uptake in distal airway epithelium from sheep and pigs (32, 33). To further explore the role of active sodium transport, experiments were designed to inhibit Na,K-ATPase. It has been difficult to study the effect of ouabain in intact animals because of cardiac toxicity. However, in the isolated rat lung, ouabain inhibited more than 90% of fluid clearance (34, 35). Subsequently, after the development of an *in situ* sheep preparation for measuring fluid clearance in the absence of blood flow, it was reported that ouabain inhibited 90% of fluid clearance over a 4-h period (28).

#### Catecholamine-dependent Regulation of Alveolar Fluid Clearance

Studies in newborn animals indicate that endogenous release of catecholamines, particularly epinephrine, stimulates reabsorption of fetal lung fluid from the airspaces of the lung (5, 36–38). In most adult mammal species, including the human lung, stimulation of  $\beta_2$ -adrenergic receptors either by salmeterol, terbutaline, or epinephrine increases fluid clearance (39–45). This stimulatory effect occurs rapidly after intravenous administration of epinephrine or instillation of terbutaline in alveolar space and

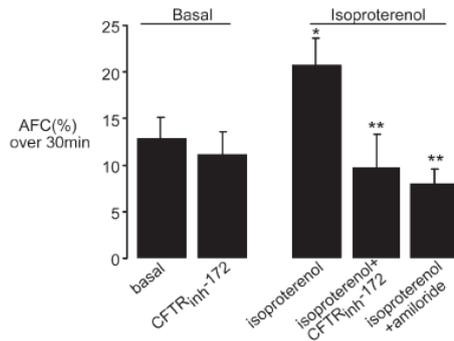
is prevented by either a nonspecific  $\beta_2$ -receptor antagonist, propranolol, or in rats by a  $\beta_2$ -antagonist. The increased fluid clearance by  $\beta_2$ -agonists can be prevented by amiloride, indicating that the stimulation was related to an increased transepithelial sodium transport (39, 44). On the basis of studies of the resolution of alveolar edema in humans, it has been difficult to quantify the effect of catecholamines on the rate of fluid clearance (46). However, studies of fluid clearance in the isolated human lung have demonstrated that  $\beta$ -adrenergic agonist therapy increases fluid clearance, and the increased fluid clearance can be inhibited with propranolol or amiloride (31, 45). These data are particularly important because aerosolized  $\beta$ -agonist treatment in some patients with pulmonary edema might accelerate the resolution of alveolar edema.

#### Potential Role of CFTR in cAMP-mediated Upregulated Fluid Transport

Although most experimental studies have attributed a primary role for active sodium transport in the vectorial transport of salt and water from the apical to the basal surface of the alveolar epithelium of the lung, the potential role of chloride, especially in mediating the cAMP-mediated upregulation of fluid clearance across distal lung epithelium, has been the subject of recent studies. One older study of cultured alveolar epithelial cells concluded that vectorial transport of chloride across alveolar epithelium occurs by a paracellular route under basal conditions and perhaps by a transcellular route in the presence of cAMP stimulation (47). Another study of cultured alveolar epithelial type II cells suggested that cAMP-mediated apical uptake of sodium might depend on an initial uptake of chloride (48). A subsequent study of cultured alveolar type II cells under apical air-liquid interface conditions reported that  $\beta$ -adrenergic agonists produced acute activation of apical chloride channels with enhanced sodium absorption (49).

To define the role of chloride transport in the active transport of salt and water across the distal pulmonary epithelium of the lung, our research group used *in vivo* lung studies to define the mechanisms and pathways that regulate chloride transport during the absorption of fluid from the distal airspaces of the lung. This approach may be important because studies in several species have indicated that distal airway epithelia are capable of ion transport (32, 33) and both ENaC and CFTR are expressed in alveolar and distal airway epithelia (50–54).

The potential role of CFTR under basal and cAMP-stimulated conditions was tested using intact lung studies in which CFTR was not functional because of failure in trafficking of CFTR to the cell membrane, the most common human mutation in cystic fibrosis ( $\Delta F508$  mice). The results supported the hypothesis that CFTR was essential for cAMP-mediated upregulation of isosmolar fluid clearance from the distal airspaces of the lung because fluid clearance could not be increased in the  $\Delta F508$  mice with either  $\beta$ -agonists or with forskolin, unlike the wild-type control mice (55). Additional studies using pharmacologic inhibition of CFTR in both the mouse and human lung with glibenclamide supported the same conclusion, namely that chloride uptake and CFTR-like transport seemed to be required for cAMP-stimulated fluid clearance from the distal airspaces of the lung (55). Glibenclamide can also inhibit potassium channels, so the inhibitory effects are not specific for CFTR, but the  $\Delta F508$  mouse studies have provided more direct evidence. Although the absence of CFTR in the upper airways results in enhanced sodium absorption (56), the data in these studies provided evidence that the absence of CFTR prevents cAMP-upregulated fluid clearance from the distal airspaces of the lung, a finding that is similar to work on the importance of CFTR in mediating cAMP-stimulated sodium absorption in human sweat ducts (57).



**Figure 3.** Effect of CFTR<sub>inh</sub>-172 on basal and isoproterenol (cAMP-stimulated) alveolar fluid clearance (AFC) in *in situ* mouse lungs. Where indicated, the tracheal instillation contains CFTR<sub>inh</sub>-172 ( $10^{-4}$  M,  $n = 6$ ), isoproterenol ( $10^{-4}$  M,  $n = 6$ ), isoproterenol + CFTR<sub>inh</sub>-172 ( $n = 8$ ), and isoproterenol + amiloride (amiloride  $10^{-4}$  M,  $n = 4$ ). \* $p < 0.05$  compared with control; \*\* $p < 0.05$  compared with isoproterenol. Data are mean  $\pm$  SD.

Because CFTR is distributed throughout the distal pulmonary epithelium in distal airway epithelium as well as at the alveolar level in the human lung (53), the data also suggest that the cAMP-mediated upregulated reabsorption of pulmonary edema fluid may occur across distal airway epithelium as well as at the level of the alveolar epithelium. Additional studies indicated that the lack of CFTR results in a greater accumulation of pulmonary edema in the presence of a hydrostatic stress, thus demonstrating the potential physiologic importance of CFTR in upregulating fluid transport from the distal airspaces of the lung (55). Another group of investigators has also demonstrated that rat alveolar type II cells express CFTR protein and also indicates they possess CFTR-like channels on the basis of patch-clamp studies (54). Recent work from our own laboratory indicates that human alveolar type II cells express CFTR at the gene level and also have CFTR inhibitable current by short-circuit studies as well as *in vitro* studies of vectorial fluid transport in human and rat alveolar epithelial type II cells (58).

Also, we have recently administered a CFTR inhibitor (59) to mice and found that their CFTR inhibitor completely blocked cAMP-stimulated fluid clearance and had no effect on basal fluid clearance (Figure 3). These data provide additional *in vivo* evidence that CFTR plays an important role in cAMP-stimulated fluid clearance across the intact lung.

The localization of sodium and chloride transporters that probably participate in vectorial ion and fluid transport in alveolar epithelial type I and II cells as well as distal airway epithelia is summarized in Figure 1.

#### Catecholamine-independent Regulation of Alveolar Fluid Clearance

In the last few years, several interesting catecholamine-independent mechanisms have been identified that can upregulate fluid transport across the distal airspaces of the lung as well as in cultured alveolar type II cells. Hormonal factors, such as glucocorticoids, can upregulate transport by transcriptional mechanisms, whereas thyroid hormone may work by a post-translational mechanism (1, 60). Some growth factors can work by either a transcriptional or direct membrane effect, or by enhancing the number of alveolar type II cells. There is also evidence that proinflammatory molecules, such as tumor necrosis factor  $\alpha$  and leukotriene D<sub>4</sub>, can upregulate sodium uptake and fluid trans-

port (61, 62). Finally, serine proteases can regulate the activity of ENaC and potentially increase fluid clearance across the distal airway epithelium (63).

#### EPITHELIAL FLUID TRANSPORT UNDER PATHOLOGIC CONDITIONS

Fluid clearance from the distal airspaces of the lung has been measured in mechanically ventilated patients with acute respiratory failure from pulmonary edema as well as in several animal models designed to simulate clinically relevant pathologic conditions. Figure 4 shows a histologic section from a patient who died of pulmonary edema and illustrates how sodium transporters may function to drive the resolution of alveolar edema.

#### Clinical Studies

Studies of fluid clearance have been done in intubated, ventilated patients by measuring the concentration of total protein in sequential samples of undiluted pulmonary edema fluid aspirated from the distal airspaces of the lung with a standard suction catheter passed through the endotracheal tube into a wedged position in the distal airways of the lung. This method for measuring fluid clearance in patients was adapted from the method for aspirating fluid from the distal airspaces of the lung in experimental studies in small and large animals (15, 39). The clinical procedure has been validated in patients by demonstrating that there is a relationship between fluid clearance and the improvement in oxygenation and the chest radiograph (46, 64).

#### Resolution of Increased Permeability Edema from Clinical Acute Lung Injury

The majority of patients with increased permeability edema and acute lung injury have impaired alveolar epithelial fluid transport, a finding that is associated with more prolonged acute respiratory failure and a higher mortality (Figure 5). In contrast, a minority of patients can remove alveolar edema fluid rapidly and these patients have a higher survival rate (46, 65, 66). These results indicate that a functional, intact distal lung epithelium is associated with a better prognosis in patients with acute lung injury, thus supporting the hypothesis that the degree of injury to the distal lung epithelium is one important determinant of outcome in patients with increased permeability pulmonary edema from acute lung injury.

#### Mechanisms That Impair Fluid Clearance in Acute Lung Injury

What are the mechanisms that can impair fluid clearance from the airspaces of the lung? Some patients have pathologic (67, 68) and biochemical (69) evidence of injury to the alveolar epithelium. There are also some clinical data that a decrease in fluid clearance may be associated with higher levels of nitrate and nitrite in pulmonary edema fluid, a finding that supports the hypothesis that nitration and oxidation of proteins essential to the epithelial fluid transport may occur in some patients with lung injury, depressing their ability to remove alveolar edema fluid (70). Several experimental studies support this mechanism as well (1, 2). Also, in animal studies, neutrophil depletion prevented the shock-induced decrease in alveolar fluid clearance (1).

The effect of endotoxemia and bacteremia on lung vascular permeability was well described in studies in sheep several years ago (71, 72). However, the impact on the function of the alveolar epithelial barrier was not addressed in those studies. Subsequent work indicated that the acute shock produced by severe bacteremia in rats markedly increases plasma epinephrine levels, as in hemorrhagic shock, and the elevated epinephrine levels can markedly upregulate the fluid transport capacity of the distal lung epithelium (44). Thus, it is possible that in the short term,

because of specific defects in the ion transport capacity of alveolar epithelial cells (1–4).

### $\beta$ -ADRENERGIC AGONIST THERAPY FOR THE TREATMENT OF ACUTE LUNG INJURY

Studies in rats demonstrated that a  $\beta_2$ -adrenergic agonist can enhance the resolution of lung edema and improve oxygenation in the resolution phase of hydrostatic pulmonary edema (80). Also, in isolated perfused rat lungs (81), there was a significant increase in fluid clearance with administration of isoproterenol or dopamine. In a recent study of the potential therapeutic value of  $\beta_2$ -adrenergic agonist therapy for the treatment of acid-induced lung injury in rats, we found that salmeterol, a  $\beta_2$ -adrenergic agonist given via the airspaces, reduced lung edema by both attenuating lung vascular injury and upregulating the clearance of alveolar edema fluid (82). One potential concern is that the use of  $\beta$ -adrenergic agonists might be associated with downregulation of the response. One rat study suggested that this might occur, whereas another mouse study did not (83, 84). From a practical perspective, it seems that the potential benefit of  $\beta_2$ -adrenergic therapy would be achieved with 3 to 4 d, a time period during which a significant downregulation to the aerosolized agonist seems unlikely.

From a clinical perspective, aerosolized  $\beta_2$ -agonist therapy has been shown to reduce the incidence of high-altitude pulmonary edema in subjects at risk for developing this condition (85). A small clinical trial in the United Kingdom has found that intravenous salbutamol, a  $\beta_2$ -agonist, reduces extravascular lung water in patients with acute lung injury (86). It may be reasonable to test the therapeutic value of aerosolized  $\beta_2$ -adrenergic agonist therapy for patients with acute lung injury, particularly because one study demonstrated that therapeutic levels of a commonly used  $\beta_2$ -agonist can be achieved in the pulmonary edema fluid in ventilated patients with standard aerosolization procedures (87).

**Conflict of Interest Statement:** None of the authors have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

### References

- Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev* 2002;82:569–600.
- Matalon S. Mechanisms and regulation of ion transport in adult mammalian alveolar type II pneumocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 1991;261:C727–C738.
- Saumon G, Basset G. Electrolyte and fluid transport across the mature alveolar epithelium. *J Appl Physiol* 1993;74:1–15.
- Multu GM, Koch WJ, Factor P. Alveolar epithelial beta 2-adrenergic receptors: their role in regulation of alveolar active sodium transport. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:1270–1275.
- Walters DV, Olver RE. The role of catecholamines in lung liquid absorption at birth. *Pediatr Res* 1978;12:239–242.
- Matthay MA, Landolt CC, Staub NC. Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep. *J Appl Physiol* 1982;53:96–104.
- Goodman BE, Crandall ED. Dome formation in primary cultured monolayers of alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1982;243:C96–C100.
- Staub NC. Pulmonary edema. *Physiol Rev* 1974;54:678–811.
- Clements JA. Lung surfactant: a personal perspective. *Annu Rev Physiol* 1997;59:1–21.
- Matalon S, Benos DJ, Jackson RM. Biophysical and molecular properties of amiloride-inhibitable  $\text{Na}^+$  channels in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1996;271:L1–L22.
- Clerici C. Sodium transport in alveolar epithelial cells: modulation by  $\text{O}_2$  tension. *Kidney Int Suppl* 1998;65:S79–S83.
- Goodman BE, Fleischer RD, Crandall ED. Evidence for active  $\text{Na}^+$  transport by cultured monolayers of pulmonary alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1983;245:C78–C83.
- Mason RJ, Williams MC, Widdicombe JH, Sanders MJ, Misfeldt DS, Berry LCJ. Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:6033–6037.
- Matalon S, Bridges RJ, Benos DJ. Amiloride-inhibitable  $\text{Na}^+$  conductive pathways in alveolar type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1991;260:L90–L96.
- Matthay MA, Folkesson HG, Verkman AS. Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelium in the adult lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1996;270:L487–L503.
- Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC. Amiloride-sensitive epithelial  $\text{Na}^+$  channel is made of three homologous subunits. *Nature* 1994;367:463–467, 1994.
- O'Brodovich H, Canessa C, Ueda J, Rafii B, Rossier BC, Edelson J. Expression of the epithelial  $\text{Na}^+$  channel in the developing rat lung. *Am J Physiol Cell Physiol* 1993;264:C491–C496.
- Yue G, Russell WJ, Benos DJ, Jackson RM, Olman MA, Matalon S. Increased expression and activity of sodium channels in alveolar type II cells of hyperoxic rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:8418–8422.
- Dobbs LG, Gonzalez R, Matthay MA, Carter EP, Allen L, Verkman AS. Highly water permeable type I alveolar epithelial cells confer high water permeability between the airspace and vasculature in rat lung. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2991–2996.
- Ridge KM, Rutschman DH, Factor P, Katz AI, Bertorello AM, Sznajder JL. Differential expression of Na-K-ATPase isoforms in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1997;273:L246–L255.
- Borok Z, Liebler JM, Lubman RL, Foster MJ, Zhou B, Li X, Zabski SM, Kim K-J, Crandall ED. Sodium transport proteins are expressed by rat alveolar epithelial type I cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L599–L608.
- Allen L, Barbry P, Dobbs L. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:1966–1971.
- Ridge KM, Olivera WG, Saldias F, Azzam Z, Horowitz S, Rutschman DH, Dumasius V, Factor P, Sznajder JI. Alveolar type I cells express the  $\alpha_2$  Na,K-ATPase, which contributes to lung liquid clearance. *Circ Res* 2003;92:453–460.
- Liebler JM, Borok Z, Kim KJ, Crandall ED. Immunoreactive  $\beta_2$  adrenergic receptors and expressed in alveolar type I cells [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:A570.
- Johnson M, Jain L, Chen X, Dobbs L, Eaton D. Detection of functional ion channels in alveolar type I cells by patch changing [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;2:A298.
- Matthay MA, Berthiaume Y, Staub NC. Long-term clearance of liquid and protein from the lungs of unanesthetized sheep. *J Appl Physiol* 1985;59:928–934.
- Matthay MA. Pathophysiology of pulmonary edema. *Clin Chest Med* 1985;6:301–314.
- Sakuma T, Pittet JF, Jayr C, Matthay MA. Alveolar liquid and protein clearance in the absence of blood flow or ventilation in sheep. *J Appl Physiol* 1993;4:176–185.
- Serikov VB, Grady M, Matthay MA. Effect of temperature on alveolar liquid and protein clearance in an *in situ* perfused goat lung. *J Appl Physiol* 1993;75:940–947.
- Rutschman DH, Olivera W, Sznajder JI. Active transport and passive liquid movement in isolated perfused rat lungs. *J Appl Physiol* 1993;75:1574–1580.
- Sakuma T, Okaniwa G, Nakada T, Nishimura T, Fujimura S, Matthay MA. Alveolar fluid clearance in the resected human lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:305–310.
- Al-Bazzaz FJ. Regulation of Na and Cl transport in sheep distal airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1994;267:L193–L198.
- Ballard ST, Schepens SM, Falcone JC, Meininger GA, Taylor AE. Regional bioelectric properties of porcine airway epithelium. *J Appl Physiol* 1992;73:2021–2027.
- Basset G, Crone C, Saumon G. Fluid absorption by rat lung *in situ*: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium. *J Physiol* 1987;384:325–345.
- Olivera W, Ridge K, Wood LD, Sznajder JI. Active sodium transport and alveolar epithelial Na-K-ATPase increase during subacute hyperoxia in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1994;266:L577–L584.
- Brown MJ, Olver RE, Ramsden CA, Strang LB, Walters D. Effects of adrenaline and of spontaneous labour on the secretion and absorption of lung liquid in the fetal lamb. *J Physiol* 1983;344:137–152.

37. Finley N, Norlin A, Baines DL, Folkesson HG. Alveolar epithelial fluid clearance is mediated by endogenous catecholamines at birth in guinea pigs. *J Clin Invest* 1998;101:972-981.
38. Norlin A, Folkesson HG. Alveolar liquid clearance in late gestational guinea pigs after induction of labor: mechanisms and regulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L606-L616.
39. Berthiaume Y, Staub NC, Matthay MA. Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep. *J Clin Invest* 1987;79:335-343.
40. Charron PD, Fawley JP, Maron MB. Effect of epinephrine on alveolar liquid clearance in the rat. *J Appl Physiol* 1999;87:611-618.
41. Crandall ED, Heming TH, Palombo RL, Goodman BE. Effect of terbutaline on sodium transport in isolated perfused rat lung. *J Appl Physiol* 1986;60:289-294.
42. Jayr C, Garat C, Meignan M, Pittet J-F, Zelter M, Matthay MA. Alveolar liquid and protein clearance in anesthetized ventilated rats. *J Appl Physiol* 1994;76:2636-2642.
43. Maron MB. Dose-response relationship between plasma epinephrine concentration and alveolar liquid clearance in dogs. *J Appl Physiol* 1998;85:1702-1707.
44. Pittet J-F, Wiener-Kronish JP, McElroy MC, Folkesson HG, Matthay MA. Stimulation of lung epithelial liquid clearance by endogenous release of catecholamines in septic shock in anesthetized rats. *J Clin Invest* 1994;94:663-671.
45. Sakuma T, Folkesson HG, Suzuki S, Okaniwa G, Fujimura S, Matthay MA. Beta-adrenergic agonist stimulated alveolar fluid clearance in ex vivo human and rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:506-512.
46. Matthay MA, Wiener-Kronish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis* 1990;142:1250-1257.
47. Kim KJ, Cheek JM, Crandall ED. Contribution of active Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> fluxes to net ion transport by alveolar epithelium. *Respir Physiol* 1991; 85:245-256.
48. Jiang X, Ingbar DH, O'Grady SM. Adrenergic stimulation of Na<sup>+</sup> transport across alveolar epithelial cells involves activation of apical Cl<sup>-</sup> channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 1998;275:C1610-C1620.
49. Jiang X, Ingbar DH, O'Grady SM. Adrenergic regulation of ion transport across adult alveolar epithelial cells: effects on Cl<sup>-</sup> channel activation and transport function in cultures with an apical air interface. *J Membr Biol* 2001;181:195-204.
50. Farman N, Talbot CR, Boucher R, Fay M, Canessa C, Rossier B, Bonvalet JP. Noncoordinated expression of a-, b-, and g-subunit mRNAs of epithelial Na<sup>+</sup> channel along rat respiratory tract. *Am J Physiol Cell Physiol* 1997;272:C131-C141.
51. Gaillard D, Hinnrasky J, Coscoy S, Hofman P, Matthay MA, Puchelle E, Barbry P. Early expression of b- and g-subunits of epithelial sodium channel during human airway development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;278:L177-L184.
52. Pitkänen OM, Smith D, O'Brodovich H, Otulakowski G. Expression of a-, b-, and g-hENaC mRNA in the human nasal, bronchial, and distal lung epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:273-276.
53. Engelhardt JF, Zepeda M, Cohn JA, Yankaskas JR, Wilson J. Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J Clin Invest* 1994; 93:737-749.
54. Brochiero E, Dagenais A, Prive A, Berthiaume Y, Grygorczyk R. Evidence of a functional CFTR Cl<sup>-</sup> channel in adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L382-L392.
55. Fang X, Fukuda N, Barbry P, Sartori C, Verkman AS, Matthay MA. Novel role for CFTR in fluid absorption from the distal airspaces of the lung. *J Gen Physiol* 2002;119:199-207.
56. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, Boucher RC. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 1995;269:847-850.
57. Reddy MM, Light MJ, Quinton PM. Activation of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) requires CFTR Cl<sup>-</sup> channel function. *Nature* 1999;402: 301-304.
58. Fang X, Song Y, Hirsch J, Galiotta LJ, Pedemonte N, Zemans RL, Dolganov G, Verkman AS, Matthay MA. Contribution of CFTR to apical-basolateral fluid transport in cultured human alveolar epithelial type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; Sep 2 [Epub ahead of print].
59. Ma T, Thiagarajah JR, Yang H, Sonawane ND, Folli C, Galiotta LJ, Verkman AS. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J Clin Invest* 2002;110:1599-1601.
60. Lei J, Nowbar S, Mariash CN, Ingbar DH. Thyroid hormone stimulates Na-K-ATPase activity and its plasma membrane insertion in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L762-772.
61. Sloniewsky DE, Ridge KM, Adir Y, Fries FP, Briva A, Sznajder JI, Sporn PH. Leukotriene D4 activates alveolar epithelial Na,K-ATPase and increases alveolar fluid clearance. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:407-412.
62. Ware LB. Modulation of alveolar fluid clearance by acute inflammation: the plot thickens. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:332-333.
63. Planes C, Leyvraz C, Uchida T, Angelova MA, Vuagniaux G, Hummler E, Matthay MA, Clerici C, Rossier BC. In vitro and in vivo regulation of transepithelial lung alveolar sodium transport by serine proteases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;125:16-22.
64. Vergheze GM, Ware LB, Matthay BA, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport and the resolution of clinically severe hydrostatic pulmonary edema. *J Appl Physiol* 1999;87:1301-1312.
65. Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:980-988.
66. Ware LB, Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1376-1383.
67. Bachofen M, Weibel ER. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* 1977;116:589-615.
68. Albertine KH, Soulier MF, Wang Z, Ishizaka A, Hashimoto S, Zimmerman GA, Matthay MA, Ware LB. Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *Am J Pathol* 2002;161:1783-1796.
69. Newman V, Gonzalez RF, Matthay MA, Dobbs LG. A novel alveolar type I cell-specific biochemical marker of human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:990-995.
70. Zhu S, Ware LB, Geiser T, Matthay MA, Matalon S. Increased levels of nitrate and surfactant protein a nitration in the pulmonary edema fluid of patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:166-172.
71. Brigham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury: state of art. *Am Rev Respir Dis* 1986;133:913-927.
72. Brigham KL, Woolverton WC, Blake LH, Staub NC. Increased sheep lung vascular permeability caused by pseudomonas bacteremia. *J Clin Invest* 1974;54:792-804.
73. Wiener-Kronish JP, Albertine KH, Matthay MA. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to *Escherichia coli* endotoxin. *J Clin Invest* 1991;88:864-875.
74. Wiener-Kronish JP, Sakuma T, Kudoh I, Pittet JF, Frank D, Dobbs L, Vasil ML, Matthay MA. Alveolar epithelial injury and pleural empyema in acute *P. aeruginosa* pneumonia in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 1993;75:1661-1669.
75. Kurahashi K, Kajikawa O, Sawa T, Ohara M, Gropper MA, Frank DW, Martin TR, Wiener-Kronish JP. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Clin Invest* 1999;104:743-750.
76. Pittet J-F, Matthay MA, Pier G, Grady M, Wiener-Kronish JP. *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung and pleural injury in sheep: differential protective effect of circulating versus alveolar immunoglobulin G antibody. *J Clin Invest* 1993;92:1221-1228.
77. Sawa T, Yahr TL, Ohara M, Kurahashi K, Gropper MA, Wiener-Kronish JP, Frank DW. Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. *Nat Med* 1999;5:392-398.
78. Chen XJ, Seth S, Yue G, Kamat P, Compans RW, Guidot D, Brown LA, Eaton DC, Jain L. Influenza virus inhibits ENaC and lung fluid clearance. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L366-L373.
79. Frank JA, Gutierrez JA, Jones KD, Allen L, Dobbs L, Matthay MA. Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-injured rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:242-249.
80. Frank JA, Wang Y, Osorio O, Matthay MA.  $\beta$ -adrenergic agonist therapy accelerates the resolution of hydrostatic pulmonary edema in sheep and rats. *J Appl Physiol* 2000;89:1255-1265.
81. Azzam ZS, Saldias FJ, Comellas A, Ridge KM, Rutschman DH, Sznajder JI. Catecholamines increase lung edema clearance in rats with increased left atrial pressure. *J Appl Physiol* 2001;90:1088-1094.

82. McAuley DF, Frank JA, Fang X, 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* 2004;32:1470-1476.
83. Morgan EE, Hodnichak CM, Stader SM, Maender KC, Boja JW, Folkesson HG, Maron MB. Prolonged isoproterenol infusion impairs the ability of beta(2)-agonists to increase alveolar liquid clearance. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 2002;282:L666-L674.
84. Sartori C, Fang X, McGraw DW, Koch P, Snider ME, Folkesson HG, Matthay MA. Selected contribution: long-term effects of beta(2)-adrenergic receptor stimulation on alveolar fluid clearance in mice. *J Applied Physiol* 2002;93:1875-1880.
85. Sartori C, Allemann Y, Duplain H, Lepori M, Egli M, Lipp E, Hutter D, Turini P, Hugli O, Cook S, et al. Salmeterol for the prevention of high-altitude pulmonary edema. *N Engl J Med* 2002;346:1631-1636.
86. Perkins G, McAuley D, Goo F, Thickett D. The beta agonist lung injury trial (BAITI) [abstract]. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:A294.
87. Atabai K, Ware LB, Snider ME, Koch P, Daniel B, Nuckton TJ, 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* 2002;28:705-711.

## RESUME

L'agression pulmonaire aiguë et le syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) sont caractérisés par une augmentation de la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire à l'origine de l'exsudation d'un liquide d'œdème riche en protéines conduisant à une altération sévère des échanges gazeux. En dépit des progrès réalisés ces dernières années dans la prise en charge des patients, la mortalité demeure élevée (30-40%) (1). L'agression pulmonaire aiguë est marquée par un état procoagulant et antifibrinolytique à l'origine de dépôts de fibrine et de membranes hyalines dans le poumon distal (2). La protéine C activée est un important régulateur de la coagulation et exerce des propriétés anti-inflammatoires pulmonaires (3).

Ainsi, dans un premier temps, notre travail a consisté à caractériser l'équilibre pulmonaire au cours de l'administration de protéine C activée *in vivo* sur un modèle murin de pneumopathie aiguë à *P. aeruginosa* (*Pa*). Nos résultats ont montré que l'administration de PCa à la phase précoce de l'agression pulmonaire aiguë induite par *Pa* tendait à augmenter la formation de l'œdème pulmonaire avec une perte de la compartimentalisation de la réponse inflammatoire. Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'équilibre hydrique pulmonaire dépendant du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène au cours de la pneumonie aiguë à *E. coli*. L'inhibition du tonus  $\beta$ -adrénergique endogène induisait une augmentation de l'œdème pulmonaire en diminuant la résorption de l'œdème alvéolaire et en majorant le trouble de perméabilité vasculaire pulmonaire. Enfin, la stimulation  $\beta_2$ -adrénergique exogène diminuait l'œdème pulmonaire au décours de la pneumonie à *Pa*.

Ainsi, des approches pharmacologiques différentes peuvent moduler l'équilibre hydrique pulmonaire au cours des pneumonies aiguës. Les connaissances fondamentales acquises au cours de ce travail de thèse seront directement valorisables par la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques au cours de l'agression pulmonaire aiguë secondaire à la pneumonie aiguë.