



HAL
open science

Etude de déterminants de la dysfonction vasculaire pulmonaire au cours du syndrome de détresse respiratoire aigue

Guillaume Voiriot

► **To cite this version:**

Guillaume Voiriot. Etude de déterminants de la dysfonction vasculaire pulmonaire au cours du syndrome de détresse respiratoire aigue. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2014. Français. NNT : 2014PEST0023 . tel-01790024

HAL Id: tel-01790024

<https://theses.hal.science/tel-01790024>

Submitted on 11 May 2018

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.

**Académie de Créteil
Université Paris Est**

**Thèse de Doctorat
Sciences de la Vie et de la Santé**

**Présentée par
Guillaume Voiriot**

**Etude de déterminants de la dysfonction vasculaire pulmonaire au
cours du syndrome de détresse respiratoire aigue**

**Thèse dirigée par
Pr Bernard Maitre
Pr Armand Mekontso Dessap**

Soutenue le 25 mars 2014

**Rapporteurs : Pr Bruno Crestani
Pr Antoine Vieillard-Baron**

**Examineurs : Dr Jorge Boczkowski
Pr Bernard Maitre
Pr Armand Mekontso Dessap
Pr Robert Naeije**

REMERCIEMENTS

A Jorge Bocskowski, Bruno Crestani, Robert Naeije et Antoine Vieillard-Baron, qui m'ont fait l'honneur de participer au jury de cette thèse en tant que rapporteurs ou examinateurs, qu'ils soient remerciés pour leur disponibilité,

A Bernard Maitre et Armand Mekontso Dessap, directeur et co-directeur de cette thèse, pour leur encadrement, leur confiance et leur ouverture d'esprit,

A Serge Adnot, pour son accueil dans le laboratoire qu'il dirige,

A tous les membres de l'équipe 08, pour leur accueil et leur bienveillance

A Valérie Amsellem et Mehdi Latiri, pour les explorations biologiques,

A Rachid Souktani, pour l'apprentissage patient des gestes et techniques de chirurgie,

A Jeanne Tran Van Nhieu, pour son son aide précieuse au microscope,

A Damien Contou, Aurélie Hervé et Keyvan Razazi pour leur participation aux explorations animales.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	3
TABLE DES FIGURES	5
LISTE DES ABBREVIATIONS	6
PREAMBULE	7
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION	10
1. La circulation pulmonaire	10
1.1. Alvéole et membrane alvéolocapillaire pulmonaires	
1.2. Acteurs anatomiques de la circulation pulmonaire	
1.2.1. Ventricule droit	
1.2.2. Vascularisation pulmonaire	
1.3. Acteurs cellulaires de la circulation pulmonaire	
1.3.1. Cellules endothéliales pulmonaires	
1.3.2. Cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires	
2. Le syndrome de détresse respiratoire aigue	21
2.1. Définition	
2.2. Epidémiologie	
2.3. Facteurs de risque de mortalité	
2.4. Physiopathologie	
2.4.1. Œdème pulmonaire lésionnel	
2.4.2. Phase exsudative	
2.4.3. Phase de résolution	
2.5. Support ventilatoire	
2.6. Modèles animaux	
3. La dysfonction vasculaire pulmonaire au cours de l'ARDS	37
3.1. Physiopathologie	
3.1.1. Dysfonction endothéliale pulmonaire	
3.1.1.1. Marqueurs de la dysfonction endothéliale pulmonaire	
3.1.1.2. Occlusions microvasculaires pulmonaires	
3.1.1.3. Majoration de la perméabilité endothéliale	

3.1.1.4. Anomalies de la vasomotricité pulmonaire	
3.1.2. Compression vasculaire extrinsèque	
3.1.3. Remodelage vasculaire	
3.1.4. Synthèse	
3.2. Hypertension pulmonaire aigue	
3.2.1. Définition	
3.2.2. Description	
3.2.3. Incidence	
3.2.4. Pronostic	
3.2.5. Défaillance ventriculaire droite	
4. Hypothèses et objectifs du travail	52
5. Le modèle animal	52
5.1. Choix du modèle	
5.2. Description du modèle	
CHAPITRE 2 - PRESENTATION DES RESULTATS	57
1. Etude des effets cardio-pulmonaires physiologiques et génomiques de manœuvres de recrutement alvéolaire dans un modèle murin d'agression pulmonaire aigue	
2. L'interleukine 6 exercent des effets anti-inflammatoires et protecteurs de l'hémodynamique droite dans un modèle murin d'agression pulmonaire aigue	
3. L'âge avancé est associé à une gravité accrue dans un modèle murin de syndrome de détresse respiratoire aigue	
CHAPITRE 3 - DISCUSSION ET CONCLUSION	74
ANNEXES	78
REFERENCES	82
CURRICULUM VITAE	104
RESUME	108

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Les acteurs cellulaires de l'alvéole pulmonaire.

Figure 2: Forme des ventricules droit et gauche en modélisation 3D.

Figure 3: Volume pulmonaire et calibre des microvaisseaux pulmonaires.

Figure 4: Score semi-quantitatif de sévérité de l'ARDS.

Figure 5: Définition de l'ARDS dite de Berlin (2012).

Figure 6: Evolution de la mortalité de l'ARDS des années 1980 aux années 2000.

Figure 7: Physiopathologie de l'ARDS.

Figure 8: Cinétique de recrutement local des PNN au cours de l'inhalation de LPS chez la souris.

Figure 9: Représentation schématique des principaux mécanismes de l'activation endothéliale pulmonaire au cours de l'ARDS.

Figure 10: Représentation schématique des principaux mécanismes de la dysfonction vasculaires pulmonaires au cours de l'ARDS.

Figure 11: Cascade d'événements hémodynamiques à l'origine de la défaillance cardiaque droite au cours de l'ARDS.

LISTES DES ABBREVIATIONS

ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
CEAP	Cellules Endothéliales Artérielles Pulmonaires
CEMP	Cellules Endothéliales Microvasculaires Pulmonaires
CEMP_p	Cellules Endothéliales Microvasculaires Pulmonaires Progénitrices
CMLAP	Cellules Musculaires Lisses Artérielles Pulmonaires
CRF	Capacité Résiduelle Fonctionnelle
EGF	Endothelial Growth factor
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase
G-CSF	Granulocyte Stimulating Growth Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Stimulating Growth Factor
HTP	Hypertension pulmonaire
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IL	Interleukine
iNOS	Inductible Nitric Oxide Synthase
KC	Keratinocyte-derived Chemokine
LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	Monocyte Chimioattractant Protein-1
MIP-2α	Macrophage Inflammatory Protein 2 α
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
nNOS	Neuronal Nitric oxide Synthase
NO	Nitric Oxide
PAF	Platelet Activating Factor
P_{AP}	Pression Artérielle Pulmonaire
PAPO	Pression artérielle Pulmonaire Occluse
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PG	Prostaglandine
P_{OG}	Pression de l'Oreille Gauche
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PEP	Pression Expiratoire Positive
PNN	Polynucléaires Neutrophiles
Q_c	Débit Cardiaque
ROS	Reactive Oxygen Species
RPT	Résistances Pulmonaires Totales
RVP	Résistances Vasculaires Pulmonaires
sIL-6R	Récepteur Soluble à l'Interleukine-6
sRAGE	Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products
TGF	Transforming Growth Factor
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VILI	Ventilator-Induced Lung Injury
VM	Ventilation Mécanique
V_t	Volume tidal (courant)
vWf	Von Willebrand Factor

PREAMBULE

Le syndrome de détresse respiratoire aigue (ou *Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) est la forme la plus grave d'œdème pulmonaire lésionnel et est associé à une mortalité élevée. Il est défini par une détresse respiratoire aigue de mécanisme non exclusivement cardiogénique, associée à une hypoxémie et à des infiltrats pulmonaires bilatéraux radiologiques. Il s'agit d'une pathologie secondaire à la lésion de la membrane alvéolocapillaire par des agents agressants (mécaniques, chimiques ou cellulaires) qui sont soit inhalés, soit délivrés dans la circulation pulmonaire. Les mécanismes de cette pathologie inclut une dysfonction vasculaire pulmonaire, qui se caractérise par des altérations structurales et fonctionnelles des acteurs cellulaires et non cellulaires de la microvascularisation pulmonaire. Les éléments fonctionnels sont dominés par l'effet des médiateurs à effets vasoconstricteurs et par la vasoconstriction hypoxique. De très nombreux facteurs structuraux jouent un rôle, notamment l'obstruction des microvaisseaux pulmonaires, liées à l'œdème pulmonaire lésionnel lui-même mais aussi à la ventilation mécanique (VM). La principale conséquence de ces altérations est l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires, avec comme résultante une majoration de l'impédance à l'éjection du ventricule droit. Les mécanismes de l'hypertension pulmonaire (HTP) aigue au cours de l'œdème pulmonaire lésionnel et de l'ARDS sont en fait multiples et impliquent par ailleurs les thérapeutiques ventilatoires utilisées. L'HTP et la dysfonction ventriculaire droite associée, réalisant au maximum un tableau de cœur pulmonaire aigu, sont associées à un pronostic péjoratif au cours de l'ARDS chez l'humain. Mais les déterminants de cette dysfonction vasculaire pulmonaire demeurent largement méconnus. Notre capacité à mieux les caractériser pourrait être une étape importante dans une démarche thérapeutique innovante

visant à proposer de nouveaux traitements de l'ARDS centrés sur la dysfonction vasculaire pulmonaire.

Pour progresser dans cette démarche, nous avons d'abord mis au point un modèle murin d'ARDS, et fait ensuite le choix d'étudier trois facteurs potentiellement impliqués dans la dysfonction vasculaire pulmonaire de l'ARDS: un facteur "exogène", la VM à haut niveau de pression positive, et deux facteurs "endogènes": un médiateur de la cascade inflammatoire et l'âge.

Le modèle murin d'ARDS mis au point est proche du scénario humain. Il se caractérise par une double agression, la première pseudo-septique par l'instillation orotrachéale de particules bactériennes et la seconde mécanique par une VM prolongée à bas volume courant (*tidal volume*, V_t) telle qu'utilisée en pratique clinique courante. Ce modèle inclut des explorations fonctionnelles et hémodynamiques invasives in vivo. Nous avons vérifié que ce modèle d'agression était responsable d'une dysfonction vasculaire pulmonaire.

Dans un premier travail, nous avons exploré l'impact de l'utilisation de manœuvres intermittentes de recrutement alvéolaire. Cette technique consiste à appliquer de manière transitoire et répétée au cours du support ventilatoire de hauts niveaux de pression positive. Elle pourrait apporter un bénéfice en terme de mécanique ventilatoire et d'échanges gazeux.

Dans un deuxième travail, nous avons étudié le rôle de l'interleukine(IL)-6. Cette cytokine joue un rôle clé dans la réponse inflammatoire aigue. Elle a été proposée comme biomarqueur pronostique péjoratif au cours de l'ARDS. Nous avons utilisé des souris déficientes en IL-6 d'une part et de l'IL-6 humaine recombinante d'autre part.

Dans un troisième travail, nous avons étudié l'impact d'un facteur intrinsèque, l'âge, décrit comme facteur prédictif indépendant de mortalité au cours de l'ARDS. Nous avons utilisé des

souris adultes jeunes et adultes matures soumises à la double agression évoquée avant ou à une VM à bas Vt seule.

Le présent mémoire de recherche présente la synthèse de ces travaux et s'articule en trois parties:

- L'introduction, exposant d'abord des rappels relatifs à la circulation pulmonaire, ensuite un synthèse bibliographique de l'ARDS, et enfin une revue de la physiopathologie de la dysfonction vasculaire pulmonaire de l'ARDS.
- La présentation des résultats.
- La discussion des résultats.

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION

1. La circulation pulmonaire

Dans ce chapitre sont abordées les bases anatomiques et physiologiques de la circulation pulmonaire, de la macro à la microcirculation, ainsi que les acteurs cellulaires impliqués, afin de comprendre la physiopathologie de la dysfonction vasculaire pulmonaire au cours de l'ARDS.

1.1. Alvéole pulmonaire et membrane alvéolocapillaire

Une unité respiratoire est composée d'une bronchiole respiratoire, des canaux alvéolaires, des chambres et des alvéoles. L'alvéole est la zone fonctionnelle du poumon, siège des échanges gazeux, après convection de l'air vers l'alvéole au travers des voies aériennes. Le nombre total d'alvéoles pour les deux poumons varierait de 270 à 790 millions, pour une surface totale d'échange de 80 à 140 m² (1–3). L'alvéole a un volume moyen de $4,2 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$, c'est-à-dire qu'un millimètre cube de parenchyme pulmonaire contient 170 alvéoles (3). L'espace polygonale alvéolaire est délimité par un épithélium spécialisé constitué de pneumocytes de type I et de type II, qui assure un rôle de barrière physique et fonctionnelle vis à vis de l'environnement extérieur (4) (**Figure 1**).

Le pneumocyte de type I est une cellule de différenciation terminale, ne se divisant pas, de morphologie pavimenteuse aplatie, disposée en monocouche, représentant 40% des cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires et couvrant de 95 à 97% de la surface alvéolaire (5).

Le pneumocyte de type II, de morphologie sphérique, pourvue de microvillosités et d'inclusions lamellaires riche en protéines et en lipides, est la cellule de renouvellement de l'épithélium alvéolaire, capable de se diviser et de se différencier en pneumocyte I (6). Les pneumocytes de type II constituent 60% des cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires, 10 à

15% de l'ensemble des cellules du poumon et couvrent moins de 5% de la surface alvéolaire (6–8). Les pneumocytes de type II sécrètent le surfactant pulmonaire, matériau composé de phospholipides et de protéines, tapissant la surface endoalvéolaire (8) et pourvu de propriétés tensioactives facilitant l'expansion des alvéoles au cours de l'inspiration. Les pneumocytes de type II ont aussi des propriétés immunologiques, telles que la synthèse de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et de substances antibiotiques (surfactant, complément, lactoferrine, lysozyme), antioxydantes et antiprotéases (8).

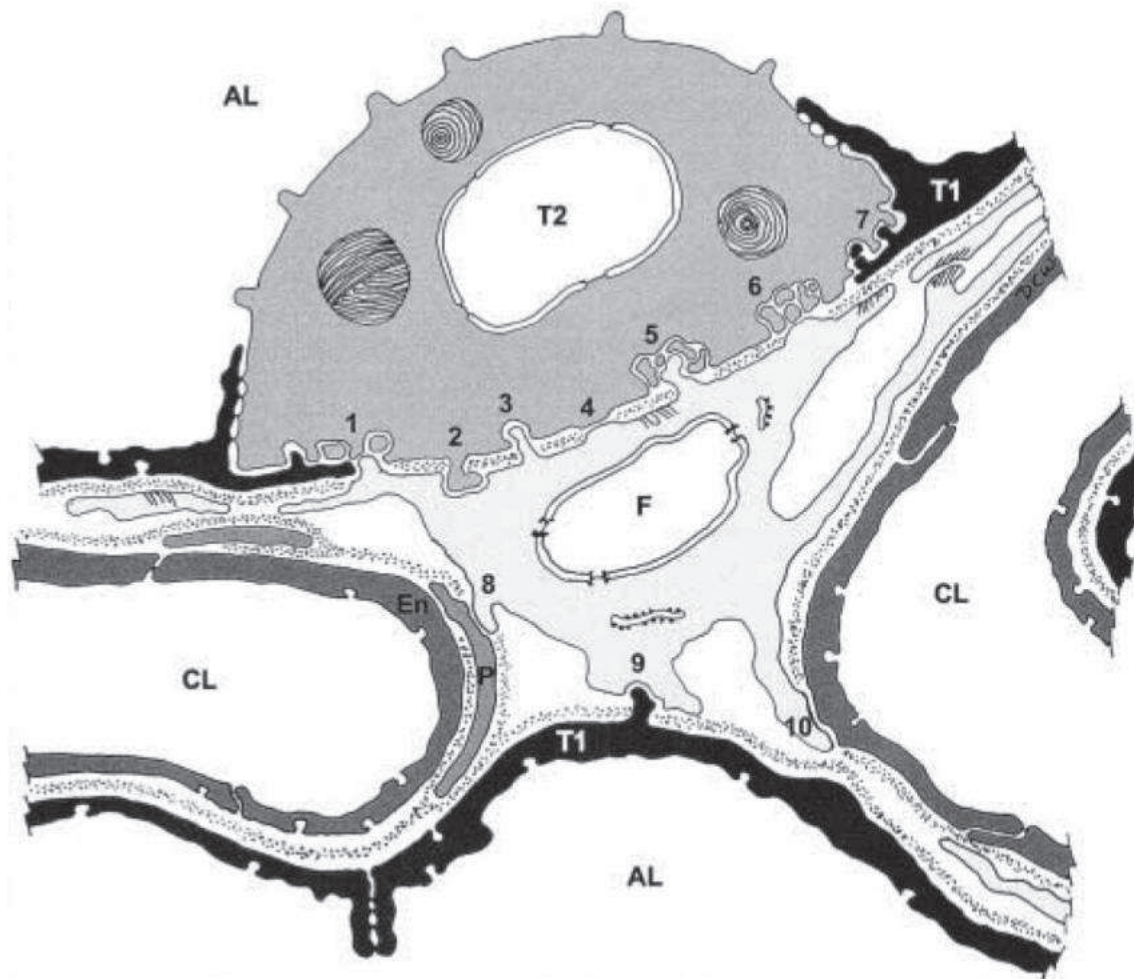


Figure 1: Les acteurs cellulaires de l'alvéole pulmonaire incluent les pneumocytes de type I (T1) et II (T2), les fibroblastes (F), les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires (En) et les péricytes (P). Les lumières alvéolaire (AL) et capillaire (CL) sont notées. Les connexions intercellulaires sont marquées, notamment entre pneumocytes I et II (1 et 7) et entre pneumocytes II et fibroblastes (2-6). D'après Townsley et al. (9).

Dans l'espace endoalvéolaire du sujet sain résident des cellules de l'immunité, incluant des macrophages, des lymphocytes, des polynucléaires neutrophiles (PNN) et des mastocytes. Les macrophages alvéolaires représentent 90% de ce pool de cellules immunitaires résidentes. Ces acteurs de première ligne de l'immunité innée ont une durée de vie longue, jusqu'à 3 mois. Ils sont essentiellement originaires du pool de monocytes circulants. Leurs rôles sont nombreux, incluant l'opsonisation, la phagocytose et la dégradation des pathogènes respiratoires, la présentation d'antigène aux cellules de l'immunité spécifique, la libération de médiateurs de l'inflammation et la clairance des PNN apoptotiques (10). Au cours de la réaction inflammatoire, par exemple lors d'une infection, leur population est amplifiée, via le recrutement et la différenciation de monocytes circulants, sous l'action attractante des chimiokines dont la *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 (11).

Les lymphocytes représentent 10% du pool de cellules immunitaires résidentes de l'espace endoalvéolaire chez le sujet sain. Ils participent à la réponse immunitaire humorale et cellulaire spécifique (12).

Les PNN représentent moins de 5% du pool de cellules immunitaires résidentes de l'espace endoalvéolaire chez le sujet sain. Au cours de l'agression aigüe de l'ARDS, les PNN sont recrutés du sang circulant vers le milieu endoalvéolaire par un gradient de chimiokines. Les principales chimiokines des PNN sont l'interleukine 8 (IL-8, CXCL8) chez l'humain et le *macrophage inflammatory protein 2 α* (MIP-2 α , CXCL2) et le *keratinocyte-derived chemokine* (KC, CXCL11) chez la souris (13). D'autres facteurs solubles jouent un rôle dans le recrutement local des PNN, tels que la fraction C5 activée du complément, le *platelet activating factor* (PAF) et le leucotriène B4. Les chimiokines sont libérés principalement par les macrophages alvéolaires, les pneumocytes de type II et les cellules endothéliales. Sous leur action, les PNN sont activés, adhèrent à l'endothélium vasculaire pulmonaire grâce aux interactions avec les molécules d'adhésion endothéliales puis migrent vers l'espace

endoalvéolaire par diapédèse, à travers les jonctions intercellulaires endothéliales (13). En situation d'agression aiguë, les PNN deviennent les cellules majoritaires de l'espace endoalvéolaire (13). Ils participent à la phagocytose microbienne et des particules opsonisées, libèrent par dégranulation dans les vésicules d'endocytose ou dans l'espace endoalvéolaire d'enzymes et médiateurs (lysosyme, élastase, défensines, cathepsines et des espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) (14). Stimulés, ils libèrent aussi des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines. Leur survie dans l'alvéole n'excède pas 48 heures. Après leur décès par apoptose, les PNN sont phagocytés par les macrophages alvéolaires (15).

La membrane alvéolocapillaire, qui sépare le milieu sanguin du milieu aérien, est constituée de 6 couches: i) le surfactant, ii) l'épithélium alvéolaire, iii) la membrane basale épithéliale alvéolaire, iv) l'espace interstitiel, v) la membrane basale capillaire, qui fusionne souvent avec la membrane basale épithéliale alvéolaire, et vi) l'endothélium capillaire. Son épaisseur totale est de 0,6 μm en moyenne, mais peut atteindre 0,2 μm au minimum au niveau des zones d'échanges gazeux. Hors des zones de fusion des membranes basales capillaire et épithéliale, l'espace interstitiel est composé de cellules et d'une matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire est constituée de protéines fibreuses (collagène et élastine) et de protéines structurales ou adhésives (fibronectine et laminine) au sein d'un gel polysaccharide hydraté contenant des glycosaminoglycanes (16). La principale cellule de l'espace interstitiel est le fibroblaste. Les fibroblastes représentent 30 à 40% de l'ensemble des cellules du poumon. Cette cellule, d'origine mésenchymateuse, fusiforme, longue de 20 à 30 μm et large de 5 à 10 μm , avec des prolongements courts et ramifiés, sécrète du collagène, de la fibronectine, des protéoglycanes, des glycoprotéines et des glycosaminoglycanes (17). Au cours du phénomène de cicatrisation sont observés des myofibroblastes, au phénotype mixte de fibroblastes et de cellules musculaires lisses (18). La population de fibroblastes au sein de l'organisme et du

poumon est hétérogène et présente une variabilité en terme de morphologie, de phénotype, de profil génétique et de capacité de prolifération (18,19).

1.2. Acteurs anatomiques de la circulation pulmonaire

1.2.1. Ventricule droit

Le ventricule droit est le ventricule prédominant au cours de la vie embryonnaire et foetale. Pendant cette période, seul 20% du sang éjecté par le ventricule droit pénètre dans les poumons, le reste gagnant soit l'oreillette gauche par le foramen ovale soit l'aorte par le *ductus arteriosus* (20,21). A la naissance, les résistances des vaisseaux pulmonaires chutent rapidement, augmentant le volume sanguin pénétrant dans les poumons (22). L'élévation de la pression atriale gauche conduit à la fermeture du foramen ovale (23), qui reste cependant perméable chez près d'un quart des sujets (24). Le *ductus arteriosus* se ferme dès les premiers jours de la vie *ex-utero*. A 3 semaines de vie, le régime de pression au sein de la circulation pulmonaire est celui du sujet adulte (25).

Le ventricule droit est une cavité de géométrie complexe (**Figure 2**). Il forme, vue en coupe, un croissant accolé à la droite du ventricule gauche. Sa morphologie le distingue radicalement du ventricule gauche, notamment par ses grosses trabéculations, l'absence de continuité des fibres musculaires entre les valves d'admission et d'éjection (26) et la faible épaisseur de sa paroi, qui n'excède pas 2 à 3 mm en fin de diastole (27). Les fibres musculaires ventriculaires droites sont hélicoïdales, expliquant le mouvement de torsion observé au cours de la contraction. L'absence d'une bande médiane de fibres orientées transversalement, qui agiraient comme dans le ventricule gauche en raccourcissant le diamètre de la cavité, explique que la modification géométrique principale du ventricule droit au cours de la systole est un raccourcissement longitudinal (28). On notera que le septum interventriculaire est considéré

structurellement comme une partie du ventricule droit, en cela qu'il est constitué de fibres longitudinales appartenant au ventricule droit (26). Le ventricule droit s'accommode aisément de variations importantes du retour veineux, dépendantes notamment de la position, de la volémie sanguine ou encore de la respiration (29). La faible épaisseur de sa paroi est en cause, qui favorise sa distensibilité, mais sa morphologie est aussi impliquée. En effet, sa forme en soufflet permet une grande variation du volume de remplissage pour une faible variation d'aire de sa paroi libre. Ces caractéristiques géométriques et fonctionnelles sont adaptées à l'éjection de volumes sanguins variables, mais ne sont pas performantes pour générer une pression élevée.

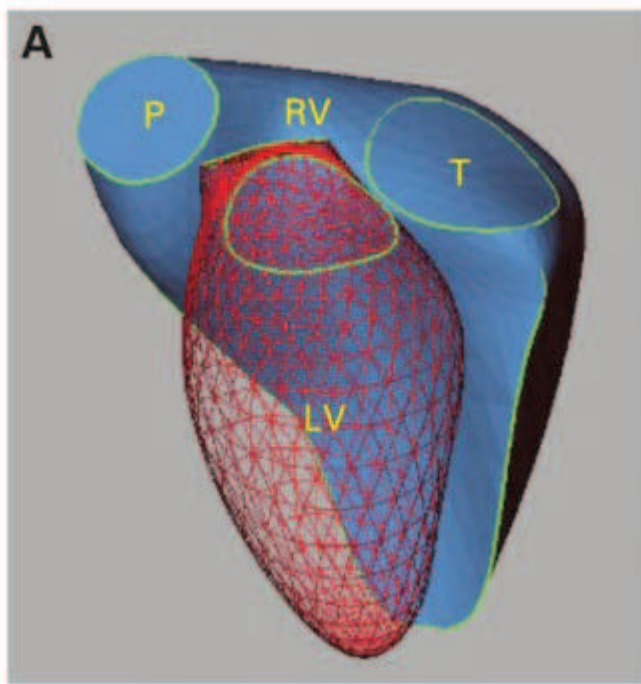


Figure 2: Les formes des ventricules droit (RV) et gauche (LV) ont été modélisées et reconstruites en 3D. On observe la forme particulière du ventricule droit, enroulé autour du ventricule gauche. D'après Sheehan et al. (26).

Des données ont suggérées que les myocards des ventricules droit et gauche différaient structurellement et fonctionnellement (30–32). Ainsi, si le myocarde ventriculaire droit, plus

riche en isoforme α de chaîne lourde de myosine, est capable d'une contraction plus rapide (31), sa réponse inotrope à une stimulation adrénérgique est beaucoup plus faible que celle du myocarde ventriculaire gauche (32).

La perfusion coronaire du ventricule droit est systole-diaastolique, car la pression tissulaire du ventricule droit, au contraire du ventricule gauche, n'excède jamais en condition physiologique la pression aortique, permettant au flux coronaire de persister au deux temps de la révolution cardiaque (27).

1.2.2. Vascularisation pulmonaire

Le ventricule droit éjecte dans un système de circulation à basse pression, faiblement résistant et hautement compliant, qui permet une grande adaptation aux variations du volume éjecté par le ventricule droit (22). Les artères pulmonaires se ramifient jusqu'aux capillaires pulmonaires, parallèlement à l'arborescence aérienne.

Une classification fonctionnelle (33) distingue les artères de large calibre qui transmettent l'énergie du flux sanguin, les artères de moyen calibre qui distribuent le flux sanguin, et les artères de petit calibre qui contrôlent la pression via l'activité musculaire lisse pariétale. Les artères de large calibre sont les artères présegmentaires extra-lobaires et intra-lobaires. Les artères de moyen calibre sont les artères segmentaires et la première génération d'artères intra-acinaires qui accompagnent les bronchioles terminales. Les artères de faible calibre incluent les artères intra-acinaires au delà de la deuxième génération jusqu'aux artérioles terminales pré-capillaires.

Une classification anatomique (34) est basée sur la composition de la paroi artérielle. De la première à la neuvième génération, c'est-à-dire jusqu'à 2 mm de diamètre environ, la paroi artérielle présente une couche élastique et les artères sont dites élastiques (générations 1 à 6) ou transitionnelles (générations 7 à 9). En dessous de 2 mm, la paroi artérielle est purement

musculaire, dépourvu de fibres élastiques et les artères sont dites musculaires. En deçà de 150 μm de diamètre, les artères sont inconstamment muscularisées, puis souvent amusculaires en deçà de 16 μm . Cependant, il peut y avoir une monocouche musculaire dans les artérioles tout-à-fait terminales, jusqu'à l'entrée du lit capillaire.

Les artères musculaires sont les plus résistantes, c'est-à-dire participent de manière prédominante aux résistances vasculaires pulmonaires (RVP). Les RVP sont calculées comme le ratio de la pression motrice du débit sanguin pulmonaire, soit le gradient de la pression artérielle pulmonaire (P_{AP}) moins la pression de l'oreillette gauche (P_{OG}) sur le débit cardiaque (Q_C) c'est-à-dire $RVP = (P_{AP} - P_{OG})/Q_C$. La pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO), mesurée lors du cathétérisme artériel pulmonaire, est une bonne approximation de la P_{OG} . Les résistances sont exprimées en unités Wood (en $\text{mmHg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$) ou en $\text{dynes}\cdot\text{second}\cdot\text{cm}^{-5}$, une unité Wood équivaut à $80 \text{ dynes}\cdot\text{second}\cdot\text{cm}^{-5}$ (22). Les résistances dites pulmonaires totales (RPT), aussi appelées RVP "totales", désignent le ratio de la P_{AP} sur le Q_C , c'est -à-dire $RPT = P_{AP}/Q_C$. Les RVP sont parfois assimilées à la post-charge ventriculaire droite, mais en fait la sous-estiment. C'est l'impédance vasculaire pulmonaire (ZVP) qui correspond à la post-charge ventriculaire droite. La ZVP dépend des RVP mais aussi de l'élastance et des ondes réfléchies (33,35).

Les résistances vasculaires pulmonaires sont influencés par le volume pulmonaire. Schématiquement, lorsque le volume du poumon croit au dessus de la capacité résiduelle fonctionnelle (CRF), les vaisseaux extra-alvéolaires subissent une traction radiaire du parenchyme avoisinant, ce qui augmente leur diamètre, alors que les vaisseaux intra-alvéolaires sont étirés, ce qui réduit leur lumière. Lorsque le volume pulmonaire décroît en dessous de la CRF, les phénomènes inverses se produisent. Les vaisseaux intra et extra-alvéolaires se comportent donc comme deux compartiments inversement impactés par les variations de volumes pulmonaires de part et d'autre de la CRF (33,36,37) (**Figure 3**).

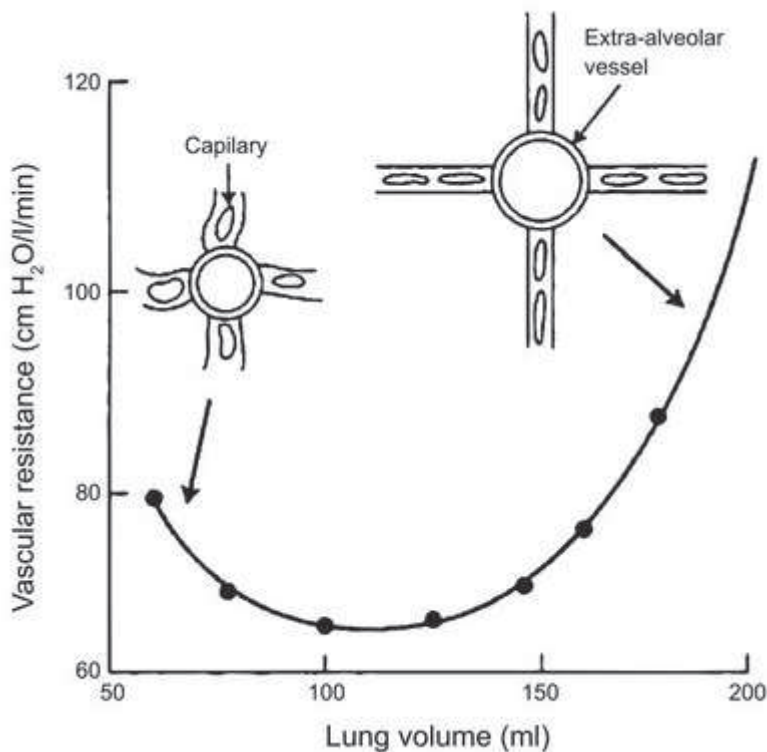


Figure 3: Le volume pulmonaire est un déterminant du calibre des microvaisseaux pulmonaires et des résistances vasculaires pulmonaires. D'après Price et al. (38).

Les vaisseaux intra et extra-alvéolaires sont soumis à des régimes de pression environnante différents. La pression environnante des vaisseaux extra-alvéolaires est la pression pleurale.

La pression environnante des vaisseaux intra-alvéolaires est la pression alvéolaire (33).

Les résistances vasculaires pulmonaires peuvent s'élever selon 4 principaux mécanismes physiopathologiques affectant la microvascularisation pulmonaire: la thrombose, la contraction, le remodelage et la compression extrinsèque. Les résistances vasculaires pulmonaires, en conditions physiologiques, n'excèdent pas 1/20ème des résistances vasculaires systémiques. Un gradient de 5mmHg de part et d'autre de la circulation pulmonaire est suffisant pour permettre le flux transpulmonaire, ce qui souligne la faible fonction contractile ventriculaire droite requise.

1.3. Acteurs cellulaires de la circulation pulmonaire

1.3.1. Cellules endothéliales pulmonaires

Les cellules endothéliales forment une monocouche de cellules squameuses tapissant la paroi interne des vaisseaux pulmonaires tout au long de l'axe artère-capillaire-veine. Ces cellules présentent au niveau du poumon une hétérogénéité phénotypique. Deux types cellulaires sont classiquement distingués dans le poumon: les cellules endothéliales artérielles pulmonaires (CEAP) et les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires (CEMP) , la transition se situant au niveau des vaisseaux de 25 µm de diamètre (39).

L'endothélium pulmonaire joue un rôle de barrière entre le sang et le microenvironnement tissulaire, mais permet les échanges gazeux au niveau de l'alvéole. Il participe à la régulation des flux liquidiens entre le sang et l'interstitium. En conditions normales, une faible quantité de fluide est filtré à travers la monocouche endothéliale et drainé par le système lymphatique pulmonaire. Cette filtration est limitée par la nature continue de l'endothélium, incluant des jonctions serrées et adhérentes intercellulaires (40,41). Ainsi le flux liquidien est finement régulé et emprunte passivement les zones de jonction intercellulaire (voie paracellulaire), sous l'effet du gradient de pression hydrostatique entre les secteurs vasculaire et interstitiel (41,42). L'albumine et d'autres macromolécules sont activement transportées à travers les cellules endothéliales par un système complexe de vésicules (voie transcellulaire) (41,43). L'eau peut aussi pénétrer les cellules endothéliales via les aquaporines (44).

Les cellules endothéliales ont des fonctions métaboliques. Elles fixent certaines substances vasoactives circulantes (bradykinine, endothéline, angiotensine II), et en produisent d'autres (angiotensine II, nitric oxide (NO)) en réponse à divers stimuli, participant à la régulation du tonus vasculaire pulmonaire, de l'angiogénèse et de la prolifération cellulaire (45,46).

La barrière endothéliale joue aussi un rôle d'isolant physique entre les facteurs de coagulation et les plaquettes du compartiment sanguin d'une part et le compartiment sous-endothélial

prothrombogène d'autre part. Dans ce but, la surface de l'endothélium est recouverte d'une fine couche de glycoprotéines et de protéoglycanes, appelé glycocalyx (47). Par ailleurs, les cellules endothéliales libèrent des médiateurs anti-aggrégants et anticoagulants tels que le NO, l'héparine, la prostacycline ou encore la protéine C activée (46). Lorsque l'endothélium est lésé, la basale sous-endothéliale est exposée au sang, initiant la cascade de la coagulation. Les CEMP régulent activement ce mécanisme, via la production séquentielle de substances prothrombotiques (facteur von Willebrand (vWf), P-selectine), antithrombotiques (NO, heparan sulfate, thrombomoduline, prostacycline) et fibrinolytiques (facteur activateur du plasminogène) (48).

Toutes les cellules endothéliales du poumon n'exercent pas les fonctions sus-décrites à un degré équivalent. Une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle existe, qui concerne la morphologie, les propriétés de barrières, l'expression de molécules d'adhésion, les capacités de prolifération et de régénération, les interactions avec les leucocytes et les réponses à l'influx intracellulaire de calcium et à l'étirement (39,49–54). Il existe notamment une capacité de régénération et un potentiel angiogénique beaucoup plus élevés pour les CEMP par rapport aux CEAP (55), grâce à une quantité importante de CEMP progénitrices (CEMP_P). Ces CEMP_P sont résidentes de l'endothélium et caractérisées par i) un potentiel de régénération important (>2000 divisions) et une capacité de vasculogénèse, ii) l'expression de marqueurs de l'endothélium (CD31, CD144, *endothelial nitric oxide (NO) synthase* (eNOS) et vWf, iii) l'expression de marqueurs des progéniteurs (CD34 et CD309) et iv) la conservation des spécificités fonctionnelles des CEMP (56). Chez le rat, jusqu'à 50% des CEMP isolées d'artères pulmonaires ont des caractéristiques de CEMP_P (56).

Si les fonctions des cellules endothéliales sont majoritairement constitutives, certaines sont inductibles, via l'exposition à des stimuli pro-inflammatoires tels que les endotoxines bactériennes ou les cytokines pro-inflammatoires. L'endothélium pulmonaire est alors activé

et des modifications structurales et fonctionnelles l'affectent, incluant principalement l'expression accrue de molécules d'adhésion, la libération de cytokines, l'apparition d'un phénotype prothrombogène, et des modifications du tonus vasculaire pulmonaire (57).

1.3.1. Cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires (CMLAP) présentent deux populations phénotypiquement et fonctionnellement distinctes. Les cellules de morphologie épithélioïde sont de type synthétique, à potentiel de prolifération, exprimant fortement l' α -actine et les protéines de la matrice extracellulaire, et faiblement la myosine. Les cellules en fuseau sont de type contractile, ont un faible potentiel de prolifération et de migration et expriment fortement la myosine et faiblement l' α -actine (58,59).

2. Syndrome de détresse respiratoire aigue

Dans ce chapitre sont d'abord abordées successivement la définition de l'ARDS, son épidémiologie et les grandes lignes de sa physiopathologie. Ensuite les modalités de prise en charge, notamment ventilatoire, des patients avec ARDS sont détaillées. Enfin, les techniques d'étude expérimentale de l'ARDS via les modèles animaux sont discutées.

2.1. Définition

La première description de l'ARDS a été proposée par Ashbaugh en 1967 (60), à propos de 12 patients présentant, à l'occasion de pathologies diverses (pneumonie virale, polytraumatisme et pancréatite), un syndrome respiratoire d'installation aigue associant une dyspnée de repos, une tachypnée, une hypoxémie réfractaire, une compliance pulmonaire abaissée et des opacités radiologiques pulmonaires bilatérales. En 1988, cette définition a été précisée par Murray, qui proposait la prise en compte de l'étiologie et des atteintes extra-respiratoires et

l'utilisation d'un score semi-quantitatif de la sévérité de l'atteinte pulmonaire à 4 items, dit *Lung Injury Score*: le degré d'hypoxémie, le niveau de pression expiratoire positive (PEP), la compliance pulmonaire statique, et le degré d'extension des opacités radiologiques (61) (**Figure 4**). Ce score a servi la recherche clinique et l'inclusion des patients dans les essais thérapeutiques, mais deux critiques principales l'affectaient: i) sa capacité à prédire la morbi-mortalité était faible, et ii) il ne distinguait pas le mécanisme de l'œdème, ce qui conduisait à inclure des patients présentant un œdème pulmonaire cardiogénique au lieu d'un œdème lésionnel.

	Score
Chest radiograph	
No alveolar consolidation	0
Alveolar consolidation confined to 1 quadrant	1
Alveolar consolidation confined to 2 quadrants	2
Alveolar consolidation confined to 3 quadrants	3
Alveolar consolidation confined to 4 quadrants	4
Hypoxaemia score	
$PaO_2/FiO_2 \geq 300$	0
PaO_2/FiO_2 225–299	1
PaO_2/FiO_2 175–224	2
PaO_2/FiO_2 100–174	3
$PaO_2/FiO_2 < 100$	4
PEEP score (when mechanically ventilated)	
≤ 5 cm H ₂ O	0
6–8 cm H ₂ O	1
9–11 cm H ₂ O	2
12–14 cm H ₂ O	3
≥ 15 cm H ₂ O	4
Respiratory system compliance score (when available)	
≥ 80 ml/cm H ₂ O	0
60–79 ml/cm H ₂ O	1
40–59 ml/cm H ₂ O	2
20–39 ml/cm H ₂ O	3
≤ 19 ml/cm H ₂ O	4
The score is calculated by adding the sum of each component and dividing by the number of components used.	
No lung injury	0
Mild to moderate lung injury	0.1–2.5
Severe lung injury (ARDS)	>2.5

Figure 4: Un score semi-quantitatif à 4 items a été développé dans les années 90 et visait à évaluer la gravité des patients ARDS. D'après Murray et al. (61).

En 1994, une nouvelle définition internationale simplifiée a été proposée lors d'une conférence de consensus américano-européenne (62). Deux stades de gravité étaient distingués: l'agression pulmonaire aiguë (*Acute Lung Injury* - ALI) était le stade de gravité inférieure ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$) et l'ARDS était le stade de gravité supérieure ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$). Considérant qu'ALI et ARDS s'inscrivaient dans un continuum chronologique (63), cette définition permettait d'inclure dans les essais les patients dès le stade d'ALI, c'est-à-dire précocement au cours de l'atteinte pulmonaire. Par ailleurs, cette définition intégrait un critère de mécanisme, absent de la définition précédente. Sa simplicité a facilité son utilisation en pratique clinique courante et en recherche clinique pendant près de deux décennies. En 2013, une nouvelle définition a été proposée par un groupe d'expert européens et américains réunis à Berlin (64) (**Figure 5**). Cette définition précisait la durée d'installation, abandonnait le terme ALI pour fixer 3 niveaux de gravité (léger, modéré et sévère) de l'ARDS selon le rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, introduisait un critère de PEP minimale, et simplifiait la réflexion relative au mécanisme de l'œdème.

Table 3. The Berlin Definition of Acute Respiratory Distress Syndrome

Acute Respiratory Distress Syndrome	
Timing	Within 1 week of a known clinical insult or new or worsening respiratory symptoms
Chest imaging ^a	Bilateral opacities—not fully explained by effusions, lobar/lung collapse, or nodules
Origin of edema	Respiratory failure not fully explained by cardiac failure or fluid overload Need objective assessment (eg, echocardiography) to exclude hydrostatic edema if no risk factor present
Oxygenation ^b	
Mild	$200 \text{ mm Hg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mm Hg}$ with PEEP or CPAP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}^c$
Moderate	$100 \text{ mm Hg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mm Hg}$ with PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$
Severe	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mm Hg}$ with PEEP $\geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$

Figure 5: Définition de l'ARDS dite de Berlin (2012). D'après Ranieri et al. (64).

2.2. Epidémiologie

Le nombre de cas d'ALI/ARDS (définition 1994) aux Etats-Unis a été estimé à 190,000 patients adultes par an en 2000, soit une incidence annuelle estimée à 59 cas pour 100,000 habitants (65). Dans la population de réanimation, l'incidence de l'ALI/ARDS (définition 1994) est élevée, atteignant ainsi près de 15% des patients ventilés (63). La première cause d'ARDS est l'infection pulmonaire (65). Les autres étiologies fréquentes sont les infections extra-pulmonaires, l'inhalation du contenu gastrique et les polytraumatismes. Les causes moins fréquentes incluent entre autres la pancréatite aiguë, la polytransfusion ou encore les intoxications par inhalation (66).

2.3 Mortalité et facteurs de risque de gravité

Au début et au milieu des années 1980, la mortalité de l'ARDS atteignait 60% (67,68). Elle a ensuite progressivement décliné, et s'est stabilisée à partir du milieu des années 1990 vers 25 à 45% (69). Les facteurs impliqués dans cette baisse sont multiples, incluant notamment l'amélioration globale de la prise en charge des patients de réanimation et l'évolution des techniques et matériels de ventilation artificielle. La compréhension des phénomènes de *ventilator-induced lung injury* (VILI, lésions pulmonaires induites par la ventilation), notamment du concept de volotraumatisme à l'origine de la baisse du Vt insufflé (70,71) a probablement aussi joué un rôle.

Les facteurs de risque de mortalité rapportés chez les patients ARDS sont nombreux, et peuvent être regroupés ainsi : intrinsèques (âge, comorbidités, tabagisme) (69,72–77), liés au mécanisme de l'ARDS (75), au degré d'hypoxémie (73,75), au degré d'espace mort induit par la réduction du lit vasculaire pulmonaire (78), au degré d'altération de la mécanique ventilatoire (78), à la gravité globale et au nombre de défaillances extra-respiratoires (74,75), au nombre de jour de ventilation artificielle avant l'apparition de l'ARDS (75) et à l'apparition

d'une défaillance cardiaque droite (75,79–82) On note qu'une méta-analyse récente réalisée sur un total de 89 études et 18900 patients a identifié l'âge comme l'unique facteur clinique pronostique indépendant de mortalité (69) (**Figure 6**).

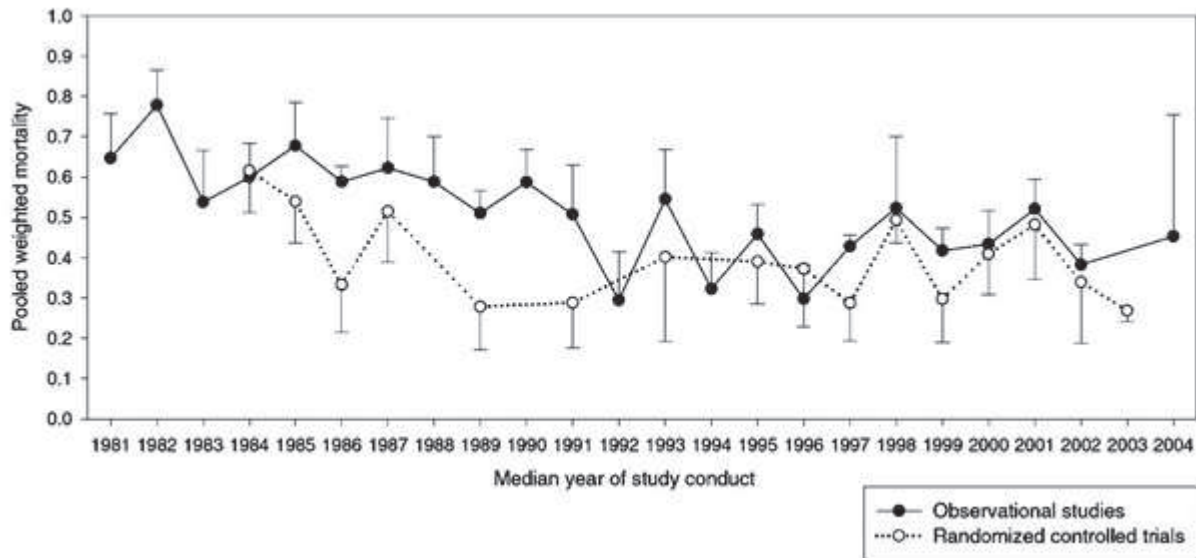


Figure 6: La mortalité de l'ARDS a décré jusu'à la fin des années 1990, puis s'est stabilisée entre 25 et 45%. En pointillés les données des essais contrôlés randomisés et en trait plein les études observationnelles. D'après Phua et al. (69).

Différents scores prédictifs de mortalité au cours de l'ARDS ont été étudiés. Les scores traditionnels de gravité du malade de réanimation tels que l'APACHE II (83) ont une performance correcte. Un score spécifique simple, utilisant l'âge, la bilirubine plasmatique, la diurèse et l'hématocrite a été dérivé d'une cohorte de patients ARDS non traumatiques (84) et validé dans une large cohorte prospective (85).

En plus des variables cliniques, de nombreux marqueurs pronostiques biologiques ont été explorés dans des cohortes de patients ARDS. Ces biomarqueurs, dosés dans le plasma ou dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA), ont été ciblés à cause de leur rôle dans la physiopathologie de l'ARDS. Il s'agit principalement de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, *tumor necrosis factor* (TNF)- α), de cytokines régulatrices (IL-10), de marqueurs

d'adhésion endothéliale (vWF), de marqueurs de lésion épithéliale (*soluble receptor for advanced glycation end products* (sRAGE), protéine D du surfactant), de facteurs de la coagulation et de fibrinolyse (protéine C, *plasminogen activator inhibitor-1*) et de molécules d'adhésion (*intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1) (86). L'utilisation combinée des biomarqueurs et des marqueurs cliniques pourrait accroître encore leur caractère prédictif (87). En dépit de leur intérêt pronostique potentiel, aucun de ces biomarqueurs n'est utilisé en routine clinique.

L'intérêt pronostique des données scannographiques est à souligner. Le scanner thoracique évalue l'étendue de l'atteinte pulmonaire, précisant son caractère (multi)focal ou diffus, et évalue le potentiel de recrutabilité (88,89). Les données scannographiques, combinées aux données cliniques, ont été intégrées dans un score de sévérité de l'ARDS, assez performant pour prédire la mortalité (88).

Les facteurs génétiques contribuant à la susceptibilité de développer un ARDS autant qu'à sa sévérité jouissent d'un intérêt crescendo. Les variants de plus de 25 gènes ont été montrés associés avec le développement d'un ARDS et avec une sévérité accrue (90). Il s'agissait de gènes régulant l'inflammation, la coagulation, la dysfonction endothéliale, la production de radicaux libres de l'oxygène ou encore l'apoptose, autant de processus cellulaires impliqués tant dans la lésion pulmonaire que dans la réparation au cours de l'ARDS.

2.4. Physiopathologie

La physiopathologie et l'évolution de l'ARDS, de l'agression initiale au dommage parenchymateux pulmonaire et à sa résolution, sont abordées dans ce chapitre.

2.4.1. Œdème pulmonaire lésionnel

L'œdème pulmonaire est défini comme l'accumulation pathologique de liquide dans les espaces et tissus extravasculaires pulmonaires. Il résulte le plus souvent d'un déséquilibre entre les phénomènes qui tendent à déplacer le liquide des vaisseaux vers les espaces extravasculaires et les mécanismes qui tendent à évacuer ce liquide, c'est-à-dire le drainage lymphatique interstitiel et l'absorption liquidienne par l'épithélium alvéolaire. L'augmentation de la pression hydrostatique capillaire est le mécanisme de l'œdème pulmonaire dit hémodynamique qui survient dans l'insuffisance cardiaque ou la surcharge volémique.

L'œdème pulmonaire de l'ARDS est de mécanisme lésionnel, c'est-à-dire consécutif à une lésion de la membrane alvéolocapillaire, causée par des agents agressants de nature mécanique, chimique ou cellulaire abordés plus haut. L'agression peut être directe, c'est-à-dire via des agents inhalés, ou indirecte via des agents délivrés dans la circulation pulmonaire (66). Plusieurs mécanismes physiopathologiques sont alors mis en jeu, détaillés après, incluant brièvement une réaction inflammatoire intense, une accumulation et une activation inappropriées des leucocytes et des plaquettes, une activation de la coagulation, une perméabilité accrue des barrières épithéliale et endothéliale constitutives de la membrane alvéolocapillaire et une inactivation du surfactant (66). Il en résulte au plan anatomopathologique à la phase initiale un aspect de dommage alvéolaire diffus, associant dépôts endo-alvéolaires de membranes hyalines, épaissement des parois alvéolaires, œdème alvéolaire et interstitiel, congestion capillaire et infiltrat inflammatoire (91).

L'œdème pulmonaire lésionnel est responsable d'une altération de l'hématose, avec au premier plan une hypoxémie. Les mécanismes potentiels de l'hypoxémie sont plusieurs, incluant un trouble de la diffusion de l'oxygène, des anomalies des rapports ventilation/perfusion et une hypoventilation alvéolaire (92). L'hypoxémie est potentiellement profonde et peu ou pas corrigée par l'oxygène, alors dite réfractaire.

2.4.2. Phase exsudative

L'agression initiale est responsable d'une lésion des différents constituants de la barrière alvéolocapillaire. Au niveau de l'épithélium alvéolaire est observée une destruction par nécrose et apoptose des pneumocytes I et dans une moindre mesure des pneumocytes II (66). La production de surfactant est abaissée (93), tandis que la membrane basale épithéliale se trouve dénudée, se fragmente et se couvre de dépôts de membranes hyalines riches en protéines. Cette perte de l'intégrité épithéliale favorise l'œdème alvéolaire, par rupture physique de la barrière d'une part et par altération des capacités de résorption de l'œdème d'autre part (66). L'œdème alvéolaire est exsudatif fibrineux riche en leucocytes et en plaquettes. L'atteinte du versant endothélial de la barrière est concomitante et participe à la fuite liquidienne. Les CEMP sont disjointes par rupture de leurs jonctions intercellulaires adhérentes (*vascular endothelial cadherin*) et serrées, et tendent à s'éloigner les unes des autres par un phénomène de contraction de leur cytosquelette (57). La mise en contact du sang avec la basale sous-endothéliale participe à l'agrégation plaquettaire et l'activation de la coagulation. L'espace interstitiel est élargi, siège d'un œdème et de la migration de cellules mésoenchymateuses qui participent à l'inflammation locale.

La réaction inflammatoire est un processus clé dans la réponse à l'agression initiale et dans la lésion de la membrane alvéolo-capillaire. Les macrophages alvéolaires sont activés précocement, participent à la phagocytose des débris cellulaires et des agents pathogènes, et libèrent des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, IL-8), des médiateurs lipidiques tels que les dérivés de l'acide arachidonique et des métalloprotéases (94). Ils contribuent à amplifier la réponse inflammatoire locale et systémique, via l'activation des CEMP et le recrutement local de PNN et de monocytes (95). L'activation des CEMP, impliquant le facteur de transcription NF κ B, s'accompagne d'une régulation positive des récepteurs membranaires au TNF de type 2 et d'une production accrue d'IL-6 et d'IL-8 (96).

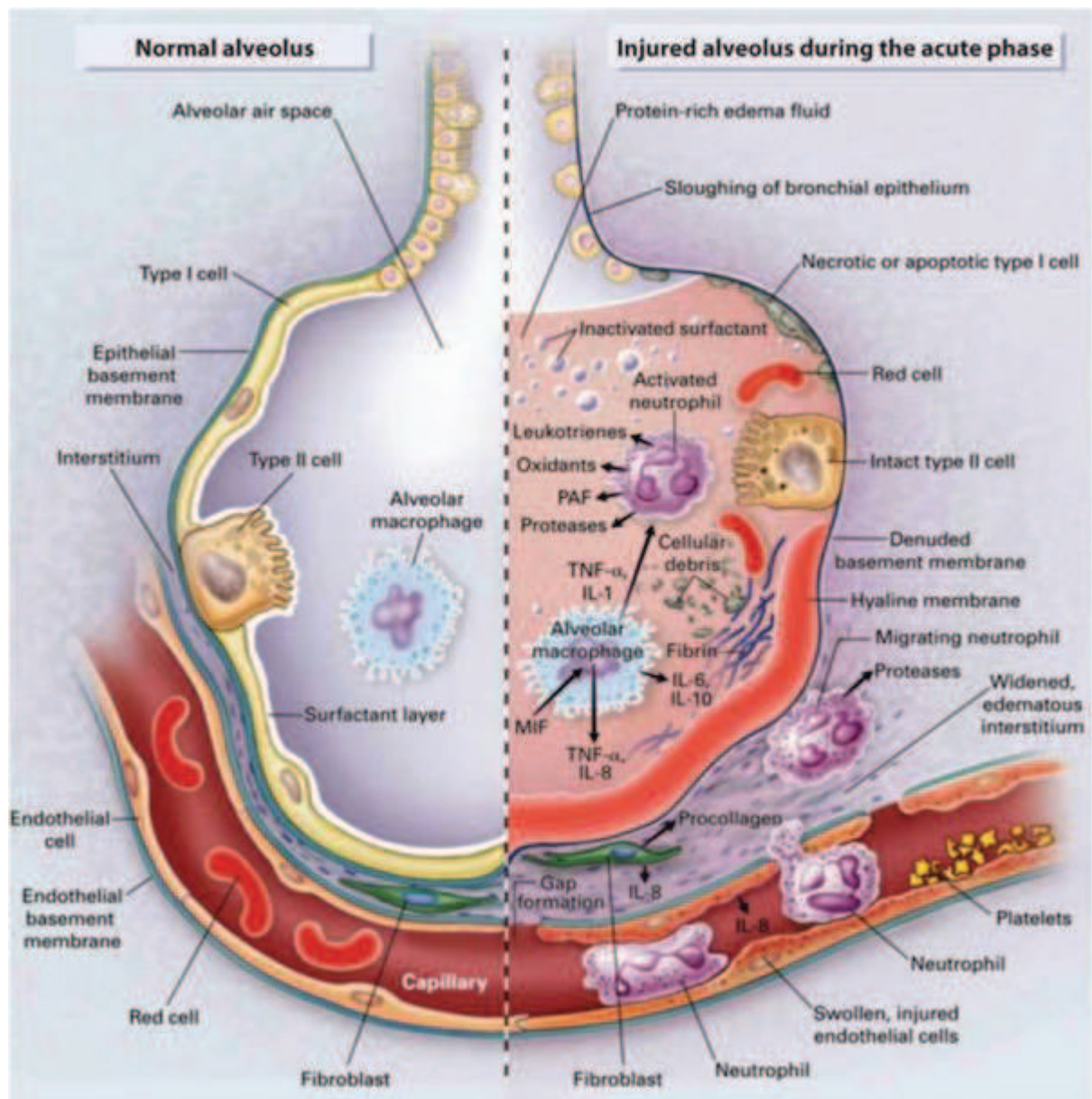


Figure 7: Les mécanismes physiopathologiques de l'ARDS incluent une réaction inflammatoire intense, une accumulation et une activation inappropriées des leucocytes et des plaquettes, une activation de la coagulation, une perméabilité accrue des barrières épithéliale et endothéliale constitutives de la membrane alvéolocapillaire et une inactivation du surfactant. D'après Ware & Matthay et al. (66).

L'hyperexpression des molécules d'adhésion à la surface de CEMP facilitent la fixation des PNN et leur migration trans-endothéliale. Les PNN activés participent à l'amplification de la réponse inflammatoire en sécrétant des cytokines (IL-1 β , TNF α , IL-6), des facteurs de croissance, des collagénases, de l'élastase et des radicaux libres de l'oxygène (97,98). Ces médiateurs oxydants contribuent à l'inactivation du surfactant et à la majoration des lésions

épithéliales et endothéliales via la peroxydation des lipides membranaires (99). Les PNN meurent par apoptose et sont phagocytés par les macrophages. Ce phénomène peut être limité au cours de l'ARDS par la présence de *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) et de *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) dans l'alvéole (100).

En résumé, cette phase exsudative est marquée au niveau épithélial par une inactivation du surfactant, une destruction de pneumocytes I, une fragmentation de la membrane basale, des dépôts de membranes hyalines et un œdème alvéolaire riche en protéines et en débris cellulaires. Au niveau endothélial, on décrit une perte de continuité de la barrière, par rupture des jonctions intercellulaires et contraction du cytosquelette des CEMP, et une activation cellulaire qui promeut la coagulation, amplifie la réponse inflammatoire et favorise la migration trans-endothéliale des leucocytes vers la milieu alvéolaire (**Figure 7**). La réaction inflammatoire est intense et implique les cellules de l'immunité innée.

2.4.3. Phase de résolution

Le processus de réparation est enclenché dès les premiers jours d'évolution de l'ARDS. La phase initiale est proliférative. Des fibroblastes infiltrent l'espace endo-alvéolaire (101), acquièrent des caractéristiques de myofibroblaste par l'expression l' α -actine du muscle lisse, et développe un phénotype pro-cicatrisant, marqué par une production augmentée de protéines de la matrice extracellulaire en même temps qu'une baisse de la capacité de dégradation de la matrice extracellulaire via l'expression accrue d'inhibiteurs de métalloprotéases (102,103). Sous l'effet de facteurs de croissance (*transforming growth factor* (TGF)- β 1, *epithelium growth factor* (EGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF)), ces fibroblastes produisent une matrice extracellulaire provisoire, riche en fibronectine, en collagène et en fibrinogène (104), qui sert de support à la réépithélialisation. La restauration d'un épithélium fonctionnel est une étape clé du processus de réparation, qui permet d'assurer la résorption du fluide alvéolaire

(105), de recombattre l'alvéole et de limiter l'évolution fibrosante (106,107). Les pneumocytes II prolifèrent, s'étalent et se différencient en pneumocytes I, sous l'effet combiné de l'IL-1 β (108,109), de prostaglandine (PG) E2 (110), de facteurs de croissance et par la levée de l'inhibition de contact liée à la présence de pneumocytes I à l'état basal (111,112). Les fibroblastes participent aussi activement à la reconstruction alvéolaire, en sécrétant les différents constituants de la matrice extracellulaire normale après digestion de la matrice extracellulaire provisoire par les métalloprotéases, et en libérant des facteurs de croissance des pneumocytes II.

La résolution se poursuit par la disparition de l'hyperplasie épithéliale (113,114). La prolifération des pneumocytes de type II est freinée et les fibroblastes et les PNN meurent par apoptose, ce qui contribue à diminuer l'inflammation locale (115,116). L'état d'hypercoagulabilité s'amende, freinant la fibroprolifération et diminuant l'inflammation locale (117). Les métalloprotéases sont les acteurs enzymatiques clés du remodelage de l'exsudat et participent donc aussi activement à la réparation épithéliale (118).

Le processus complexe d'hémostase alvéolaire sus-résumé, qui vise à la résolution du processus lésionnel et à la réparation des différents composants de l'unité alvéolocapillaire, est complexe, impliquent au premier plan les pneumocytes II, les fibroblastes et la famille enzymatique des métalloprotéases. Ce processus peut inconstamment faillir, et l'évolution être fibrosante, marquée par une intense prolifération fibroblastique, un excès de matrice extracellulaire, une désorganisation de l'architecture alvéolaire et en conséquence une altération fonctionnelle fixée du poumon compromettant l'hématose (119).

2.5. Support ventilatoire

La prise en charge thérapeutique des patients ARDS consiste en premier lieu en la prise en charge médico-chirurgicale du facteur causal de la maladie, par exemple le traitement

antibiotique dans le cas d'une pneumonie bactérienne. En parallèle, au plan symptomatique, la gestion de ces patients implique la correction de l'hypoxémie et le contrôle de l'hypercapnie via le recours à la VM. Cette thérapeutique de support est ainsi utilisée depuis plusieurs décennies chez les patients ARDS et les modalités de son application ont évolué, alors que les données expérimentales et cliniques soutenant ses effets potentiellement délétères s'accumulaient (VILI).

Le concept de VILI a été élaboré dans les années 70. Webb et coll. ont exposé des poumons sains à une VM, avec plusieurs niveaux de pression inspiratoire (14, 30 et 45 cmH₂O) et de pression expiratoire positive (PEP) (0 et 10 cmH₂O). Le dégât parenchymateux pulmonaire était observé croissant avec le niveau de pression positive, et l'application d'une PEP était protectrice (120). Dreyfuss et coll. ont alors investigué les rôles respectifs du niveau de pression positive d'une part et du Vt d'autre part. En d'autres termes, il s'agissait de préciser lequel du "barotrauma" ou du "volotrauma" déterminait en premier lieu l'intensité du VILI. Des rats sains étaient soumis à une VM, avec plusieurs niveaux de pression inspiratoire. Dans un des groupes à haut niveau de pression inspiratoire, le Vt était limité grâce à un bandage circulaire de la cage thoracique limitant la compliance du système respiratoire (121). Cette étude montrait que le haut Vt, indépendamment du niveau de pression utilisé, était le principal déterminant du VILI. Ce concept de "volotrauma" a été exploré et validé chez l'humain (70) et a conduit à la réduction du Vt recommandé (6 mL/kg de poids théorique) (122) et effectivement appliqué au patient en pratique clinique courante (123). La réduction du Vt a été montrée associée à une limitation des lésions pulmonaires épithéliales et endothéliales chez l'animal (124) et à une baisse des taux sériques et pulmonaires de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6, IL-8, IL-1 β et TNF- α chez l'humain (125,126). L'élévation des taux sériques de ces biomarqueurs au cours du VILI suggèrent d'ailleurs un lien entre la stratégie ventilatoire adoptée et la progression des défaillances extra-respiratoires. Ainsi

l'inflammation systémique accrue associée à l'utilisation d'une stratégie ventilatoire à haut Vt chez le rongeur participe à un "biotrauma", c'est-à-dire une agression extra-respiratoire et à la progression de la défaillance multiviscérale (127–129).

Si le "volotrauma" est le principal mécanisme contributeur du VILI, le "barotrauma" peut aussi être impliqué, notamment pour des niveaux élevés de pression des voies aériennes au cours du plateau télé-inspiratoire, en pratique au-delà de 30 à 35 cmH₂O, qui exposent à un risque accru de pneumothorax (130). Cela a conduit à recommander chez le patient ARDS une limitation de la pression de plateau à 30 cmH₂O (122), largement appliquée dans les essais cliniques (131) et en pratique clinique courante (123,132).

Basée sur ces données expérimentales et humaines, une stratégie de ventilation dite protectrice, c'est-à-dire incluant un Vt bas (vers 6 mL/kg) et la limitation de la pression de plateau (vers 30 cmH₂O) a ainsi émergée dans les années 1990 (133). Une telle stratégie pouvait néanmoins avoir des effets délétères, car le bas Vt favorise les phénomènes d'atélectasie ou dérecrutement et d'ouverture/fermeture des alvéoles (134,135). La PEP s'est révélé un outil efficace de lutte contre ce phénomène délétère (121), indépendamment de son bénéfice en terme d'oxygénation. Trois larges essais randomisés ont ainsi comparés au cours des années 2000 des stratégies ventilatoires à PEP basse et à PEP haute (85,131,136). Aucune différence de mortalité n'était notée mais des bénéfices sur des critères secondaires étaient observés, notamment sur la durée de VM, les défaillances extra-respiratoires et le recours aux thérapeutiques de sauvetage dans l'étude européenne (131). Les résultats de ces 3 travaux ont été poolés dans une méta-analyse, qui a inclus d'autres essais cliniques comparant différents niveaux de PEP et qui a montré un bénéfice en terme de mortalité à l'utilisation d'une stratégie à PEP élevée chez les patients ARDS (137).

La stratégie de VM adoptée en pratique courante chez le patient ARDS a donc évolué au cours des années 2000 (71,123) vers un triptyque protecteur associant bas Vt, pression de

plateau limitée et PEP haute, dans un objectif de limitation des différents phénomènes sus-évoqués (volotrauma et biotrauma, barotrauma, atelectrauma) participant aux lésions pulmonaires associées à la VM.

Le recrutement des territoires alvéolaires et la limitation des phénomènes d'atélectasie au cours de la stratégie protectrice sus-évoquée ont conduit à considérer des techniques de recrutement alternatives à la PEP. L'application intermittente et répétée de haut niveau de pression positive, soit via une PEP très élevée soit via une insufflation à haut volume a été largement explorée chez l'animal dans différents modèles d'ARDS (138–143). Ces manœuvres de recrutement ont été testées chez l'homme dès le début des années 2000 (144), puis dans 3 essais contrôlés randomisés (136,145,146), et ont montré des bénéfices limités, essentiellement sur la mécanique ventilatoire et sur l'hématose (147).

2.6. Modèles animaux d'étude de l'ARDS

Un modèle animal d'étude de l'ARDS prévoit d'appliquer à un animal une agression pulmonaire aigue visant à reproduire fidèlement les mécanismes physiopathologiques autant que les caractéristiques lésionnelles des différents composants de la membrane alvéolocapillaire décrits chez l'humain (148). Le modèle peut en outre être évolutif, c'est-à-dire mimer l'histoire naturelle de l'ARDS dans ses différentes phases (148). Puisque un large panel de causes d'ARDS est décrit chez l'humain (65), il est naturel d'observer un large panel de modalités d'agression pulmonaire chez l'animal. Les agents agressants préférentiellement utilisés au cours de la période 2003-2007 sont, d'après le nombre d'articles indexés dans *PubMed*, la VM agressive (30%), le lipopolysaccharide (LPS) bactérien (19%), la bactérie vivante (16%), l'hyperoxie (12%), la bléomycine intratrachéale (10%), l'acide oléique par voie systémique (5%), la ponction-ligature caecale (4%) et l'inhalation d'acide (3%). Certaines agressions sont considérées comme lésant préférentiellement l'épithélium alvéolaire

(inhalation d'acide, VM agressive, bléomycine intratrachéale), d'autres l'endothélium vasculaire pulmonaire (acide oléique par voie systémique, LPS par voie systémique, hyperoxie), tandis que certaines sont responsables d'une lésion homogène des composants de la membrane alvéolocapillaire (bactérie vivante, ponction-ligature caecale, LPS inhalé) (148). Le modèle utilisant le LPS, par voie inhalée (aérosol ou instillation intratrachéale) ou systémique (injection intraveineuse ou intrapéritonéale) est très relevant cliniquement (13), car le sepsis est la première cause d'ARDS chez l'humain (65). Le LPS est une glycoprotéine présente au niveau de la membrane externe des bactéries Gram-négative. Via sa fixation à la *LPS-binding protein*, il active le CD14/TLR4 (149), présent notamment à la surface des monocytes/macrophages ainsi que des cellules épithéliales et endothéliales dans le poumon, initiant ainsi la réponse inflammatoire via le facteur de transcription *nuclear factor kappa B* (NFkB) (150). Administré par voie inhalé chez l'humain, le LPS est responsable d'une réponse précoce surtout cytokinique, avec forte concentration bronchoalvéolaire de cytokines pro-inflammatoires et d'une réponse tardive, vers 24 à 48h, surtout cellulaire, avec un afflux de PNN, monocytes/macrophages et lymphocytes au niveau bronchoalvéolaire (151). Chez la souris, l'administration inhalée de LPS est aussi responsable d'une intense alvéolite à PNN culminant entre 12 et 24 heures après l'exposition et d'une fuite liquidienne importante et précoce (152) (**Figure 8**).

Des modèles animaux plus complexes, dit *two-hit*, sont utilisés. Il s'agit d'exposer à une VM des animaux préalablement soumis à une agression exogène, par exemple par LPS inhalé (153,154) ou injecté (155–159). Le scénario clinique de l'ARDS chez l'humain est ainsi plus fidèlement respecté. De plus, loin d'être seulement additifs, les effets de l'agent agressant et ceux de la VM ont été montrés synergiques dans l'apparition de lésions pulmonaires chez l'animal (153,155). La VM utilisée dans ces modèles *two-hit* peut être à haut Vt (153,154), mais peut aussi être appliquée selon les modalités protectrices sus-décrites (157,158),

considérant qu'une VM, même à bas Vt et de courte durée, est responsable d'une inflammation pulmonaire et systémique chez l'animal (160).

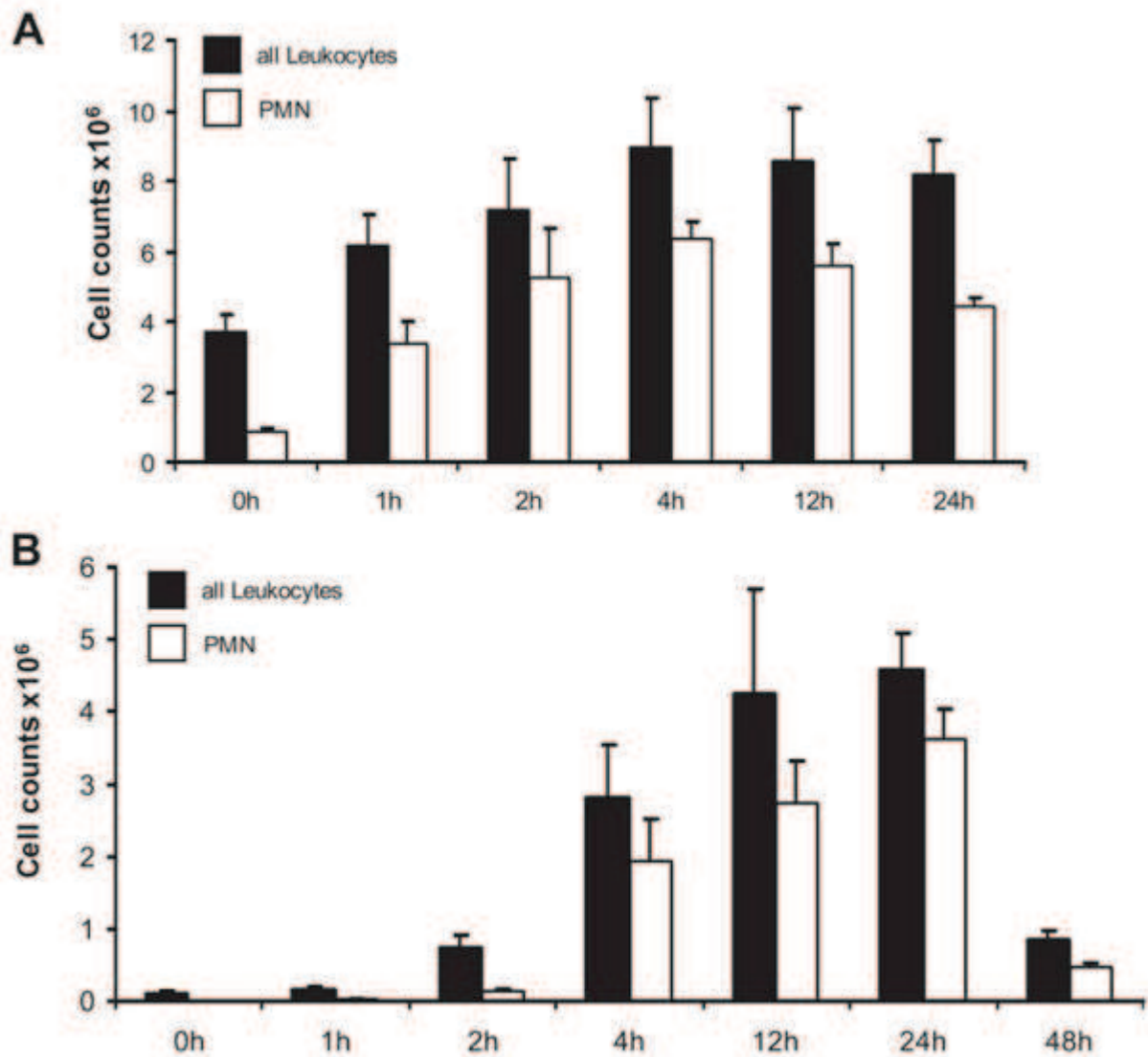


Figure 8: L'inhalation (aérosol) de LPS chez la souris induit un recrutement local de leucocytes/PNN culminant vers 4-12h dans le poumon total (A) et vers 12-24h au niveau bronchoalvéolaire (B). D'après Reutershan et al. (152).

3. Dysfonction vasculaire pulmonaire au cours de l'ARDS

Dans ce chapitre sont détaillés les mécanismes physiopathologiques de la dysfonction vasculaire pulmonaire au cours de l'ARDS, ainsi que ses déterminants et son impact pronostique.

3.1. Physiopathologie

La dysfonction vasculaire pulmonaire est usuellement définie par l'augmentation des RVP, qui résultent de 4 principaux mécanismes sus-listés affectant la microvascularisation pulmonaire (thrombose, vasoconstriction, remodelage et compression extrinsèque). Ces mécanismes sont tous mis en jeu au cours de l'ARDS, et sont attribués à l'agression initiale et aux lésions pulmonaires induites, en particulier endothéliales, ainsi qu'aux thérapeutiques utilisées, notamment la VM.

3.1.1. Dysfonction endothéliale pulmonaire (Figure 9)

3.1.1.1. Marqueurs de la dysfonction endothéliale dans l'ARDS

Des données suggérant des altérations précoces structurales et fonctionnelles de l'endothélium pulmonaire au cours de l'ARDS se sont accumulées depuis plus de 30 ans. Des séries autopsiques de patients ARDS ont ainsi caractérisées les anomalies histologiques affectant la microvascularisation pulmonaire, qui incluait une congestion des cellules endothéliales, des anomalies mitochondriales et du réticulum endoplasmique adjacent aux lumières capillaires (161), la formation de nombreuses vésicules de pinocytose et l'apparition d'espaces au niveau des zones de jonction intercellulaire de la couche mononuclée endothéliale (162). Au plan fonctionnel a été décrite au cours de l'ARDS une libération perturbée de marqueurs d'activation endothéliale, tels que le facteur von Willebrand, l'enzyme de conversion de

l'angiotensine et l'angiopoïétine 2. Ainsi le taux plasmatique de facteur von Willebrand était élevé précocement au cours d'une agression pulmonaire induite par LPS chez le primate, bien avant l'apparition de lésions histologiques de l'endothélium pulmonaire (163), et a par ailleurs été montré associé à la mortalité chez les patients ARDS (164). Le taux plasmatique d'enzyme de conversion de l'angiotensine de type II est précocement abaissé chez les patients ARDS (165), et sa fraction fixée à l'endothélium pulmonaire est un biomarqueur de sévérité (166). Le taux plasmatique d'angiopoïétine 2 est élevé au cours de l'ARDS (167), et l'évolution de son taux plasmatique de J0 à J3 prédictif de mortalité chez les patients ARDS (168). Enfin, le rapport des concentrations plasmatiques d'angiopoïétine II sur angiopoïétine I est un biomarqueur précoce de gravité au cours de l'ARDS (169).

3.1.1.2. Occlusions microvasculaires pulmonaires

L'activation des CEMP au cours de l'ARDS s'accompagne de l'expression accrue et rapide de molécules d'adhésion des PNN (E- et P-sélectines, ICAM-1) (96,170–173), qui permet les phénomènes de *rolling*, capture et adhésion des PNN, largement décrits au niveau de l'endothélium systémique (174). Ce phénomène est amplifié par le stress oxydant (175). L'adhésion des PNN sur les CEMP amplifie le phénomène de contraction du cytosquelette des CEMP, abordé après, qui tend à ouvrir les jonctions intercellulaires (176). La migration trans-endothéliale des PNN et leur extravasation vers le secteur extravasculaire utilise la protéine transmembranaire *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM)-1 exprimée à la surface des CEMP activées au niveau des jonctions intercellulaires. Le stress oxydant amplifie la perméabilité endothéliale, facilitant le passage des PNN (175). L'activation des CEMP et des PNN est contemporain d'interactions avec les plaquettes (177). Les CEMP activées acquièrent en effet un phénotype prothrombotique, incluant l'expression membranaire de facteurs de l'activation et de l'agrégation plaquettaires tels que le facteur tissulaire (178) et le

facteur von Willebrand (163) et de facteurs d'adhésion tels que E- et P-sélectines (179), et une limitation de la capture de la sérotonine circulante au niveau pulmonaire (180). Les plaquettes activées stimulent en retour les PNN via la libération d'un vaste arsenal de médiateurs (181). Les plaquettes agrégées et les PNN adhérents sont séquestrés dans le lit capillaire pulmonaire (51,182) et participent ainsi à l'occlusion des microvaisseaux pulmonaires. Les modifications du cytosquelette des PNN activés est un facteur supplémentaire d'obstruction (183). Leur déformabilité s'en trouve en effet diminuée, ce qui ralentit leur transit intrapulmonaire, participe à leur piégeage au niveau du site de l'inflammation et facilite leurs interactions avec les CEMP. Les CEMP activées participent par ailleurs à un phénomène de coagulation intravasculaire. L'expression accrue de facteur tissulaire active la voie extrinsèque de la coagulation tandis que l'exposition de la basale sous endothéliale active la voie intrinsèque. Les cytokines pro-inflammatoires, libérées localement par les CEMP et les cellules recrutées au site de l'inflammation amplifient le phénomène (184). L'IL-6 régule positivement l'expression de facteur tissulaire à la surface des CEMP (178), alors que le TNF α freine la fibrinolyse en stimulant la libération de l'inhibiteur de l'activation du plasminogène de type 1 (185). Par ailleurs, l'activité fibrinolytique des CEMP activées est diminuée au cours de l'ARDS, principalement à cause d'une baisse de la libération des activateurs du plasminogène (186). En résumé, l'activation des CEMP et l'acquisition d'un phénotype procoagulant ainsi leurs interactions avec les plaquettes et les PNN au cours de la réponse inflammatoire concourent à un phénomène d'occlusion microvasculaire pulmonaire au cours de l'ARDS. Ce phénomène a été décrit il y a plus de 30 ans dans des études autopsiques et angiographiques, qui montraient une perte de densité capillaire ainsi que des défauts microvasculaires au niveau pulmonaire chez les patients ARDS (187–190). La fraction espace-mort résultant de la réduction du lit vasculaire pulmonaire a été montrée indépendamment associée au risque de décès chez le patient ARDS (78).

3.1.1.3. Majoration de la perméabilité endothéliale

Au cours de l'ARDS, les CEMP présentent des modifications structurales qui majorent la perméabilité endothéliale (176). La physiopathologie implique une augmentation du calcium intracellulaire, consécutive à la fixation à la surface des CEMP de thrombine, de substances vasoactives (thrombine, histamine, bradykinine, thromboxane A2) ou encore de radicaux libres de l'oxygène au cours de la réaction inflammatoire. Les chaînes légères de myosine endothéliale sont alors phosphorylées et interagissent avec les filaments d'actine, provoquant la contraction des CEMP et la distension des zones de jonctions intercellulaires, qui deviennent poreuses, majorant ainsi la perméabilité aux liquides et aux cellules dont les PNN (175,191). Des mécanismes de perméabilité indépendants des chaînes légères de myosine endothéliale ont également été décrits, impliquant par exemple les radicaux libres de l'oxygène et la protéine kinase C (175,192) ou encore le TNF α et les cadhérines endothéliales (193). La description histologique de l'hyperperméabilité endothéliale chez le patient ARDS est ancienne (161,162), et son intensité suggérée associée à la sévérité et au degré d'alvéolite neutrophilique (194). La perméabilité endothéliale favorise l'œdème de l'espace interstitiel, qui participe à une compression extrinsèque des microvaisseaux pulmonaires et donc à une augmentation des RVP (38).

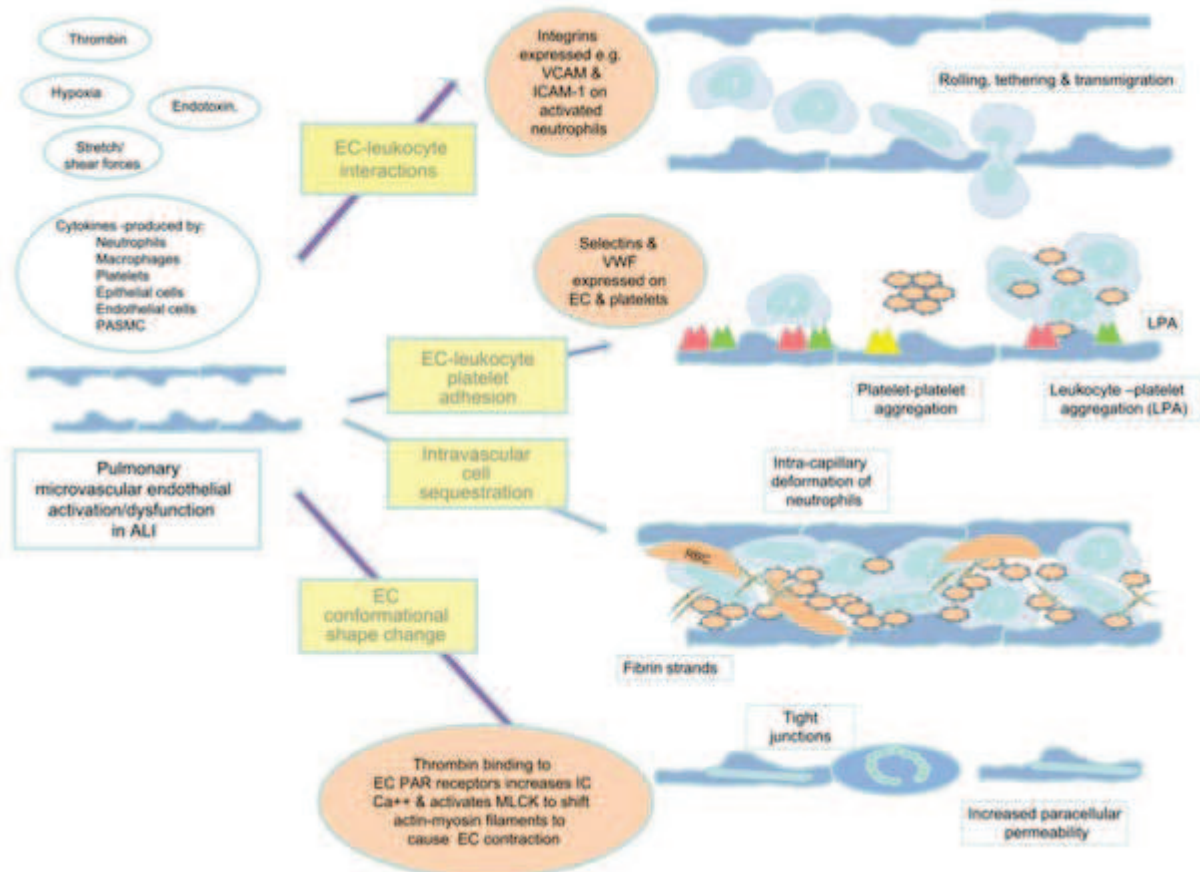


Figure 9: Au cours de l'agression pulmonaire aigue, en présence de médiateurs circulants notamment cytokiniques, les CEMP sont activées et interagissent avec les leucocytes et les plaquettes. Il en résulte des changements structuraux et fonctionnels de l'endothélium pulmonaire, incluant une expression accrue de molécules d'adhésion, l'acquisition d'un phénotype pro-thrombogène, une séquestration des leucocytes et des plaquettes, une sorte de contraction du cytosquelette et une hyperperméabilité. D'après Price et al. (38)

3.1.1.4. Anomalies de la vasomotricité pulmonaire

Au cours de l'ARDS est décrit un déséquilibre de la balance vasomotrice pulmonaire. Les principaux mécanismes impliqués sont la vasoconstriction pulmonaire hypoxique (VPH) et la sécrétion perturbée d'agents vasomoteurs tels que le NO, les dérivés de l'acide arachidonique et l'endothéline-1.

Vasoconstriction pulmonaire hypoxique

La VPH est un phénomène dynamique réversible intrinsèque aux artérioles pulmonaires, qui vise à optimiser les échanges gazeux en dirigeant préférentiellement le débit sanguin

pulmonaire vers les territoires ventilés, réduisant le shunt droit-gauche intrapulmonaire (195,196). Brièvement, l'hypoxie dans les voies aériennes inhibe les canaux potassiques oxygène-sensible des CMLAP. La dépolarisation de la membrane ainsi induite provoque l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants. L'augmentation du calcium intracellulaire provoque la vasoconstriction (196). Au cours de l'ARDS, la VPH est un mécanisme protecteur des échanges gazeux (195) mais participe à l'augmentation des RVP (197).

Médiateurs vasomoteurs pulmonaires

Les dérivés de l'acide arachidonique sont une famille de médiateurs de l'inflammation produits par les cyclooxygénases et qui exercent par ailleurs des effets vasomoteurs. Le thromboxane A₂, vasoconstricteur pulmonaire et promoteur de la perméabilité endothéliale et de l'agrégation plaquettaire (198), est libéré par les plaquettes fixées aux PNN activés au cours de l'ARDS expérimental induit par LPS (177) et participe à l'élévation des RVP (199,200). La prostaglandine E₁ a des effets opposés, c'est-à-dire vasodilatateur et antiagrégant plaquettaire. Son taux circulant a été montré abaissé chez les patients ARDS (201).

L'endothéline-1 est l'une des 3 isoformes de l'endothéline. Il s'agit d'un agent vasoconstricteur et proliférant des cellules musculaires lisses, sécrétée principalement par les CEMP au niveau pulmonaire en réponse à divers stimulus, incluant notamment l'hypoxie, le LPS, le TNF α et l'interféron (202). Les CEMP sont aussi impliquées dans la clairance de l'endothéline-1 circulante, à peu près égale à la sécrétion en situation physiologique (203). L'endothéline-1 se fixe à deux récepteurs, type A et type B, qui régulent des voies de signalisation distinctes. Le récepteur de type A est exprimé sur les cellules musculaires lisses et induit la vasoconstriction via la protéine kinase C. Le récepteur de type B est exprimé sur les cellules endothéliales, dont les CEMP, et induit une vasodilatation impliquant la voie de la NO synthase (NOS) et des prostaglandines (204). L'activation des CEMP au cours de la

réponse inflammatoire s'accompagne d'une sécrétion accrue d'endothéline-1 (204,205). Le taux circulant d'endothéline-1 a été montré élevé chez les patients ARDS (206) et chez les patients septiques ARDS ou non ARDS (207), et s'abaissant concomitamment à l'amélioration clinique et à la baisse des RVP (208). Un prétraitement par antagonistes des récepteurs à l'endothéline a été montré associée à une baisse précoce des RVP dans un modèle canin d'ARDS induit par l'acide oléique (209).

Le NO est un vasodilatateur pulmonaire endogène synthétisé à partir de la L-arginine par les différentes isoformes de la NOS, neuronale (nNOS), endothéliale (eNOS) et inducible (iNOS). Les CEMP expriment constitutivement la eNOS, enzyme clé de la régulation du tonus vasculaire pulmonaire (210), et peuvent exprimer la iNOS en réponse à différents stimuli pro-inflammatoires (204). Au cours du sepsis, l'expression pulmonaire de la eNOS est précocement mais transitoirement accrue, tandis que celle de la iNOS l'est précocement, intensément et durablement (211). Au niveau artériel pulmonaire, l'exposition au LPS induit une production intense de NO via la iNOS d'activité autocrine (212). Le NO active la guanylate cyclase soluble, aboutissant à la production de guanosine 3,5-monophosphate cyclique (cGMP), qui induit une relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires (204). Le NO exerce aussi des effets inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire, de l'adhésion des PNN, du facteur de transcription NF κ B, de la prolifération cellulaire et de la VPH (213–217). Dans des modèles animaux d'ARDS induits par LPS, VILI et ischémie-reperfusion, une production élevée de NO par la eNOS était protectrice (218–223). Le NO peut aussi avoir des effets délétères, comme l'hypotension et la cytotoxicité (224). Ainsi des données animales suggèrent qu'une intense production de NO pourrait aggraver les lésions pulmonaires, en induisant la formation de métabolites toxiques du NO tel que le peroxy-nitrite (225). La déficience en iNOS était d'ailleurs protectrice dans un modèle murin de ventilation à haut Vt (226). Ces travaux expérimentaux indiquent globalement une expression accrue des

enzymes synthétisant le NO au cours de l'agression pulmonaire aigue, mais livrent des données contradictoires quant à la quantité de NO effectivement produite au niveau artériel pulmonaire ainsi qu'au caractère protecteur de la régulation positive des eNOS et iNOS. Ces incertitudes sont accrues par des données humaines montrant chez des patients ARDS un NO exhalé abaissé (227).

Anomalies de la vasomotricité pulmonaire au cours de l'ARDS

La vasomotricité pulmonaire au cours de l'ARDS a été explorée *ex vivo* dans plusieurs modèles animaux. Dans des modèles de poumon isolé perfusé chez le rat préalablement exposé au LPS, des augmentations de la vasoconstriction induite par l'acétylcholine et de la VPH étaient décrites (228–230). Dans des modèles d'artère pulmonaire isolée chez le rat préalablement soumis au LPS, à l'ischémie-reperfusion ou à une ventilation à haut Vt étaient décrites une augmentation de la VPH et une baisse de la vasorelaxation endothélium-dépendante (231–234). Par ailleurs, l'impact de la ventilation en pression positive, en particulier de la PEP, a été suggérée directement inductrice d'une vasoconstriction accrue mais réversible, médiée par les canaux calciques des CMLAP (235,236). Ces travaux expérimentaux tendent à confirmer des anomalies des propriétés vasomotrices pulmonaires au cours de l'ARDS, avec globalement un profil de vasoconstriction accrue et de vasodilatation altérée, attribuable à la fois à l'agression initiale et au support ventilatoire.

3.1.3. Compression et étirement vasculaires

Comme abordé avant, l'augmentation de la perméabilité endothéliale au cours de l'ARDS favorise l'extravasation de liquide, à l'origine d'une œdème interstitiel, qui participe à une compression extrinsèque des microvaisseaux pulmonaires. D'autres mécanismes de compression extrinsèque et de stress mécanique cyclique sont spécifiquement liés à l'utilisation de la VM. La pression positive intrathoracique est responsable d'une augmentation

des pressions environnantes des vaisseaux extra et intra-alvéolaires. Au delà d'un niveau critique de pression environnante, les microvaisseaux pulmonaires peuvent être collabés. Des travaux expérimentaux chez le gros animal ont montré que ce mécanisme jouait un rôle important dans l'HTP de l'ARDS (237) et que le siège préférentiel de la compression extrinsèque était les microvaisseaux extra-alvéolaires (238). Par ailleurs, l'application de hauts niveaux de pression positive expose au risque de distension alvéolaire. Le volume pulmonaire excède alors largement la CRF, ce qui provoque l'étirement des vaisseaux intra-alvéolaires, alors de calibre diminué. A l'opposé, la ventilation à bas Vt, à risque d'atélectasie, réduit le calibre des vaisseaux extra-alvéolaires dans les zones à volume inférieur à la CRF (37,239).

3.1.2. Remodelage vasculaire

Dès les premières séries autopsiques de patients ARDS a été décrit un remodelage vasculaire, à type d'épaississement de la média avec hypertrophie musculaire lisse au niveau des artères pulmonaires muscularisées et de néomuscularisation des artérioles distales, réduisant la lumière vasculaire, croissant au cours du temps (161,240). Une série autopsique de nouveaux ventilés en contexte de détresse respiratoire aigüe néonatale montrait également une prolifération accrue de différents types cellulaires du poumon, incluant les cellules endothéliales (241). Les mécanismes proposés sont proches de ceux impliqués dans l'hypertension pulmonaire chronique. Les effets pro-proliférants et anti-apoptotiques de l'endothéline-1 et des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 sur les CMLAP ont été incriminés (242,243). D'ailleurs, l'effet de l'exposition prolongée et répétée à une inflammation pulmonaire par un agent d'agression tel que le LPS induisait une hypertension pulmonaire avec hypertrophie musculaire lisse (244).

3.1.4. Synthèse

Les composants de la dysfonction vasculaire pulmonaire observée au cours de l'ARDS incluent:

- une dysfonction endothéliale pulmonaire, avec thromboses microvasculaires pulmonaires, majoration de la perméabilité vasculaire pulmonaire favorisant un œdème interstitiel, et déséquilibre de la balance des médiateurs vasoactifs en faveur des agents vasoconstricteurs,
- des phénomènes de compression extrinsèque et d'étirement des microvaisseaux pulmonaires associés à la ventilation en pression positive,
- et tardivement un remodelage vasculaire.

Il en résulte une augmentation des RVP et en conséquence une HTP avec élévation du gradient de pression vasculaire transpulmonaire (**Figure 10**).

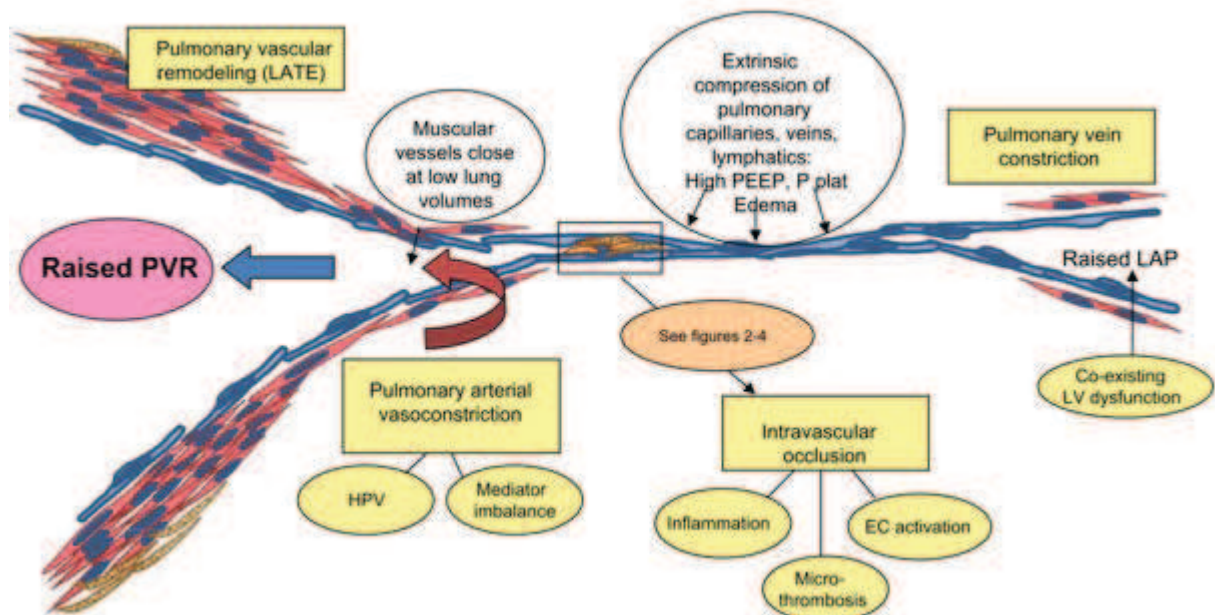


Figure 10: La dysfonction vasculaire pulmonaire au cours de l'ARDS résultent de mécanismes d'occlusion microvasculaire, d'hyperperméabilité et œdème interstitiel, déséquilibre de la balance des médiateurs vasoactifs, compression extrinsèque et remodelage vasculaire, attribués à l'agression initiale et à la ventilation en pression positive. D'après Price et al. (38).

3.2. Hypertension pulmonaire

3.2.1. Définition

L'HTP est définie par une P_{AP} moyenne supérieure à 25 mmHg et des RVP supérieures à 240 dyn.s.cm⁻⁵ au cathétérisme artériel pulmonaire (245). A l'échocardiographie, l'HTP est suspectée en cas de P_{AP} systolique estimée supérieure à 35 mmHg (246) et de temps d'accélération du flux artériel pulmonaire raccourci (247). L'HTP est le plus souvent de cause vasculaire pulmonaire. Mais l'HTP peut aussi être causée par une hyperpression des cavités gauches. La PAPO est alors élevée, supérieure à 15 mmHg, et l'HTP est dite post-capillaire. Le gradient de pression vasculaire transpulmonaire, dite pression motrice, est calculé comme la différence entre la P_{AP} et la PAPO. Cette valeur est utilisée au numérateur pour le calcul des RVP, comme expliqué avant.

3.2.2. Description

L'HTP chez les patients souffrant d'ARDS a été décrite pour la première fois il y a presque 40 ans (248). Les auteurs ont mis en évidence chez des patients ARDS en VM une augmentation des RVP et du travail ventriculaire droit, avec dilatation progressive des cavités cardiaques droites, conduisant à une défaillance hémodynamique réfractaire après plusieurs jours de VM (249). D'autres études ont confirmé ces résultats en utilisant le cathétérisme artériel pulmonaire, la scintigraphie, ou l'échocardiographie (250–252), y compris les effets sur le ventricule droit, plus tard désignés comme cœur pulmonaire aigu en échocardiographie (251). Les modèles animaux ont permis de confirmer l'élévation des RVP au décours immédiat d'une agression pulmonaire aiguë, par exemple chez le chien exposé à l'acide oléique (237), et ont déterminé que les contributions respectives des différents segments de la vascularisation

pulmonaire dans les RVP restaient inchangées, les artérioles pulmonaires étant toujours le territoire résistif principal (253).

3.2.3. Incidence

L'HTP était d'incidence fréquente à l'époque où le Vt et les niveaux de pression de plateau dans les voies aériennes n'étaient pas limités (248,250). Vingt cinq ans plus tard, l'incidence du cœur pulmonaire aigu était évaluée à 25% au cours des 3 premiers jours chez 75 patients ARDS soumis à une VM protectrice (252). Cette incidence atteignait même 50% dans une cohorte de patients ARDS très sévères, c'est-à-dire profondément hypoxémiques (254). Une pression de plateau limitée à 27 cmH₂O a alors été proposée comme acceptable au regard de l'hémodynamique ventriculaire droite (255). Deux études plus récentes, appliquant aussi une stratégie de VM protectrice à des patients ARDS, rapportent une incidence du cœur pulmonaire aigu comparable, entre 20 et 25% (80,256).

3.2.4. Pronostic

A la fin des années 2000, deux études menées sur de larges collectifs de patients ARDS soulignaient la valeur pronostique négative de l'HTP (79) et de l'insuffisance cardiaque droite aigue précoce, définie par une pression atriale droite supérieure à la PAPO (75). Cet impact pronostique péjoratif pourrait persister à l'ère de la VM protectrice. Dans une large étude nord-américaine analysant les données d'hémodynamique invasive recueillies chez 475 patients ARDS, l'élévation du gradient de pression vasculaire transpulmonaire et des RVP était indépendamment associée à la mortalité ainsi qu'au recours aux thérapeutiques de support des défaillances d'organes (81). Chez les patients avec un gradient de pression vasculaire transpulmonaire supérieur à 24 mmHg, la mortalité atteignait 50% (81). Un travail français concomitant a aussi étudié les données d'hémodynamique invasive recueillies dans

une large cohorte de patients ARDS. La P_{AP} moyenne et l'observation d'une pression veineuse centrale supérieure à la PAPO étaient des facteurs indépendants de mortalité (257).

Concernant l'impact pronostique de la défaillance cardiaque droite associée à l'HTP, les données à l'ère de la ventilation protectrice sont contrastées. Dans l'étude de Osman, une défaillance ventriculaire droite, définie par la présence simultanée i) d'une P_{AP} moyenne supérieure à 25 mmHg, ii) d'une pression veineuse centrale supérieure à la PAPO et iii) d'un volume d'éjection indexé inférieur à 30 mL/m², était présente chez 9,6% des 145 patients et n'était pas associée à la mortalité (257). De même, dans l'étude de Bull, l'incidence de la défaillance cardiaque droite, définie par une pression veineuse centrale supérieure à la PAPO, était d'incidence comparable (12%) et également non associée à la mortalité (81). D'autres études humaines ont exploré l'impact pronostique d'un cœur pulmonaire aigu, diagnostiqué en échocardiographie, au cours de l'ARDS et n'ont pas montré d'association à la mortalité (252,256). Mais l'étude récente de Boissier montrait que l'existence d'un cœur pulmonaire aigu était associée à un recours accru aux drogues de support hémodynamique et était indépendamment associée à la mortalité (80).

Des auteurs se sont interrogés sur les éventuels effets additifs délétères sur le parenchyme pulmonaire de l'HTP au cours de l'ARDS. L'hypothèse était que l'HTP pouvait aggraver l'hyperperméabilité vasculaire et donc l'œdème, et par ce mécanisme grever le pronostic. Des travaux successifs utilisant des modèles de poumon isolé perfusé ont montré que seule l'augmentation du débit sanguin vasculaire pulmonaire, et non celle des pressions vasculaires pulmonaires, pouvait effectivement majorer les lésions de VILI (258–260).

3.2.5. Défaillance ventriculaire droite

L'élévation des RVP, et l'augmentation du gradient de pression vasculaire transpulmonaire ainsi induite, est responsable d'une augmentation de l'impédance à l'éjection du ventricule

droit. Il en résulte une dilatation de la cavité (261), qui n'est pas structurellement et morphologiquement adaptée à une augmentation brutale de post-charge. La dilatation du ventricule droit accroît sa consommation d'oxygène et abaisse sa force contractile (262). Elle entraîne aussi un déplacement à gauche du septum interventriculaire en diastole, gênant le remplissage du ventricule adelphe au sein d'un sac péricardique inextensible (263). Cette altération de la fonction diastolique ventriculaire gauche entraîne une baisse du débit cardiaque (264). Il en résulte une baisse de la délivrance en oxygène, qui favorise l'ischémie myocardique ventriculaire droite (265). Cette ischémie est potentiellement aggravée par une gêne à la perfusion coronaire du ventricule droit, à cause de la distension de sa paroi libre, qui abaisse voire supprime le flux coronaire droit systolique (266). Cette cascade physiopathologique, reproductible chez l'animal par une sténose expérimentale des artères pulmonaires proximales (262), est caractéristique des interactions des ventricules droit et gauche au cours de l'HTP aigue chez le patient ARDS (**Figure 11**).

Des phénomènes additionnels, liés à la VM, concourent à altérer davantage l'hémodynamique cardiaque droite. La baisse du retour veineux systémique causée par la pression intrathoracique élevée abaisse la pré-charge ventriculaire droite (267). L'hypercapnie permissive, à l'ère de la ventilation à bas Vt, a été montrée délétère pour l'hémodynamique cardiaque droite (80,252,268), en concordance avec l'effet vasoconstricteur pulmonaire démontré chez l'animal (269) et chez l'adulte sain (270,271). Enfin, l'agression cytokinique au cours de la réponse inflammatoire pourrait exercer des effets dépresseurs myocardiques directs, comme le suggèrent des données expérimentales (272).

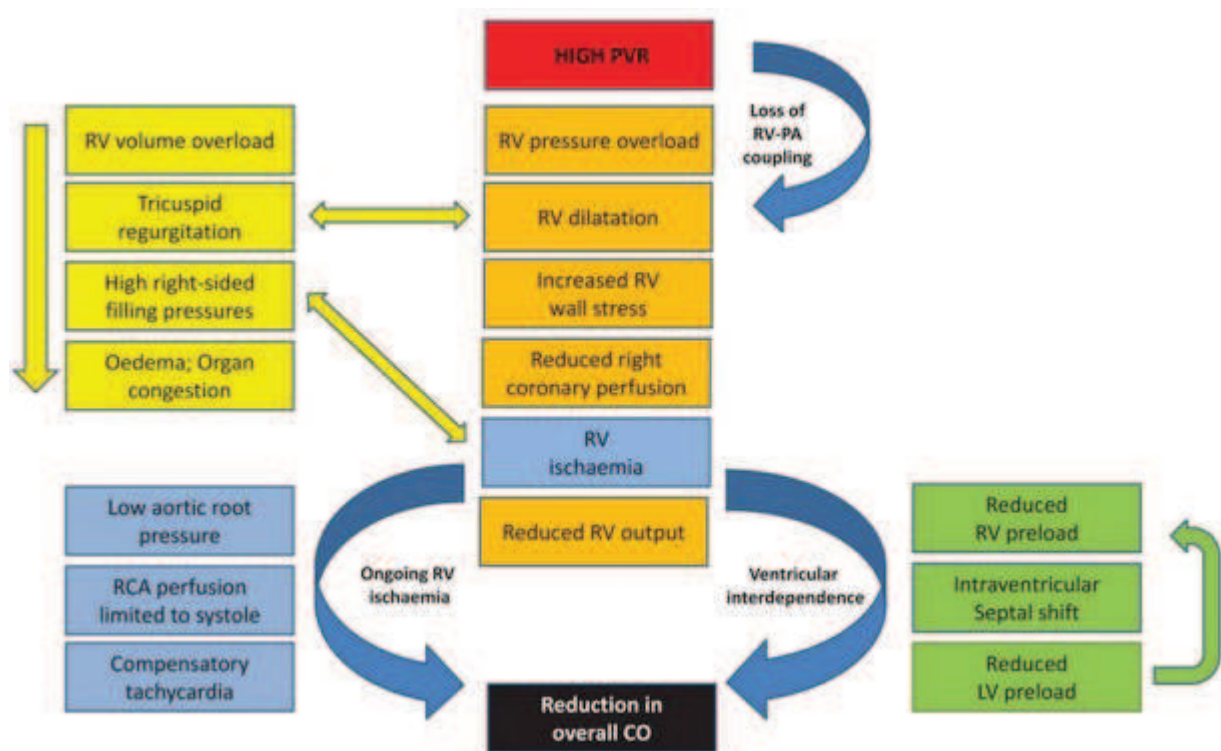


Figure 11: Au cours de l'ARDS, l'augmentation des RVP induit une cascade d'événements hémodynamiques, affectant les ventricules droit puis gauche, et pouvant conduire *in fine* à une insuffisance circulatoire aigue. D'après Price et al. (273).

Les déterminants connus de l'apparition d'une défaillance ventriculaire droite au cours de l'ARDS relèvent surtout de la VM et de ses modalités d'application. La pression de plateau a historiquement été considérée comme le principal d'entre eux (255). La PEP élevée, à pression de plateau constante, a aussi été imputée, a fortiori lorsque le volume pulmonaire recruté par la PEP élevée est faible (268). Plus récemment, un autre paramètre de mécanique ventilatoire, la pression motrice soit la différence de la pression de plateau et de la PEP totale, a été montrée indépendamment associée à l'apparition d'un cœur pulmonaire aigu au cours de l'ARDS (80). Dans la même étude, l'infection comme cause de l'ARDS était un autre facteur prédictif indépendant (80). Dans l'autre étude française récente sus-citée, le seul facteur de risque indépendant de développer un cœur pulmonaire aigu était l'hypercapnie (256).

4. Hypothèses et objectifs du travail

Nous avons formulé 3 hypothèses de travail, relatives à différents déterminants potentiels de la dysfonction vasculaire pulmonaire au cours de l'ARDS :

- les manœuvres de recrutement alvéolaire pourraient aggraver la dysfonction vasculaire pulmonaire,
- l'IL-6, aux propriétés anti-inflammatoires, pourraient jouer un rôle protecteur de la dysfonction vasculaire pulmonaire,
- l'âge avancé, seul facteur prédictif clinique indépendant de mortalité, pourrait un facteur intrinsèque d'aggravation de la dysfonction vasculaire pulmonaire.

Les objectifs de ce travail étaient d'étudier dans un modèle murin d'ARDS :

- les effets de manœuvres de recrutement alvéolaire sur la mécanique ventilatoire, sur l'inflammation et le dégât parenchymateux pulmonaires, sur l'hémodynamique pulmonaire et sur le transcriptome pulmonaire et ventriculaire droit,
- les effets d'une déficience en IL-6 sur l'inflammation et le dégât parenchymateux pulmonaires, ainsi que sur l'hémodynamique pulmonaire,
- les effets d'un âge adulte "mature", par rapport à un âge adulte jeune, sur la mécanique ventilatoire, sur l'inflammation et le dégât parenchymateux pulmonaires, ainsi que sur l'hémodynamique pulmonaire.

5. Le modèle animal

5.1. Choix du modèle

Le modèle animal choisi et mis au point répondait aux exigences suivantes :

- être un modèle de souris, pour permettre une exploration biologique avancée et l'utilisation de souris transgéniques invalidées pour d'éventuels gènes d'intérêt,
- être proche du scénario clinique humain, c'est-à-dire associer une agression exogène initiale à une VM protectrice,
- permettre des explorations physiologiques respiratoires et hémodynamiques invasives.

Le choix du mode d'agression s'est porté sur le LPS par voie orotrachéale, mode d'agression exogène présentant plusieurs intérêts, déjà abordés avant et résumés ici :

- il est ancien, connu, largement usité et aisément reproductible sous réserve de conserver le même lot de produit,
- il est pseudo-septique, donc cliniquement relevant, car le sepsis est la première cause d'ARDS chez l'humain,
- il produit une inflammation pulmonaire intense et précoce, avec alvéolite riche en PNN, et une fuite liquidienne pulmonaire importante, qui sont potentialisés par une VM surajoutée (modèle *two hit*).

En conséquence, le modèle utilisé avait pour caractéristiques principales :

- d'associer une instillation orotrachéale de LPS suivie 18 à 20 heures plus tard d'une VM à bas V_t et PEP non nulle durant de 3 à 5 heures,
- d'utiliser le FlexiVent (Scireq), ventilateur du petit animal de dernière génération,
- de réaliser des mesures d'hémodynamiques invasives au terme de la phase de VM.

5.2. Description du modèle

La souris subissait une instillation oropharyngée d'une solution de LPS d'*E. coli*. La dose de LPS instillée a été choisie lors d'études préliminaires comme la plus forte dose (5 µg/g) n'occasionnant pas de mortalité importante au cours de la VM chez des souris males adultes jeunes C57BL6J, souche connue peu vulnérable à cet agent agressant (148). La technique d'instillation orotrachéale consistait en une courte anesthésie par inhalation d'Isoflurane à 5% en ventilation spontanée, au cours de laquelle un volume de 40 à 50 µl d'une solution de LPS dilué dans du PBS était déposée dans l'oropharynx via un fin cathlon. L'animal était maintenu par les incisives en position proclive à 60° pendant quelques secondes, permettant l'inhalation du liquide. Il était ensuite immédiatement réveillé puis replacé dans sa cage avec accès à l'eau et à la nourriture. Le contrôle du LPS utilisait le PBS à même volume et selon la même technique. Dix-huit à 20 heures après l'instillation orotrachéale de LPS, la souris était anesthésiée par Pentobarbital injecté et Isoflurane inhalé, intubée et la VM commençait, pour une durée de 3 à 5 heures. Les paramètres de ventilation minute utilisés (fréquence respiratoire 180/min et Vt 8 mL/kg) s'étaient avérés corrects en terme de ventilation alvéolaire lors d'expérimentations préliminaires, c'est-à-dire assurant une légère hypocapnie compensant une acidose métabolique. Ils s'étaient par ailleurs avérés protecteurs chez la souris dans un travail antérieur (160). Les gaz inhalés étaient réchauffés et humidifiés par un humidificateur chauffant (humidité absolue de 21 mg H₂O/L à 24°C de température ambiante). L'anesthésie était continue par Isoflurane inhalé à 1,5%. Le choix d'une anesthésie utilisant un gaz halogéné était guidé par des travaux antérieurs montrant son caractère peu déresseur hémodynamique (274). La curarisation continue utilisait Pancuronium et une solution chaude de sérum salé isotonique plus glucosé était injectée par voie intrapéritonéale toutes les heures pour assurer une volémie et une glycémie correctes. La température était continuellement

monitorée par sonde rectale et régulée par un tapis chauffant pour une température cible à 36,5°C. Le mode ventilatoire utilisé était en volume contrôlé à débit constant. Le V_t réglé était supérieur au V_t délivré, eu égard à la compression des gaz dans le circuit inspiratoire. En conséquence, le V_t effectivement délivré était continuellement contrôlé et au besoin adapté pour maintenir un V_t délivré de 8 ml/kg environ. La PEP était à 3cmH₂O et le rapport temps inspiratoire / temps expiratoire (I/E) étaient à 67%. En début de la ventilation étaient réalisées deux inspirations profondes lentes permettant de standardiser les mesures de mécanique ventilatoire (VHS, *volume history standardisation*), puis plusieurs perturbations évaluant la mécanique respiratoire étaient réalisées en début et en fin de VM ainsi qu'à chaque heure. Au cours de la dernière heure de VM étaient réalisées des mesures d'hémodynamique invasive incluant un cathétérisme ventriculaire droit par voie jugulaire pour mesure de la pression ventriculaire droite, une thermodilution transpulmonaire pour mesure du débit cardiaque et éventuellement un cathétérisme carotidien pour mesure de la pression artérielle systémique. Le cathéter utilisé (diamètre 1,4Fr soit 0,47mm) était muni à son extrémité d'un capteur piézo-électrique de mesure de pression. Il était connecté via un transducteur à un ordinateur muni du logiciel d'exploration hémodynamique Notocord.

Le système de ventilation utilisé était le FlexiVent (Scireq), qui comprend un ventilateur animal asservi à un ordinateur et un système de recueil des paramètres physiologiques respiratoires en VM. Le ventilateur se composait d'un cylindre coulissant dans un piston et de deux valves, inspiratoire et expiratoire. Il était connecté via un amplificateur de signal à un logiciel de recueil et d'analyse des résultats en temps réel. Les paramètres de ventilation (mode ventilatoire, fréquence respiratoire, temps inspiratoire, pause télé-inspiratoire et expiratoire, V_t) était réglés sur l'ordinateur. Les pressions dans les voies aériennes, les débits et les volumes (réglés et délivrés) étaient enregistrés en continu. Le ventilateur permettait

l'application d'une PEP. Pour l'estimation des paramètres de mécanique respiratoire, le système interrompait brièvement la ventilation pour appliquer un signal test (perturbation).

Plusieurs perturbations étaient utilisées :

- capacité pulmonaire totale: insufflation lente (3 secondes) suivie d'un plateau télé-inspiratoire de 3 secondes à pression constante (30cmH₂O),
- capture (*snapshot*): perturbation oscillatoire sinusoïdale de courte durée (1,2s), à fréquence (150/min) et à volume (10ml/kg) déterminés permettant une estimation de résistance et de compliance dite dynamique,
- oscillation forcée basse fréquence: application de multiples oscillations sinusoïdales à faible volume (3ml/kg) et à différentes fréquences basses (de 0,5 à 20,5 Hz) sur une durée de 16s, permettant l'estimation de l'impédance du système respiratoire ainsi que des mesures d'élastance et de résistance des voies aériennes,
- courbe pression-volume: boucle insufflation-exsufflation à haut volume et à faible débit, sur 16 secondes, pouvant être contrôlée en pression (pression d'insufflation à 30cmH₂O) ou en volume (volume 40ml/kg),
- insufflation profonde : insufflation d'un volume de 30 ml/kg sur 0,75 seconde suivie d'une durée identique d'expiration.

CHAPITRE 2 - RESULTATS

Articles originaux:

1. Mekontso Dessap A^{*}, Voiriot G^{*}, Zhou T, Marcos E, Dudek SM, Jacobson JR, Machado R, Adnot S, Brochard L, Maitre B, Garcia JG. Conflicting physiological and genomic cardiopulmonary effects of recruitment maneuvers in murine acute lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 2012 Apr;46(4):541-50. (* co-auteurs)

2. Voiriot G, Razazi K, Amsellem V, Tran Van Nhieu J, Latiri M, Hervé A, Adnot S, Mekontso Dessap A, Maitre B. Interleukin-6 exerts lung protective anti-inflammatory and hemodynamic effects in a double-hit murine acute lung injury. **Intensive Care Med Experimental** 2014 (soumis).

3. Voiriot G, Contou D, Tran Van Nhieu J, Amsellem V, Latiri M, Adnot S, Maitre B, Mekontso Dessap A. Aging exacerbates acute respiratory distress syndrome in a double hit murine model. **Crit Care Med** 2014 (soumis).

1. Etude des effets cardio-pulmonaires physiologiques et génomiques de manœuvres de recrutement alvéolaire dans un modèle murin d'agression pulmonaire aigue

Mekontso Dessap A^{*}, Voiriot G^{*}, Zhou T, Marcos E, Dudek SM, Jacobson JR, Machado R, Adnot S, Brochard L, Maitre B, Garcia JG. Conflicting physiological and genomic cardiopulmonary effects of recruitment maneuvers in murine acute lung injury. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 2012 Apr;46(4):541-50. (* co-auteurs)

Objectifs, méthodes et résultats:

La stratégie de VM protectrice à bas Vt utilisée en pratique clinique courante (123) peut exercer des effets délétères, car le Vt bas promeut les phénomènes d'atélectasie (135) ou dérecrutement et d'ouverture/fermeture des alvéoles, qui peuvent aggraver les lésions pulmonaires (134,275). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'utilisation de manœuvres de recrutement alvéolaire consistant en des insufflations profondes répétées, a montré des bénéfices en terme d'oxygénation et de mécanique ventilatoire chez l'humain (136,144–146).

Mais des données suggéraient aussi que les manœuvres de recrutement exerçaient des effets cardiovasculaires délétères. En effet, une manœuvre d'insufflation profonde, à objectif de volume ou de pression, induit une augmentation des pressions intrathoracique et transpulmonaire, avec risque de surdistension. Il en résulterait une baisse du remplissage du ventricule droit donc de sa pré-charge et des phénomènes de compression extrinsèque et d'étirement des vaisseaux intra-alvéolaires majorant les résistances vasculaires pulmonaires. Les conséquences immédiates décrites chez l'homme et chez l'animal sont une dilatation ventriculaire droite, une baisse du débit cardiaque et une hypotension artérielle systémique (138,276–278). Ces effets cardiovasculaires délétères ont été montrés transitoires,

disparaissant dans les minutes suivant la manœuvre, et limités par l'expansion volémique (277,278). Cependant, les effets de la répétition cyclique de ce stress mécanique sur la vascularisation pulmonaire étaient méconnus. Des données déjà anciennes suggéraient une vulnérabilité des CEMP à un étirement cyclique "exagéré". Ainsi, dans des modèles cellulaires tentant de reproduire les conditions de la ventilation à haut V_t , considérée à l'extrême comme une ventilation avec manœuvre de recrutement en 1/1, le stress mécanique cyclique avait été montré inducteur d'apoptose (279), de perméabilité endothéliale accrue (280,281) et de sécrétion majorée de chimiokines attractantes des PNN (282). Nous avons ainsi élaboré l'hypothèse selon laquelle les manœuvres de recrutement exerçaient des effets favorables sur la mécanique ventilatoire et l'hématose d'une part mais défavorables sur la microvascularisation pulmonaire d'autre part.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons choisi une manœuvre de recrutement décrite chez la souris (140). Nous l'avons utilisée dans le modèle *two hit* sus-décrit. La VM durait 5 heures. Quatre groupes étaient constitués, selon que les animaux étaient soumis ou non à l'inhalation de LPS et aux manœuvres de recrutement. D'abord, nous avons exploré la mécanique ventilatoire et l'hémodynamique ventriculaire droite avant le sacrifice. Ensuite nous avons étudié l'inflammation et le dommage parenchymateux pulmonaire. Enfin, nous avons analysé le transcriptome au niveau pulmonaire et cardiaque.

Notre objectif était de décrire l'existence d'une dysfonction vasculaire pulmonaire associée à l'utilisation de manœuvres de recrutement alvéolaire, et de tenter d'en préciser les mécanismes.

Nous avons pu établir que:

- l'utilisation de manœuvres de recrutement améliorait les échanges gazeux (moindre PaCO_2), limitait la dégradation de la mécanique ventilatoire sur la période de ventilation, mais ne limitait ni le dommage parenchymateux ni l'œdème,

- l'utilisation de manœuvres de recrutement chez les animaux exposés au LPS ne limitait pas l'inflammation pulmonaire mais au contraire majorait certains biomarqueurs circulants de l'inflammation (classe des IL-6),
- l'utilisation de manœuvres de recrutement chez les animaux exposés ou non exposés au LPS était responsable d'une augmentation des résistances pulmonaires totales; l'analyse transcriptomique pulmonaire montrait une dysrégulation de groupes de gènes impliqués dans les principaux mécanismes régissant la dysfonction endothéliale pulmonaire (perméabilité endothéliale, tonus vasculaire, thrombose microvasculaire et remodelage) chez les animaux exposés au LPS.
- l'utilisation de manœuvres de recrutement chez les animaux exposés au LPS était associée à une dysrégulation de groupes de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, l'apoptose et l'architecture membranaire au niveau ventriculaire droit.

Notre travail montre que les manœuvres de recrutement utilisées au cours de l'ARDS ont des effets bénéfiques, portant sur la mécanique ventilatoire et l'hématose, mais pourraient exercer par ailleurs des effets néfastes à type de dysfonction vasculaire pulmonaire. Ce travail illustre les inconvénients d'une stratégie ventilatoire guidée par un seul bénéfice fonctionnel ou de l'hématose, dans l'ignorance par ailleurs d'éventuels effets biologiques délétères, notamment microvasculaires.

Conflicting Physiological and Genomic Cardiopulmonary Effects of Recruitment Maneuvers in Murine Acute Lung Injury

Armand Mekontso Dessap^{1,2,3*}, Guillaume Voiriot^{1,2*}, Tong Zhou⁴, Elisabeth Marcos^{1,2}, Steven M. Dudek⁴, Jeff R. Jacobson⁴, Roberto Machado⁴, Serge Adnot^{1,2}, Laurent Brochard⁵, Bernard Maitre^{1,2,3}, and Joe G. N. Garcia⁴

¹INSERM, Unité U955 (Institut Mondor de Recherche Biomédicale), Créteil, France; ²Université Paris Est Créteil Val de Marne, Faculté de Médecine, Créteil, France; ³AP-HP, Groupe Henri Mondor–Albert Chenevier, Service de Réanimation Médicale, Créteil, France; ⁴Institute for Personalized Respiratory Medicine, Section of Pulmonary, Critical Care, Sleep and Allergy, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois; and ⁵Intensive Care Unit, Geneva University Hospital, and Geneva University, Geneva, Switzerland

Low tidal volume ventilation, although promoting atelectasis, is a protective strategy against ventilator-induced lung injury. Deep inflation (DI) recruitment maneuvers restore lung volumes, but potentially compromise lung parenchymal and vascular function via repetitive overdistention. Our objective was to examine cardiopulmonary physiological and transcriptional consequences of recruitment maneuvers. C57/BL6 mice challenged with either PBS or LPS via aspiration were placed on mechanical ventilation (5 h) using low tidal volume inflation (TI; 8 μ l/g) alone or in combination with intermittent DIs (0.75 ml twice/min). Lung mechanics during TI ventilation significantly deteriorated, as assessed by forced oscillation technique and pressure–volume curves. DI mitigated the TI-induced alterations in lung mechanics, but induced a significant rise in right ventricle systolic pressures and pulmonary vascular resistances, especially in LPS-challenged animals. In addition, DI exacerbated the LPS-induced genome-wide lung inflammatory transcriptome, with prominent dysregulation of a gene cluster involving vascular processes, as well as increases in cytokine concentrations in bronchoalveolar lavage fluid and plasma. Gene ontology analyses of right ventricular tissue expression profiles also identified inflammatory signatures, as well as apoptosis and membrane organization ontologies, as potential elements in the response to acute pressure overload. Our results, although confirming the improvement in lung mechanics offered by DI, highlight a detrimental impact in sustaining inflammatory response and exacerbating lung vascular dysfunction, events contributing to increases in right ventricle afterload. These novel insights should be integrated into the clinical assessment of the risk/benefit of recruitment maneuver strategies.

Keywords: mechanical ventilation; microarray; pulmonary hypertension; right ventricle; acute lung injury

Studies demonstrating lower mortality rates in patients with acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS) receiving low tidal volume ventilation (1, 2) have resulted in adoption of these ventilation guidelines in clinical

(Received in original form August 31, 2011 and in final form November 16, 2011)

* A.M.D. and G.V. contributed equally to this work.

This work was supported by grants from the Monahan foundation (A.M.D.), Société de Réanimation de Langue Française (AMD), Société Française d'Anesthésie Réanimation (A.M.D.), Laboratoires Servier (A.M.D.), and National Institutes of Health grant HL58094 (J.G.N.G.).

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Joe G. N. Garcia, M.D., Vice Chancellor for Research, University of Illinois at Chicago, 1737 West Polk Street, 305D AOB, Chicago, IL 60612-7227. E-mail: jggarcia@uic.edu

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Cell Mol Biol Vol 46, Iss. 4, pp 541–550, Apr 2012

Copyright © 2012 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2011-0306OC on December 1, 2011

Internet address: www.atsjournals.org

practice (3). However, low tidal volume ventilation also promotes atelectasis (4), with the potential to worsen lung injury through local alveolar hypoxia, increases in lung permeability (5), and lung inflammation (6). Local intrapulmonary shear forces generated during repeated reopening of atelectatic alveoli may also accelerate injury (7). Deep inflation (DI) recruitment maneuvers have been proposed as a means of periodically reopening regions of atelectasis. Experimental and clinical studies have demonstrated improvement in oxygenation, ventilation, and lung mechanical function after DI, without evidence of lung injury (8, 9). However, several adverse cardiovascular effects have been noted with lung recruitment maneuvers, with both high intrathoracic pressures (potentially leading to a decrease in systemic venous return) and high transpulmonary pressures (with the potential for increases in right ventricular afterload via compression and stretch of small alveolar vessels) (10–12). Although preload effects may be easily mitigated by fluid loading (12), DI-induced afterload effects may prompt right ventricular compromise (13, 14).

As pulmonary vascular dysfunction has been recognized as common during ALI and independently associated with poor outcomes (15), the aim of the present work was to examine the physiological and genomic effects of DI on lung mechanics and right ventricle function. Using a murine model of lung injury with prolonged low tidal volume mechanical ventilation, we assessed physiological and genomic cardiopulmonary responses to DI and performed multianalyte profiling of cytokines, chemokines, and markers of endothelial injury in plasma and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid. Some of the results of this study have been previously reported in the form of an abstract (16).

MATERIALS AND METHODS

Additional details on the methods are provided in the online supplement.

Animal Protocol

Male C57BL/6 mice, weighing 20–30 g, were anesthetized with inhaled 5% isoflurane (Abbott, Rungis, France), and aspirated a 50- μ l volume instillate (consisting of PBS or 4 μ g/g of *Escherichia coli* LPS, O55:B5; Sigma-Aldrich, Chimie, Lyon, France) into the lower respiratory tract (17). After oropharyngeal aspiration, the mice were returned to their cages for 18 hours, then were reanesthetized and intubated for mechanical ventilation (*see* online supplement for details).

Mechanical Ventilation

Mice were ventilated in the supine position using humidified gas, by means of a computer-driven small-animal ventilator (flexiVent; Scireq, Montreal, PQ, Canada) as follows: tidal volume, 8 μ l/g of body weight; respiratory rate, 180/min; end-expiratory pressure, 3 cm H₂O; and FI_{O₂}, 1 (18). Mechanical ventilation lasted 5 hours with continuous anesthesia,

muscle paralysis, a body temperature maintained at 36.5°C, and regular intraperitoneal warm fluid boluses (see online supplement for details).

Experimental Design

The experimental design included four groups: PBS + TI (PBS aspiration followed by mechanical ventilation with tidal inflations only); PBS + DI (PBS aspiration followed by mechanical ventilation with intermittent DI); LPS + TI (LPS aspiration followed by mechanical ventilation with tidal inflations only); and LPS + DI (LPS aspiration followed by mechanical ventilation with intermittent DI). DI maneuvers were supplied by the flexiVent ventilator (see online supplement for details) as a volume of 0.75 ml delivered twice per minute, as this recruitment strategy was previously shown to safely improve lung mechanics during a 2-hour ventilation protocol in a murine model while conferring protection from biotrauma (8).

Respiratory Mechanics

Forced oscillation techniques (FOTs) were assessed at initiation of mechanical ventilation (before and after volume history standardization),

and then repeated hourly, for calculation of respiratory system dynamic resistance, elastance, and compliance (single-frequency FOT data), as well as airway Newtonian resistance, tissue damping, and tissue elastance (low-frequency FOT data) (19, 20). In addition, quasistatic compliance of the respiratory system was evaluated from a continuous pressure–volume curve performed at start and end of mechanical ventilation (see online supplement for details).

Hemodynamic Explorations

Before the end of the timed ventilator protocol, mice underwent hemodynamic explorations. Right ventricular systolic pressure was measured during a short respiratory pause via jugular catheterization with an ultraminiature 1.4 F high-fidelity pressure transducer catheter, and cardiac output was measured by the transpulmonary thermodilution technique (21) (see online supplement for details). Total pulmonary vascular resistances were calculated as the ratio of right ventricular systolic pressure to cardiac output.

Specimen Collection

After hemodynamic measurements, arterial blood was obtained via carotid puncture for determination of blood gases and subsequent

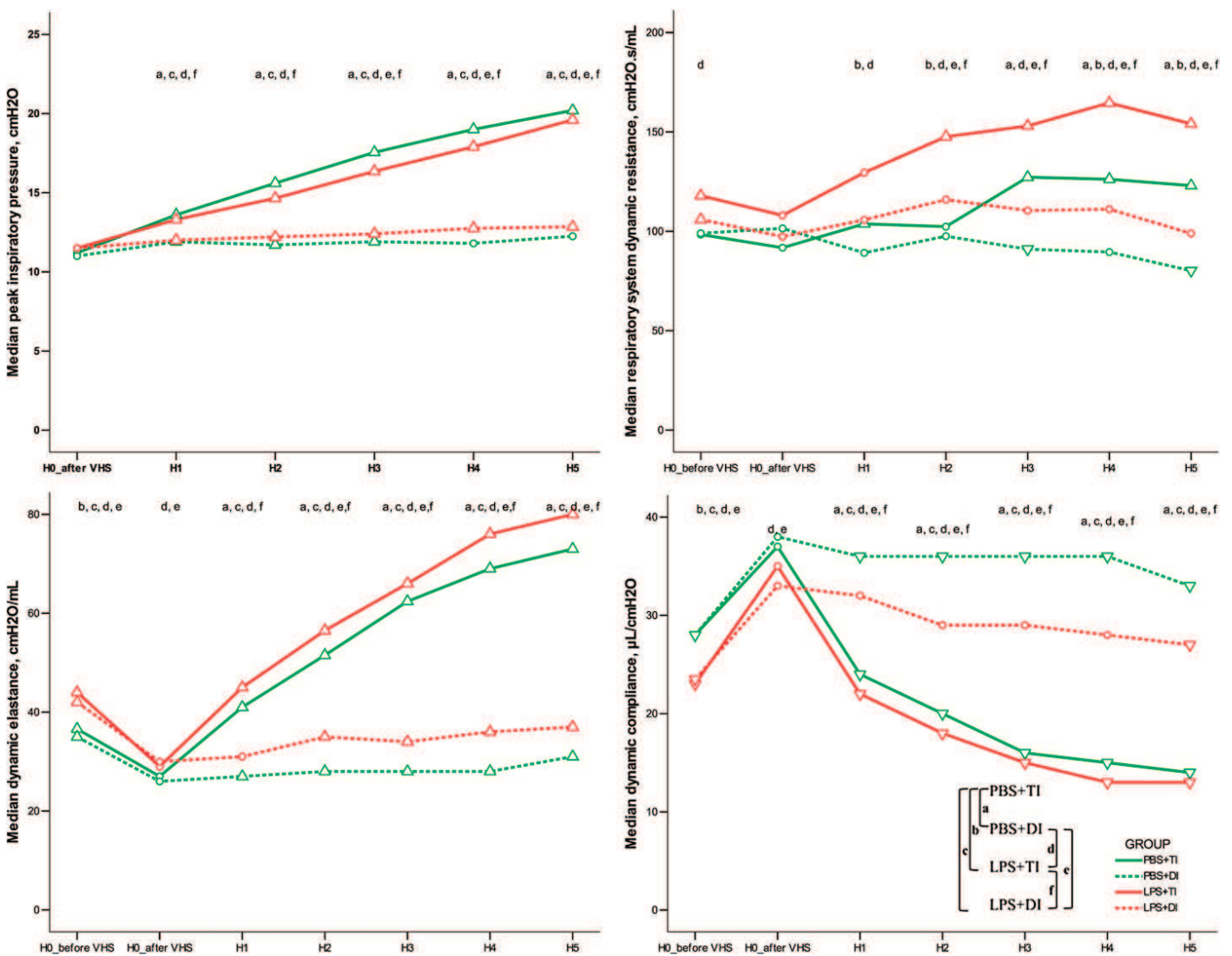


Figure 1. Airway pressures monitoring and single-frequency forced oscillation technique (FOT) results during 5 hours of mechanical ventilation using tidal inflations (TIs) or deep inflations (DIs) in mice after PBS or LPS aspiration. The depicted nomenclature of a, b, c, d, e, and f denote a Bonferroni-corrected *P* value less than 0.05 for the Mann-Whitney pairwise comparisons (after Kruskal Wallis test): PBS + TI versus PBS + DI, PBS + TI versus LPS + TI, PBS + TI versus LPS + DI, PBS + DI versus LPS + TI, PBS + DI versus LPS + DI, and LPS + TI versus LPS + DI, respectively. Triangles and inverted triangles denote significant increase and decrease, respectively (as compared with H0_after volume history standardization) with Bonferroni-corrected *P* value less than 0.05 for pairwise Wilcoxon (after Friedman’s test) (*n* = 6–9 animals per group). H0_before VHS denotes experiment start before volume history standardization. H0_after VHS denotes experiment start after volume history standardization.

measurement of cytokines, chemokines, and markers of endothelial injury using mouse multianalyte cytokine kits (*see* online supplement for details). Cardiac right and left ventricles, as well as right lower lobe of the lung, were harvested, quick frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C (*see* online supplement for details). The remaining lung was lavaged with four separate 0.5-ml aliquots of saline at 20°C and underwent fixation (4% paraformaldehyde) and paraffin embedding.

BAL

The total cell count was determined for a fresh fluid specimen using a Malassez hemocytometer. BAL fluid was centrifuged (1,600 rpm, 7 min, 4°C), and cell-free supernatants were stored at -80°C for subsequent assessment of protein content and multianalyte cytokine and chemokine concentrations (*see* online supplement for details).

Histological Analysis

Lung sections of 5- μm thickness were cut and stained with hematoxylin and eosin. True-color, high-resolution digital images were obtained from stained slides using an Aperio ScanScope CS scanner (Aperio,

Vista, CA) with a 20 \times scanning magnification. The degree of lung edema and vascular congestion were blindly determined using a high-speed automated whole-slide quantitative image analysis tool (Genie histology pattern recognition, ImageScope version 6.25 software; Aperio) (*see* online supplement for details) (22).

RNA Isolation and Transcript Analysis

We extracted total RNA from frozen tissues (three to four animals per group) with a combined protocol using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and the RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA), as previously described (23, 24). We used total RNA (5 μg) to synthesize double-stranded cDNA, then biotin-labeled antisense cRNA which was fragmented and hybridized to the Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array (containing $\sim 34,000$ genes; Affymetrix, Santa Clara, CA) (*see* online supplement for details).

Oligonucleotide Array Analysis

After quality evaluation (25, 26), arrays were normalized and processed using the Bioconductor “GCRMA” package (<http://www.bioconductor.org>). To identify differentially expressed genes, we conducted pairwise

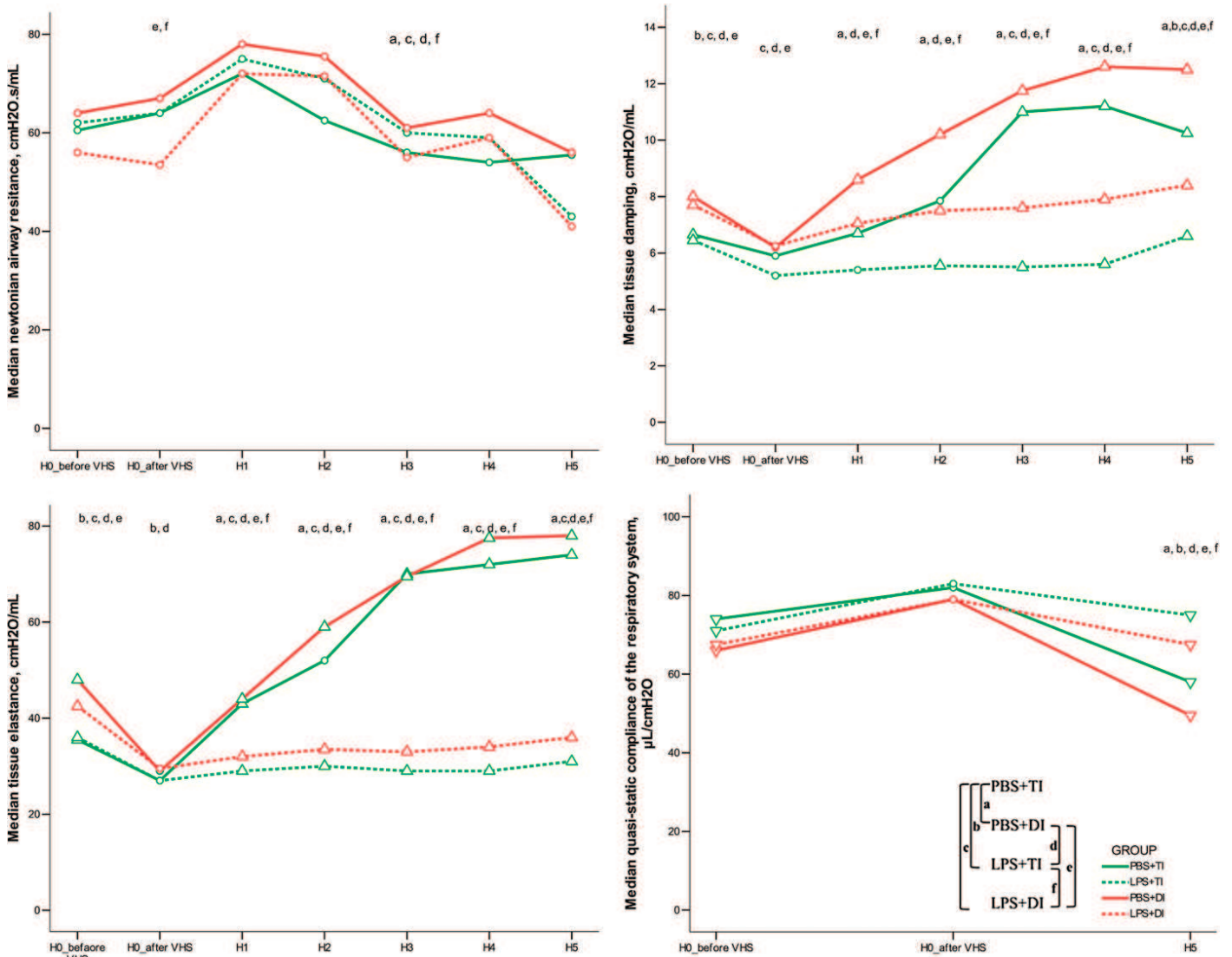


Figure 2. Low-frequency FOT results and pressure–volume curve data before and during 5 hours of mechanical ventilation using TIs or DIs in mice after PBS or LPS aspiration. a, b, c, d, e, and f denote a Bonferroni-corrected *P* value less than 0.05 for the Mann-Whitney pairwise comparisons (after Kruskal Wallis test): PBS + TI versus PBS + DI, PBS + TI versus LPS + TI, PBS + TI versus LPS + DI, PBS + DI versus LPS + TI, PBS + DI versus LPS + DI, and LPS + TI versus LPS + DI, respectively. Triangles and inverted triangles denote significant increase and decrease, respectively (as compared with HO_after volume history standardization) with Bonferroni-corrected *P* value less than 0.05 for pairwise Wilcoxon (after Friedman’s test) ($n = 6-9$ animals per group). HO_before VHS denotes experiment start before volume history standardization. HO_after VHS denotes experiment start after volume history standardization.

comparisons using Significance Analysis of Microarrays (27) (see online supplement for details).

Identification of Gene Ontology Categories and Pathways Enriched with Dysregulated Genes

The lists of dysregulated genes were imported into Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (28). The genes in these lists were mapped to DAVID identifiers, and then functionally annotated using the DAVID default gene ontology categories and pathways (see online supplement for details).

Quantitative RT-PCR

Quantification of selected transcripts was performed by TaqMan real-time RT-PCR assays using a CFX384 Rea-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA) (see online supplement for details).

Statistical Analysis of Nonmicroarray Data

The data were analyzed using the SPSS Base 13.0 statistical software package (SPSS Inc., Chicago, IL). Continuous data were expressed as median (first through third quartiles), unless otherwise stated. Independent samples were compared using the Kruskal-Wallis test followed by pairwise Mann-Whitney test. Related samples were compared using the Friedman test followed by pairwise Wilcoxon test (with Bonferroni correction). Categorical variables, expressed as percentages, were evaluated using the chi-square test or Fisher exact test. Two-tailed *P* values smaller than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Effect of DI on Respiratory and Hemodynamic Parameters

Results of respiratory monitoring, FOT, and pressure-volume curves are displayed in Figures 1 and 2. Manual adjustment for a delivered tidal volume of 8 μ l/g of body weight resulted in a constant minute ventilation throughout the experiment in all groups. At initiation of mechanical ventilation, animals challenged with LPS exhibited higher values of dynamic elastance, tissue damping, and tissue elastance as compared with those having received PBS. This difference partially persisted after volume history standardization and during mechanical ventilation. Mechanical ventilation with TI was associated with a progressive and major increase in airway pressures, dynamic elastance, tissue damping, and tissue

elastance, whereas dynamic compliance and quasistatic compliance decreased, with each change significantly mitigated in groups receiving DI. Arterial blood gas analysis, BAL data, and quantitative histological assessment at the end of the ventilation protocol are reported in Table 1. LPS challenge was associated with an increase in BAL fluid cell count, as well as histological evidence of increased lung edema and vascular congestion.

Hemodynamic data at the end of the ventilation protocol are reported in Table 2, with heart rates and cardiac outputs comparable among groups. Right ventricular systolic pressure and total pulmonary vascular resistances were increased in all groups as compared with the PBS + TI group, with the highest values observed in the LPS + DI group.

Effect of DI on Genomic Parameters

The gene-filtering parameters of significance analysis of microarray and the number of dysregulated genes in lung and heart tissues identified by pairwise comparisons (PBS + TI as reference group) are summarized in Table E1 in the online supplement. Lung gene expression profiling showed robust differential expression for both LPS + TI (660 genes) and LPS + DI (1,697 genes). Gene expression profiles were not significantly different between PBS + DI group and the PBS + TI reference group, suggesting the absence of prominent effects of DI in the absence of lung injury. Clustered heat maps revealed that most dysregulated lung genes from LPS + TI animals were also dysregulated in LPS + DI animals (Figure 3), with gene ontology and pathway functional annotation clustering revealing significant overlap. Among the top 10 common enriched clusters were clusters involving inflammatory responses, chemotaxis, cell migration, microsomes, extracellular matrix, and carbohydrate binding (Figure 4). Interestingly, a unique dysregulated cluster significantly enriched in LPS + DI lungs (rank 3), but not by LPS + TI involved genes related to vascular processes (Figure 4 and Figure E1). For example, genes involved in the vascular smooth muscle contraction pathway were significantly dysregulated in LPS + DI lungs, but not by LPS + TI (Figure E2). The fold change levels in gene expression for selected, significantly dysregulated genes by LPS + DI involved in lung inflammation and lung vascular dysfunction (endothelial injury, microvascular thrombosis, vascular tone and remodeling) are displayed in Figure 5A. Genome-wide expression profiling results

TABLE 1. ARTERIAL BLOOD GASES, BRONCHOALVEOLAR LAVAGE DATA, AND HISTOLOGICAL ANALYSIS AT THE END OF 5 HOURS OF MECHANICAL VENTILATION USING TIDAL INFLATIONS OR DEEP INFLATIONS IN MICE THAT UNDERWENT PBS OR LPS ASPIRATION

	PBS + TI	PBS + DI	LPS + TI	LPS + DI
Arterial blood gases				
Pa _{O₂} /Fi _{O₂}	289 (270–394)	306 (265–339)	268 (205–296)	283 (274–339)
pH	7.19 (7.15–7.30)	7.34 (7.29–7.41)*	7.17 (7.07–7.22) [†]	7.24 (7.16–7.32)
Pa _{CO₂} , mm Hg	34 (23–40)	22 (21–30)	34 (31–48) [†]	20 (13–24) [‡]
HCO ₃ ⁻ , mmol/L	13.0 (11.3–14.0)	13.2 (9.9–15.1)	12.5 (11.0–14.5)	9.1 (4.9–11.4)
Lactates, mmol/L	2.5 (2.3–2.7)	2.6 (2.5–3.0)	2.8 (2.4–3.0)	3.2 (2.7–4.1)
Bronchoalveolar lavage				
Cell count, cell/ μ l [§]	380 (105–845)	1,080 (535–1225)	2,255 (2005–2815)* [†]	2,430 (2,047–2,800)* [†]
Protein concentration, μ g/ml	88 (22–145)	63 (18–185)	134 (120–233)*	250 (150–470)* [†]
Lung histology				
Lung edema, % surface	45 (43–47)	43 (41–48)	50 (46–52) [†]	49 (46–50)* [†]
Vascular congestion, % surface	75 (73–76)	74 (73–75)	79 (77–80)* [†]	79 (77–80)* [†]

Definition of abbreviations: DI, deep inflations; Pa_{CO₂}, arterial carbon dioxide tension; Pa_{O₂}/Fi_{O₂}, ratio of arterial oxygen tension and fraction of inspired oxygen fraction; TI, tidal inflations.

Data are median (25th–75th percentile); *n* = 7–13 animals/group.

* *P* value < 0.05 (Mann-Whitney test after Kruskal Wallis test) as compared to PBS + TI.

[†] *P* value < 0.05 (Mann-Whitney test after Kruskal Wallis test) as compared to PBS + DI.

[‡] *P* value < 0.05 (Mann-Whitney test after Kruskal Wallis test) as compared to LPS + TI.

[§] Differential cell count was performed in a limited number of animals and showed a predominance of polymorphonuclear neutrophils (>80% of total cells) in all groups.

TABLE 2. HEMODYNAMIC DATA AT THE END OF FIVE HOURS OF MECHANICAL VENTILATION USING TIDAL INFLATIONS OR DEEP INFLATIONS IN MICE THAT UNDERWENT PBS OR LPS ASPIRATION

	PBS + TI	PBS + DI	LPS + TI	LPS + DI
Heart rate, bpm	540 (535–570)	530 (503–563)	550 (500–580)	530 (515–573)
Right ventricular systolic pressure, mm Hg	27 (24–29)	35 (31–40)*	37 (35–38)*	49 (46–54)*,†,‡
Cardiac output, ml/min	23 (21–30)	19 (18–31)	25 (18–29)	22 (17–26)
Total pulmonary resistance, mm Hg · min/ml	1.06 (0.90–1.36)	1.84 (1.25–2.09)*	1.48 (1.24–1.97)*	2.43 (2.32–2.51)*,†,‡

Definition of abbreviations: DI, deep inflations; TI, tidal inflations.

Data are median (25th–75th percentile); $n = 9$ to 13 animals per group.

* P value < 0.05 (Mann-Whitney test after Kruskal Wallis test) as compared to PBS + TI.

† P value < 0.05 (Mann-Whitney test after Kruskal Wallis test) as compared to PBS + DI.

‡ P value < 0.05 (Mann-Whitney test after Kruskal Wallis test) as compared to LPS + TI.

were validated by quantitative RT-PCR (Figure 5B). In addition, the angiotensin-2:angiotensin-1 gene expression ratio, a metric for vascular dysfunction, was significantly increased only in the LPS + DI group (Figure 5C) when compared with the PBS + TI group.

Similar to lung expression profiles, right ventricle gene expression analysis showed differential expression in both LPS + TI and LPS + DI mice, whereas PBS + DI had no significant impact. Gene ontology and pathway functional annotation clustering revealed little overlap between dysregulated terms in right ventricles from LPS + TI and LPS + DI groups, with only two common enriched clusters among the top 10 (extracellular matrix and platelet-derived growth factor binding). Clusters enriched by genes dysregulated in right ventricles from LPS + DI animals, but not enriched by LPS + TI, involved the acute inflammatory response, apoptosis, and membrane organization (Figure E3). Unlike lung and right ventricle gene expression, left ventricle gene expression profiling

displayed significant dysregulation in PBS + DI-exposed mice as well as LPS + TI and LPS + DI animals, with three top-10 enriched gene ontology and pathway clusters shared by PBS + DI- and LPS + TI-challenged mice (mitochondria/cellular respiration, nucleotide binding, and contractile apparatus) (Figure E4).

Effect of DI on Indices of Lung and Systemic Inflammation

Predictably, BAL concentrations for the vast majority of cytokines/chemokines assayed (25 out of 27) were significantly increased in LPS-challenged mice (as compared with PBS + TI), with equivalent fold changes observed in LPS + TI and LPS + DI mice (Figure 6A). The concentrations of 10 out of 27 cytokines/chemokines, as well as all four endothelial markers assayed in plasma, were significantly increased in LPS-challenged mice (compared with PBS + TI). For these 14 differentially

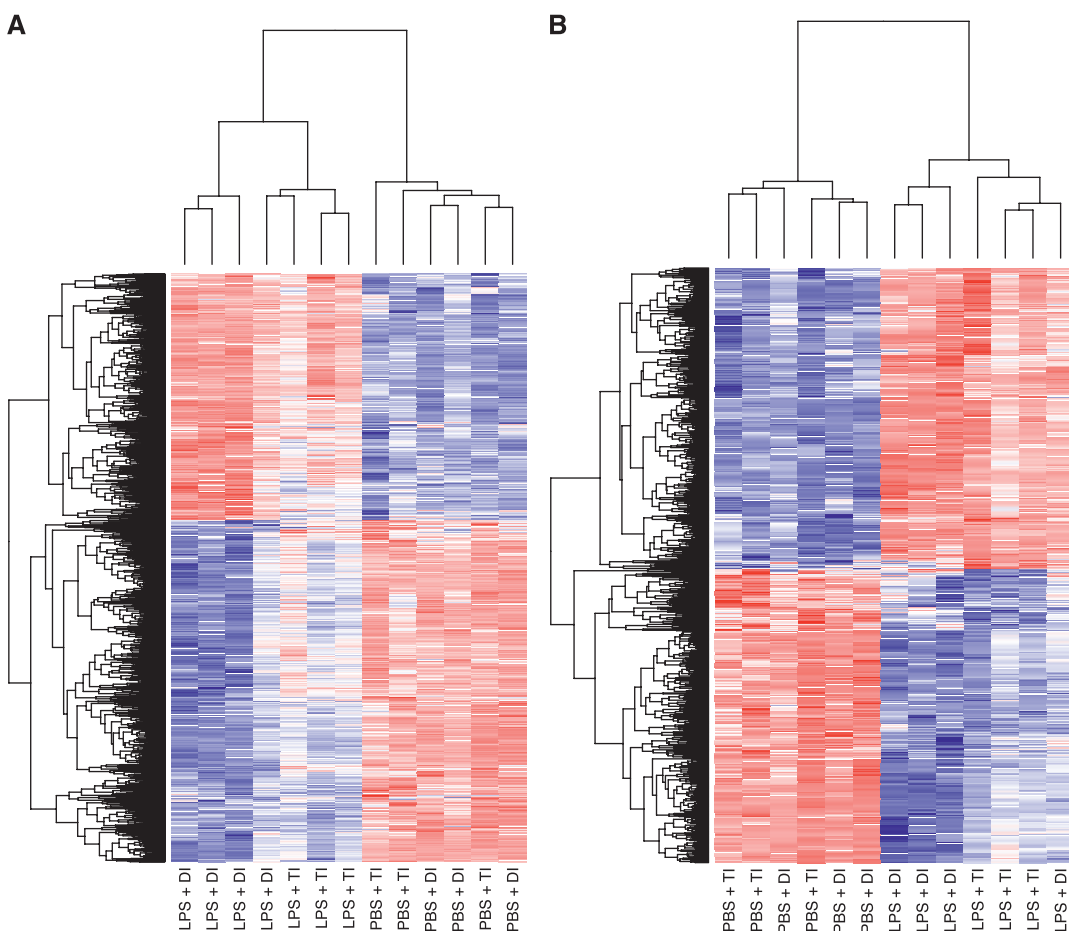


Figure 3. Expression pattern of dysregulated lung genes in mice exposed to mechanical ventilation using TIs or DIs after PBS or LPS aspiration. The expression levels of dysregulated lung genes identified using significance analysis of microarrays for LPS + DI versus PBS + TI comparison (A) and for LPS + TI versus PBS + TI comparison (B) are displayed by hierarchical clustering (using Bioconductor). Sample clustering is displayed at the top; gene clusters are displayed on the left; blue, white, and red represent expression levels below, at, and above mean level, respectively.

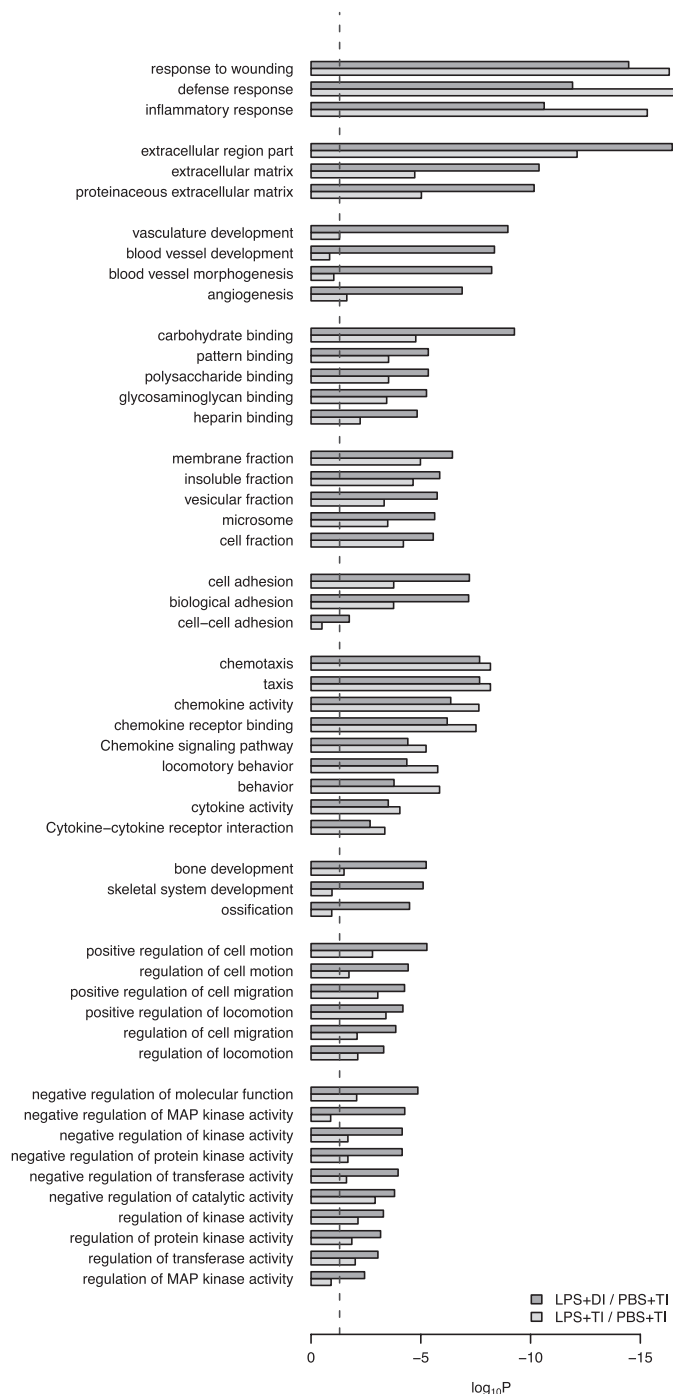


Figure 4. Top 10 clusters of gene ontology categories and pathways enriched by genes dysregulated by LPS + DI (using PBS + TI as the reference group) in lungs. Groups were compared using significance analysis of microarray (LPS + DI versus PBS + TI and LPS + TI versus PBS + TI), and the lists of dysregulated genes were explored by Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery functional annotation clustering to assess significance of gene-term enrichment. Bars represent the log-transformed enrichment *P* value (modified Fischer's exact test) of each category for the LPS + DI versus PBS + TI comparison (dark gray) and for the LPS + TI versus PBS + TI comparison (light gray). The top 10 clusters are those with the highest enrichment score (calculated as the geometric mean of the enrichment *P* values of all categories within the cluster) for the LPS + DI versus PBS + TI comparison. The vertical dashed line represents the 0.05 significance threshold. TI, ventilation with TIs only.

expressed proteins, equivalent fold changes were observed in LPS + TI and LPS + DI for 11 proteins, with significantly higher fold changes with LPS + DI as compared with LPS + TI for leukemia inhibitory factor, IL-6, and total plasminogen activator inhibitor-1 levels (Figure 6B).

DISCUSSION

In the setting of modest positive end-expiratory pressure (PEEP) and low tidal volume ventilation, we examined the effects of prolonged ventilation with intermittent DI delivery on lung mechanics, right ventricle hemodynamics, and cardiopulmonary gene expression in mice with or without prior lung injury. DI maneuvers significantly alleviated lung mechanic alterations produced by low tidal volume ventilation. However, these benefits were accompanied by increases in right ventricle pressures and total pulmonary vascular resistances, especially in the setting of LPS-induced lung injury. Genome-wide expression profiling provided compelling corroborative evidence that DI strategies produce vascular dysfunction and sustained inflammation in LPS-challenged lungs.

After LPS aspiration, mice exhibited higher values of dynamic elastance, tissue damping, and tissue elastance as compared with those having received PBS, and this difference partially persisted after volume history standardization and during mechanical ventilation. The alteration of mechanical properties of the lung after LPS aspiration is in line with previous reports (29) and consistent with the inflammatory changes eventually observed in tissues (gene expression by microarray) and BAL fluid (cell count and cytokine concentrations). Consistent with its potential to prevent alveolar derecruitment, DI resulted in more effective ventilation, as shown by the trend toward lower PaCO₂ values in animals receiving DI, despite all groups being matched to the same total minute ventilation. Mechanical ventilation with TI was associated with a dramatic impairment in resistive and elastic properties of lung tissue in both PBS- and LPS-challenged mice, which were significantly mitigated by the use of DI. In particular, DI reduced the striking increase in tissue damping and tissue elastance observed with TI ventilation. These findings are in line with previous reports highlighting a progressive alteration of lung mechanics during low tidal volume ventilation in mice, which can be attributed to atelectasis and prevented by DI (8).

Despite their beneficial effect on lung mechanics, DI maneuvers were associated with significant increases in right ventricle systolic pressure and total pulmonary vascular resistances, especially in LPS-challenged animals. We interpret these findings to be in accordance with previous experimental and clinical studies showing an increase in right ventricle afterload during recruitment maneuvers (10–13, 30). Although a normal right ventricle (RV) could not theoretically generate very high pressures in an acute setting, the time constant of RV adaptation to increased afterload is not well known, and mild RV hypertrophy has been described after several hours of hypoxemic respiratory failure in patients free of any underlying pathological conditions (31). We attempted to determine molecular signatures that describe the effects of LPS-induced lung injury and those of mechanical ventilation with DI by performing extensive expression profiling of lung and cardiac tissues. Interestingly, a cluster involving the lung vasculature was enriched in genes dysregulated by LPS + DI, but not in those dysregulated by LPS + TI, highlighting the potential involvement of lung vascular dysfunction in the rise in right ventricle pressures observed in LPS + DI mice. Several genes implicated in endothelial injury, vascular tone, vascular remodeling, and microvascular thrombosis were highly dysregulated in LPS + DI lungs. Of note, the ratio of angiotensin-2 to angiotensin-1 gene expression was significantly increased in the LPS + DI group as compared

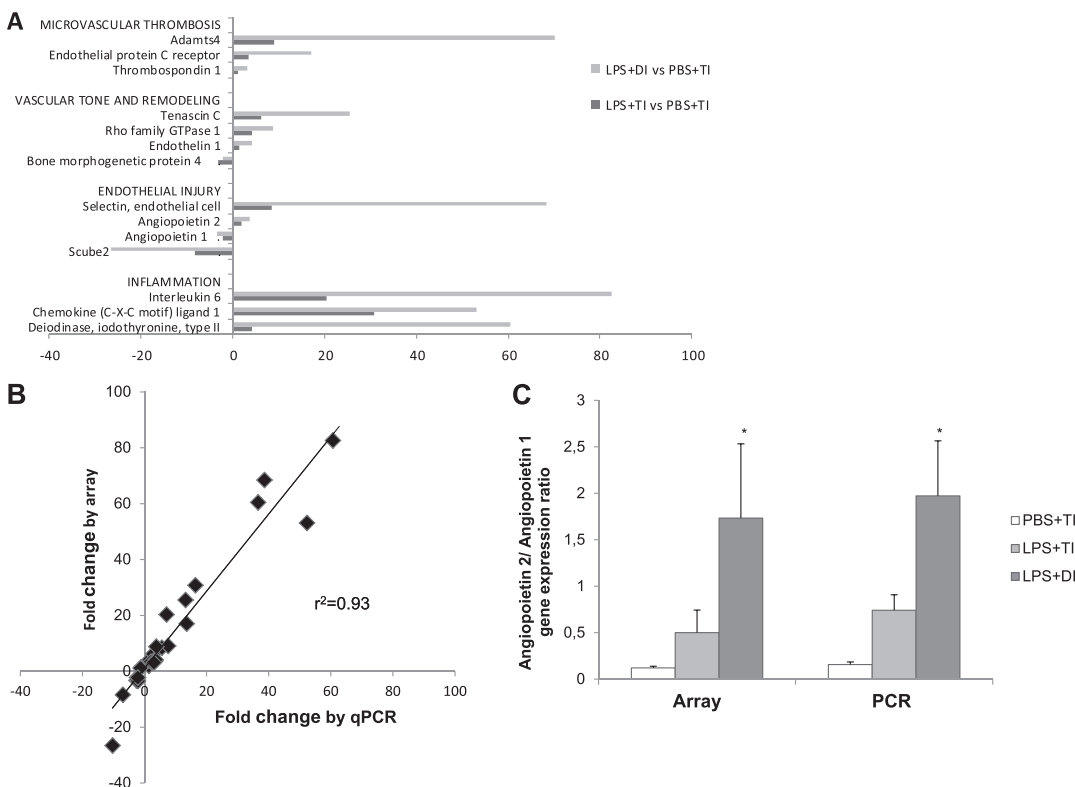


Figure 5. Fold changes in lung microarray expression of selected genes involved in inflammation and vascular dysfunction. Comparisons of gene expression after LPS + DI versus PBS + TI (light gray) and LPS + TI versus PBS + TI (dark gray) (A) and their correlation with RT-PCR validation assays (B). (C) The ratio of angiopoietin-2 to angiopoietin-1 array expression level (mean and SEM) in each group. LPS, LPS aspiration; qPCR, quantitative PCR; TI, ventilation with TIs only; Scube2, signal peptide CUB domain epidermal growth factor-like 2.

with PBS + TI. Angiopoietin-1 and -2 are vascular growth factors that classically act in an agonist/antagonist manner on the endothelial tyrosine kinase receptor to influence integrity and function of the vascular endothelium, particularly with regard to lung vascular permeability (32). The ratio of angiopoietin-2 to -1 plasma concentrations has been recently proposed as a marker of endothelial injury and validated as a predictor of mortality in patients with ALI (33).

Our findings of deleterious effects of DI on pulmonary vascular and right ventricular function may seem in contradiction to a previous report by Duggan and colleagues (34) that recruitment maneuvers reversed vascular leak and right ventricular failure caused by atelectasis. Several differences between the two studies may explain the dissimilar results (34). First, this study used a model of uninjured rat lungs ventilated for a shorter period (2.5 h), a strategy that may minimize lesions associated with the repetition of overdistention and vascular stretch with DI. Our studies used a murine model of lung injury with prolonged ventilation (5 h) to mimic the human condition where patients with ALI/ARDS exhibit significant lung injury and are typically ventilated for several days. During prolonged ventilation, the benefits of recruitment may be outweighed by cumulative damage from excessive overdistention. High tidal volume ventilation, which is an extreme case of delivering DI with every breath, has been known for several decades to be injurious to the lung (35–37). Our study suggests that frequency of high tidal ventilation required to induce vascular injury is much lower than might previously have been thought. A second difference in these two studies is the ventilation of the rat control group with zero PEEP (a strategy known to be injurious because of cyclic opening and closing of pulmonary units), whereas our murine studies used moderate PEEP (3 cm H₂O) in all groups. A third key difference is the nature of strategies used for recruitment of atelectatic lung. Clearly, a variety of strategies may accomplish this, including application of high PEEP (38, 39). For lung recruitment, the rat studies applied 2 cm H₂O PEEP

throughout the ventilatory protocol, with intermittent increases to 8 cm H₂O, whereas we employed DI. Whether the use of such PEEP levels in our model would have effects that differed from those of DI warrants further examination.

This is the first study to explore right and left heart gene expression in a model of ALI. We identified ontology clusters enriched by right ventricle genes dysregulated in LPS + DI animals, but not enriched by LPS + TI that involved genes associated with acute inflammatory responses, apoptosis, and membrane organization. Given that the LPS + DI group exhibited the highest values of right ventricle systolic pressures, these three pathways are likely involved in the cardiac transcriptional response to acute pulmonary hypertension. Consistent with this notion, a recent study assessing right ventricle gene expression in a rat model of pulmonary embolism with pulmonary hypertension found a robust inflammatory response within the right ventricle tissue (40). In our study, transcriptional changes in the left ventricle shared four major gene ontology clusters that involved the mitochondrion/cellular respiration, ATP binding, catabolic processes, and sarcomere, findings very similar to the transcriptional changes in energy metabolism and contractile-related genes identified as key elements of sepsis-induced myocardial depression (41).

Although extrapolation of experimental findings to the human condition should obviously be undertaken with significant caution, our study provides several potentially important clinical implications. First, our results may discourage the systematic use of frequent lung recruitment maneuvers during prolonged ventilation, although the range of volumes used for DIs in our experimental model, as well as murine chest wall properties, are very different from the clinical scenario. Lung recruitment maneuvers have been proposed for use during anesthesia and after surgery for atelectasis prevention, as well as in patients with ARDS to reverse lung atelectasis. To date, these maneuvers have not been proven to significantly decrease overall morbidity or mortality (42). Second, our data also clearly display an existing discrepancy between

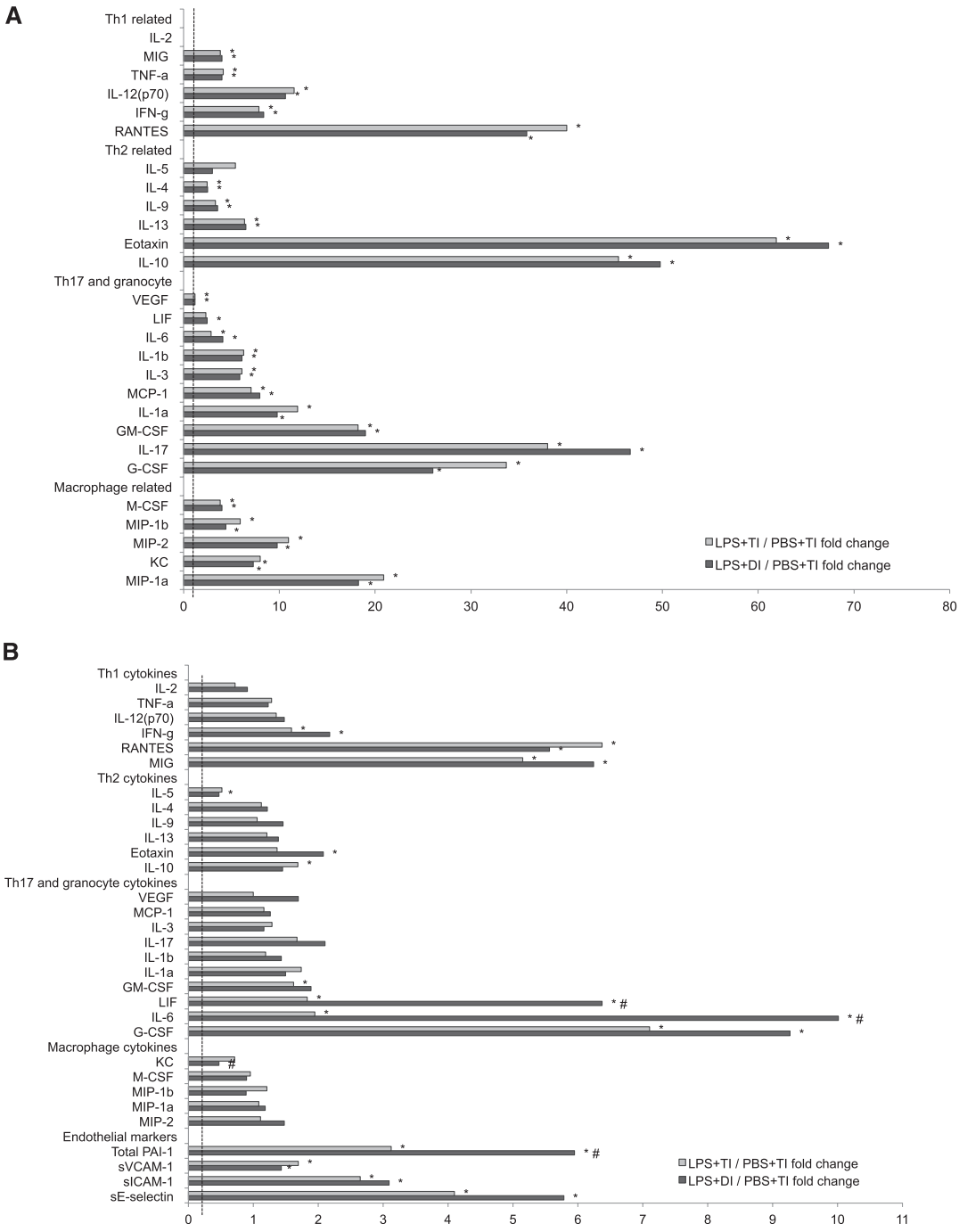


Figure 6. Fold changes in concentrations of various cytokines, chemokines, and endothelium markers in bronchoalveolar lavage (A) and plasma (B) by multi-analyte assay for LPS + DI versus PBS + TI (dark gray) and LPS + TI versus PBS + TI (light gray) comparisons. **P* < 0.05 (Mann-Whitney test after Kruskal-Wallis test) as compared with PBS + TI; #*P* < 0.05 (Mann-Whitney test after Kruskal-Wallis test) as compared with LPS + TI. G-CSF, granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor; KC, keratinocyte-derived cytokine; LIF, leukemia inhibitory factor; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MCP-1, monocyte chemoattractant protein; MIG, monokine induced by interferon- γ ; MIP, macrophage inflammatory protein; PAI, plasminogen activator inhibitor; RANTES, regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted; sICAM, soluble intercellular adhesion molecule; sVCAM, soluble vascular cell adhesion molecule; Th, T helper cell; VEGF, vascular endothelial growth factor.

physiological and biological lung responses in the context of ALI. In general, an intervention associated with improvement in lung mechanics is assumed to produce similar advantageous effects at the cellular level. Despite clearly beneficial effects on lung mechanics, DI did not reduce overall lung biotrauma in our model and, in fact, produced either similar or worsened gene expression dysregulation compared with LPS + TI-exposed mice. The increase in BAL and plasma concentration of various cytokines, chemokines, and endothelial markers was either similar in these two groups or more aberrant in LPS + DI-challenged animals, as was the case for leukemia inhibitory factor, IL-6, and total plasminogen activator inhibitor-1. Our findings suggest the utility of assessing both physiological and biological markers to accurately interpret the impact of ventilator settings in the clinical scenario. These results also demonstrate the experimental occurrence of pulmonary vascular dysfunction,

even in the context of reduced airway pressures and improved lung mechanics. It has been reported for several years that, besides the epithelial injury, ARDS is also a disease of the pulmonary circulation (43) that can affect the right ventricle (44), highlighting the need for an optimal balance between hemodynamics and respiratory mechanics. A recent study reported that pulmonary vascular dysfunction (defined as an increase in transpulmonary gradient or pulmonary vascular resistance) is common in ALI and independently associated with poor outcomes (15). In the Respiratory Management of Acute lung Injury Study of the ARDSNetwork (2), patients had a better outcome when using a low tidal volume, despite significantly worse oxygenation, illustrating the risks of looking at a single physiological endpoint of respiratory function. Our study provides a dramatic example of improvement in lung mechanical properties being associated with a significant worsening of vascular function and inflammation.

In conclusion, we observed a striking deterioration of lung mechanics in mice subjected to prolonged low tidal volume ventilation after PBS or LPS aspiration. This deterioration was remarkably mitigated by DI recruitment maneuvers. However, in LPS-challenged animals, DI did not attenuate lung inflammatory transcriptional profile, but rather produced dysregulation of several vascular genes, resulting in an increase in right ventricle afterload. Gene ontology identified inflammation, apoptosis, and membrane organization as potential key elements of the right ventricle response to acute pressure overload, whereas the left ventricle transcriptional profile often revealed dysregulated genes in energy metabolism, nucleotide binding, and contractile apparatus.

Author disclosures are available with the text of this article at www.atsjournals.org.

Acknowledgments: The authors are very grateful to the following members of the University of Illinois at Chicago's Institute for Personalized Respiratory Medicine for their invaluable help: Biji Mathew, Ph.D., Jessica Siegler, XiaoGuang Sun, M.D., Ph.D., Michael Wade, and Eddie Chiang. They are also indebted to Shwu-Fan Ma, Ph.D. (Section of Pulmonary and Critical Care, University of Chicago), Ryan Deaton (Department of Pathology, University of Illinois at Chicago), as well as Rachid Souktani, Ph.D. (Plateforme Petit Animal, INSERM U955, Créteil), for invaluable scientific and technical assistance.

References

- Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, Kairalla RA, Deheinzelin D, Munoz C, Oliveira R, et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1998;338:347–354.
- 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.
- Esteban A, Ferguson ND, Meade MO, Frutos-Vivar F, Apezteguia C, Brochard L, Raymondos K, Nin N, Hurtado J, Tomicic V, et al. Evolution of mechanical ventilation in response to clinical research. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:170–177.
- Richard JC, Maggiore SM, Jonson B, Mancebo J, Lemaire F, Brochard L. Influence of tidal volume on alveolar recruitment: respective role of PEEP and a recruitment maneuver. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1609–1613.
- Carpenter TC, Stenmark KR. Hypoxia decreases lung neprilysin expression and increases pulmonary vascular leak. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L941–L948.
- Madjdpour C, Jewell UR, Kneller S, Ziegler U, Schwendener R, Booy C, Klausli L, Pasch T, Schimmer RC, Beck-Schimmer B. Decreased alveolar oxygen induces lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L360–L367.
- Muscudere JG, Mullen JB, Gan K, Slutsky AS. Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;149:1327–1334.
- Allen GB, Suratt BT, Rinaldi L, Petty JM, Bates JH. Choosing the frequency of deep inflation in mice: balancing recruitment against ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291:L710–L717.
- Grasso S, Mascia L, Del Turco M, Malacarne P, Giunta F, Brochard L, Slutsky AS, Marco Ranieri V. Effects of recruiting maneuvers in patients with acute respiratory distress syndrome ventilated with protective ventilatory strategy. *Anesthesiology* 2002;96:795–802.
- Fujino Y, Goddon S, Dolhnikoff M, Hess D, Amato MB, Kacmarek RM. Repetitive high-pressure recruitment maneuvers required to maximally recruit lung in a sheep model of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2001;29:1579–1586.
- Lim SC, Adams AB, Simonson DA, Dries DJ, Broccard AF, Hotchkiss JR, Marini JJ. Transient hemodynamic effects of recruitment maneuvers in three experimental models of acute lung injury. *Crit Care Med* 2004;32:2378–2384.
- Odenstedt H, Aneman A, Karason S, Stenqvist O, Lundin S. Acute hemodynamic changes during lung recruitment in lavage and endotoxin-induced ali. *Intensive Care Med* 2005;31:112–120.
- Nielsen J, Nilsson M, Freden F, Hultman J, Alstrom U, Kjaergaard J, Hedenstierna G, Larsson A. Central hemodynamics during lung recruitment maneuvers at hypovolemia, normovolemia and hypervolemia: a study by echocardiography and continuous pulmonary artery flow measurements in lung-injured pigs. *Intensive Care Med* 2006;32:585–594.
- Mekontso Dessap A, Charron C, Devaquet J, Aboab J, Jardin F, Brochard L, Vieillard-Baron A. Impact of acute hypercapnia and augmented positive end-expiratory pressure on right ventricle function in severe acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 2009;35:1850–1858.
- Bull TM, Clark B, McFann K, Moss M. Pulmonary vascular dysfunction is associated with poor outcomes in patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:1123–1128.
- Mekontso Dessap AVG, Zhou T, Marcos E, Dudek SM, Jacobson JR, Machado R, Adnot S, Brochard L, Maitre B, Garcia JGN. Cardiopulmonary effects of recruitment maneuvers in murine acute lung injury highlight conflicting physiological and genomic indices [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:A4004.
- Foster WM, Walters DM, Longphre M, Macri K, Miller LM. Methodology for the measurement of mucociliary function in the mouse by scintigraphy. *J Appl Physiol* 2001;90:1111–1117.
- Thammanomai A, Majumdar A, Bartolak-Suki E, Suki B. Effects of reduced tidal volume ventilation on pulmonary function in mice before and after acute lung injury. *J Appl Physiol* 2007;103:1551–1559.
- Pillow JJ, Korfhagen TR, Ikegami M, Sly PD. Overexpression of tgf-alpha increases lung tissue hysteresivity in transgenic mice. *J Appl Physiol* 2001;91:2730–2734.
- Hantos Z, Daroczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol* 1992;72:168–178.
- Champion HC, Villnave DJ, Tower A, Kadowitz PJ, Hyman AL. A novel right-heart catheterization technique for *in vivo* measurement of vascular responses in lungs of intact mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:H8–H15.
- Gilbertson JR, Ho J, Anthony L, Jukic DM, Yagi Y, Parwani AV. Primary histologic diagnosis using automated whole slide imaging: a validation study. *BMC Clin Pathol* 2006;6:4.
- Hong SB, Huang Y, Moreno-Vinasco L, Sammani S, Moitra J, Barnard JW, Ma SF, Mirzapioazova T, Evenoski C, Reeves RR, et al. Essential role of pre-B-cell colony enhancing factor in ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:605–617.
- Meyer NJ, Huang Y, Singleton PA, Sammani S, Moitra J, Evenoski CL, Husain AN, Mitra S, Moreno-Vinasco L, Jacobson JR, et al. GADD45a is a novel candidate gene in inflammatory lung injury via influences on Akt signaling. *FASEB J* 2009;23:1325–1337.
- Li C, Hung Wong W. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* 2001;2:RESEARCH0032.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003;19:185–193.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:5116–5121.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44–57.
- Rocco PR, Momesso DP, Figueira RC, Ferreira HC, Cadete RA, Legora-Machado A, Koatz VL, Lima LM, Barreiro EJ, Zin WA. Therapeutic potential of a new phosphodiesterase inhibitor in acute lung injury. *Eur Respir J* 2003;22:20–27.
- Nielsen J, Ostergaard M, Kjaergaard J, Tingleff J, Berthelsen PG, Nygard E, Larsson A. Lung recruitment maneuver depresses central hemodynamics in patients following cardiac surgery. *Intensive Care Med* 2005;31:1189–1194.
- Jardin F, Dubourg O, Bourdarias JP. Echocardiographic pattern of acute cor pulmonale. *Chest* 1997;111:209–217.
- Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res* 2006;312:630–641.
- Ong T, McClintock DE, Kallet RH, Ware LB, Matthay MA, Liu KD. Ratio of angiopoietin-2 to angiopoietin-1 as a predictor of mortality in acute lung injury patients. *Crit Care Med* 2010;38:1845–1851.

34. Duggan M, McCaul CL, McNamara PJ, Engelberts D, Ackerley C, Kavanagh BP. Atelectasis causes vascular leak and lethal right ventricular failure in uninjured rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1633–1640.
35. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:294–323.
36. Slutsky AS. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest* 1999;116(1, Suppl):9S–15S.
37. Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures: protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis* 1974;110:556–565.
38. Gattinoni L, D'Andrea L, Pelosi P, Vitale G, Pesenti A, Fumagalli R. Regional effects and mechanism of positive end-expiratory pressure in early adult respiratory distress syndrome. *JAMA* 1993;269:2122–2127.
39. Halter JM, Steinberg JM, Schiller HJ, DaSilva M, Gatto LA, Landas S, Nieman GF. Positive end-expiratory pressure after a recruitment maneuver prevents both alveolar collapse and recruitment/derecruitment. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1620–1626.
40. Zagorski J, Sanapareddy N, Gellar MA, Kline JA, Watts JA. Transcriptional profile of right ventricular tissue during acute pulmonary embolism in rats. *Physiol Genomics* 2008;34:101–111.
41. dos Santos CC, Gattas DJ, Tsoporis JN, Smeding L, Kabir G, Masoom H, Akram A, Plotz F, Slutsky AS, Husain M, *et al.* Sepsis-induced myocardial depression is associated with transcriptional changes in energy metabolism and contractile related genes: a physiological and gene expression-based approach. *Crit Care Med* 2010;38:894–902.
42. Meade MO, Cook DJ, Guyatt GH, Slutsky AS, Arabi YM, Cooper DJ, Davies AR, Hand LE, Zhou Q, Thabane L, *et al.* Ventilation strategy using low tidal volumes, recruitment maneuvers, and high positive end-expiratory pressure for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008;299:637–645.
43. Zapol WM, Snider MT. Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *N Engl J Med* 1977;296:476–480.
44. Vieillard-Baron A, Schmitt JM, Augarde R, Fellahi JL, Prin S, Page B, Beauchet A, Jardin F. Acute cor pulmonale in acute respiratory distress syndrome submitted to protective ventilation: incidence, clinical implications, and prognosis. *Crit Care Med* 2001;29:1551–1555.

ONLINE DATA SUPPLEMENT

Conflicting physiological and genomic cardiopulmonary effects of recruitment maneuvers in murine acute lung injury

Armand Mekontso Dessap, Guillaume Voiriot, Tong Zhou, Elisabeth Marcos, Steven M Dudek, Jeff R Jacobson, Roberto Machado, Serge Adnot, Laurent Brochard, Bernard Maitre, and Joe GN Garcia

MATERIAL AND METHODS

Animal protocol

The experiments were performed in accordance with the official regulations of the French Ministry of Agriculture and the US National Institute of Health guidelines for the experimental use of animals. Male C57BL/6 mice weighing 20 to 30 g were anesthetized with inhaled 5% isoflurane (Abbott, Rungis, France), and suspended by their upper incisors from a rubber band on a 60° incline board. The tongue was gently extended to prevent swallowing, and a 50 μ L volume instillate (consisting of PBS or 4 μ g/g of E. coli LPS, O55:B5, Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France) was delivered into the distal part of the oropharynx and aspirated into the lower respiratory tract (E1). After oropharyngeal aspiration, the mice returned to their cages for 18 hours, then were reanesthetized with intraperitoneal pentobarbital (30 μ g/g of body weight, Hospira, Meudon La Forêt, France) followed by continuous 5% isoflurane (Abbott, Rungis, France). The larynx was surgically exposed and the trachea was intubated orally under direct vision with a metal cannula (internal diameter of 1 mm, Harvard Apparatus, Les Ulis, France).

The tracheal cannula was properly secured with surgical thread (Ethicon 3-0, Ethicon, Auneau, France) before connection to mechanical ventilator in order to avoid leaks.

Mechanical ventilation

Mice were ventilated in the supine position using humidified gas (20 mgH₂O/L absolute humidity, MR410 humidifier, Fischer & Paykel Healthcare, Courtaboeuf, France), with a tidal volume of 8 μ L/g of body weight, a respiratory rate of 180/min, 3 cmH₂O end-expiratory pressure, and FiO₂ of 1, by means of a computer-driven small-animal ventilator (*flexiVent*, Scireq, Montreal, Canada). Because load impedance has been shown to influence ventilator performance and the resulting delivered tidal volume (E2), the displacement volume of the piston was manually adjusted on a regular basis to make sure that the delivered tidal volume was 8 μ L/g of body weight. Mechanical ventilation lasted 5 hours with continuous anesthesia maintained by 1% isoflurane and muscle paralysis using intraperitoneal pancuronium at the onset of the experiment and every two hours (0.8 μ L/g of body weight, Organon, Puteaux, France) to ensure passive mechanical conditions. The body temperature was monitored using a rectal probe and was maintained at 36.5 °C with a blanket connected to a homeothermic regulator (Homeo-blanket system 50-7221F, Harvard Apparatus, Les Ulis, France). Mice received intraperitoneal warm fluid boluses (5% dextrose with 9 g/L NaCl) at the onset of the experiment (20 μ L/g of body weight) and every hour (10 μ L/g of body weight).

Experimental design

The experimental design included four groups: PBS+TI (PBS aspiration followed by mechanical ventilation with tidal inflations only), PBS+DI (PBS aspiration followed by mechanical ventilation with intermittent DI), LPS+TI (LPS aspiration followed by mechanical ventilation

with tidal inflations only), and LPS+DI (LPS aspiration followed by mechanical ventilation with intermittent DI). DI maneuvers were delivered by the *flexiVent* ventilator in a quasi-sinusoidal, nonsustained, and nonpressure-limited fashion in order to mimic the tidal inflations. A volume of 0.75 mL delivered twice per minute was chosen as this recruitment strategy was previously shown to safely improve lung mechanics during a 2 hour ventilation protocol in a murine model while conferring protection from biotrauma (E3).

Respiratory mechanics

Special features of the *flexiVent* ventilator include a continuous monitoring of airway pressures and a precision computer-controlled piston that is capable of accurately measuring the delivered volume (with appropriate corrections for gas compression) and to produce any desired waveform, allowing respiratory mechanics assessment with the forced oscillation technique (FOT) and pressure-volume curves (E3). Before each mouse was connected to the ventilator, pressure and piston displacement calibration data were collected to correct the respiratory mechanics data (E4). Mice were allowed to stabilize on the ventilator for 5 minutes and were then inflated three times to a transrespiratory pressure of 30 cmH₂O to establish a standard volume history. FOT were assessed at initiation of mechanical ventilation (before and after volume history standardization), and then repeated hourly to capture the time course and the detailed response to mechanical ventilation. FOT measurements included a 1.2 second, 2.5 Hz single-frequency signal (SnapShot-150 perturbation) and an eight seconds, broadband low-frequency signal containing 17 mutually prime frequencies between 0.5 and 19.75 Hz (Quick Prime-8 perturbation). Respiratory system dynamic resistance, elastance, and compliance were calculated in the *flexiVent* software by fitting the single frequency FOT data to the single compartment model (E5). Respiratory system input impedance was calculated from the low frequency FOT data and

airway Newtonian resistance, tissue damping and tissue elastance were determined by iteratively fitting the constant-phase model to input impedance (E6). In addition, a continuous pressure-volume curve (pressure-driven from 3 to 30 cmH₂O) was performed at start and end of mechanical ventilation. The loops were processed by the *flexiVent* software to fit the Salazar-Knowles equation and to calculate parametric results, such as the quasi-static compliance of the respiratory system. Before the end of the timed ventilator protocol, mice underwent hemodynamic explorations.

Hemodynamic explorations

Through the cervical midline incision, both the right jugular vein and left carotid artery were isolated using a stereomicroscope (Leica MZ 7.5, Leica Microsystems, Nanterre, France). An ultra-miniature 1.4F high fidelity pressure transducer catheter (SPR-671, Millar Instruments, Houston, TX) was inserted into the right jugular vein and advanced into the right ventricle. The micromanometer was calibrated in vitro electronically and against a column of mercury with the reference zero level taken at midchest. Right ventricular systolic pressure was measured during a short respiratory pause with the use of a Gould transducer (Gould, Cleveland, USA) and a Notocord system (Emka Technologies, Paris, France). Cardiac output was measured by the transpulmonary thermodilution technique (E7). Briefly, a thermistor microprobe (Fr-1; Columbus Instruments, Columbus, OH) was inserted into the left carotid artery and advanced to the aortic arch, where changes in aortic blood temperature were measured. A catheter placed in the right jugular vein was advanced to the right atrium for rapid bolus injection of 20 μ L of saline solution at 20°C with the use of a constant rate syringe (Hamilton Company, Reno, NV). Cardiac output was computed in triplicate and averaged, using the Cardiomax-III system (Columbus

Instruments). Total pulmonary vascular resistances were calculated as the ratio of right ventricular systolic pressure to cardiac output.

Specimen collection

At the end of the timed ventilator protocol and after hemodynamic measurements, arterial blood was obtained via carotid puncture, using a heparinized needle and syringe, for determination of blood gases using a GEM Premier 3000 analyser (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, USA) and subsequent measurement of cytokines, chemokines and markers of endothelial injury using Bioplex (Bio-Rad, Hercules, CA) and Milliplex (Millipore Corporation, Billerica, MA) mouse multi-analyte cytokine kits in accordance with manufacturer's instructions. Immediately following thoracotomy, the heart was removed and right and left ventricles were carefully isolated by manual dissection, then immediately quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The right lower bronchus was sutured, and the right lower lobe of the lung was removed, quick-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The remaining lung was lavaged with four separate 0.5 mL aliquots of saline at 20°C and then underwent fixation (4% paraformaldehyde) and paraffin embedding.

Bronchoalveolar lavage

The total cell count was determined for a fresh fluid specimen using a Malassez hemocytometer. The cell pellet was diluted in saline, and differential cell counts were done on cytocentrifuge preparations in few animals (Cytospin 3; Shandon Scientific, Cheshire, UK) stained with Diff-Quick stain (Baxter Diagnostics, McGaw Park, IL). Bronchoalveolar lavage fluid was centrifuged (1600 rpm, 7 min at 4°C), and cell-free supernatants were stored at -80°C for subsequent assessment of protein content (using a colorimetric BCA assay, Thermo Scientific,

Rockford, IL), and cytokines and chemokines concentrations (using a multi-analyte Bioplex mouse cytokine kit, Bio-Rad, Hercules, CA) in accordance with manufacturer's instructions.

Histological analysis

Lung sections of 5 μm thickness were cut and stained with hematoxylin and eosin. True color high resolution digital images were obtained from stained slides using an Aperio ScanScope CS scanner (Aperio, Vista, CA) with a 20 \times scanning magnification. The degree of lung injury was blindly determined using a high speed automated whole-slide quantitative image analysis tool (Genie histology pattern recognition, ImageScope version 6.25 software, Aperio, Vista, CA) (E8). Briefly, the Genie software was trained to recognize different components of lung structure (conducting airways, blood vessels, and lung parenchyma). Then positive pixel counts and colocalization scoring algorithms were used to identify different elements within these components (air, proteinaceous fluid/hyalines membranes, and cells). After successful training, quantitative image analysis tools were used to automatically assess the following parameters on entire lung tissue sections across a large set of slides (n=9 to 12 animals per group): lung edema (defined as the relative surface occupied by fluid/hyaline membranes within lung parenchyma); and vascular congestion (defined as the relative surface occupied by cells within vessels).

RNA isolation and transcript analysis

We extracted total RNA from frozen tissues with a combined protocol using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) and the RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA) as previously described (E9, 10). For each group, we prepared RNA from the tissues of three to four animals. We used total RNA (5 μg) to synthesize double-stranded cDNA using the One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA). The cDNA served as a template to synthesize biotin-labeled

antisense cRNA using an IVT Labeling Kit (Affymetrix). Labeled cRNA was fragmented and hybridized to the Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array (containing ~ 34,000 genes), as described in the Affymetrix GeneChip protocol. Chips were scanned using a GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix).

Oligonucleotide array analysis

We evaluated chip quality, including RNA degradation, reverse transcription, cRNA synthesis and labeling, hybridization, chip washing, and scanning, using GCOS, dChip, and the Bioconductor Affy package (E11, 12). Arrays were normalized and processed using Bioconductor “GCRMA” package. To identify differentially expressed genes, we conducted pairwise comparisons using Significance Analysis of Microarrays (E13). For probe sets representing the same Entrez Gene [National Center for Biotechnology Information (NCBI 2008a)] or UniGene accession numbers (NCBI 2008c), we included only the probe set with the lowest false detection rate in the gene list. *The microarray data have been submitted to the NCBI's Gene Expression Omnibus Datasets.*

Identification of gene ontology categories and pathways enriched with dysregulated genes.

The lists of dysregulated genes were imported into DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (E14). The genes in these lists were mapped to DAVID identifiers, and then functionally annotated using the DAVID default gene ontology categories (biological processes, cellular components, molecular functions) and pathways [BBID (Biological Biochemical Image Database), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), and Biocarta]. The number of genes in each functional classification category was compared against that of all genes in the Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array

(modified Fisher Exact test), to determine the significance of the category or pathway. Due to the redundant nature of annotations, we used the functional annotation clustering algorithm, which integrates Kappa statistics and fuzzy heuristic clustering to group annotations with common gene members together. The group enrichment score, calculated as the geometric mean (in log scale) of member's p-values in a corresponding cluster, was used to rank cluster's biological significance.

Quantitative RT-PCR. Quantification of selected transcripts was performed by TaqMan real-time RT-PCR assays using a CFX384 Rea-Time PCR Detection System (Biorad, Hercules, CA). cDNAs were generated from 1 µg of total RNA using the qScript cDNA SuperMix kit (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD). The resulting cDNA was subjected to a 40 cycles PCR amplification using manufacturer's TaqMan Gene Expression Master Mix Kit protocol. The ready-made primer and probe sets were ordered from *Applied Biosystems*. (Catalog #: Il6: Mm01210733_m1; Cxcl1: Mm00433859_m1; Sele: Mm01310199_m1; Tnc: Mm00495681_m1; Edn1: Mm00438659_m1; Angpt1: Mm00456503_m1; Dio2: Mm00515664_m1; Rnd1: Mm01310221_m1; Bmp4: Mm00432087_m1; Scube2: Mm01166099_m1; Actb: 4352933E; Angpt2: Mm00545826_m1; Procr: Mm00440992_m1; Adamts4: Mm01295275_m1; Thbs1: Mm01335418_m1). Three replicates were run for each gene for each sample in a 384- well plate. Actin-b was used as the endogenous reference gene as it did not exhibit significant expression changes between groups. The relative quantitation method ($\Delta\Delta C_t$) was used, with the ratio of the mRNA level for the gene of interest normalized to the level of endogenous reference gene and the average of the PBS+TI samples as the calibrator value.

REFERENCES

- E1. Foster WM, Walters DM, Longphre M, Macri K, Miller LM. Methodology for the measurement of mucociliary function in the mouse by scintigraphy. *J Appl Physiol* 2001;90(3):1111-1117.
- E2. Thammanomai A, Majumdar A, Bartolak-Suki E, Suki B. Effects of reduced tidal volume ventilation on pulmonary function in mice before and after acute lung injury. *J Appl Physiol* 2007;103(5):1551-1559.
3. Allen GB, Suratt BT, Rinaldi L, Petty JM, Bates JH. Choosing the frequency of deep inflation in mice: Balancing recruitment against ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291(4):L710-717.
- E4. Schuessler TF, Bates JH. A computer-controlled research ventilator for small animals: Design and evaluation. *IEEE Trans Biomed Eng* 1995;42(9):860-866.
5. Pillow JJ, Korfhagen TR, Ikegami M, Sly PD. Overexpression of tgf-alpha increases lung tissue hysteresivity in transgenic mice. *J Appl Physiol* 2001;91(6):2730-2734.
- E6. Hantos Z, Daroczy B, Suki B, Nagy S, Fredberg JJ. Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs. *J Appl Physiol* 1992;72(1):168-178.
- E7. Champion HC, Villnave DJ, Tower A, Kadowitz PJ, Hyman AL. A novel right-heart catheterization technique for in vivo measurement of vascular responses in lungs of intact mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278(1):H8-H15.
- E8. Gilbertson JR, Ho J, Anthony L, Jukic DM, Yagi Y, Parwani AV. Primary histologic diagnosis using automated whole slide imaging: A validation study. *BMC Clin Pathol* 2006;6:4.
- E9. Hong SB, Huang Y, Moreno-Vinasco L, Sammani S, Moitra J, Barnard JW, Ma SF, Mirzapioazova T, Evenoski C, Reeves RR, Chiang ET, Lang GD, Husain AN, Dudek SM, Jacobson JR, Ye SQ, Lussier YA, Garcia JG. Essential role of pre-b-cell colony enhancing factor in ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178(6):605-617.
- E10. Meyer NJ, Huang Y, Singleton PA, Sammani S, Moitra J, Evenoski CL, Husain AN, Mitra S, Moreno-Vinasco L, Jacobson JR, Lussier YA, Garcia JG. Gadd45a is a novel candidate gene in inflammatory lung injury via influences on akt signaling. *Faseb J* 2009;23(5):1325-1337.
- E11. Li C, Hung Wong W. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* 2001;2(8):RESEARCH0032.
- E12. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003;19(2):185-193.
- E13. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(9):5116-5121.
- E14. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using david bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4(1):44-57.

FIGURE LEGENDS

Figure E1. Genes involved in lung vascular processes that are dysregulated by LPS+DI challenge but not LPS+TI. Groups were compared using significance analysis of microarray (LPS+DI vs. PBS+TI and LPS+TI vs. PBS+TI) and the lists of dysregulated genes were explored by DAVID functional annotation clustering to assess significance of gene-term enrichment. Involvement or not of a given gene in the corresponding gene ontology category are highlighted in green and black respectively. A=GO:0001525~angiogenesis, B=GO:0048514~blood vessel morphogenesis, C=GO:0001568~blood vessel development, D=GO:0001944~vasculature development.

Figure E2. KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathway map of vascular smooth muscle contraction. Red stars indicate genes dysregulated in lungs from LPS+DI group but not LPS+TI group (using PBS+TI as the reference group). PBS, phosphate buffered saline aspiration; LPS, lipopolysaccharide aspiration. TI, ventilation with tidal inflations only, DI, ventilation with deep inflations.

Figure E3. Top 10 right ventricular clusters of gene ontologies and pathways enriched by LPS+DI. Groups were compared using significance analysis of microarray (LPS+DI vs. PBS+TI and LPS+TI vs. PBS+TI) and the lists of dysregulated genes were explored by DAVID functional annotation clustering to assess significance of gene-term enrichment. Bars represent the log transformed enrichment p value (modified Fischer's exact test) of each category for the LPS+DI vs. PBS+TI comparison (dark grey) and for the LPS+TI vs. PBS+TI comparison (light grey). Clusters are ranked according to their enrichment score (calculated as the geometric mean of the

enrichment p values of all categories within the cluster) for the LPS+DI vs. PBS+TI comparison. The vertical dashed line represents the 0.05 significance threshold. TI, ventilation with tidal inflations only, DI, ventilation with deep inflations; PBS, phosphate buffered saline aspiration; LPS, lipopolysaccharide aspiration.

Figure E4. Top 10 left ventricular clusters of gene ontologies and pathways enriched by LPS+TI. Groups were compared using significance analysis of microarray (LPS+TI vs. PBS+TI and PBS+DI vs. PBS+TI) and the lists of dysregulated genes were explored by DAVID functional annotation clustering to assess significance of gene-term enrichment. Bars represent the log transformed enrichment p value (modified Fischer's exact test) of each category for the LPS+TI vs. PBS+TI comparison (dark grey) and for the PBS+DI vs. PBS+TI comparison (light grey). The top 10 clusters are those with the highest enrichment score (calculated as the geometric mean of the enrichment p values of all categories within the cluster) for the LPS+TI vs. PBS+TI comparison. The vertical dashed line represents the 0.05 significance threshold. PBS, phosphate buffered saline aspiration; LPS, lipopolysaccharide aspiration; TI, ventilation with tidal inflations only, DI, ventilation with deep inflations.

Figure E5. Absolute concentrations of various cytokines, chemokines and endothelium markers in bronchoalveolar lavage (panel A) and plasma (panel B) by multi-analyte assay for PBS+TI (green), PBS+DI (striped green), LPS+TI (red), and LPS+DI (striped red). PBS, phosphate buffered saline aspiration; LPS, lipopolysaccharide aspiration; TI, ventilation with tidal inflations only, DI, ventilation with deep inflations.

SUPPLEMENTAL TABLES AND FIGURES

Table E1. Gene filtering criteria and results of lung and heart microarray analysis by significant analysis of microarray

	False discovery rate	Fold change	Number of dysregulated unique genes		
			PBS+DI vs. PBS+TI	LPS+TI vs. PBS+TI	LPS+DI vs. PBS+TI
Lung	5%	2	0	660 (334 up / 326 down)	1697 (710 up / 987 down)
Right ventricle	10%	2	0	431 (17 up / 414 down)	188 (64 up / 124 down)
Left ventricle	10%	2	155 (1 up / 154 down)	1276 (460 up / 816 down)	539 (326 up / 21 down)

PBS, phosphate buffered saline aspiration; LPS, lipopolysaccharide aspiration; TI, ventilation with tidal inflations only, DI, ventilation with deep inflations.

Figure E1.

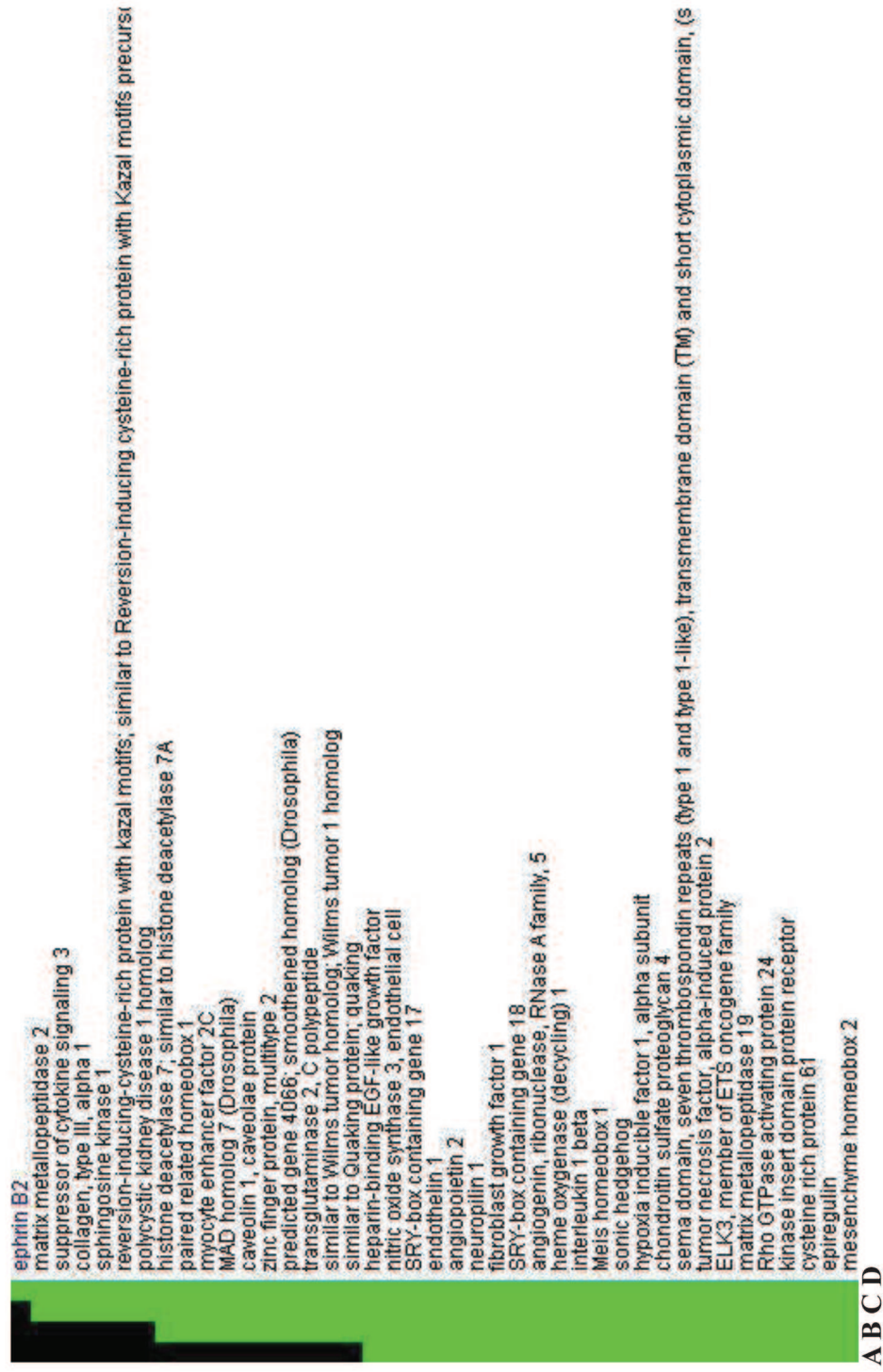


Figure E2.

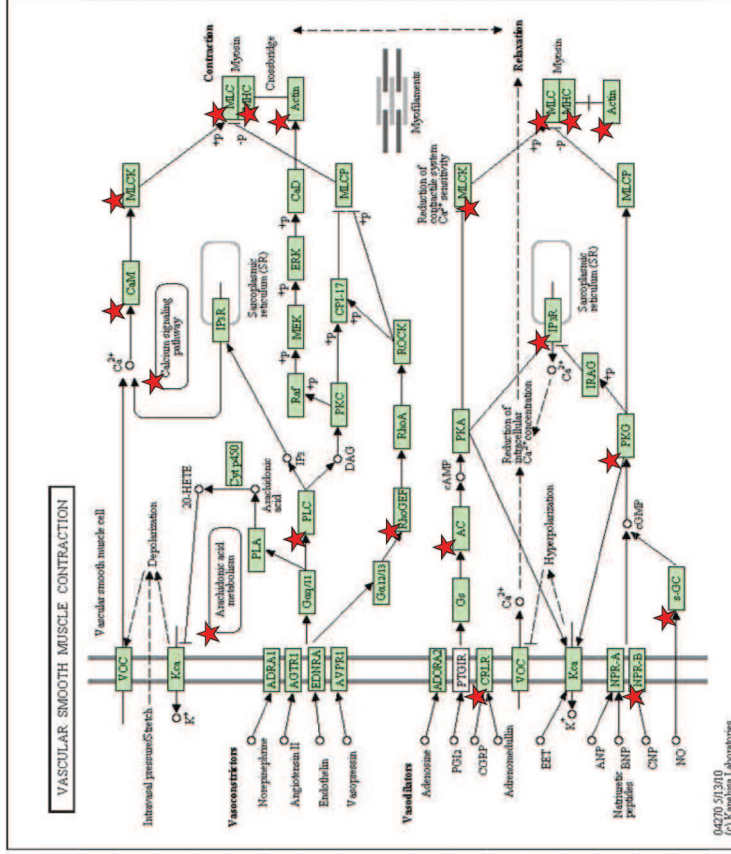


Figure E3.

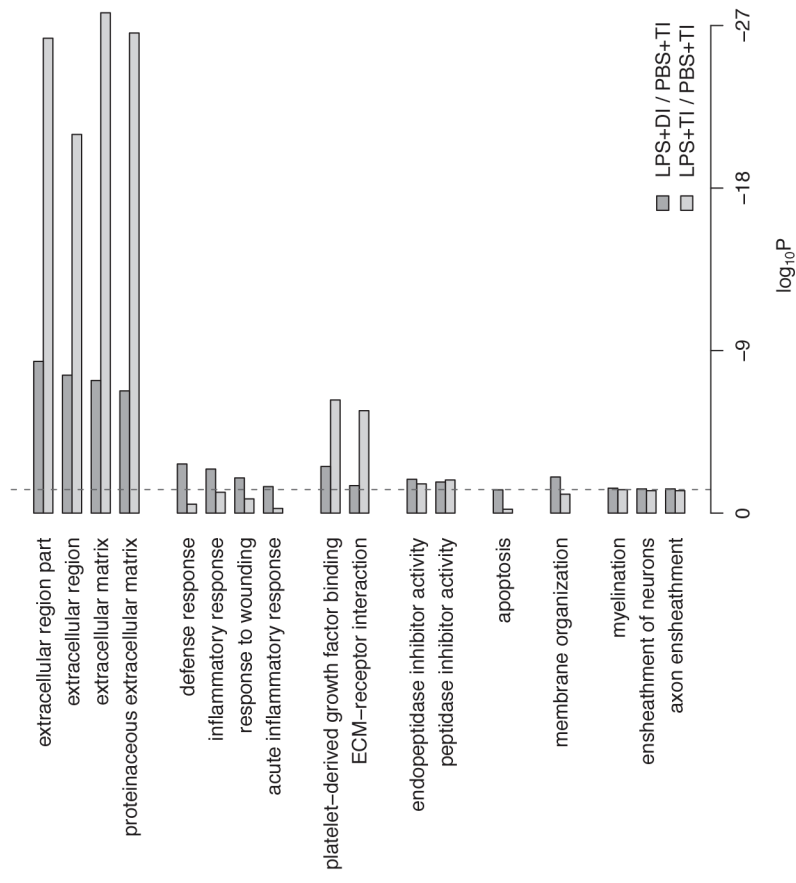


Figure E4.

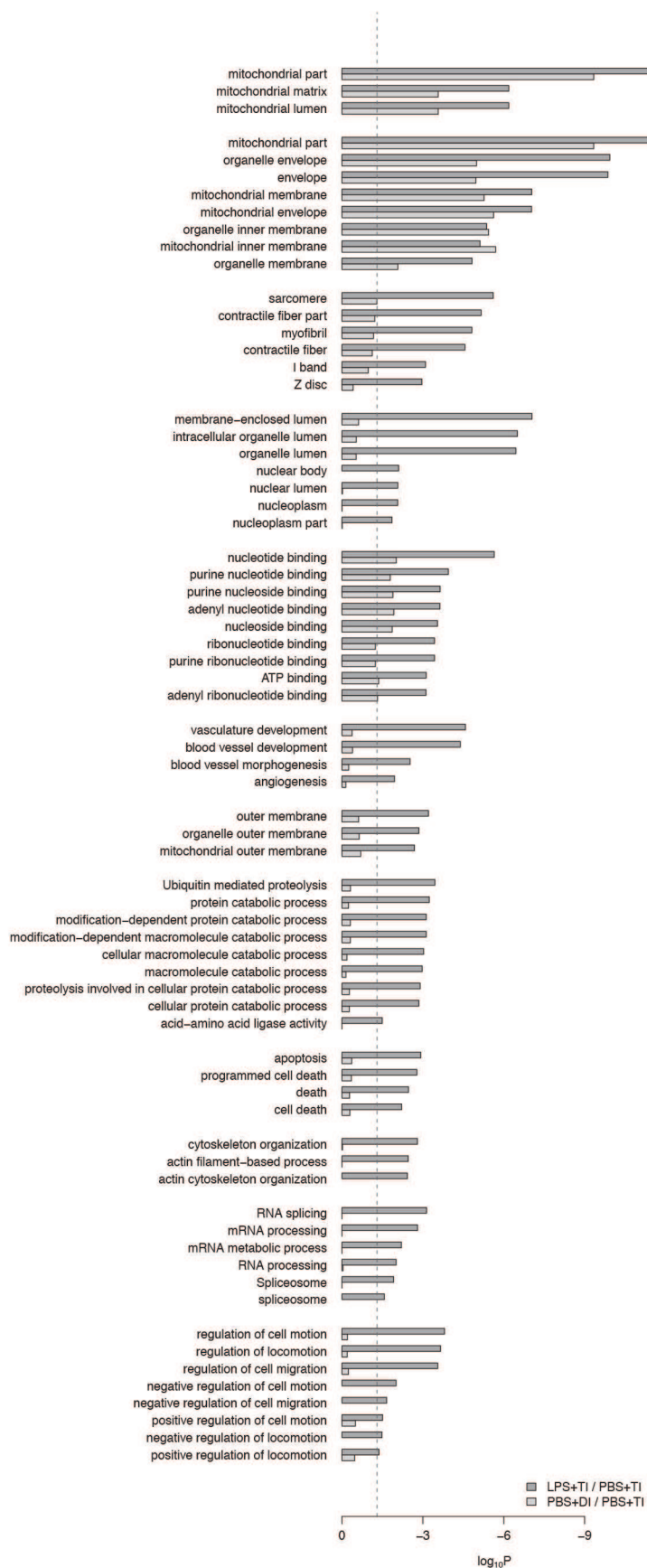
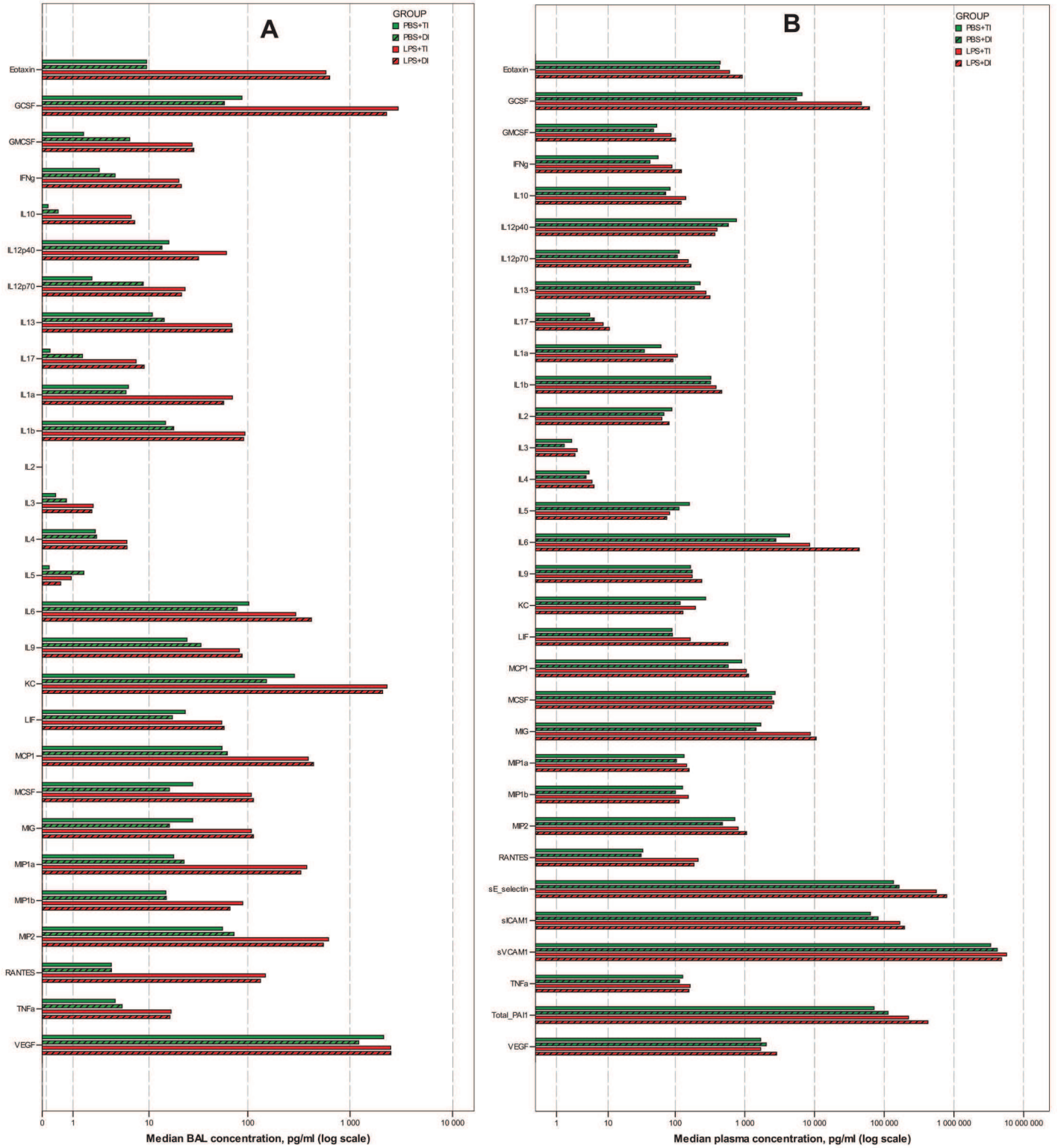


Figure E5



Discussion des méthodes

La fréquence de réalisation de la manœuvre de recrutement était basée sur les travaux d'Allen, qui l'avait montrée comme le meilleur compromis entre agression ventilatoire (VILI) et atélectasie (140). La manœuvre de recrutement utilisée consistait en l'insufflation d'un volume de 0,75 mL (environ 30 mL/kg) deux fois consécutivement toutes les minutes. Cette manœuvre était sinusoïdale, à objectif de volume (0,75 mL), sans pression maximale, sans plateau télé-inspiratoire. Quantité d'autres manœuvres de recrutement ont été utilisées, avec des variations sur chacun des paramètres mais sans différence majeure quant à l'oxygénation ou la mécanique ventilatoire (283).

Discussion des résultats

Nous avons observé au cours de la période de ventilation une dégradation progressive de la mécanique ventilatoire, avec élévation des pressions des voies aériennes, baisse de la compliance du système respiratoire et altération concordante des autres paramètres de mécanique ventilatoire (*tissue damping*, élastance...), attribuables à des phénomènes d'atélectasie (140,142). Comme attendu, l'utilisation des manœuvres de recrutement prévenait efficacement ce phénomène tant chez les animaux contrôles que chez les animaux exposés au LPS.

Par ailleurs, nous avons montré que l'exposition prolongé de la microvascularisation pulmonaire à un stress mécanique cyclique induisait l'induction d'une dysfonction endothéliale pulmonaire. L'analyse transcriptomique montrait que les principaux mécanismes décrits dans l'introduction pouvaient être impliqués, sans qu'il soit possible de déterminer la part respective de chacun ou les mécanismes prédominants.

L'analyse transcriptomique au niveau du ventricule droit montrait par ailleurs chez les animaux exposés au LPS et aux manœuvres de recrutement la dysrégulation de groupes de

gènes impliqués dans l'inflammation, l'apoptose et l'architecture membranaire. Ces données illustraient la réponse cardiaque transcriptionnelle à une HTP aigue, en accord avec des données antérieures montrant une intense réponse inflammatoire au niveau du myocarde ventriculaire droit dans un modèle d'embolie pulmonaire avec HTP chez le rat (284).

2. L'interleukine 6 exercent des effets anti-inflammatoires et protecteurs de l'hémodynamique droite dans un modèle murin d'agression pulmonaire aigue

Voiriot G, Razazi K, Amsellem V, Tran Van Nhieu J, Latiri M, Hervé A, Adnot S, Mekontso Dessap A, Maitre B. Interleukin-6 exerts lung protective anti-inflammatory and hemodynamic effects in a double-hit murine acute lung injury. **Intensive Care Med Experimental** (soumis).

Objectifs, méthodes et résultats:

L'IL-6 est un médiateur clé de la réponse aigue inflammatoire. Cette cytokine pléiotropique aux effets pro- et anti-inflammatoires (285), a suscité l'intérêt en tant que biomarqueur au cours du sepsis et d'autres affections aiguës. Au cours de l'ARDS humain, les taux plasmatiques et broncho-alvéolaires ont été montrés associés à une morbi-mortalité accrue, et leur surveillance a même été proposée pour guider une stratégie ventilatoire protectrice (125,126). Au delà de cet intérêt comme biomarqueur de sévérité, des auteurs ont tenté de préciser son rôle en tant qu'acteur de l'inflammation locale. De nombreux travaux ont ainsi exploré les effets de l'inactivation ou de l'hyperexpression de l'IL-6 dans divers modèles d'agression pulmonaire aigue. Les résultats obtenus dans les modèles septiques ou pseudo-septiques soutenaient l'hypothèse de propriétés anti-inflammatoires prédominantes, et protectrices du dégât parenchymateux et de l'œdème pulmonaires (286–288). Xing incriminait le rôle immuno-modérateur joué par l'IL-6 lors de la réponse aigue, incluant une régulation négative de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires précoces (TNF α , MIP-2, GM-CSF) et une régulation positive de cytokines et médiateurs anti-inflammatoires (IL-10, TNF-soluble récepteur, protéine antagoniste du récepteur à l'IL-1) (288). Xing soulignait à l'inverse les propriétés pro-inflammatoires prédominantes au cours de la réponse immune aux infections

chroniques ainsi qu'au cours des maladies inflammatoires chroniques (288). Mais des données contradictoires existaient, et la discussion autour du rôle de l'IL-6 au cours de l'ARDS n'était pas éteinte (289). Deux points étaient à souligner: i) aucun des travaux antérieurement publiés n'avait utilisé un modèle murin proche du scénario humain, associant une agression pseudo-septique à une ventilation protectrice, et ii) aucun de ses travaux n'avait exploré le versant endothélial de l'atteinte pulmonaire via l'étude de la dysfonction vasculaire pulmonaire et sa participation éventuelle aux différences observées. Nous avons donc décidé d'examiner ce point et fait l'hypothèse que la déficience en IL-6 était associée à une sévérité accrue dans le modèle *two hit* développé.

Notre objectif était de montrer cette sévérité accrue et de rechercher la participation d'une dysfonction vasculaire pulmonaire.

Des souris males adultes C57BL6J sauvages et déficientes en IL-6 étaient utilisées, et recevaient ou non un traitement par IL-6 humaine recombinante (rHuIL-6). La ventilation durait 5 heures. La FiO₂ était à 0,5. Les données de mécanique ventilatoire et d'hémodynamique invasive étaient recueillies. L'inflammation, l'œdème et le dommage parenchymateux pulmonaires étaient étudiés.

Dans un set d'expériences complémentaires, des souris sauvages, sans agression pulmonaire préalable, préalablement traitées ou pas par rHuIL-6 ou rHuIL-6+L-NAME (inhibiteur de NOS), étaient anesthésiées, intubées, ventilées (FiO₂= 0,5) et équipées du cathéter de mesure en continu de la pression systolique ventriculaire droite, puis après une période de stabilisation de 30 minutes, soumises à une série de 4 challenges hypoxiques (FiO₂= 0,08). Trois groupes étaient constitués (contrôle, rHuIL-6, rHuIL-6 + L-NAME)..

Nous avons pu établir que :

- la déficience en IL-6 était associée à une inflammation et un œdème pulmonaires majorés; le traitement par rHuIL-6 prévenait partiellement ses anomalies, et limitait le dégât parenchymateux pulmonaire,
- la déficience en IL-6 était associée à une élévation des RPT, témoignant d'une dysfonction vasculaire pulmonaire majorée, prévenue par le traitement par rHuIL-6,
- un traitement par rHuIL-6 limitait la VPH, sauf en cas de co-traitement par L-NAME, suggérant un rôle des NOS dans la protection conférée par l'IL-6 vis-à-vis de la dysfonction vasculaire pulmonaire.

Notre travail supportait un rôle anti-inflammatoire prédominant de l'IL-6 au cours de l'ARDS et suggérait par ailleurs un effet protecteur vasculaire pulmonaire, qui pourrait impliquer au premier plan une régulation NOS-induite de la vasoréactivité pulmonaire.

Interleukin-6 exerts lung protective anti-inflammatory and hemodynamic effects in a double-hit murine acute lung injury.

Guillaume Voiriot¹, MD; Keyvan Razazi^{1,2}, MD; Valérie Amsellem¹, Ph.D; Jeanne Tran Van Nhieu^{3,4}, MD; Mehdi Latiri¹, MS; Aurélie Hervé¹, MD; Serge Adnot^{1,3,5}, MD, PhD; Armand Mekontso Dessap^{1,2,3*}, MD, PhD; Bernard Maitre^{1,2,3*}, MD, PhD

¹INSERM, Unité U955, Créteil, France.

²AP-HP, Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Service de Réanimation Médicale, Créteil, France.

³ Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, France.

⁴AP-HP, Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Créteil, France.

⁵AP-HP, Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Service des Explorations Fonctionnelles, Créteil, France.

*AMD and BM equally contributed to this work.

Correspondence to : Bernard Maitre, MD, PhD
Professor of Medicine
Service de Réanimation Médicale
Hôpital Henri Mondor
AP-HP, Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier
94010 Créteil, France
Email: bm.maitre@gmail.com
Tel: +33 1 49813693

ABSTRACT

Background. Interleukin 6 (IL-6) is a biomarker of severity and a predictive factor of poor prognosis during acute respiratory distress syndrome (ARDS). However, its proper role in contributing to lung inflammation and injury as well as its acute pulmonary hemodynamic effects have not been investigated in a clinically-closed murine model of ARDS.

Methods. Anesthetized adult male C57Bl6 wild-type (WT) and IL-6 knock-out (IL-6KO) mice, treated with recombinant human IL-6 (rHuIL-6) or vehicle and challenged with lipopolysaccharide, underwent a five hours low tidal volume (8ml/kg) mechanical ventilation. Before sacrifice, right ventricular systolic pressure (RVSP) and cardiac output were invasively measured. In addition, RVSP was recorded during hypoxic challenges in uninjured WT mice pretreated with rHuIL-6, rHuIL-6 + non-selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitor L-NAME or vehicle.

Results. IL-6KO mice exhibited a strong deterioration of lung elastic properties and the highest lung inflammation and injury score. Their treatment with rHuIL-6 partially prevented this severity. In addition, rHuIL-6 reduced the lung leukocyte infiltration in WT mice. IL-6KO mice displayed higher total pulmonary resistances as compared to WT, and this effect was mitigated by the rHuIL-6 treatment. Lastly, rHuIL-6 mitigated hypoxic pulmonary vasoconstriction in uninjured WT mice, and this effect was abolished by co-treatment with L-NAME.

Conclusions. Despite being known as a pejorative prognosis factor in serum of ARDS patients, IL-6 was shown to exert lung protective anti-inflammatory effects in a septic-like double-hit murine model of ARDS. Moreover, the IL-6 deficiency caused a marked acute pulmonary hypertension, at least partially attributable to vasoactive mechanisms. A dysregulation of NOS isoforms could be involved, which needs to be thoroughly investigated.

Abstract: 264 words.

KEYWORDS

interleukin-6, acute lung injury, acute respiratory distress syndrome, mechanical ventilation, pulmonary hypertension, nitric oxide synthase.

BACKGROUND

Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is a life threatening syndrome consisting in an acute and sudden respiratory failure caused by a noncardiogenic edema responsible for hypoxemia and radiological bilateral lung infiltrates (1). The pathology is characterized by an alteration of the alveolocapillary membrane due to various traumatic agents either inhaled or delivered to the lungs via the blood circulation (2). The pathogenesis involves a potent inflammatory response involving a complex group of mediators, including interleukin (IL)-6. This pleiotropic cytokine is produced at sites of tissue inflammation and released into the circulation by a variety of different cell types, including macrophages, lymphocytes, endothelial cells, epithelial cells and fibroblasts (3) during sepsis and acute organ injuries. IL-6 acts as a major pro-inflammatory mediator for the induction of the acute phase response (4), leading to a wide range of local and systemic reactions properties including fever, leucocytes recruitment and activation, hepatic regeneration and hemodynamic effects. Considering its key role as a mediator of the acute phase response, its role as a prognostic biomarker in sepsis and various acute organ injuries has been explored since years in clinical and experimental studies. During ARDS, the plasmatic and/or broncho-alveolar levels of IL-6 have been identified as early biomarkers of lung injury (5–8) and predictive factors of prolonged mechanical ventilation, organ dysfunctions, morbidity and mortality (9,10,11,12). However, whether the increased plasmatic or tissue levels of IL-6 during acute organ injuries including sepsis and ALI/ARDS, contribute to organ injury, prevent it or help scrutinize it, remains controversial (13). Indeed, beneficial anti-inflammatory effects of IL-6 have been shown in experimental lung injury (14–16). This hypothesis has not been explored in a lung injury model closed to the human scenario. Moreover, the pulmonary hemodynamic effects of IL-6 during ARDS are almost unknown, and pulmonary vascular dysfunction is a major hallmark of ARDS (17). In this study, we used a double-hit clinically-closed

murine model of ARDS including lipopolysaccharide (LPS) aspiration followed by five hours low tidal volume mechanical ventilation. We applied this model to IL-6 gene knock-out mice to address the role of IL-6 during ARDS in terms of respiratory mechanics, lung inflammation, as well as right-sided ventricular hemodynamics.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Mice lacking IL-6 (IL-6^{-/-}) were generated by homologous recombination on the C57Bl/6 and IL-6^{-/-} genetic background (18). The wild-type IL-6^{+/+} mice (WT mice) and mutant homozygous knock-out IL-6^{-/-} mice (IL-6KO mice) were male littermates obtained by breeding heterozygous mutants. Mice were 12-22 weeks old and weighted 20 to 33 g. All animal care and procedures were performed after approval of the Institutional Animal Care Committee, in accordance with the official regulations of the French Ministry of Agriculture guidelines for the experimental use of animals.

Experimental design

The experimental design included four groups: WT (WT mice receiving vehicle injections), IL-6KO (IL-6KO mice receiving vehicle injections), WT+rHuIL-6 (WT mice receiving rHuIL-6 injections) and IL-6KO+rHuIL-6 (IL-6KO mice receiving rHuIL-6 injections); each group included 8 to 11 animals.

Animal protocol

Mice were anesthetized with inhaled 5% isoflurane (Abbott, Rungis France) and were kept in spontaneous breathing. They received retro-orbital intravenous injections (19) of either 3 µg/kg of recombinant human IL-6 (rHuIL-6, PromoCell, Heidelberg, Germany) or vehicle (saline), then 2 µl/g of body weight volume instillate consisting of 2 µg/µl of *Escherichia coli* 055:B5 derived LPS (Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France) was delivered into the distal part of the oropharynx and aspirated into the lower respiratory

tract. For the choice of rHuIL-6 concentration, we referred to previously published works using similar regimen of intravenous rHuIL-6 in mouse models of sepsis (20) or acute myocardial infarction (21). After oropharyngeal aspiration, mice woke up and returned to their cage with free access to water and food. Eighteen hours later, mice were reanesthetized with intraperitoneal pentobarbital (30 $\mu\text{g/g}$ of body weight, Hospira, Meudon La Forêt, France) followed by continuous 5% isoflurane (Abbott, Rungis France). The second intravenous injection of rHu IL-6 or vehicle was performed. The larynx was surgically exposed and the trachea was intubated orally under direct vision with a metal cannula (internal diameter of 1 mm, Harvard Apparatus, Les Ulis, France). The tracheal cannula was properly secured with surgical thread (Ethicon 3-0, Ethicon, Auneau, France) before connection to mechanical ventilator in order to avoid leaks. The cervicotomy was closed with surgical thread (Ethicon 6.0, Ethicon, Auneau, France).

Mechanical ventilation

The ventilator regimen has been extensively detailed elsewhere (22). Briefly, mice were ventilated in the supine position using humidified gas (20 mgH₂O/L absolute humidity, MR410 humidifier, Fischer & Paykel Healthcare, Courtaboeuf, France), with a tidal volume of 8 $\mu\text{L/g}$ of body weight, a respiratory rate of 180/min, 3 cmH₂O end-expiratory pressure, and FiO₂ of 0.5, by means of a computer-driven small-animal ventilator (flexiVent, Scireq, Montreal, Canada). Mechanical ventilation lasted 5 hours with continuous anesthesia maintained by 1.5% isoflurane and muscle paralysis using intraperitoneal pancuronium at the onset of the experiment and every two hours (0.8 $\mu\text{g/g}$ of body weight, Organon, Puteaux, France) to ensure passive mechanical conditions. Mice received intraperitoneal warm fluid boluses (5% dextrose with 9 g/L NaCl) at the onset of the experiment (20 $\mu\text{L/g}$ of body weight) and every hour (10 $\mu\text{L/g}$ of body weight).

Respiratory mechanics

The flexiVent ventilator was used for continuous measurement of the airways pressure and to explore the respiratory mechanics using different waveforms, including the single frequency forced oscillation technique (FOT) and pressure-volume curves (22).

Hemodynamic explorations

Through the cervical midline incision, both the right jugular vein and left carotid artery were isolated using a stereomicroscope (Leica MZ 7.5, Leica Microsystems, Nanterre, France). An ultra-miniature 0.47 mm high fidelity pressure transducer catheter (SPR-671, Millar Instruments, Houston, TX) was inserted into the right jugular vein and advanced into the right ventricle. The micromanometer was calibrated in vitro, firstly electronically and secondly against a column of mercury with the reference zero level taken at mid chest. Right ventricular systolic pressure was measured during a short end-expiratory ventilatory pause using a Gould transducer (Gould, Cleveland, USA) and a Notocord system (Emka Technologies, Paris, France). Cardiac output was measured by the transpulmonary thermodilution technique (23). Briefly, a 0.34 mm external diameter thermistor microprobe (Columbus Instruments, Columbus, OH) was inserted into the left carotid artery and advanced to the aortic arch, where changes in aortic blood temperature were measured. A 0.5mm external diameter catheter placed in the right jugular vein was advanced to the right atrium for bolus injection of 20 μ L of NaCl 9 g/L solution at 20°C. Five consecutive cardiac output measurements were obtained using the Cardiomax-III system (Columbus Instruments) and total pulmonary resistances were calculated as the ratio of right ventricular systolic pressure to cardiac output.

Specimen collection

At the end of the timed ventilator protocol and after hemodynamic measurements, mice were exsanguinated via sectioning the left carotid artery. Arterial blood gases were determined in some WT group mice. Bronchoalveolar lavage (BAL) were performed with four separate 0.5 mL aliquots of saline at 20 °C and then lungs underwent fixation

(paraformaldehyde 4%) and paraffin embedding. The total cell count of BAL was determined for a fresh fluid specimen using a Malassez hemocytometer. Bronchoalveolar lavage fluid was centrifuged (1600 rpm, 7 min at 4°C). The cell pellet was diluted in saline, and differential cell counts were done in few animals on cytocentrifuge preparations (Cytospin 3; Shandon Scientific, Cheshire, UK) stained with Diff-Quick stain (Baxter Diagnostics, McGaw Park, IL). Cell-free supernatants were stored at -80°C for subsequent assessment of total protein concentration (Bio-Rad Protein Assay) and cytokines concentrations [macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2) and tumor necrosis factor α (TNF- α)], in duplicate, using ELISA immunoassay kit, (R&D systems, Abingdon, UK) in accordance with manufacturer's instructions.

Histological analysis

Paraffin lungs blocks were sectioned at 5 μ m thickness and mounted on glass slides. After staining with hematoxylin and eosin, all slides were examined under a light microscope by an experienced pathologist in a blinded fashion. Lung injury was assessed using an histological scoring system designed to evaluate the heterogeneous lesions of lung injury and adapted from previously published scores (24,25). For the two main non-alveolar structures of the lung (veins and bronchi/arteries), three pathological processes (edema, congestion/hemorrhage and leukocyte infiltration) were scored on two scales, an intensity scale (0 to 4, with 0 if absent, 1 if mild, 2 if moderate, 3 if severe, and 4 if very severe) and an extension scale (0 if absent, 1 if <25% of lung involvement, 2 if 25–50% of lung involvement, 3 if 50–75% of lung involvement, and 4 if >75% of lung involvement). For the alveoli, three pathological processes (thickness of the alveolar wall, neutrophil aggregation in airspace, and macrophage aggregation in airspaces) were scored on the same abovementioned scales. Then for each pathological process of each structure, the product of both intensity value and extension value was calculated. The resulting values (0 to 16) were added, to provide partial scores of edema in veins and bronchi/arteries (0

to 32), congestion/hemorrhage in veins and bronchi/arteries (0 to 32), leukocyte infiltration (0 to 48, associating leukocyte infiltration in veins and bronchi/arteries and thickness of the alveolar wall) and alveolitis (0 to 32, associating neutrophil aggregation and macrophage aggregation in airspaces). Finally, these four partial scores were added all together, to provide a global lung injury score (0 to 144).

Acute hypoxic challenge

Hypoxic challenge was used to explore the effects of IL-6 on the pulmonary vascular reactivity. rHuIL-6 (3 μ g/kg of body weight via retro-orbital intravenous injection) and the non-specific nitric oxide synthase (NOS) inhibitor N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME, 50 μ g/g of body weight intraperitoneally, Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France), or vehicle (NaCl 9 g/L), were used. Briefly, wild-type C57Bl6 12-14 weeks old mice weighing 25-30 g were randomly assigned to receive rHuIL-6 + L-NAME, rHuIL-6 + vehicle or vehicle + vehicle. Five hours later, mice were anesthetized and intubated for mechanical ventilation, and the Millar transducer catheter was immediately inserted and advanced into the right ventricle. After thirty minutes of stabilization, the right ventricular systolic pressure was continuously recorded during four consecutive hypoxic challenges (FiO₂ of 0.08 during 2 minutes, followed by 5 minutes of reoxygenation).

Statistics

The data were analyzed using the SPSS Base 18.0 statistical software package (SPSS Inc, Chicago, IL). Continuous data were explored with a test of normality (Kolmogorov Smirnov test). Since some continuous data were not normally distributed, they were all expressed as median [1st quartile - 3rd quartile] unless otherwise stated and independent sample were compared using the Kruskal-Wallis test followed by pairwise Mann-Whitney test, with correction for multiple testing by Benjamini-Hochberg false discovery rate. Two-tailed p values smaller than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Lung mechanics

The ventilator settings allowed suitable minute ventilation, regarding the partial arterial CO₂ pressure determined in five animals of the WT group (39 [33-43] mmHg). Results of airways pressures monitoring, forced oscillation techniques and pressure-volume curves are displayed in **Figure 1**. At initiation of mechanical ventilation, IL-6KO mice exhibited lower values of quasi-static compliance as compared with WT mice. These differences remained significant after volume history standardization, but were not altered by injections of rHuIL-6. Dynamic elastance and peak airways pressures progressively increased during mechanical ventilation, whereas dynamic and quasi-static compliances decreased. This progressive deterioration of respiratory function was similar between WT and IL-6KO and was not influenced by rHuIL-6 administration.

Lung inflammation, edema and injury

BAL and lung histology data are reported in **Table 1**. Lung histology is illustrated in **Figure 2**. In comparison with WT mice, IL-6KO mice were more prone to lung inflammation and alveolocapillary leak as assessed by a significantly higher BAL fluid cell count ($p=0.024$) and a trend towards higher concentrations of TNF α and protein in the BAL fluid ($p=0.096$ and $p=0.064$ respectively). IL-6KO mice receiving rHuIL-6 were protected from this higher severity, with lower BAL protein concentration ($p=0.048$), alveolitis ($p=0.042$) and global lung injury score ($p=0.042$) in comparison to IL-6KO mice. Consistently, no significant difference was observed between WT and IL-6KO+rHuIL-6 mice. The rHuIL-6 treatment in WT mice mitigated leukocyte infiltration ($p=0.045$).

Hemodynamics

IL-6KO mice exhibited markedly increased right ventricular systolic pressures and total pulmonary resistances as compared to WT mice (53.0 [47.9-59] vs. 36.3 [33.3-39.8] mmHg, $p < 0.001$ and 2.22 [1.78-2.41] vs. 1.61 [1.37-1.91] mmHg.min/mL, $p = 0.044$, respectively), with similar cardiac outputs (25.1 [23.0-28.9] vs. 21.6 [19.2-25.1] mL/min, $p = 0.129$) (**Figure 3**). These differences were totally abolished when IL-6KO mice received rHuIL-6.

Nitric oxide pathway exploration

In order to assess whether the acute pulmonary hypertension observed in IL-6KO mice was attributable to a vasoactive mechanism involving the nitric oxide (NO) pathway, we performed four consecutive hypoxic challenges in WT mice previously treated with rHuIL-6, rHuIL-6+L-NAME or vehicle, while measuring right ventricular systolic pressure (**Figure 4**). Mice receiving rHuIL-6 exhibited significantly lower increases in pressures in response to acute hypoxia as compared with vehicle-treated mice (4.9 [4.2-9.6] vs. 11.1 [9.6-14.4] mmHg, $p = 0.044$). This altered hypoxic pulmonary vasoconstriction was totally restored with the L-NAME co-treatment.

DISCUSSION

In a septic-like double-hit murine model of ARDS, we explored the right-sided hemodynamic and pulmonary effects of the IL-6 deficiency. As compared with WT mice, IL-6KO mice exhibited reduced lung compliance and higher lung inflammation and injury, as well as an acute pulmonary hypertension, which was at least partially attributable to NO-dependent vaso-active mechanisms.

The role of IL-6 in ARDS has been explored since decades in various rodent models, including hyperoxia (14,26), inhalation or aspiration of bacterial particles (15,27), IgG aspiration (28), acid aspiration (29,30), bacterial pneumonia (16) and high tidal volume-associated lung injury (30). These studies used IL-6 overexpression (14,26), recombinant

IL-6 administration (15,16,28,31), IL-6-blocking antibodies (28,31) or IL-6 deficiency (15,16, 29-31). However, none of these studies used a model combining a protective mechanical ventilation as commonly used in clinical practice (32) and a septic-like lung injury, as lung infection is the most frequent cause of ARDS in humans (1). In the present work, we used a double-hit lung injury model (22) reproducing the human clinical scenario of ARDS, by combining LPS aspiration and low tidal volume ventilation (33). Low tidal volume ventilation has been shown to be protective during ARDS (34). The ventilator parameters we used (respiratory rate of 180/min and tidal volume of 8 μ L/g of body weight) have been shown to be protective in mice (8). The duration of low tidal volume mechanical ventilation was considered as sufficient to be a hit in mice regarding data previously published (8). The double hit lung injury model we used has been shown to induce an acute pulmonary hypertension (22), and allowed us to explore the impact of the IL-6 deficiency on the pulmonary vascular dysfunction during ARDS.

No particular phenotype in terms of elastic properties of the lungs has been previously shown in healthy IL-6KO mice (35). Globally, except studies using acid aspiration model (29,30), IL-6 has been shown to exert lung protective effects during ARDS (14-16,26-28,31). In the present work, we found a severely altered compliance of the respiratory system in LPS-exposed IL-6KO mice when starting mechanical ventilation. During the low tidal volume ventilation, dynamic elastance and compliance progressively deteriorated in WT and IL6-KO mice, probably because of atelectasis, as previously shown (22,36). IL-6KO mice demonstrated worsened pulmonary inflammation and injury in response to LPS aspiration and mechanical ventilation as compared to WT animals. In fact, IL-6KO mice exhibited the highest values for each partial scores of edema, congestion/hemorrhage, leukocyte infiltration and alveolitis, and consequently the highest global score. Treatment with exogenous IL-6 totally prevented this worse histological lung damage in IL-6KO animals as well as lung leukocyte infiltration in WT mice, in

agreement with previous reports (31). Exogenous IL-6 also mitigated the increase in BAL fluid protein observed in IL-6KO mice, in agreement with previous reports demonstrating the potential of IL-6 in decreasing alveolar permeability and lung edema during lung injury (28,31).

These protective effects attributable to IL-6 during ARDS have been particularly observed in the field of septic or septic-like injury. Indeed, in addition to promoting inflammation, lung damage and edema, IL-6 deficiency alters bacterial clearance in experimental pneumonia (16,37) and is associated with increased mortality in LPS aspiration (15). Moreover, in extra-pulmonary sepsis models, IL-6 exerts protective effects, in part through its ability to inhibit apoptosis (38) and promote regeneration of hepatocytes (39). IL-6 deficiency also alleviated lung edema formation, lung histological damage and deterioration of lung mechanics in double-hit models combining acid aspiration and mechanical ventilation (29,30). At the opposite, the two previous works showing deleterious properties of IL-6 were performed with non-septic models of ARDS (29,30). These discrepancies highlight the importance of the model when studying the role of IL-6 in ARDS.

ARDS can cause an acute pulmonary hypertension (40), that may be worsened by the use of mechanical ventilation, especially with high PEEP (41) or during high-frequency oscillatory ventilation (42). The mechanism of this pulmonary vascular dysfunction, which is associated with a poor prognosis in human ARDS (17,43,44,45), is multifactorial, including at least partially dysregulated vasodilatation/vasoconstriction (46). In mice lacking IL-6, we observed an increase in total pulmonary resistances, as compared to WT mice and IL-6KO mice receiving exogenous IL-6. We hypothesized that this acute pulmonary hypertension could be related to a dysregulation of NO-dependent vasoactive mechanisms. Indeed, IL-6 displays NO-dependent acute systemic hemodynamics effects, involving heart and systemic vessels. The acute administration of

IL-6 induces a transient dose-dependent systemic hypotension in rats (47). In vitro, an acute IL-6 exposure of hamster papillary muscles (48) or cardiomyocytes (49) decreases their contractility. This acute negative inotropic effect may result from an activation of endothelial NO synthase (eNOS) as well as inducible NO synthase (iNOS) (50), with a downstream decrease in intracellular Ca^{++} influx (51). Other data suggest that IL-6, in association with IL-1 β could be implicated in the NOS-dependent systemic vasodilatation during sepsis (52). To explore our hypothesis, we used WT mice exposed to hypoxic challenges, and showed that a rHuIL-6 treatment decreases the baseline right ventricular systolic pressure and mitigates the hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV). Considering that both eNOS and iNOS contribute to the pulmonary vascular tone and modulate HPV (53), we used the non-selective NOS inhibitor L-NAME. Its co-administration with rHuIL-6 totally restored HPV. This finding suggests a role for NOS isoforms in mediating the IL-6-induced inhibition of HPV. Consequently, the acute pulmonary hypertension observed during lung injury in mice lacking endogenous IL-6 might be attributed at least partially to vasoactive mechanisms involving a dysregulation of NOS isoforms, which remains to be fully investigated. Of note, a such IL-6-related inhibition of HPV could be considered either beneficial regarding right-sided hemodynamics or deleterious regarding gas exchanges. This point has to be considered when envisaging the potential protective effects of rHuIL-6 in ARDS humans.

Our study admitted limits. In term of hemodynamics, we did not assess the systemic blood pressure, but assumed no difference between groups considering that i) cardiac output did not differ between groups, and ii) baseline systemic blood pressure has been shown similar in WT and IL-6KO mice (54). So we assumed that left-sided myocardial function and pressures did not differ between groups, considering that intravenous rHuIL-6 has been shown to affect very transiently left-sided hemodynamics in rodents (47).

CONCLUSIONS

In conclusion, in a septic-like double-hit murine model of ARDS (five hours low tidal volume mechanical ventilation following LPS aspiration), we observed that IL-6 deficiency is deleterious, causing an increase in lung inflammation and histological injury, which were partially reversed by exogenous IL-6. In addition, IL-6 deficiency was associated with a marked acute pulmonary hypertension during lung injury, which was totally prevented by the administration of exogenous IL-6. IL-6 acted as limiting the hypoxic pulmonary vasoconstriction, most probably by regulating the NO pathway. These findings highlight the discrepancy between the common use of IL-6 concentration as a pejorative prognostic factor in human sepsis and its protective role during experimental sepsis and ARDS.

LIST OF ABBREVIATIONS

ALI: Acute Lung Injury

ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome

eNOS: Endothelial NO Synthase

HPV: Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction

IL-6: Interleukin-6

IL-6KO: IL6 Knock-Out

iNOS: Inducible NO Synthase

L-NAME: N ω -Nitro-L-Arginine Methyl Ester Hydrochloride

rHuIL-6: Recombinant Human IL-6

RVSP: Right Ventricular Systolic Pressure

WT: Wild-Type

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Study concept and design: SA, BM, AMD, GV.

Acquisition of data: VA, ML, AH, AR, JTRN, GV.

Analysis and interpretation of data: BM, AMD, GV.

Drafting of the manuscript: GV.

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: BM, AMD.

Statistical analysis: GV.

Study supervision: BM, AMD.

Acquisition of funding: BM, GV.

ACKNOWLEDGEMENTS

GV is a recipient from the *Fondation de Recherche Médicale* (FRM) and from the *Fond de Recherche en Santé Respiratoire* (FRSR); A grant has been obtained from the Academy of Paris (Legs Poix).

BIBLIOGRAPHY

1. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD (2005) Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 353(16):1685–93
2. Ware LB, Matthay MA (2000) The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 342(18):1334–49
3. Gadiant RA, Patterson PH (1999) Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells*. 17(3):127–37
4. Fattori E, Cappelletti M, Costa P, Sellitto C, Cantoni L, Carelli M, Faggioni R, Fantuzzi G, Ghezzi P, Poli V (1994) Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J Exp Med*. 180(4):1243–50
5. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS (1997) Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest*. 99(5):944–52
6. Veldhuizen RA, Slutsky AS, Joseph M, McCaig L (2001) Effects of mechanical ventilation of isolated mouse lungs on surfactant and inflammatory cytokines. *Eur Respir J*. 17(3):488–94
7. Stüber F, Wrigge H, Schroeder S, Wetegrove S, Zinserling J, Hoeft A, Putensen C (2002) Kinetic and reversibility of mechanical ventilation-associated pulmonary and systemic inflammatory response in patients with acute lung injury. *Intensive Care Med*. 28(7):834–41
8. Vaporidi K, Voloudakis G, Priniannakis G, Kondili E, Koutsopoulos A, Tsatsanis C, Georgopoulos D (2008) Effects of respiratory rate on ventilator-induced lung injury at a constant PaCO₂ in a mouse model of normal lung. *Crit Care Med*. 36(4):1277–83
9. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno S, Slutsky AS (1999) Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *Jama J Am Med Assoc*. 282(1):54–61
10. Parsons PE, Eisner MD, Thompson BT, Matthay MA, Ancukiewicz M, Bernard GR, Wheeler AP (2005) Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury. *Crit Care Med*. 33(1):1–6; discussion 230–232
11. Frank JA, Parsons PE, Matthay MA (2006) Pathogenetic significance of biological markers of ventilator-associated lung injury in experimental and clinical studies. *Chest*. 130(6):1906–14
12. Remick DG, Bolgos G, Copeland S, Siddiqui J (2005) Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. *Infect Immun*. 73(5):2751–7

13. O'Malley K, Moldawer LL (2006) Interleukin-6: Still crazy after all these years. *Crit Care Med.* 34(10):2690–1
14. Ward NS, Waxman AB, Homer RJ, Mantell LL, Einarsson O, Du Y, Elias JA (2000) Interleukin-6-induced protection in hyperoxic acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 22(5):535–42
15. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK (1998) IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 101(2):311–20
16. Jones MR, Quinton LJ, Simms BT, Lupa MM, Kogan MS, Mizgerd JP (2006) Roles of interleukin-6 in activation of STAT proteins and recruitment of neutrophils during *Escherichia coli* pneumonia. *J Infect Dis.* 193(3):360–9
17. Bull TM, Clark B, McFann K, Moss M, National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Network (2010) Pulmonary vascular dysfunction is associated with poor outcomes in patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 182(9):1123–8
18. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Köhler G (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature.* 368(6469):339–42
19. Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, Huizing M, Hoogstraten-Miller S (2011) Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim.* 40(5):155–60
20. Arikan AA, Yu B, Mastrangelo MA, Tweardy DJ (2006) Interleukin-6 treatment reverses apoptosis and blunts susceptibility to intraperitoneal bacterial challenge following hemorrhagic shock. *Crit Care Med.* 34(3):771-7
21. Matsushita K, Iwanaga S, Oda T, Kimura K, Shimada M, Sano M, Umezawa A, Hata J, Ogawa S (2005) Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. *Lab Invest.* 85(10):1210-23
22. Mekontso Dessap A, Voiriot G, Zhou T, Marcos E, Dudek SM, Jacobson JR, Machado R, Adnot S, Brochard L, Maitre B, Garcia JG (2012) Conflicting physiological and genomic cardiopulmonary effects of recruitment maneuvers in murine acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 46(4):541–50
23. Champion HC, Villnave DJ, Tower A, Kadowitz PJ, Hyman AL (2000) A novel right-heart catheterization technique for in vivo measurement of vascular responses in lungs of intact mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278(1):H8–H15
24. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Londhe V, Xue YY, Li K, Phillips RJ, Strieter RM (2002) Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest.* 110(11):1703-16
25. Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Shiga M, Maekawa N, Obara H (1998) Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits. *Anesthesiology.* 88(5):1300-9

26. Kolliputi N, Waxman AB (2009) IL-6 cytoprotection in hyperoxic acute lung injury occurs via suppressor of cytokine signaling-1-induced apoptosis signal-regulating kinase-1 degradation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 40(3):314–24
27. Leemans JC, Vervoordeldonk MJB, Florquin S, van Kessel KP, van der Poll T (2002) Differential role of interleukin-6 in lung inflammation induced by lipoteichoic acid and peptidoglycan from *Staphylococcus aureus*. *Am J Respir Crit Care Med.* 165(10):1445–50
28. Shanley TP, Foreback JL, Remick DG, Ulich TR, Kunkel SL, Ward PA (1997) Regulatory effects of interleukin-6 in immunoglobulin G immune-complex-induced lung injury. *Am J Pathol.* 151(1):193–203
29. Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, Ermolaeva M, Veldhuizen R, Leung YH, Wang H, Liu H, Sun Y, Pasparakis M, Kopf M, Mech C, Bavari S, Peiris JS, Slutsky AS, Akira S, Hultqvist M, Holmdahl R, Nicholls J, Jiang C, Binder CJ, Penninger JM (2008) Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell.* 133(2):235–49
30. Gurkan OU, He C, Zielinski R, Rabb H, King LS, Dodd-o JM, D'Alessio FR, Aggarwal N, Pearse D, Becker PM (2011) Interleukin-6 mediates pulmonary vascular permeability in a two-hit model of ventilator-associated lung injury. *Exp Lung Res.* 37(10):575–84
31. Wolters PJ, Wray C, Sutherland RE, Kim SS, Koff J, Mao Y, Frank JA (2009) Neutrophil-derived IL-6 limits alveolar barrier disruption in experimental ventilator-induced lung injury. *J Immunol.* 182(12):8056–62
32. Esteban A, Ferguson ND, Meade MO, Frutos-Vivar F, Apezteguia C, Brochard L, Raymondos K, Nin N, Hurtado J, Tomicic V, González M, Elizalde J, Nightingale P, Abroug F, Pelosi P, Arabi Y, Moreno R, Jibaja M, D'Empaire G, Sandi F, Matamis D, Montañez AM, Anzueto A (2008) Evolution of mechanical ventilation in response to clinical research. *Am J Respir Crit Care Med.* 177(2):170–7
33. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR (2008) Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 295(3):L379-99
34. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network (2000) Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 342(18):1301-8
35. Tasaka S, Inoue K-I, Miyamoto K, Nakano Y, Kamata H, Shinoda H, Hasegawa N, Miyasho T, Satoh M, Takano H, Ishizaka A (2010) Role of interleukin-6 in elastase-induced lung inflammatory changes in mice. *Exp Lung Res.* 36(6):362–72
36. Allen GB, Suratt BT, Rinaldi L, Petty JM, Bates JHT (2006) Choosing the frequency of deep inflation in mice: balancing recruitment against ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 291(4):L710–717
37. Dalrymple SA, Slattery R, Aud DM, Krishna M, Lucian LA, Murray R (1996) Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun.* 64(8):3231–5

38. Arikan AA, Yu B, Mastrangelo M-A, Tweardy DJ (2006) Interleukin-6 treatment reverses apoptosis and blunts susceptibility to intraperitoneal bacterial challenge following hemorrhagic shock. *Crit Care Med.* 34(3):771–7
39. Deutschman CS, Cereda M, Ochroch EA, Raj NR (2006) Sepsis-induced cholestasis, steatosis, hepatocellular injury, and impaired hepatocellular regeneration are enhanced in interleukin-6 $-/-$ mice. *Crit Care Med.* 34(10):2613–20
40. Zapol WM, Snider MT (1977) Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *N Engl J Med.* 296(9):476–80
41. Vieillard-Baron A, Schmitt JM, Augarde R, Fellahi JL, Prin S, Page B, Beauchet A, Jardin F (2001) Acute cor pulmonale in acute respiratory distress syndrome submitted to protective ventilation: incidence, clinical implications, and prognosis. *Crit Care Med.* 29(8):1551–5
42. Guervilly C, Forel JM, Hraiech S, Demory D, Allardet-Servent J, Adda M, Barreau-Baumstark K, Castanier M, Papazian L, Roch A (2012) Right ventricular function during high-frequency oscillatory ventilation in adults with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 40(5):1539-45
43. Villar J, Blazquez MA, Lubillo S, Quintana J, Manzano JL (1989) Pulmonary hypertension in acute respiratory failure. *Crit Care Med.* 17(6):523-6
44. Monchi M, Bellenfant F, Cariou A, Joly LM, Thebert D, Laurent I, Dhainaut JF, Brunet F (1998) Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome. A multivariate analysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 158(4):1076-81
45. Boissier F, Katsahian S, Razazi K, Thille AW, Roche-Campo F, Leon R, Vivier E, Brochard L, Vieillard-Baron A, Brun-Buisson C, Mekontso Dessap A (2013) Prevalence and prognosis of cor pulmonale during protective ventilation for acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 39(10):1725-33.
46. Moloney ED, Evans TW (2003) Pathophysiology and pharmacological treatment of pulmonary hypertension in acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J.* 21(4):720–7
47. Comini L, Pasini E, Bachetti T, Dreano M, Garotta G, Ferrari R (2005) Acute haemodynamic effects of IL-6 treatment in vivo: involvement of vagus nerve in NO-mediated negative inotropism. *Cytokine.* 30(5):236–42
48. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL (1992) Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science.* 257(5068):387–9
49. Kinugawa K, Takahashi T, Kohmoto O, Yao A, Aoyagi T, Momomura S, Hirata Y, Serizawa T (1994) Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on $[Ca^{2+}]_i$ and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. *Circ Res.* 75(2):285–95
50. Yu X, Kennedy RH, Liu SJ (2003) JAK2/STAT3, not ERK1/2, mediates interleukin-6-induced activation of inducible nitric-oxide synthase and decrease in contractility of adult ventricular myocytes. *J Biol Chem.* 278(18):16304–9

51. Yu X-W, Chen Q, Kennedy RH, Liu SJ (2005) Inhibition of sarcoplasmic reticular function by chronic interleukin-6 exposure via iNOS in adult ventricular myocytes. *J Physiol.* 566(Pt 2):327–40
52. Bhagat K, Hingorani AD, Palacios M, Charles IG, Vallance P (1999) Cytokine-induced venodilatation in humans in vivo: eNOS masquerading as iNOS. *Cardiovasc Res.* 41(3):754–64
53. Fagan KA, Tyler RC, Sato K, Fouty BW, Morris KG Jr, Huang PL, McMurtry IF, Rodman DM (1999) Relative contributions of endothelial, inducible, and neuronal NOS to tone in the murine pulmonary circulation. *Am J Physiol.* 277(3 Pt 1):L472–478
54. Schrader LI, Kinzenbaw DA, Johnson AW, Faraci FM, Didion SP (2007) IL-6 deficiency protects against angiotensin II induced endothelial dysfunction and hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(12):2576-81

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1

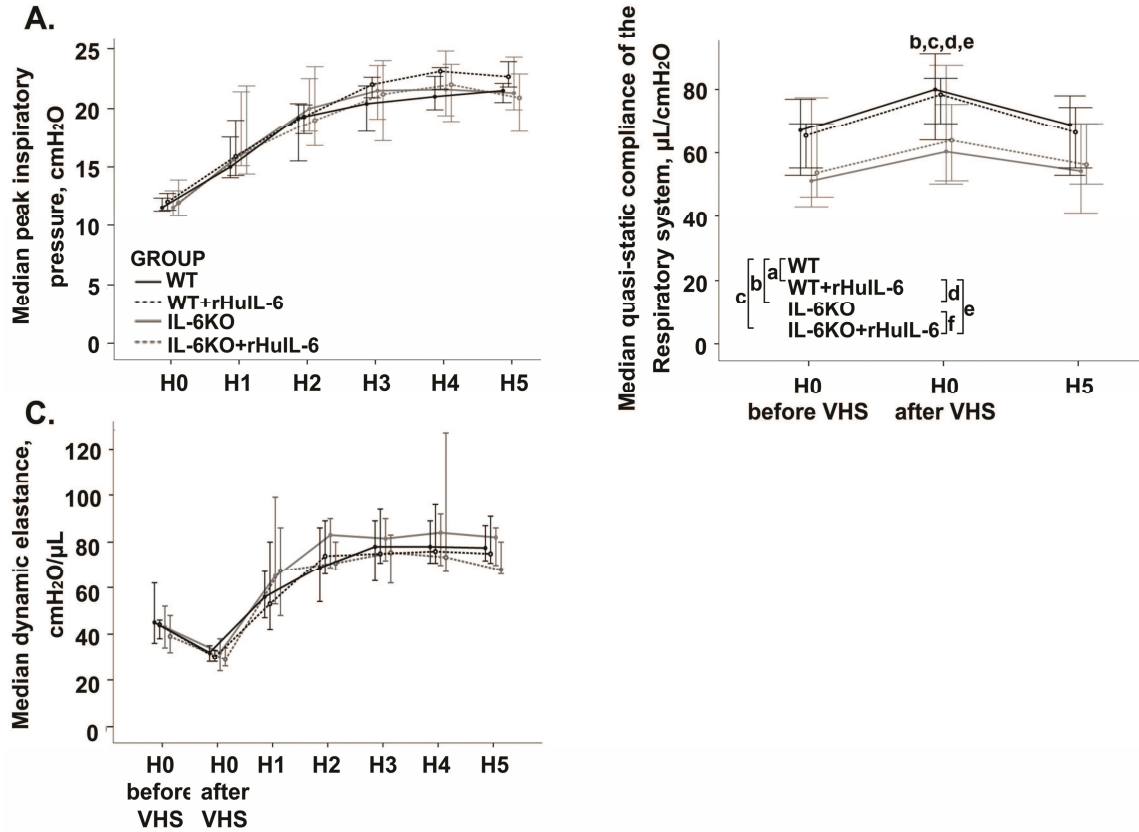


Figure 1. Respiratory mechanics during five hours (H0 to H5) of low tidal volume mechanical ventilation following a lipopolysaccharide aspiration in wild type (WT) and interleukin-6 knock-out (IL-6KO) mice, receiving either recombinant human interleukin-6 (rHuIL-6) or vehicle (saline). **A.** Peak airways pressures. **B.** Quasi-static compliance of the respiratory system calculated using a pressure-volume curve. **C.** Dynamic elastance of the respiratory system calculated using the single frequency forced oscillation technique. Volume history standardization (VHS) consisted in two inflations to an airway pressure of 30 cmH₂O. The depicted nomenclature a, b, c, d, e and f denote Benjamini-Hochberg corrected p value < 0.05 for the following Mann-Whitney pairwise comparisons (following Kruskal Wallis test): WT vs. WT+rHuIL-6, WT vs. IL-6KO, WT vs. IL-6KO+rHuIL-6,

WT+rHuIL-6 vs. IL-6KO, WT+rHuIL-6 vs. IL-6KO+rHuIL-6 and IL-6KO vs. IL-6KO+rHuIL-6 respectively. Points represent the median and errors bars represent the 95% confidence interval. N = 8 to 11 animals per group.

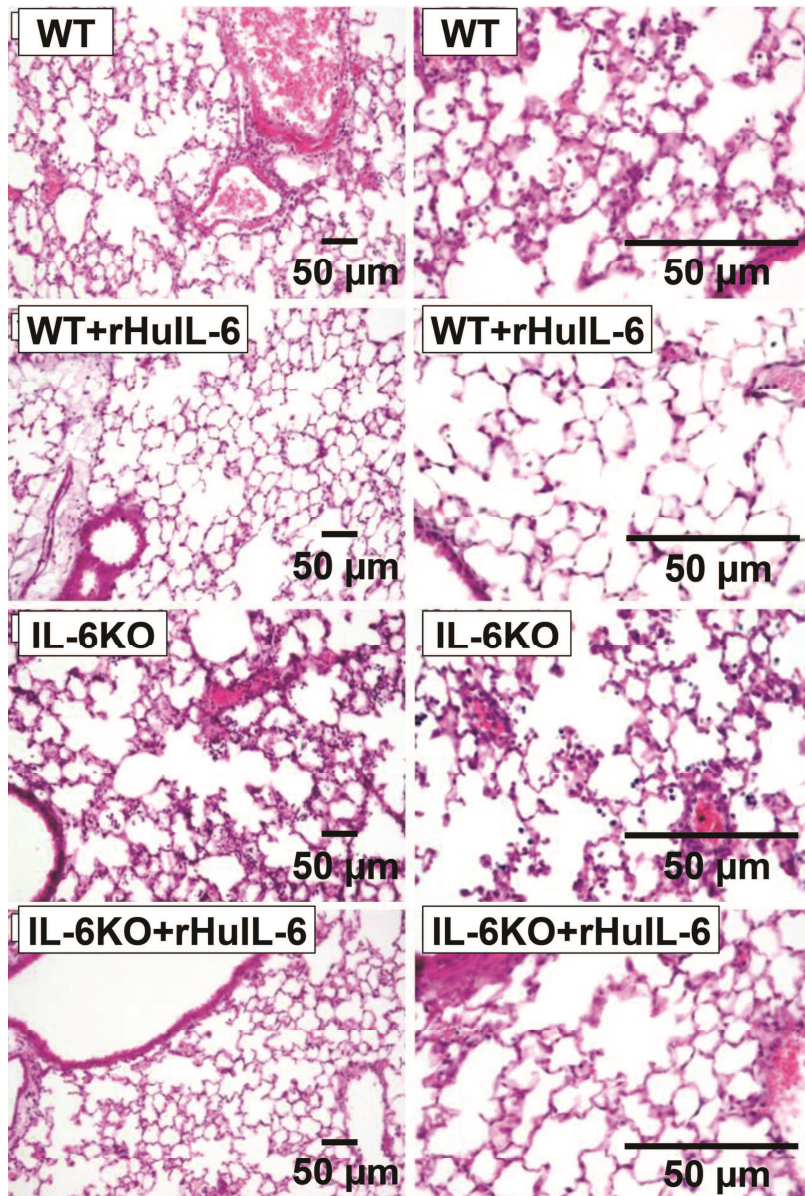


FIGURE 2

Figure 2. Histological representations of the lung after five hours of low tidal volume mechanical ventilation following a lipopolysaccharride aspiration in wild type (WT) and interleukin-6 knock-out (KO) mice, receiving either recombinant human interleukin-6 (IL-6) or vehicle . Lungs underwent fixation (paraformaldehyde 4%), paraffin embedding, staining with hematoxylin and eosin, and examination under a light microscope.

FIGURE 3

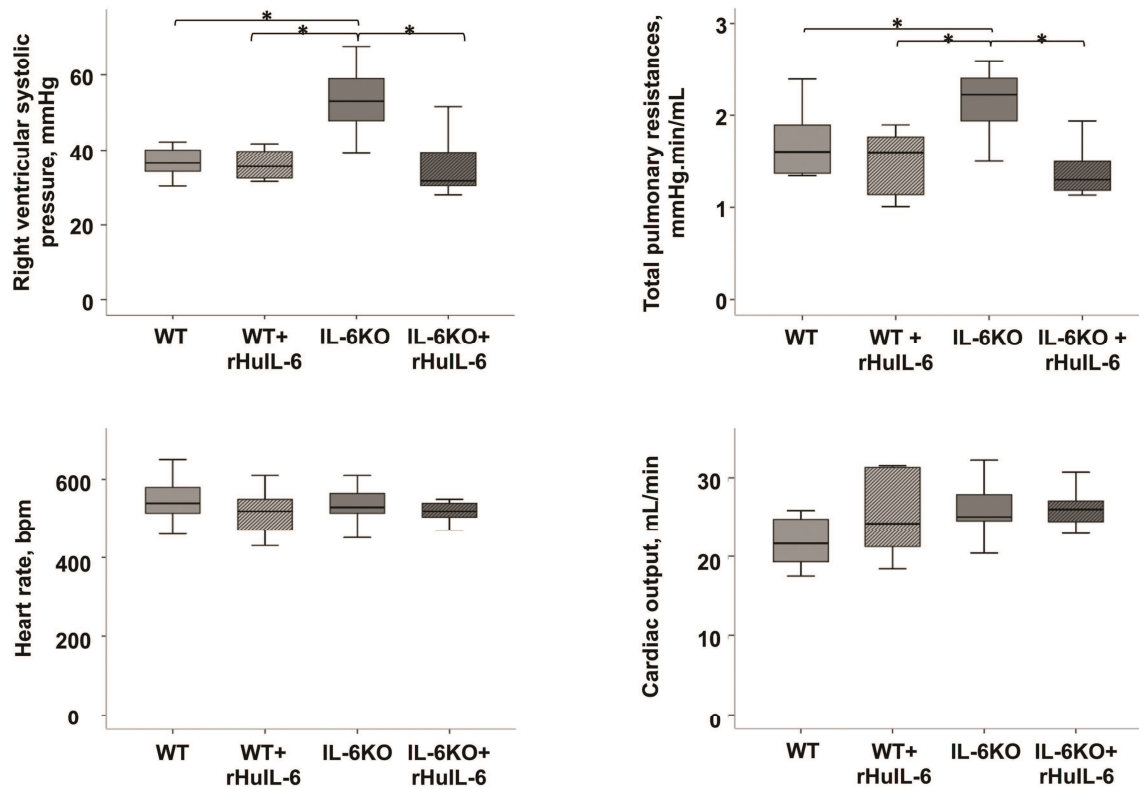


Figure 3. Hemodynamic data obtained at the end of five hours low tidal volume mechanical ventilation following a lipopolysaccharride aspiration in wild type (WT) and interleukin-6 knock-out (IL-6KO) mice, receiving either intravenous recombinant human interleukin-6 (rHuIL-6) or vehicle (saline). **A.** Right ventricular systolic pressure. **B.** Total pulmonary resistances. **C.** Heart rate. **D.** Cardiac output. Right ventricular systolic pressure was measured during a short end-expiratory pause using an ultra-miniature catheter inserted into the right jugular vein and advanced into the right ventricle. Cardiac output was measured by the transpulmonary thermodilution technique. Total pulmonary resistances were calculated as the ratio of right ventricular systolic pressure to cardiac output. * denotes Benjamini-Hochberg corrected p value<0.05 for the Mann-Whitney pairwise comparison (following Kruskal Wallis test). N = 6 to 10 animals per group.

FIGURE 4

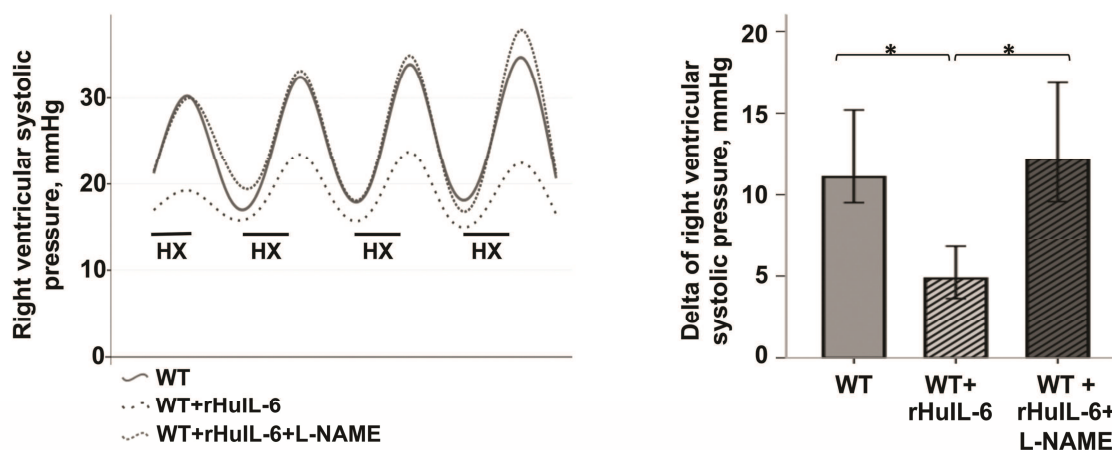


Figure 4. Hemodynamic data obtained during hypoxic challenges. WT mice received either recombinant human interleukin-6 (rHuIL-6) or rHuIL-6 in association with the non-specific inhibitor of nitric oxide synthase N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME). Control mice received vehicle (saline). Five hours later, mice were intubated for mechanical ventilation and an ultra-miniature catheter was immediately inserted into the right jugular vein and advanced into the right ventricle. **A.** After 30 minutes of stabilization, the right ventricular systolic pressure was continuously recorded during four consecutive hypoxic challenges (FiO₂ of 0.08 during 2 minutes, followed by 5 minutes of reoxygenation). **B.** The delta of right ventricular systolic pressure was calculated as the mean difference from peak to baseline right ventricular systolic pressure during the four consecutive hypoxic challenges. * denotes Benjamini-Hochberg corrected p value < 0.05 for the Mann-Whitney pairwise comparison (following Kruskal Wallis test). Columns represent the median and errors bars represent the 95% confidence interval. N = 4 animals per group.

TABLE 1

Bronchoalveolar lavage data and histological analysis at the end of a 5 hours mechanical ventilation following a lipopolysaccharide aspiration in association with either recombinant human IL-6 (rHuIL-6) or vehicle (saline) treatment in wild-type (WT) or IL-6 deficient mice (IL-6KO).

	WT	WT+rHuIL-6	IL-6KO	IL-6KO+rHuIL-6
Bronchoalveolar lavage				
Cell count, cell/ μ L	3860 [1830-5760]	3100 [1970-5995]	8440 [5500-16300] *#	6600 [3760-14200]
Protein concentration, μ g/mL	264 [167-380]	239 [190-348]	494 [381-747] §	257 [192-267]
TNF α , pg/mL	207 [82-319]	111 [53-228]	438 [389-769] #	279 [132-486]
MIP-2, pg/mL	597 [369-629]	620 [538-648]	560 [355-596]	550 [515-599]
Lung histology				
Partial scores				
Edema	5.0 [2.5-8.5]	5.5 [4.0-6.0]	8.0 [6.0-10.5]	5.0 [3.0-6.5]
Congestion/hemorrhage	8.0 [5.5-10.0]	5.5 [4.0-9.0]	10.0 [5.0-12.0]	3.0 [3.0-6.5]
Leukocyte infiltration	4.0 [3.0-5.0]	2.0 [1.0-3.0] *	6.0 [3.0-10.0] #	1.0 [1.0-4.5]
Alveolitis	11.0 [8.5-14.0]	8.5 [6.0-11.0]	12.0 [8.0-21.0] §	6.0 [4.5-7.5]
Global lung injury score	26.0 [24.0-34.5]	22.0 [19.5-27.0]	39.0 [24.0-49.5] §	17.0 [13.0-22.5]

Data are median [25th-75th percentile]. N=5 to 11 animals per group. *, #, and § indicate a Benjamini-Hochberg corrected p value <0.05 (Mann-Whitney test following Kruskal Wallis test) as compared to WT, WT+rHuIL-6 and IL-6KO+rHuIL-6 respectively. ^a differential cell count, performed in a limited number of animals, showed a predominance of polymorphonuclear neutrophils (>80% of total cells).

Discussion des méthodes:

Le timing de traitement par rHuIL-6 (2 injections, la première en même temps que l'inhalation de LPS, la deuxième 18 heures plus tard au moment de l'intubation) et la dose injectée (3 µg/kg à chaque injection) n'ont pas fait l'objet d'expérimentations préliminaires pharmacocinétiques de type dose-réponse et temps-réponse, mais ont été choisis sur la base de travaux antérieurement publiés (290,291).

Le protocole expérimental ne prévoyait pas de groupe contrôle ou double contrôle négatif, c'est-à-dire non soumis au LPS voire sans VM, de sorte que les animaux des 4 groupes constitués étaient soumis au *two hit* du modèle. Ces groupes contrôle aurait permis de vérifier: i) le phénotype basal des animaux IL-6, et ii) la validité du modèle d'ARDS utilisé, en terme notamment d'inflammation et de dégât parenchymateux pulmonaires. Cependant, nous n'avons pas souhaité compliquer le protocole expérimental et multiplier le nombre de groupes, jugeant que i) le phénotype basal des souris IL-6 avait été largement décrit quant à l'inflammation, l'hémodynamique et la mécanique ventilatoire (292,293), sans mise en évidence de particularité phénotypique, et ii) notre modèle avait été préalablement décrit et sa validité démontrée dans le premier travail de cette thèse.

Les souris utilisées pour les expériences d'hypoxie aigue n'étaient pas préalablement exposées au LPS. Cela pouvait limiter la compréhension des résultats obtenus et la formulation d'hypothèse mécanistique quant aux données hémodynamiques obtenues chez les animaux agressés-ventilés. Ce choix a été dicté par des difficultés techniques, puisque lors d'expériences préliminaires, nous avons observé un mortalité importante avec des souris préalablement exposées au LPS et soumises ensuite aux challenges hypoxiques consécutifs.

Discussion des résultats

Dans le modèle utilisé, nous avons mis en évidence que la déficience en IL-6 était associée à une gravité accrue, marquée au niveau pulmonaire par une mécanique dégradée et une augmentation de l'alvéolite, de l'œdème, des cytokines pro-inflammatoires TNF α et MIP-2 et du dommage parenchymateux. Le traitement par rHuIL-6 limitait partiellement ces anomalies. Nous ne pouvons exclure qu'une administration à posologie supérieure aurait pu totalement prévenir ces différences. Seule la mécanique ventilatoire n'était pas améliorée par le traitement rHuIL-6. L'explication pouvait résider dans le caractère plurifactoriel de ce paramètre fonctionnel, reflet global des lésions tant parenchymateuses pulmonaires que pariétales. Le traitement des souris sauvages par rHuIL-6 n'était associé à aucune différence. Pour expliquer cela, nous supposons la dose d'IL-6 exogène administrée futile en comparaison à la libération endogène.

Nous avons observé chez les souris déficientes en IL-6 une franche augmentation des RPT. Cette HTP n'était pas explicable par des pressions des voies aériennes plus élevées. D'autres mécanismes impliqués dans l'augmentation des RPT au cours de l'ARDS étaient candidats, notamment les occlusions microvasculaires et l'œdème interstitiel. En effet, nous observions chez les animaux déficients en IL-6 des lésions d'ARDS globalement plus sévère pour chacun des items du score histologique. Mais le traitement de ces animaux par rHuIL-6 nous a fait envisager un autre mécanisme. En effet, nous avons constaté que si le traitement par rHuIL-6 limitait partiellement la majoration de l'inflammation et des lésions pulmonaires, il prévenait totalement la dysfonction vasculaire pulmonaire. Nous avons donc supposé que la déficience en IL-6 était responsable d'une anomalie de la vasoréactivité pulmonaire, et nous avons incriminé une dysrégulation des NOS sur les données de la littérature. En effet, l'IL-6 exerce des effets hémodynamiques systémiques NO-dépendants, impliquant cœur et vaisseaux. L'administration systémique d'IL-6 chez le rat a été montrée responsable d'une hypotension artérielle aiguë transitoire dose-dépendante. *In vitro*, l'exposition du muscle papillaire de

hamster (272) ou des cardiomyocytes (294) à l'IL-6 diminuait la contractilité. L'effet inotrope négatif pouvait être attribuable à une régulation positive des eNOS et iNOS (295,296). D'autres données suggéraient un rôle conjoint de l'IL-6 et de l'IL-1 β dans la vasodilatation NOS-dépendante au cours du sepsis (297). Nous avons alors exploré cette voie. Ne disposant pas d'outil d'étude *ex vivo* de la vasomotricité pulmonaire de type poumon isolé-perfusé par exemple, nous avons étudié *in vivo* la vasoconstriction pulmonaire hypoxique, qui est régulée négativement par les NOS (298) via la protéine kinase G et l'augmentation du calcium cytosolique dans les CMLAP. Les données obtenues supportent notre hypothèse. La déficience en IL-6 induit une dysfonction vasculaire pulmonaire attribuable, au moins partiellement, à un mécanisme vasomoteur médié par les NOS.

3. L'âge avancé est associé à une gravité accrue dans un modèle murin de syndrome de détresse respiratoire aigue

Voiriot G, Contou D, Tran Van Nhieu J, Amsellem V, Latiri M, Adnot S, Maitre B, Mekontso Dessap A. Aging exacerbates acute respiratory distress syndrome in a double hit murine model. *Crit Care Med* (Soumis).

Objectifs, méthodes et résultats:

L'âge avancé a été récemment identifié dans une méta-analyse comme l'unique facteur clinique indépendant associé à la mortalité au cours de l'ARDS (69). Cette gravité âge-dépendante a été confirmée et ses déterminants explorés dans plusieurs travaux expérimentaux utilisant des modèles murins d'ARDS. Ces études suggéraient une inflammation et une dysfonction vasculaire systémique accrues chez les animaux âgés, à l'origine d'un pronostic dégradé (299–301). Cependant, nous identifions 3 limites principales à ces travaux. D'abord, aucun n'avait utilisé un modèle murin *two hit* associant une agression septique ou pseudo-septique à une VM protectrice. Ensuite, aucun n'avait étudié l'impact du vieillissement pulmonaire et des modifications associées de l'ultrastructure parenchymateuse sur l'évolution de la mécanique ventilatoire au cours de la VM. Enfin, aucun n'avait étudié l'existence éventuelle d'une dysfonction vasculaire pulmonaire âge-dépendante participant à la gravité, alors qu'une dysfonction vasculaire systémique était identifiée par Nin et coll. (299).

Nous avons fait l'hypothèse de l'existence d'une dysfonction vasculaire pulmonaire âge-dépendante participant à la gravité accrue des sujets âgés au cours de l'ARDS.

Nos objectifs étaient de montrer une gravité accrue des souris âgées exposées au modèle d'agression *two hit* développé en terme mécanique ventilatoire d'une part et d'inflammation,

œdème et dommage parenchymateux d'autre part et de rechercher une élévation des RPT témoignant d'une dysfonction vasculaire pulmonaire.

Des souris males C57BL6 sauvages âgées de 10 à 12 semaines (jeunes) et 52 à 53 semaines (matures) étaient utilisées. Quatre groupes étaient constitués selon l'exposition préalable ou non au LPS. La dose de LPS était réduite à 3µg/g de poids corporel et la durée de VM à 3 heures, à cause d'expériences préliminaires ayant montré une mortalité des souris matures avec 4µg/g et 5 heures. Le V_t chez les souris matures était réglé sur le poids réel, après avoir vérifié la conservation du rapport poids des poumons/poids corporel avec l'âge sur quelques animaux (299). Le reste des explorations physiologiques et des études sur prélèvements biologiques était comparable au travail précédent, en dehors du dosage d'IL-6 dans le plasma et des dosages d'angiopoïétine II et de s-RAGE dans le liquide de LBA.

Nous avons pu établir que:

- l'âge était associé à une susceptibilité accrue à la VM en terme de mécanique ventilatoire,
- l'âge était associé à une susceptibilité accrue à la double agression LPS-VM, marquée par une mécanique ventilatoire dégradée, une inflammation systémique (IL-6) et pulmonaire (alvéolite, IL-6, TNFa, MIP-2) et une fuite alvéolocapillaire (dosage protéique total dans le LBA, œdème pulmonaire) majorées,
- l'âge était associé à une expression pulmonaire accrue d'angiopoïétine 2, biomarqueur de dysfonction endothéliale pulmonaire, sans pour autant d'élévation des RPT.

Ce travail a confirmé une gravité accrue âge-dépendante au cours de l'ARDS, sans clairement identifier la participation d'une dysfonction vasculaire pulmonaire majorée.

Aging exacerbates acute respiratory distress syndrome in a double hit murine model.

Guillaume Voiriot¹, Damien Contou¹, Jeanne Tran Van Nhieu^{2,3}, Valerie Amsellem¹, Mehdi Latiri¹, Serge Adnot^{1,2,4}, Bernard Maitre^{1,2,5}, Armand Mekontso Dessap^{1,2,5}.

¹INSERM, Unité U955 (Institut Mondor de Recherche Biomédicale), Créteil, France

² Université Paris Est, Faculté de Médecine, Créteil, France

³AP-HP, Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Créteil, France

⁴AP-HP, Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Service des Explorations Fonctionnelles, Créteil, France

⁵AP-HP, Groupe Henri Mondor-Albert Chenevier, Service de Réanimation Médicale, Créteil, France

Correspondence to : Prof Armand Mekontso Dessap, Réanimation Médicale, Hôpital Henri Mondor, 51 avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France; e-mail: armand.dessap@hmn.aphp.fr; Tel: +33149812394 ; Fax: +33149814943

Running title: Advanced age in acute respiratory distress syndrome.

Funding: GV is a recipient from the Fond de Recherche en Santé Respiratoire (FRSR).

ABSTRACT

Rationale

In a recent systematic review, aging has been identified as the only factor independently associated with mortality during human acute respiratory distress syndrome (ARDS). We explored this age-dependant severity in a clinically-closed two hit murine ARDS model.

Methods

Young adult (Y, 10-12 weeks) and mature old (O, 12-13 months) male C57BL6 mice underwent an aspiration of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) or control saline vehicle (C). Twenty hours later, mice underwent 3 hours of low tidal volume mechanical ventilation (MV, tidal volume 8 ml/kg). Lung mechanics were assessed hourly during MV. Right ventricular pressure and cardiac output were measured at the end of the MV. After sacrifice, lung inflammation, edema and injury were explored with bronchoalveolar lavage (BAL) and histology.

Results

At MV start, O_{PBS} mice had higher respiratory system compliance than Y_{PBS} mice. LPS aspiration dramatically altered this baseline compliance in old mice, but not in young mice. Old mice had a more pronounced alteration in lungs mechanics during MV as compared to young mice. Lung inflammation (as assessed by the total cell count, IL-6, TNF α and MIP-2 concentrations in BAL fluid), plasma inflammation (as assessed by Il-6 concentration) and alveolocapillary leak (as assessed by the total protein concentration of BAL fluid and by a histological score of lung edema), were higher in O_{LPS} mice as compared to Y_{LPS} mice at the end of MV, whereas hemodynamics (systemic blood pressure, cardiac output and pulmonary vascular resistances) were similar between groups.

Conclusion

As compared to young mice, mature old mice were more susceptible to LPS exposure and low tidal volume mechanical ventilation.

Abstract: 258 words

Key words: aging, acute respiratory distress syndrome, mechanical ventilation, pulmonary vascular dysfunction, lung edema.

INTRODUCTION

Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) is a life threatening condition consisting in an acute respiratory failure caused by a nonhydrostatic edema responsible for hypoxemia and radiological bilateral lung infiltrates (1). Despite decades of medical research and major improvements in ARDS patient care, the mortality still remains high, around 25-40% (2–6). A meta-analysis has recently identified age as the sole clinical independent predictive factor for mortality during ARDS (6). Some determinants of this "age-related" severity have been explored in studies using rodent models of ARDS with injurious mechanical ventilation (MV) (7,8) and lipopolysaccharide (LPS) administration (9). These studies suggested an enhanced lung inflammation and systemic vascular dysfunction in old animals (9). However, these reports have several limitations: i) none has examined baseline age-associated changes in lung structure (10) and lung mechanics; ii) none has explored pulmonary hemodynamics, although pulmonary vascular dysfunction has been shown to be associated with poor outcome during ARDS (11); iii) none has used a clinically closed model of ARDS.

We herein report on a clinically-closed double hit murine model of ARDS, combining LPS aspiration (as lung infection is the most frequent cause of ARDS in humans (4)) and a low tidal volume mechanical ventilation (as commonly used in clinical practice (12)) applied to young adult (10-12 weeks) and mature old (12-13 months) wild-type C57Bl6 mice. We investigated the determinants of the age-related severity of ARDS, with a focus on lung mechanics and pulmonary hemodynamics in addition to lung injury, inflammation and edema.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Young adult and mature old wild-type C57Bl6 male mice, respectively 11 ± 1.2 and 52 ± 0.4 weeks old, were used (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). All animal care and procedures

were performed after approval of the Institutional Animal Care Committee, in accordance with the official regulations of the French Ministry of Agriculture guidelines for the experimental use of animals.

Pilot experiments to adjust tidal volume per body weight

We harvested lungs from 4 young adult and 4 mature old mice to measure the lung weight/body weight ratio, which was similar: 0.0057 ± 0.00020 vs. 0.0056 ± 0.00026 , $p=0.686$. We decided to administer the tidal volume according to body weight as previously described in rats (7).

Animal protocol

Mice were anesthetized with inhaled 5% isoflurane (Abbott, Rungis France) and were kept in spontaneous breathing; 1.5 $\mu\text{l/g}$ of body weight volume instillate consisting of 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of *Escherichia coli* 055:B5 derived lipopolysaccharide (Sigma-Aldrich Chimie, Lyon, France) or control saline was delivered into the distal part of the oropharynx and aspirated into the lower respiratory tract. After oropharyngeal aspiration, mice woke up and returned to their cage with free access to water and food. Twenty hours later, mice were reanesthetized with intraperitoneal pentobarbital (30 $\mu\text{g/g}$ of body weight, Hospira, Meudon La Forêt, France) followed by continuous 5% isoflurane (Abbott, Rungis France). The larynx was surgically exposed and the trachea was intubated orally under direct vision with a metal cannula (internal diameter of 1 mm, Harvard Apparatus, Les Ulis, France). The tracheal cannula was properly secured with surgical thread (Ethicon 3-0, Ethicon, Auneau, France) before connection to mechanical ventilator in order to avoid leaks. The cervicotomy was closed with surgical thread (Ethicon 6.0, Ethicon, Auneau, France).

Mechanical ventilation

Mice were ventilated in the supine position using humidified gas (20 mgH₂O/L absolute humidity, MR410 humidifier, Fischer & Paykel Healthcare, Courtaboeuf, France), with a tidal

volume of 8 $\mu\text{L/g}$ of body weight, a respiratory rate of 180/min, an end-expiratory pressure of 3 cmH_2O , and a fraction of inspired oxygen of 0.5, by means of a computer-driven small-animal ventilator (flexiVent, Scireq, Montreal, Canada). These ventilatory parameters have been shown to provide suitable minute ventilation (13). Mechanical ventilation lasted 3 hours with continuous anesthesia maintained by 1.5% isoflurane and muscle paralysis using intraperitoneal pancuronium at the onset of the experiment and every hour (0.8 $\mu\text{g/g}$ of body weight, Organon, Puteaux, France) to ensure passive mechanical conditions. Mice received intraperitoneal warm fluid boluses (5% dextrose with 9 g/L NaCl) at the onset of the experiment (20 $\mu\text{L/g}$ of body weight) and every hour (10 $\mu\text{L/g}$ of body weight).

Experimental design

The experimental design included four groups: young adult mice exposed to lipopolysaccharide aspiration (Y_{LPS}), young adult mice exposed to control saline aspiration (Y_{C}), mature old mice exposed to LPS aspiration (O_{LPS}) and mature old mice exposed to control saline aspiration (O_{C}). Each group included 13 to 16 animals.

Lung mechanics

Special features of the *flexiVent* ventilator include a continuous monitoring of airway pressures and a precision computer-controlled piston that is capable of accurately measuring the delivered volume (with appropriate corrections for gas compression) and to produce any desired waveform, allowing respiratory mechanics assessment with the forced oscillation technique (FOT) and pressure-volume curves (13). Mice were allowed to stabilize on the ventilator for 5 minutes and were then inflated twice to a transrespiratory pressure of 30 cmH_2O to establish a standard volume history. Respiratory system dynamic compliance and elastance (C_{dyn} and E_{dyn}) were measured using the single frequency FOT at initiation of mechanical ventilation, before and after volume history standardization, and then hourly to capture the time course and the detailed response to mechanical ventilation. The respiratory

system quasi-static compliance (C_{qst}) was measured using a pressure-driven pressure-volume curve at start (before and after volume history standardization) and at end of mechanical ventilation. Before the end of the timed ventilator protocol, mice underwent hemodynamic explorations (13).

Hemodynamic explorations

Through the cervical midline incision, both the right jugular vein and left carotid artery were isolated using a stereomicroscope (Leica MZ 7.5, Leica Microsystems, Nanterre, France). An ultra-miniature 0.47 mm high fidelity pressure transducer catheter (SPR-671, Millar Instruments, Houston, TX) was inserted into the right jugular vein and advanced into the right ventricle. The micromanometer was calibrated in vitro, firstly electronically and secondly against a column of mercury with the reference zero level taken at mid chest. Right ventricular systolic pressure was measured during a short end-expiratory ventilatory pause using a Gould transducer (Gould, Cleveland, USA) and a Notocord system (Emka Technologies, Paris, France). Then the pressure transducer catheter was inserted into the left carotid artery and systemic blood pressure and cardiac rate were measured. Cardiac output was measured by the transpulmonary thermodilution technique (14). Briefly, a 0.34 mm external diameter thermistor microprobe (Columbus Instruments, Columbus, OH) was inserted into the left carotid artery and advanced to the aortic arch, where changes in aortic blood temperature were measured. A 0.5 mm external diameter catheter placed in the right jugular vein was advanced to the right atrium for bolus injection of 20 μ L of NaCl 9 g/L solution at 20°C. Five consecutive cardiac output measurements were obtained using the CardiMax-III system (Columbus Instruments) and total pulmonary vascular resistances were calculated as the ratio of right ventricular systolic pressure to cardiac output.

Specimen collection

At the end of the timed ventilator protocol and after hemodynamic measurements, mice were exsanguinated via sectioning the left carotid artery. Arterial blood gases were determined; the remaining heparinized blood was centrifuged (3500 rpm, 12 min at 4°C) and plasma supernatant was stored at -80°C for subsequent assessment of mediators. Bronchoalveolar lavages were performed with four separate 0.5 mL aliquots of saline at 20°C and then lungs underwent fixation (paraformaldehyde 4%) and paraffin embedding. The total cell count of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was determined for a fresh fluid specimen using a Malassez hemocytometer. BALF was centrifuged (1600 rpm, 7 min at 4°C). The cell pellet was diluted in saline, and differential cell counts were done in few animals on cytocentrifuge preparations (Cytospin 3; Shandon Scientific, Cheshire, UK) stained with Diff-Quick stain (Baxter Diagnostics, McGaw Park, IL). Cell-free supernatants were stored at -80°C for subsequent assessment of total protein concentration (Bio-Rad Protein Assay) and mediators. Concentrations of IL-6, macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2), tumor necrosis factor α (TNF- α), angiopoietin-2 (ang-2) and soluble receptor for advanced glycation end products (s-RAGE) were assessed in BALF and plasma using ELISA immunoassay kit (R&D systems, Abingdon, UK), in duplicate, in accordance with manufacturer's instructions.

Histological analysis

Lung sections of 5 μ m thickness were cut and stained with hematoxylin and eosin. The degree of lung injury was blindly determined by a experienced pathologist (JTVN) using a scoring system designed to evaluate the heterogeneous lesions of lung injury and adapted from previously published scores (15,16). For the two main non-alveolar structures of the lung (veins and bronchi/arteries), three pathological processes (edema, leukocyte infiltration, and congestion/hemorrhage) were scored on two scales, an intensity scale (0 to 4) and an extension scale (0 if absent; 1 if mild with <25% of lung involvement, 2 if moderate with 25–50% of lung involvement, 3 if severe with 50–75% of lung involvement, and 4 if very severe

with >75% of lung involvement). For the alveoli, three pathological processes (thickness of the alveolar wall, neutrophil aggregation in airspace, and macrophage aggregation in airspaces) were scored on the same scales. For each pathological process of each structure, the product of intensity score and extension score were calculated (0 to 16) and partial scores of edema (0 to 32), leukocyte infiltration (0 to 32) and congestion/hemorrhage (0 to 32) were computed. An alveolitis score (0 to 48) was also computed from neutrophil aggregation and macrophage aggregation in airspace. Finally, these four partial scores were added to obtain a global lung injury score (0 to 144).

Statistics

The data were analyzed using the SPSS Base 18.0 statistical software package (SPSS Inc, Chicago, IL). Continuous data were expressed as median [1st quartile - 3rd quartile] unless otherwise stated. Independent sample were compared using the Kruskal-Wallis test followed by pairwise Mann-Whitney test, with correction for multiple testing by Benjamini-Hochberg false discovery rate. Two-tailed p values smaller than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Lung mechanics and oxygenation

Results of airway pressures monitoring, forced oscillation techniques and pressure-volume curves are displayed in **Figure 1**. At initiation of mechanical ventilation, quasi-static compliance was higher and dynamic elastance was lower in old mice as compared to young animals. At initiation of mechanical ventilation, LPS aspiration was associated with an alteration of lung mechanics (lower quasi-static compliance and higher dynamic elastance) as compared to saline in old mice, but not in young animals. The progressive deterioration of lung mechanics during low tidal volume mechanical ventilation was greater in old mice as compared to young animals and in LPS challenged mice as compared to those having

received saline. Blood oxygenation was similar between groups at the end of mechanical ventilation, with a trend towards a lower ratio of partial pressure of oxygen to oxygen fraction in arterial blood of animals challenged with LPS as compared to those having received saline (326 [235-364] for Y_C, 263 [258-293] for Y_{LPS}, 345 [265-381] for O_C, 300 [267-335] for O_{LPS}, p= 0.147).

Lung injury, inflammation and edema

As compared to animals having received saline, those challenged with LPS exhibited higher lung injury (**Figure 2**), lung inflammation (as assessed by BALF total cell count, IL-6, TNF α and MIP-2 concentrations, **Figure 3**), and lung edema (as assessed by BALF total protein concentration and angiopoietin 2 concentration, **Figure 4**). LPS aspiration induced a higher systemic inflammation (as assessed by the plasma IL-6 concentration, **Figure 3**) and lung edema (as assessed by the histological lung edema score, **Figure 4**) as compared to saline in old mice but not in young animals. s-RAGE was detectable only in BAL fluid of O_{LPS} (**Figure 3**).

Hemodynamics and pulmonary vascular dysfunction

Mice challenged with LPS displayed higher total pulmonary vascular resistances as compared to those receiving saline, whereas heart rate, cardiac output and mean arterial systemic pressure were similar between groups (**Table 1 and Figure 5**).

DISCUSSION

The goal of this study was to determine whether the severity of ARDS was age-related, using a clinically-closed double hit murine model. We found an age-related susceptibility to LPS aspiration and to low tidal volume MV.

We used a model combining LPS aspiration and three hours low tidal volume MV. LPS delivered to the alveolar spaces by aerosol or aspiration is a well known, reproducible

and commonly used model of ARDS (17,18). This model is clinically relevant, since infection remains the most frequent cause of ARDS (4). LPS inhalation induces an intense and time-related alveolar recruitment of neutrophils, reaching a peak between 12 and 24 hours post exposure (19), as well as increased microvascular permeability (20). Moreover, LPS is commonly present in lungs of ARDS patients even in the absence of clinical evidence of infection (21). We combined LPS aspiration with three hours of low tidal volume MV, which is also clinically relevant, since low tidal volume MV is routinely used in ARDS patients (12). This combination is a double hit model since two hours of low tidal volume MV were shown to cause lung inflammation and edema in mice (22).

At MV start, we found a lower dynamic elastance and a higher quasi-static compliance in O_C as compared to Y_C . These findings are in line with the age-related changes in lung elastic properties described in humans (23–26) and mice (27–30) and have been attributed to structural and functional alterations of the extracellular matrix (27,28,30). In C57BL6 mice, the reduction in elastic fiber content has been shown to occur before 20 months, along with an increase in respiratory system compliance, whereas the increased collagen content in the lung parenchyma occurred later in senescence, mainly after 20 months, along with a decrease in airway resistances (30).

Previous studies having submitted old rodents to a low tidal volume MV (7,8) did not examine changes in lung compliance during the MV course, but rather focused on airway pressures and compliance at the end of the MV protocol. We assessed the relative decrease in the dynamic compliance during MV, as previously proposed (31). We found a greater alteration in lung compliance during MV in mature old mice as compared to young mice. However, we observed no difference between young and mature old mice at the end of MV, in terms of systemic and lung inflammation, lung edema and histological lung injury score. These findings are in line with previous reports in rodents (8), but might appear divergent

with results of respiratory mechanics suggesting an age-related susceptibility to MV alone. The age-related changes in the extracellular matrix might be involved, with enhanced mechanical stress (7) altering elastic properties of older lungs over the course of MV (32).

We found an age-related enhanced systemic inflammation, lung inflammation and lung injury in response to LPS+MV. The release of proteolytic enzymes as well as the production of reactive oxygen species by the inflammation-driven recruitment of neutrophils may participate to the lung damage (33). sRAGE, which is a biomarker of lung damage and severity in experimental (34–36) and human ARDS (37), was detectable only in the O_{LPS} group. These findings are in line with previous reports having explored bacterial pulmonary challenge (38) or injurious MV (7,8) in aged rodents. An age-related inflammatory response has also been described in rodents (9,39–44) or healthy humans (45) exposed to intravenous LPS. In a large European cohort of intensive care unit patients, aged subjects (>70 years) exhibited a higher incidence of multiple organ dysfunction syndrome during mechanical ventilation, that might illustrate an enhanced acute response phase as compared to adults (46).

The age-related severity of lung edema in our report may be attributable to a greater pulmonary endothelial dysfunction in old animals. We observed a higher BALF concentration of angiopoietin-2 in old animals, which is known to impair endothelial barrier (47) and to promote liquid leakage (48) through an autocrine pathway. The higher inflammatory response in old mice may contribute to activate pulmonary microvascular endothelial cells and promote endothelial permeability (49). Many other factors may contribute to the age-related endothelial dysfunction. First, increased oxidative and nitrosative lung damage as well as down-regulation of superoxyde dismutase have been described in old mice submitted to systemic LPS (43). Second, an increase in lung permeability to soluble particles has been shown in senescent mice, suggesting an age-related dysfunction of the epithelial-endothelial barrier (50). Third, an age-related susceptibility of mouse microvascular endothelial cells to

oxidative stress and cellular damage induced by circulating inflammatory factors during septicemia have been demonstrated (51). Finally, an altered lung water transport associated with downregulation of both aquaporins 1 and 5 has been identified in aged mice (52).

An age-related thrombotic phenotype has been identified in mice after systemic LPS exposure (53) or during acute pancreatitis (54), that may enhance microvascular occlusions, a key pattern of pulmonary vascular dysfunction during ARDS (55). However, we observed no difference between old and adult mice concerning total pulmonary vascular resistances. Pulmonary vascular dysfunction during ARDS is plurifactorial, and involves microvascular occlusions but also a dysregulation of vasoactive mediators (such as endothelin-1, nitric oxide and prostanoids), a vascular remodeling and an extrinsic compression of microvessels due to lung edema and alveolar distension by mechanical ventilation (49).

Our study has some limitations. First, we evaluated total pulmonary vascular resistances but not pulmonary arterial resistances because we did not assess pulmonary capillary wedge pressure. Second, our mature old mice (12-13 months) were “younger” than those used in some previous experimental works exploring the age-related severity during ARDS or sepsis (20-24 months) (9,39,56). In preliminary experiments, we explored 24 months old mice, but their mortality with the double hit model exceeded 50%, precluding any comprehensive exploration.

CONCLUSIONS

Mature old mice, as compared to young mice, were more susceptible to LPS aspiration followed by a 3 hours low tidal volume mechanical ventilation, with a enhanced alteration of lung mechanics, and greater systemic and lung inflammation and lung edema.

BIBLIOGRAPHY

1. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *Jama J Am Med Assoc.* 2012 Jun 20;307(23):2526–33.
2. 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 May 4;342(18):1301–8.
3. Brower RG, Lanken PN, MacIntyre N, Matthay MA, Morris A, Ancukiewicz M, et al. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2004 Jul 22;351(4):327–36.
4. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med.* 2005 Oct 20;353(16):1685–93.
5. Wiedemann HP, Wheeler AP, Bernard GR, Thompson BT, Hayden D, deBoisblanc B, et al. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. *N Engl J Med.* 2006 Jun 15;354(24):2564–75.
6. Phua J, Badia JR, Adhikari NKJ, Friedrich JO, Fowler RA, Singh JM, et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Feb 1;179(3):220–7.
7. Nin N, Lorente JA, De Paula M, Fernandez-Segoviano P, Penuelas O, Sanchez-Ferrer A, et al. Aging increases the susceptibility to injurious mechanical ventilation. *Intensive Care Med.* 2008 May;34(5):923–31.
8. Setzer F, Oschatz K, Hueter L, Schmidt B, Schwarzkopf K, Schreiber T. Susceptibility to ventilator induced lung injury is increased in senescent rats. *Crit Care Lond Engl.* 2013 May 27;17(3).
9. Gomez CR, Hirano S, Cutro BT, Birjandi S, Baila H, Nomellini V, et al. Advanced age exacerbates the pulmonary inflammatory response after lipopolysaccharide exposure. *Crit Care Med.* 2007 Jan;35(1):246–51.
10. Meyer KC. Aging. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(5):433–9.
11. Bull TM, Clark B, McFann K, Moss M, National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Network. Pulmonary vascular dysfunction is associated with poor outcomes in patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Nov 1;182(9):1123–8.
12. Esteban A, Ferguson ND, Meade MO, Frutos-Vivar F, Apezteguia C, Brochard L, et al. Evolution of mechanical ventilation in response to clinical research. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Jan 15;177(2):170–7.
13. Mekontso Dessap A, Voirit G, Zhou T, Marcos E, Dudek SM, Jacobson JR, et al. Conflicting physiological and genomic cardiopulmonary effects of recruitment maneuvers in murine acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 Apr;46(4):541–50.

14. Champion HC, Villnave DJ, Tower A, Kadowitz PJ, Hyman AL. A novel right-heart catheterization technique for in vivo measurement of vascular responses in lungs of intact mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Jan;278(1):H8–H15.
15. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Londhe V, Xue YY, Li K, et al. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest*. 2002 Dec;110(11):1703–16.
16. Nishina K, Mikawa K, Takao Y, Shiga M, Maekawa N, Obara H. Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits. *Anesthesiology*. 1998 May;88(5):1300–9.
17. Reutershan J, Ley K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Crit Care Lond Engl*. 2004 Dec;8(6):453–61.
18. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Sep;295(3):L379–399.
19. Reutershan J, Basit A, Galkina EV, Ley K. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Nov;289(5):L807–815.
20. Gao JJ, Xue Q, Papasian CJ, Morrison DC. Bacterial DNA and lipopolysaccharide induce synergistic production of TNF-alpha through a post-transcriptional mechanism. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Jun 1;166(11):6855–60.
21. Martin TR, Rubenfeld GD, Ruzinski JT, Goodman RB, Steinberg KP, Leturcq DJ, et al. Relationship between soluble CD14, lipopolysaccharide binding protein, and the alveolar inflammatory response in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Mar;155(3):937–44.
22. Vaporidi K, Voloudakis G, Priniannakis G, Kondili E, Koutsopoulos A, Tsatsanis C, et al. Effects of respiratory rate on ventilator-induced lung injury at a constant PaCO₂ in a mouse model of normal lung. *Crit Care Med*. 2008 Apr;36(4):1277–83.
23. FRANK NR, MEAD J, FERRIS BGJ. The mechanical behavior of the lungs in healthy elderly persons. *J Clin Invest*. 1957 Dec;36(12):1680–7.
24. Turner JM, Mead J, Wohl ME. Elasticity of human lungs in relation to age. *J Appl Physiol*. 1968 Dec;25(6):664–71.
25. Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J*. 1999 Jan;13(1).
26. Sharma G, Goodwin J. Effect of aging on respiratory system physiology and immunology. *Clin Interv Aging*. 2006;1(3):253–60.
27. Ranga V, Kleinerman J, Ip MP, Sorensen J. Age-related changes in elastic fibers and elastin of lung. *Am Rev Respir Dis*. 1979 Mar;119(3):369–76.

28. Takubo Y, Hirai T, Muro S, Kogishi K, Hosokawa M, Mishima M. Age-associated changes in elastin and collagen content and the proportion of types I and III collagen in the lungs of mice. *Exp Gerontol*. 1999 Jun;34(3):353–64.
29. Hirai T, Hosokawa M, Kawakami K, Takubo Y, Sakai N, Oku Y, et al. Age-related changes in the static and dynamic mechanical properties of mouse lungs. *Respir Physiol*. 1995 Dec;102(2-3).
30. Huang K, Rabold R, Schofield B, Mitzner W, Tankersley CG. Age-dependent changes of airway and lung parenchyma in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2007 Jan;102(1):200–6.
31. Thammanomai A, Hueser LE, Majumdar A, Bartolak-Suki E, Suki B. Design of a new variable-ventilation method optimized for lung recruitment in mice. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2008 May;104(5):1329–40.
32. Al-Jamal R, Ludwig MS. Changes in proteoglycans and lung tissue mechanics during excessive mechanical ventilation in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Nov;281(5):L1078–1087.
33. Sibille Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Feb;141(2).
34. Uchida T, Shirasawa M, Ware LB, Kojima K, Hata Y, Makita K, et al. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 May 1;173(9):1008–15.
35. Zhang H, Tasaka S, Shiraishi Y, Fukunaga K, Yamada W, Seki H, et al. Role of soluble receptor for advanced glycation end products on endotoxin-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Aug 15;178(4):356–62.
36. Su X, Looney MR, Gupta N, Matthay MA. Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an indicator of direct lung injury in models of experimental lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009 Jul;297(1).
37. Calfee CS, Ware LB, Eisner MD, Parsons PE, Thompson BT, Wickersham N, et al. Plasma receptor for advanced glycation end products and clinical outcomes in acute lung injury. *Thorax*. 2008 Dec;63(12):1083–9.
38. Antonini JM, Roberts JR, Clarke RW, Yang HM, Barger MW, Ma JY, et al. Effect of age on respiratory defense mechanisms: pulmonary bacterial clearance in Fischer 344 rats after intratracheal instillation of *Listeria monocytogenes*. *Chest*. 2001 Jul;120(1):240–9.
39. Saito H, Sherwood ER, Varma TK, Evers BM. Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech Ageing Dev*. 2003 Dec;124(10-12):1047–58.
40. Tateda K, Matsumoto T, Miyazaki S, Yamaguchi K. Lipopolysaccharide-induced lethality and cytokine production in aged mice. *Infect Immun*. 1996 Mar;64(3):769–74.

41. Chorinchath BB, Kong LY, Mao L, McCallum RE. Age-associated differences in TNF-alpha and nitric oxide production in endotoxic mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1996 Feb 15;156(4):1525–30.
42. Starr ME, Evers BM, Saito H. Age-associated increase in cytokine production during systemic inflammation: adipose tissue as a major source of IL-6. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2009 Jul;64(7):723–30.
43. Starr ME, Ueda J, Yamamoto S, Evers BM, Saito H. The effects of aging on pulmonary oxidative damage, protein nitration, and extracellular superoxide dismutase down-regulation during systemic inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jan 15;50(2):371–80.
44. Leong J, Zhou M, Jacob A, Wang P. Aging-related hyperinflammation in endotoxemia is mediated by the alpha2A-adrenoceptor and CD14/TLR4 pathways. *Life Sci*. 2010 May 8;86(19-20):740–6.
45. Krabbe KS, Bruunsgaard H, Hansen CM, Moller K, Fonsmark L, Qvist J, et al. Ageing is associated with a prolonged fever response in human endotoxemia. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 Mar;8(2):333–8.
46. Esteban A, Anzueto A, Frutos-Vivar F, Alia I, Ely EW, Brochard L, et al. Outcome of older patients receiving mechanical ventilation. *Intensive Care Med*. 2004 Apr;30(4):639–46.
47. Parikh SM, Mammoto T, Schultz A, Yuan H-T, Christiani D, Karumanchi SA, et al. Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *Plos Med*. 2006 Mar;3(3).
48. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med*. 2006 Feb;12(2):235–9.
49. Maniatis NA, Kotanidou A, Catravas JD, Orfanos SE. Endothelial pathomechanisms in acute lung injury. *Vascul Pharmacol*. 2008 Dec;49(4-6):119–33.
50. Tankersley CG, Shank JA, Flanders SE, Soutiere SE, Rabold R, Mitzner W, et al. Changes in lung permeability and lung mechanics accompany homeostatic instability in senescent mice. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985*. 2003 Oct;95(4):1681–7.
51. Tucsek Z, Gautam T, Sonntag WE, Toth P, Saito H, Salomao R, et al. Aging exacerbates microvascular endothelial damage induced by circulating factors present in the serum of septic patients. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013 Jun;68(6):652–60.
52. Zhang Y-W, Bi L-T, Hou S-P, Zhao X-L, Song Y-L, Ma T-H. Reduced lung water transport rate associated with downregulation of aquaporin-1 and aquaporin-5 in aged mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009 Jul;36(7):734–8.
53. Starr ME, Ueda J, Takahashi H, Weiler H, Esmon CT, Evers BM, et al. Age-dependent vulnerability to endotoxemia is associated with reduction of anticoagulant factors activated protein C and thrombomodulin. *Blood*. 2010 Jun 10;115(23):4886–93.

54. Okamura D, Starr ME, Lee EY, Stromberg AJ, Evers BM, Saito H. Age-dependent vulnerability to experimental acute pancreatitis is associated with increased systemic inflammation and thrombosis. *Aging Cell*. 2012 Oct;11(5):760–9.
55. Greene R, Zapol WM, Snider MT, Reid L, Snow R, O’Connell RS, et al. Early bedside detection of pulmonary vascular occlusion during acute respiratory failure. *Am Rev Respir Dis*. 1981 Nov;124(5).
56. Turnbull IR, Clark AT, Stromberg PE, Dixon DJ, Woolsey CA, Davis CG, et al. Effects of aging on the immunopathologic response to sepsis. *Crit Care Med*. 2009 Mar;37(3):1018–23.

ABBREVIATIONS

ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome

BALF: Bronchoalveolar Lavage Fluid

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FOT: Force Oscillation Technique

IL-6: Interleukin -6

LPS: Lipopolysaccharide

MIP-2: Macrophage Inflammatory Protein-2

MV: Mechanical Ventilation

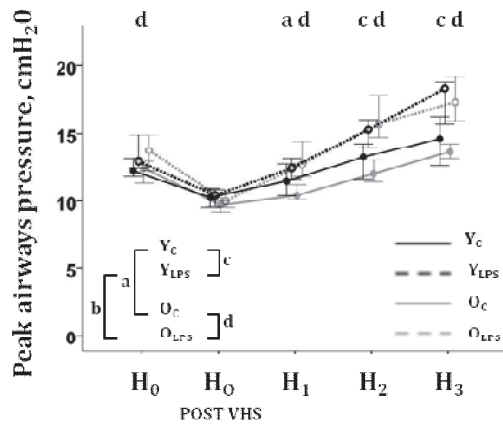
sRAGE: Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products

TNF α : Tumor Necrosis Factor- α

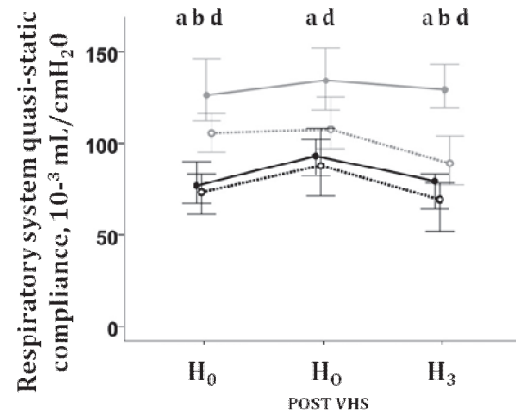
FIGURE LEGENDS

Figure 1.

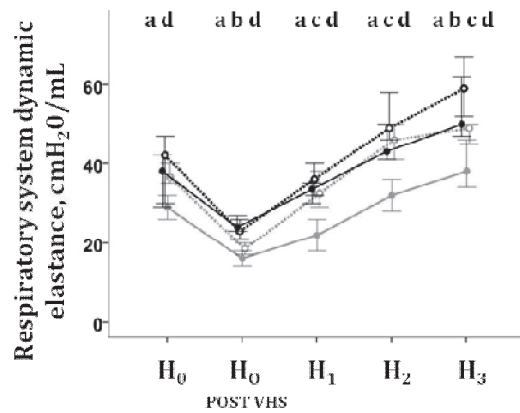
A.



B.



C.



D.

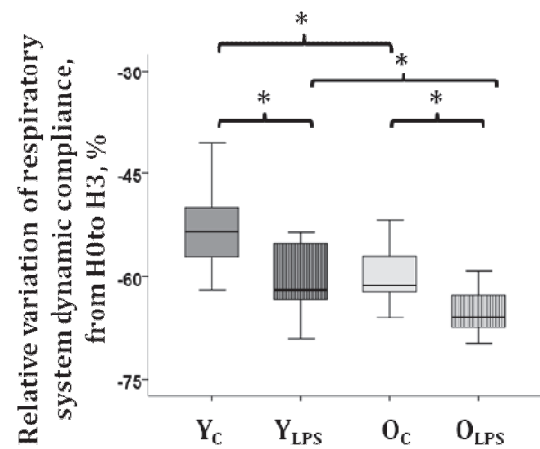
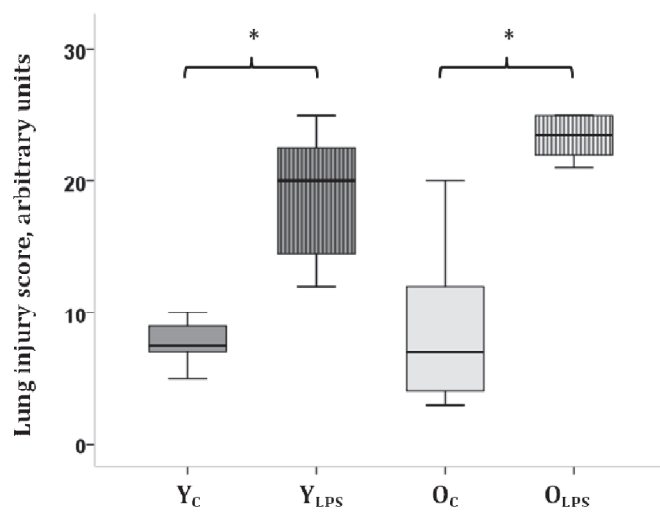


Figure 1. Respiratory mechanics during three hours (H0 to H3) of mechanical ventilation following either a lipopolysaccharide (LPS) or a control (C) saline aspiration in wild type young (Y) and old (O) mice (four groups: Y_C, Y_{LPS}, O_C and O_{LPS}; four comparisons: Y_C vs. O_C, Y_{LPS} vs. O_{LPS}, Y_C vs. Y_{LPS} and O_C vs. O_{LPS}). **A.** Peak airway pressures. **B.** Quasi-static compliance of the respiratory system calculated using a pressure-volume curve. **C.** Dynamic

elastance of the respiratory system calculated using the single frequency forced oscillation technique. **D.** Relative variation of the dynamic compliance of the respiratory system from H0 to H3 (%); the dynamic compliance of the respiratory system was calculated using the single frequency forced oscillation technique. Volume history standardization (VHS) consisted in a twice times inflation to a transrespiratory pressure of 30 cmH₂O. For A, B and C, the depicted nomenclature a, b, c and d denote Benjamini-Hochberg corrected p value < 0.05 for Mann-Whitney pairwise comparison (after Kruskal Wallis test), respectively Y_C vs. O_C, Y_{LPS} vs. O_{LPS}, Y_C vs. Y_{LPS} and O_C vs. O_{LPS}. For D, the nomenclature * denotes Benjamini-Hochberg corrected p value < 0.05 for Mann-Whitney pairwise comparison (after Kruskal Wallis test). For A, B and C, points represent the median and errors bars represent the 95% confidence interval. For D, the presentation is boxplot graph. N = 10 to 15 animals per group.

Figure 2.

A.



B.

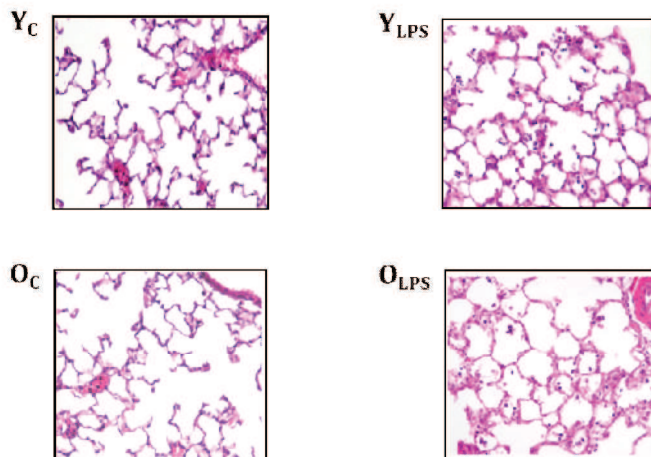


Figure 2. Lung injury score and histological representations of the lung after three hours of mechanical ventilation following either a lipopolysaccharide (LPS) or a control (C) saline aspiration in wild type young (Y) and old (O) mice (four groups: Y_C, Y_{LPS}, O_C and O_{LPS}; four comparisons: Y_C vs. O_C, Y_{LPS} vs. O_{LPS}, Y_C vs. Y_{LPS} and O_C vs. O_{LPS}). Lungs underwent fixation (paraformaldehyde 4%), paraffin embedding and staining with hematoxylin and eosin, then were examined under a light microscope. **A.** Lung injury was assessed using an original histological scoring system. The nomenclature * denotes Benjamini-Hochberg

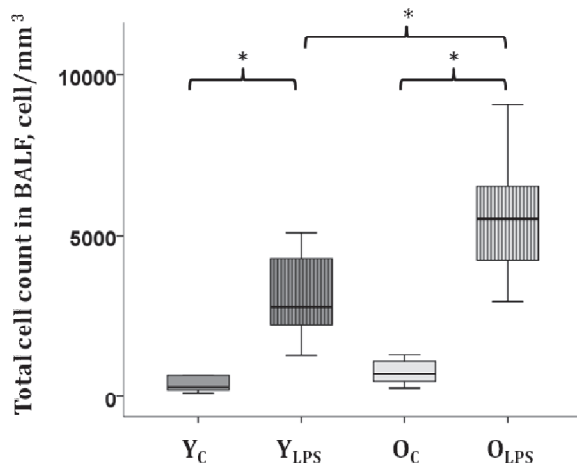
corrected p value < 0.05 for Mann-Whitney pairwise comparison (after Kruskal Wallis test).

The presentation is boxplot graph. **B.** Histological representations for each group are shown.

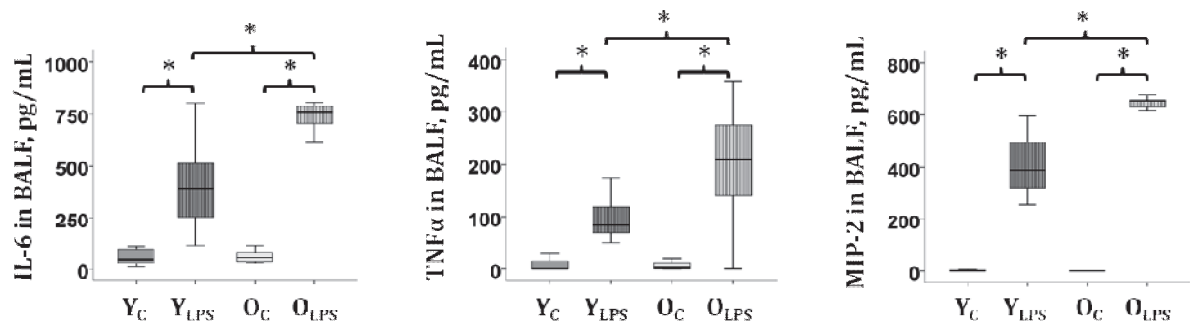
Magnification. N= 6 to 8 animals per group.

Figure 3.

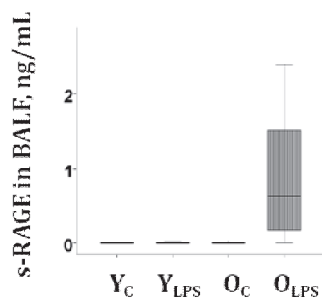
A.



B.



C.



D.

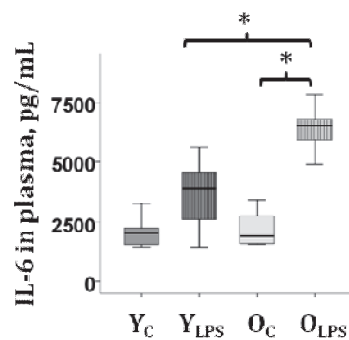
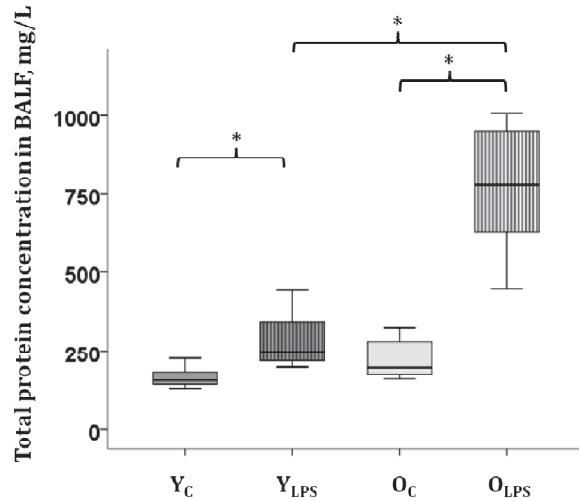


Figure 3. Lung inflammation after three hours of mechanical ventilation following either a lipopolysaccharide (LPS) or a control (C) saline aspiration in wild type young (Y) and old (O)

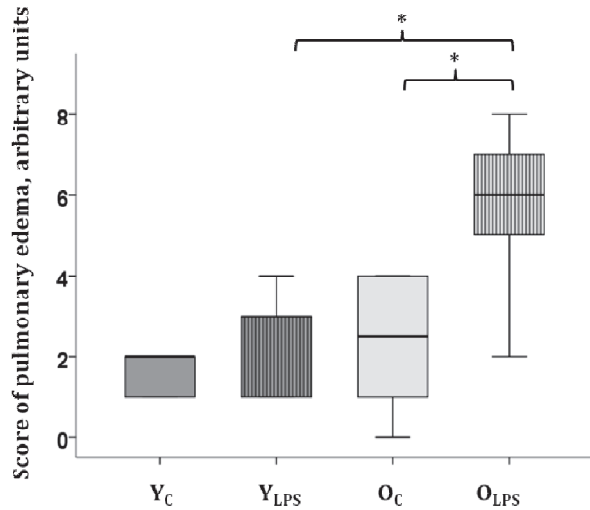
mice (four groups: Y_C, Y_{LPS}, O_C and O_{LPS}; four comparisons: Y_C vs. O_C, Y_{LPS} vs. O_{LPS}, Y_C vs. Y_{LPS} and O_C vs. O_{LPS}). Bronchoalveolar lavage was performed immediately after the sacrifice. **A.** The total cell count of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was determined using a Malassez hemocytometer. The differential cell count, performed in a limited number of animals, showed a predominance of polymorphonuclear neutrophils (>80% of total cells). **B, C and D.** After centrifugation, BALF and blood supernatants were collected for ELISA measurement of cytokine [IL-6, MIP-2, TNF- α in BALF, IL-6 in blood] and s-RAGE concentrations. The nomenclature * denotes Benjamini-Hochberg corrected p value<0.05 for Mann-Whitney pairwise comparison (after Kruskal Wallis test). The presentation is boxplot graph. N= 6 to 8 animals per group.

Figure 4.

A.



B.



C.

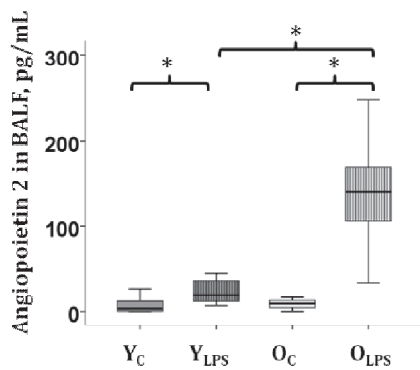


Figure 4. Alveolocapillary leak and lung edema after three hours of mechanical ventilation following either a lipopolysaccharide (LPS) or a control (C) saline aspiration in wild type young (Y) and old (O) mice (four groups: Y_C, Y_{LPS}, O_C and O_{LPS}; four comparisons: Y_C vs. O_C, Y_{LPS} vs. O_{LPS}, Y_C vs. Y_{LPS} and O_C vs. O_{LPS}). Bronchoalveolar lavage was performed immediately after sacrifice then lungs underwent fixation (paraformaldehyde 4%), paraffin embedding and staining with hematoxylin and eosin, and were examined under a light microscope. **A.** The total protein concentration of bronchoalveolar lavage fluid was

determined. **B.** Lung edema was assessed using an original histological scoring system. **C.** Bronchoalveolar lavage fluids were centrifuged. Supernatants were collected for ELISA measurement of Angiotensin 2. The nomenclature * denotes Benjamini-Hochberg corrected p value < 0.05 for Mann-Whitney pairwise comparison (after Kruskal Wallis test). The presentation is boxplot graph. N= 6 to 8 animals per group.

Figure 5.

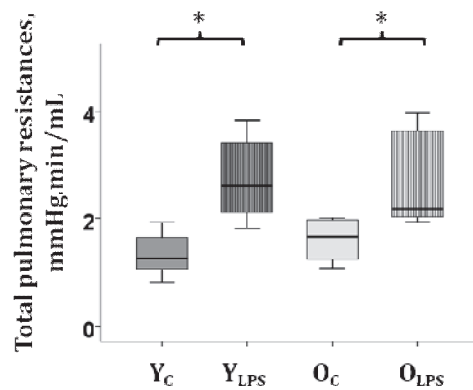


Figure 5. Total pulmonary resistances assessed at the end of a three hours mechanical ventilation following either a lipopolysaccharide (LPS) or a control (C) saline aspiration in wild type young (Y) and old (O) mice (four groups: Y_C, Y_{LPS}, O_C and O_{LPS}; four comparisons: Y_C vs. O_C, Y_{LPS} vs. O_{LPS}, Y_C vs. Y_{LPS} and O_C vs. O_{LPS}). Total pulmonary resistances were calculated as the ratio of right ventricular systolic pressure to cardiac output. The nomenclature * denotes Benjamini-Hochberg corrected p value<0.05 for Mann-Whitney pairwise comparison (after Kruskal Wallis test). The presentation is boxplot graph. N= 6 to 8 animals per group.

TABLE 1

Hemodynamic data and pulmonary vascular dysfunction assessed at the end of a three hours mechanical ventilation following either a lipopolysaccharide (LPS) or a control (C) saline aspiration in wild type young (Y) and old (O) mice (four groups: Y_C, Y_{LPS}, O_C and O_{LPS}; four comparisons: Y_C vs. O_C, Y_{LPS} vs. O_{LPS}, Y_C vs. Y_{LPS} and O_C vs. O_{LPS}).

	Y _C	Y _{LPS}	O _C	O _{LPS}
Cardiac rate (beat/min)	578[543-594]	563 [536-591]	580 [544-613]	557 [527-568]
Mean systemic blood pressure (mmHg)	63 [51-70]	48 [35-52]	64 [53-77]	52 [43-58]
Cardiac output (mL/min)	26 [18-29]	14 [12-17]	20 [15-23]	15 [11-17]
Right ventricular systolic pressure (mmHg)	31 [28-33]	39 [39-43] *	31 [26-32]	34 [30-40]
Total pulmonary resistances (mmHg min/mL)	1.3 [1.1-1.9]	2.6 [2.0-3.4] *	1.7 [1.2-2.0]	2.2 [2.0-3.7] §

Data are median [25th-75th percentile]. N= 6 to 8 animals per group. *, #, and § indicate a Benjamini-Hochberg corrected p value <0.05 (Mann-Whitney test following Kruskal Wallis test) as compared to Y_C, Y_{LPS} and O_C respectively. N= 6 to 8 animals per group

Discussion des méthodes

Dans ce travail, nous avons utilisé des souris jeunes et matures, respectivement 10-12 semaines et 52-53 semaines. Dans les travaux antérieurs ayant examiné l'impact de l'âge sur la gravité dans des modèles murins d'ARDS ou de sepsis, les animaux vieux avaient 20 à 24 mois (300,302,303). Dans un autre travail, Turnbull a utilisé des souris jeunes (4 mois), matures (12 mois) et vieilles (24 mois) dans un modèle de ponction ligature caecale et montré une mortalité crescendo avec l'âge (304). Nous souhaitions donc utiliser des souris âgées de 24 mois, mais des expériences préliminaires ont montré une mortalité élevée, faisant préférer des animaux de 12 mois, dits matures.

Discussion des résultats:

Au début de la VM, lors du branchement au ventilateur, les premières mesures de mécanique ventilatoire identifiaient des propriétés élastiques différentes entre les souris jeunes et matures. Ces dernières avaient en effet une compliance du système respiratoire plus élevée. Sans pouvoir exclure des changements structuraux de la paroi thoracique liés à l'âge, le vieillissement pulmonaire était l'explication privilégiée. Des données déjà anciennes l'ont illustré chez l'humain (305–308) et la souris (309–313) et l'ont attribué à des modifications structurales et fonctionnelles de la matrice extracellulaire. Chez la souris C57BL6, la raréfaction des fibres élastiques est un événement précoce du remodelage pulmonaire lié à l'âge, survenant surtout avant 20 mois et correspondant à l'augmentation de la compliance, tandis que l'augmentation du collagène est plus tardive, survenant surtout après 20 mois et correspondant à l'augmentation des résistances des voies aériennes (312). Ces modifications âge-dépendantes du tissu de soutien pulmonaire pouvaient être impliquées dans les différences observées entre souris jeunes et matures non préalablement exposées au LPS.

Nous avons identifié une vulnérabilité âge-dépendante à la double agression LPS-MV. Les marqueurs de la réponse inflammatoire locorégionale (IL-6, MIP-2, TNF α) et systémique (IL-6) étaient augmentés chez les souris matures, en concordance avec les travaux antérieurs dans d'autres modèles d'agression (299–301). Une inflammation âge-dépendante avait aussi été montrée chez l'humain sain exposé au LPS systémique (314). La fuite alvéolocapillaire augmentée chez les souris matures suggérait une dysfonction endothéliale pulmonaire, en concordance avec une angiopoïétine 2 élevée. Ce facteur de croissance angiogénique, aussi exprimé chez l'humain, a été montré participant à la lésion de la membrane alvéolocapillaire (315) et promoteur de la fuite liquidienne (316) au cours de la réponse aiguë inflammatoire. En plus de l'inflammation majorée, plusieurs facteurs pouvaient être impliqués dans cette dysfonction endothéliale pulmonaire âge-dépendante. D'abord, un stress oxydant majoré et une régulation négative de la superoxyde dismutase ont été décrits chez des souris âgées soumises au LPS systémique (317). Par ailleurs, une susceptibilité âge-dépendante des cellules microvasculaires endothéliales murines au stress oxydant et au dommage cellulaire induits par les médiateurs inflammatoires systémiques de patients septiques a été mise en évidence (318). Ensuite une augmentation de la perméabilité alvéolaire aux particules fines a été montrée chez des souris âgées, suggérant un vieillissement de la barrière alvéolocapillaire (319). Enfin un transport hydrique pulmonaire altéré a été identifié chez la souris âgée, attribué à une régulation négative des aquaporines 1 et 5 (320).

En dépit des arguments biologiques et histologiques suggérant une atteinte endothéliale pulmonaire augmentée chez les souris matures, nous n'avons pas observée d'élévation âge-dépendante des RPT. Mais la dysfonction vasculaire pulmonaire de l'ARDS est plurifactorielle, impliquant l'hyperperméabilité endothéliale mais aussi les occlusions microvasculaires, une dysrégulation des agents vasomoteurs ou encore le remodelage

vasculaire, et l'ensemble de ces phénomènes n'était peut-être pas assez exacerbé pour induire une dysfonction vasculaire pulmonaire accrue chez les souris matures.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Nous avons développé et utilisé un modèle murin d'ARDS *two hit*, incluant une VM protectrice et des exploration physiologiques respiratoires et hémodynamiques. L'objectif était de disposer d'un outil induisant une dysfonction vasculaire pulmonaire, permettant de l'évaluer et d'en étudier les causes. Le paramètre d'évaluation global de la dysfonction vasculaire pulmonaire était les RPT. Deux limites affectaient le choix de ce paramètre hémodynamique. Premièrement, il n'était pas calculé à partir de la P_{AP} mais de la PSVD, comme dans d'autres travaux antérieurs relatifs à l'HTP aigue chez la souris (321). En effet, la P_{AP} est difficilement mesurable chez la souris sauf à disposer d'un cathéter très spécifique (322). Deuxièmement, l'utilisation des RVP eut été préférable, afin d'éviter la confusion d'une éventuelle composante d'HTP post-capillaire, mais la PAPO n'est pas accessible chez la souris. Nous avons tenté de pallier à ces limitations en mesurant le débit cardiaque. Puisqu'il était globalement comparable entre les groupes dans les deuxième et troisième travaux, nous avons estimé la probabilité d'une composante cardiaque gauche faible. Il aurait été intéressant de mesurer en continu la pression artérielle systémique mais ce monitoring aurait rendu le modèle très instable.

Le premier travail a étudié l'impact de manœuvres de recrutement alvéolaire, une technique de ventilation non utilisée en pratique clinique courante mais jouissant d'un intérêt croissant. Une augmentation des RPT étaient notées chez les souris exposées à la technique. Une approche globale transcriptomique a été choisie, car elle permettait d'explorer sans a priori les différentes voies métaboliques et cellulaires impliquées dans les mécanismes de thrombose, remodelage, vasomotricité et hyperperméabilité endothéliale. Cette approche a ainsi confirmé le caractère plurifactoriel de la dysfonction vasculaire pulmonaire de l'ARDS. Nos données suggéraient des effets vasculaires délétères des manœuvres de recrutement, alors que le

bénéfice en terme de mécanique ventilatoire était clair, et conforme aux travaux antérieurs. Des données récentes tendaient à confirmer nos observations. Dans un modèle murin utilisant le LPS inhalé ou systémique suivie d'une VM protectrice, 3 types de manœuvres de recrutement étaient testées. Deux d'entre elles étaient associées à une expression accrue de *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1, compatible avec une dysfonction endothéliale pulmonaire (283), sans mesure cependant associée de la pression ventriculaire droite.

Dans notre second travail, nous avons étudié l'IL-6, un médiateur clé de la réponse aigue inflammatoire. Nous avons illustré le paradoxe d'une cytokine à la fois biomarqueur péjoratif et acteur protecteur au cours de l'ARDS (289). Nous avons montré que la déficience en IL-6 était associée à une gravité accrue de l'atteinte pulmonaire, partiellement prévenue par un traitement par rHuIL-6. Nous avons montré aussi chez les souris déficientes des RPT élevées, au moins partiellement attribuables à une dérégulation de la vasomotricité pulmonaire impliquant les NOS. Une voie d'intérêt complémentaire dans la thématique IL-6 concerne le rôle du récepteur soluble à l'IL-6 (sIL-6R). Essentiellement libéré par clivage du récepteur membranaire de l'IL-6, il fixe l'IL-6 circulante, permettant la stimulation de différents types cellulaires dépourvus du récepteur membranaire via la voie de signalisation intracellulaire GP130/JAK-1/STAT1-3 impliquée dans l'homéostasie cellulaire (323). Ses effets immunomodulateurs et antioxydants ont été montrés bénéfiques dans des modèles d'agression aigue (324,325). Il a été montré dans un modèle d'inflammation des tissus sous-cutanés que la libération locale de sIL-6R, essentiellement par les PNN recrutés au site de l'inflammation, stimulait la sécrétion de la chemokine MCP-1 attractante des macrophages par les cellules endothéliales, induisant un switch PNN-macrophages engageant la résolution du processus infectieux (326). L'exploration du rôle de la voie IL-6/sIL-6R au cours de l'agression pulmonaire aigue est donc d'intérêt et pourrait s'inscrire dans la continuité de ce travail.

Notre troisième travail n'a pas identifié d'HTP chez les souris d'âge mature en comparaison aux souris adultes jeunes soumises au modèle d'ARDS. Néanmoins, des signes de souffrance endothéliale ont été constatés, incluant une fuite alvéolocapillaire et un taux pulmonaire d'angiopoïétine II accru. La question de la sénescence pourrait être explorée. Ce phénomène consiste en un arrêt permanent de la réplication cellulaire associé à des modifications phénotypiques caractérisées par une instabilité génomique, la perte de certaines fonctions cellulaires spécialisées et une altération de l'expression de multiples gènes codant pour des facteurs de croissance, des protéases ou encore des protéines extracellulaires. La sénescence survient après un certain nombre de divisions cellulaires et le raccourcissement progressif des télomères (sénescence répllicative) ou est induite par l'exposition à un facteur de stress (sénescence prématurée). La sénescence cellulaire a déjà été explorée dans les maladies pulmonaires. Ainsi un raccourcissement anormal des télomères, associé à des mutations des gènes des télomérases, a été décrit dans des cas sporadiques ou familiaux de fibrose pulmonaire idiopathique (327). Au cours de l'ARDS, l'intensité de la réponse inflammatoire et du stress oxydatif pourrait favoriser une telle sénescence prématurée, même sur une période courte. Ce vieillissement cellulaire accéléré pourrait alors amplifier la réponse inflammatoire et perturber les mécanismes de réparation alvéolaire. Il est possible aussi que la sénescence répllicative associée au vieillissement, en perturbant les mécanismes de réparation alvéolaire, participe au pronostic dégradé chez les patients ARDS et à la gravité accrue des souris d'âge mature dans notre travail. L'étude des marqueurs de sénescence prématurée chez les animaux agressés et l'utilisation de souris transgéniques TERT $-/-$ dépourvues d'activité télomérase, présentant une sénescence répllicative accélérée, pourraient permettre d'explorer ces points.

Conclusion

La dysfonction vasculaire pulmonaire est une composante importante de l'ARDS et participe au mauvais pronostic. Son étude, notamment expérimentale, constitue donc un axe de recherche important. Elle est possible chez le petit animal, dans un modèle cliniquement relevant, induisant une HTP aigue et offrant les outils d'exploration physiologique permettant de la quantifier. Les mécanismes physiopathologiques mis en jeu, qui affectent surtout l'endothélium pulmonaire, sont complexes et intriqués. L'analyse transcriptomique montrait ainsi des phénomènes d'hyperperméabilité, de thrombose microvasculaire et de dysrégulation de la vasomotricité pulmonaire. Les facteurs déterminants de la dysfonction vasculaire pulmonaire, encore largement méconnus, seraient relatifs à l'agent agressant, à la réponse de l'hôte et au support ventilatoire. Nous avons ainsi illustré les effets d'une réaction inflammatoire dysrégulée par la déficience d'une cytokine régulatrice. Nous avons aussi montré l'impact potentiellement délétère de certaines modalités ventilatoires. D'autres déterminants ou facteurs favorisants restent à explorer. Cela pourrait permettre d'avancer davantage dans la compréhension de la composante lésionnelle vasculaire pulmonaire de l'ARDS, de guider ou de personnaliser les modalités d'utilisation du support ventilatoire, et d'envisager d'éventuelles thérapeutiques médicamenteuses ciblant l'endothélium pulmonaire.

ANNEXES

ANNEXE 1:

Liste des travaux non inclus dans cette thèse, auxquels j'ai participé et qui ont donné lieu à publication ou à présentation:

- Hervé A, Voiriot G, Razazi K., Adnot S, Maitre B, Mekontso Dessap A. Characterization of a murine model of acute chest syndrome. ATS Meeting 2010. Am J Respir Crit Care Med. 2010;181:A2678
- Guivarch E, Voiriot G, Rouze A, Tran Van Nhieu J, Maitre B, Mekontso-Dessap A, Desmard M, Boczkowski J. Effects of adjusting tidal volume on actual or ideal body weight in ventilated obese mice. ATS Meeting 2012. Am J Respir Crit Care Med. 2012; 185:A5457
- Rouzé A, Voiriot G, Guivarch E, Tran Van Nhieu J, Roux F, Isabey D, Brochard L, Maitre B, Mekontso-Dessap A, Boczkowski J. Non injurious mechanical ventilation aggravates pre-existing pulmonary inflammation in elastase-induced emphysema in mice. ATS Meeting 2012. Am J Respir Crit Care Med. 2012;185:A5437
- Voiriot G, Zimnicka AM, Choudhury MS, Smith KA, Wan J, Adnot S, Maitre B, Mekontso Dessap A, Yuan JXJ. High PEEP mechanical ventilation enhances pulmonary vasoconstriction induced by Ca²⁺ influx through VDCC. ATS Meeting 2013. Am J Respir Crit Care Med. 2013;187:A1138
- Voiriot G, Smith KA, Tauseef M, Mehta D, Yuan JXJ. Notch signaling is involved in acute hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction. ATS Meeting 2013. Am J Respir Crit Care Med. 2013;187:A2255
- Wan J, Yamamura A, Zimnicka AM, Voiriot G, Smith KA, Tang H, Ayon RJ, Choudhury MS, Ko EA, Wang J, Wang C, Makino A, Yuan JX. Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca²⁺ channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2013 Jul 15;305(2):L154-64.

ANNEXE 2

Résumé de la présentation en communication orale du travail n°2 (ATS meeting 2010):

Role of interleukin 6 during acute lung injury: study in a lipopolysaccharide-induced murine model under mechanical ventilation

Voiriot G, Herve A, Razazi K, Souktani R, Gary-Bobo G, Adnot S, Brochard L, Maitre B, Mekontso Dessap A.

Rationale

Interleukin 6 (IL-6) is a key biological indicator of the inflammatory response in the critically ill patients. Plasma and broncho-alveolar IL-6 levels had been described as pejorative prognostic factors during acute respiratory distress syndrome (ARDS) in clinics and animal studies. Unfortunately, the true role of IL-6 in contributing to lung damage during ARDS remains unclear.

Methods

Wild-type C57BL6 and IL-6 knock-out (IL-6^{-/-}) male adult mice were submitted to an aspiration of Escherichia coli lipopolysaccharide (LPS) or PBS at time H0. At H18, mice were intubated and started mechanical ventilation (MV, tidal volume 8 ml/kg; positive end-expiratory pressure 3 cm H₂O, inspired oxygen fraction 0.5). At each hour, respiratory system mechanics were assessed. A right ventricular catheterization and a transpulmonary thermodilution were performed at H4.5 and animals were sacrificed at H5. A broncho-alveolar lavage was performed and lungs were removed for histological analysis. In a supplementary group of IL-6^{-/-} mice, the effects of the administration of a human recombinant IL-6 (rHu IL-6) at H0 and H18 were studied. Considering results, right ventricular pressure was measured during an acute hypoxic challenge (breathing 9% oxygen) in wild-type mice receiving or not rHu IL-6 five hours before.

Results

In IL6^{-/-} mice group, in comparison with wild-type mice, we observed during MV a higher impairment of respiratory system compliance, in concordance at time of sacrifice with higher pulmonary inflammation and histologic lung injury. But the administration of rHu IL-6 to IL-6^{-/-} mice was almost inefficient in reversing these differences. Concerning hemodynamics, IL6^{-/-} mice suffered from pulmonary hypertension, with marked increase of right ventricular systolic pressure and total pulmonary resistance. Of note, IL-6^{-/-} mice receiving rHu IL-6 were strongly protected from developing these hemodynamic anomalies. During hypoxic challenge, wild-type mice having received rHu IL-6 did not develop acute pulmonary hypertension.

Conclusion

In the present murine model, the IL-6 deficiency was deleterious in term of respiratory mechanics and lung inflammation/injury, suggestive of a central anti-inflammatory role of this cytokine during ARDS. Most of all, the IL-6 deficiency was associated with a marked pulmonary hypertension, which seemed to be attributable to pulmonary vasoactive properties of IL-6.

ANNEXE 3

Résumé de la présentation en communication orale du travail n°3 (ATS meeting 2012):

Effects of advanced age in a murine model of acute lung injury

Voiriot G, Contou D, Tran Van Nhieu J, Adnot A, Maitre B, Mekontso Dessap A.

Rationale

In a recent systematic review, aging has been identified as the only factor independently associated with mortality during acute respiratory distress syndrome. This age-dependant severity was previously explored in several experimental works. Those works had two main limits: (i) none focused on changes in lung mechanics, (ii) none explored the right ventricular and pulmonary hemodynamics.

Methods

Young (8-10 weeks) and old (12 months) C57BL6 male mice underwent an aspiration of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) or vehicle (PBS). Twenty hours later, mice were anesthetized and intubated, and started a 3 hours period of mechanical ventilation (MV, tidal volume 8 ml/kg, positive end-expiratory pressure 3 cm H₂O). Lung mechanics were assessed hourly during MV. Right ventricular pressure and cardiac output (transpulmonary thermodilution) were used to calculate total pulmonary resistances at the end of the MV. After sacrifice, a bronchoalveolar lavage (BAL) was performed and the lungs were harvested. BAL cellularity and histological lung edema and injury were assessed. Four groups (n=10-15 mice per group) were studied (PBS young mice = Y_{PBS}, PBS old mice = O_{PBS}, LPS young mice = Y_{LPS} and LPS old mice = O_{LPS}). Continuous data were expressed as median.

Results

At baseline, when starting MV, O_{PBS} mice had a higher respiratory system compliance (μL/cmH₂O) than Y_{PBS} mice, respectively 126 vs. 77 (p<0.001). LPS exposure dramatically altered this baseline compliance in old mice (O_{LPS} vs. O_{PBS}, respectively 106 vs. 126, p=0.001), but not in young mice (Y_{LPS} vs. Y_{PBS}, respectively 73 vs. 77, p=0.19). During MV, old mice had a more pronounced decrease in compliance as compared to young mice (-66% in O_{LPS}, -61% in O_{PBS}, -62% in Y_{LPS} and -53% in Y_{PBS}, p<0.001). The total cell count of BAL fluid (cell/μL) were higher in O_{LPS} group as compared to Y_{LPS} group, respectively 5500 vs. 2800 (p<0.001). The alveolocapillary leak, quantified by the total protein concentration of BAL fluid (μg/mL; 777 in O_{LPS}, 197 in O_{PBS}, 246 in Y_{LPS} and 155 in Y_{PBS}, p<0.001) and by a histological score of lung edema (arbitrary units; 6.0 in O_{LPS}, 2.5 in O_{PBS}, 3.0 in Y_{LPS} and 2.0 in Y_{PBS}, p=0.035), was also higher in O_{LPS} group as compared to Y_{LPS} group. Concerning hemodynamics, pulmonary vascular resistances were similar in Y_{LPS} and O_{LPS} groups.

Conclusion

Old mice were more susceptible to LPS exposure and non-injurious mechanical ventilation, with a marked alveolocapillary leak.

ANNEXE 4

Résumé de présentation en session poster (ATS meeting 2013):

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire du Pr Jason Yuan, University of Illinois at Chicago, Chicago au cours de l'année 2011-2012. L'objectif du travail était d'étudier l'impact d'une VM à PEP élevée sur la vasoréactivité pulmonaire chez des souris adultes jeunes saines.

High PEEP mechanical ventilation enhances pulmonary vasoconstriction induced by Ca²⁺ influx through VDCC

Voiriot G, Zimnicka AM, Choudhury MS, Smith KA, Wan J, Adnot S, Maitre B, Mekontso Dessap A, Yuan JXJ.

Introduction

Mechanical ventilation is a key supportive treatment in intensive care units. In patients with ALI/ARDS, high PEEP is routinely used to enhance gas exchange; however, this ventilatory strategy can exert deleterious effects on the pulmonary vasculature. Here, we aimed in determining whether high PEEP affects pulmonary vascular reactivity and alters the expression level of Ca²⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells.

Methods

In perfused/ventilated lungs isolated from C57/BL6 mice having previously undergone for 2 hours *i*) spontaneous breathing (SB), *ii*) low PEEP low tidal volume mechanical ventilation (MV) or *iii*) high PEEP low tidal volume mechanical ventilation (MVhP), we measured and compared the changes in pulmonary arterial pressure (PAP) in response to high K⁺ perfusate and various vasoconstrictors and vasodilators. In some additional *in vivo* experiments, we measured right ventricular systolic pressure (RVSP) and collected blood for gas analysis and performed bronchoalveolar lavage (BAL). Isolated pulmonary arteries and whole-lung tissues were then used to determine mRNA expression levels of various Ca²⁺ channels.

Results

In comparison to MV mice, MVhP mice displayed a limited deterioration of the elastic properties of the lungs; however, MVhP mice exhibited a significantly higher RVSP. There was no difference of total cell count and total protein concentration in the BAL fluid between SB, MV and MVhP mice. Gas exchanges were actually improved in MVhP mice compared to MV mice. In isolated perfused/ventilated lungs, hypoxia (1% O₂)-mediated pulmonary vasoconstriction and high K⁺ (80-120 mM)-induced pulmonary vasoconstriction were both significantly enhanced in MVhP mice compared to SB mice. However, pulmonary vasoconstriction or the change in PAP induced by U46619, a thromboxane A₂ analogue, was comparable in isolated perfused/ventilated lungs from SB, MV and MVhP mice. Furthermore, in isolated perfused/ventilated lungs for which PAP was increased by high K⁺ (80 mM), acetylcholine (ACh)-induced vasodilation was significantly enhanced in MVhP mice compared to SB mice (but not in the lungs for which PAP was increased by phenylephrine). In isolated pulmonary arteries and whole-lung tissues, our real-time RT-PCR experiments showed that the mRNA expression of Ca_v1.1 (a L-type VDCC) and Ca_v3.2 (a T-typeVDCC) was significantly enhance in MVhP mice compared to SB mice.

Conclusions

Mechanical ventilation with high PEEP increased the pulmonary vasoconstrictive response to alveolar hypoxia and high K⁺ induced membrane depolarization. This augmentation of pulmonary vasoreactivity is due possibly to the upregulation of VDCC channel subunits in pulmonary arterial smooth muscle cells.

REFERENCES

1. Angus GE, Thurlbeck WM. Number of alveoli in the human lung. *J Appl Physiol*. 1972 Apr;32(4):483–5.
2. Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir Physiol*. 1978 Feb;32(2):121–40.
3. Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, et al. The number of alveoli in the human lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 Jan 1;169(1):120–4.
4. Meyrick B, Reid L. The alveolar wall. *Br J Dis Chest*. 1970 Jul;64(3):121–40.
5. Williams MC. Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:669–95.
6. Castranova V, Rabovsky J, Tucker JH, Miles PR. The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1988 May;93(3):472–83.
7. Mason RJ. Pulmonary alveolar type II epithelial cells and adult respiratory distress syndrome. *West J Med*. 1985 Nov;143(5):611–5.
8. Thompson AB, Robbins RA, Romberger DJ, Sisson JH, Spurzem JR, Teschler H, et al. Immunological functions of the pulmonary epithelium. *Eur Respir J*. 1995 Jan;8(1):127–49.
9. Townsley MI. Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins. *Compr Physiol*. 2012 Jan;2(1).
10. Marriott HM, Dockrell DH. The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Exp Lung Res*. 2007 Dec;33(10).
11. Puneet P, Moochhala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Jan;288(1).
12. Bruder D, Srikiatkachorn A, Enelow RI. Cellular immunity and lung injury in respiratory virus infection. *Viral Immunol*. 2006 Summer;19(2):147–55.
13. Reutershan J, Ley K. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Crit Care Lond Engl*. 2004 Dec;8(6):453–61.
14. Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med Camb Mass*. 2011 Apr;17(3-4).
15. Matute-Bello G, Martin TR. Science review: apoptosis in acute lung injury. *Crit Care Lond Engl*. 2003 Oct;7(5):355–8.
16. Pelosi P, Rocco PRM, Negrini D, Passi A. The extracellular matrix of the lung and its role in edema formation. *An Acad Bras Cienc*. 2007 Jun;79(2):285–97.
17. Herzog EL, Brody AR, Colby TV, Mason R, Williams MC. Knowns and unknowns of the alveolus. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Sep 15;5(7):778–82.
18. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*. 2007 Jun;170(6):1807–16.

19. Kotaru C, Schoonover KJ, Trudeau JB, Huynh M-L, Zhou X, Hu H, et al. Regional fibroblast heterogeneity in the lung: implications for remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Jun 1;173(11):1208–15.
20. Heymann MA. Control of the pulmonary circulation in the fetus and during the transitional period to air breathing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1999 Jun;84(2):127–32.
21. Kiserud T, Acharya G. The fetal circulation. *Prenat Diagn*. 2004 Dec 30;24(13):1049–59.
22. Greyson CR. The right ventricle and pulmonary circulation: basic concepts. *Rev Esp Cardiol*. 2010 Jan;63(1).
23. Rudolph AM. The changes in the circulation after birth. Their importance in congenital heart disease. *Circulation*. 1970 Feb;41(2):343–59.
24. Calvert PA, Rana BS, Kydd AC, Shapiro LM. Patent foramen ovale: anatomy, outcomes, and closure. *Nat Rev Cardiol*. 2011 Mar;8(3):148–60.
25. Dell'Italia LJ. The right ventricle: anatomy, physiology, and clinical importance. *Curr Probl Cardiol*. 1991 Oct;16(10).
26. Sheehan F, Redington A. The right ventricle: anatomy, physiology and clinical imaging. *Heart Br Card Soc*. 2008 Nov;94(11):1510–5.
27. Greyson CR. Pathophysiology of right ventricular failure. *Crit Care Med*. 2008 Jan;36(1 Suppl).
28. Sanchez-Quintana D, Anderson RH, Ho SY. Ventricular myoarchitecture in tetralogy of Fallot. *Heart Br Card Soc*. 1996 Sep;76(3):280–6.
29. Santamore WP, Amore JN. Buffering of respiratory variations in venous return by right ventricle: a theoretical analysis. *Am J Physiol*. 1994 Dec;267(6 Pt 2):H2163–2170.
30. Rouleau JL, Paradis P, Shenasa H, Juneau C. Faster time to peak tension and velocity of shortening in right versus left ventricular trabeculae and papillary muscles of dogs. *Circ Res*. 1986 Nov;59(5):556–61.
31. Reiser PJ, Portman MA, Ning XH, Schomisch Moravec C. Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Apr;280(4):H1814–1820.
32. Wang G-Y, McCloskey DT, Turcato S, Swigart PM, Simpson PC, Baker AJ. Contrasting inotropic responses to alpha1-adrenergic receptor stimulation in left versus right ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Oct;291(4):H2013–2017.
33. Roldan-Azate A, Chesler N. Pulmonary Vascular Mechanics. *Textbook of Pulmonary Vascular Diseases*. Springer. 2011.
34. Jones R, Capen D. Pulmonary Vascular Development. *Textbook of Pulmonary Vascular Diseases*. Springer. 2011.
35. Naeije R, Westerhof N. Pulmonary Vascular Function. *Textbook of Pulmonary Vascular Diseases*. Springer. 2011.
36. PERMUTT S, HOWELL JB, PROCTOR DF, RILEY RL. Effect of lung inflation on static pressure-volume characteristics of pulmonary vessels. *J Appl Physiol*. 1961 Jan;16.

37. HOWELL JB, PERMUTT S, PROCTOR DF, RILEY RL. Effect of inflation of the lung on different parts of pulmonary vascular bed. *J Appl Physiol*. 1961 Jan;16:71–6.
38. Price LC, McAuley DF, Marino PS, Finney SJ, Griffiths MJ, Wort SJ. Pathophysiology of pulmonary hypertension in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012 May 1;302(9):L803–815.
39. Stevens T. Molecular and cellular determinants of lung endothelial cell heterogeneity. *Chest*. 2005 Dec;128(6 Suppl).
40. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*. 2004 Jul;84(3).
41. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*. 2006 Jan;86(1).
42. Garcia J, Malik A. Pulmonary Circulation and Regulation of Fluid Balance. *Murray & Nadel's Textbook of Respiratory Medicine*, 4th ed. Mason Ed. 2005.
43. Minshall RD, Malik AB. Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(176 Pt 1):107–44.
44. Agre P. The aquaporin water channels. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(1).
45. Barnes PJ, Liu SF. Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol Rev*. 1995 Mar;47(1).
46. Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. 2003 Sep;196(3):430–43.
47. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng*. 2007;9:121–67.
48. Edelberg JM, Christie PD, Rosenberg RD. Regulation of vascular bed-specific prothrombotic potential. *Circ Res*. 2001 Jul 20;89(2):117–24.
49. Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Crit Care Med*. 2003 Apr;31(4 Suppl):S221–230.
50. Chetham PM, Babal P, Bridges JP, Moore TM, Stevens T. Segmental regulation of pulmonary vascular permeability by store-operated Ca²⁺ entry. *Am J Physiol*. 1999 Jan;276(1 Pt 1).
51. Doerschuk CM. Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages. *Respir Res*. 2000;1(3):136–40.
52. Parker JC, Stevens T, Randall J, Weber DS, King JA. Hydraulic conductance of pulmonary microvascular and macrovascular endothelial cell monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Jul;291(1):L30–37.
53. Parker JC, Yoshikawa S. Vascular segmental permeabilities at high peak inflation pressure in isolated rat lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Dec;283(6):L1203–1209.
54. Maniatis NA, Kotanidou A, Catravas JD, Orfanos SE. Endothelial pathomechanisms in acute lung injury. *Vascul Pharmacol*. 2008 Dec;49(4-6):119–33.
55. Stevens T, Phan S, Frid MG, Alvarez D, Herzog E, Stenmark KR. Lung vascular cell heterogeneity: endothelium, smooth muscle, and fibroblasts. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Sep 15;5(7):783–91.

56. Alvarez DF, Huang L, King JA, ElZarrad MK, Yoder MC, Stevens T. Lung microvascular endothelium is enriched with progenitor cells that exhibit vasculogenic capacity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Mar;294(3):L419–430.
57. Orfanos SE, Mavrommati I, Korovesi I, Roussos C. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill. *Intensive Care Med*. 2004 Sep;30(9):1702–14.
58. Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Gabbiani F, Gabbiani G. Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implications for the development of experimental intimal thickening. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 Jun;16(6):815–20.
59. Berk BC. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev*. 2001 Jul;81(3).
60. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 1967 Aug 12;2(7511):319–23.
61. Murray JF, Matthay MA, Luce JM, Flick MR. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1988 Sep;138(3):720–3.
62. 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. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 Mar;149(3 Pt 1):818–24.
63. Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, et al. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med*. 2004 Jan;30(1).
64. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *Jama J Am Med Assoc*. 2012 Jun 20;307(23):2526–33.
65. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1685–93.
66. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000 May 4;342(18):1334–49.
67. Pepe PE. The clinical entity of adult respiratory distress syndrome. Definition, prediction, and prognosis. *Crit Care Clin*. 1986 Jul;2(3).
68. Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, Rinaldo JE, Tate RM, Sibbald WJ, et al. High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 1987 Dec 17;317(25):1565–70.
69. Phua J, Badia JR, Adhikari NKJ, Friedrich JO, Fowler RA, Singh JM, et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Feb 1;179(3):220–7.
70. 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 May 4;342(18):1301–8.
71. Villar J, Kacmarek RM, Perez-Mendez L, Aguirre-Jaime A. A high positive end-expiratory pressure, low tidal volume ventilatory strategy improves outcome in persistent acute respiratory distress syndrome: a randomized, controlled trial. *Crit Care Med*. 2006 May;34(5):1311–8.

72. Zilberberg MD, Epstein SK. Acute lung injury in the medical ICU: comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Apr;157(4 Pt 1):1159–64.
73. Luhr OR, Antonsen K, Karlsson M, Aardal S, Thorsteinsson A, Frostell CG, et al. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Jun;159(6):1849–61.
74. Doyle RL, Szaflarski N, Modin GW, Wiener-Kronish JP, Matthay MA. Identification of patients with acute lung injury. Predictors of mortality. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Dec;152(6 Pt 1):1818–24.
75. Monchi M, Bellenfant F, Cariou A, Joly LM, Thebert D, Laurent I, et al. Early predictive factors of survival in the acute respiratory distress syndrome. A multivariate analysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Oct;158(4):1076–81.
76. Moss M, Bucher B, Moore FA, Moore EE, Parsons PE. The role of chronic alcohol abuse in the development of acute respiratory distress syndrome in adults. *Jama J Am Med Assoc.* 1996 Jan 3;275(1):50–4.
77. Calfee CS, Matthay MA, Eisner MD, Benowitz N, Call M, Pittet J-F, et al. Active and passive cigarette smoking and acute lung injury after severe blunt trauma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 Jun 15;183(12):1660–5.
78. Nuckton TJ, Alonso JA, Kallet RH, Daniel BM, Pittet J-F, Eisner MD, et al. Pulmonary dead-space fraction as a risk factor for death in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2002 Apr 25;346(17):1281–6.
79. Squara P, Dhainaut JF, Artigas A, Carlet J. Hemodynamic profile in severe ARDS: results of the European Collaborative ARDS Study. *Intensive Care Med.* 1998 Oct;24(10):1018–28.
80. Boissier F, Katsahian S, Razazi K, Thille AW, Roche-Campo F, Leon R, et al. Prevalence and prognosis of cor pulmonale during protective ventilation for acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 2013 Oct;39(10):1725–33.
81. Bull TM, Clark B, McFann K, Moss M, National Institutes of Health/National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Network. Pulmonary vascular dysfunction is associated with poor outcomes in patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Nov 1;182(9):1123–8.
82. Osman D, Monnet X, Castelain V, Anguel N, Warszawski J, Teboul J-L, et al. Incidence and prognostic value of right ventricular failure in acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 2009 Jan;35(1).
83. Cooke CR, Kahn JM, Caldwell E, Okamoto VN, Heckbert SR, Hudson LD, et al. Predictors of hospital mortality in a population-based cohort of patients with acute lung injury. *Crit Care Med.* 2008 May;36(5):1412–20.
84. Cooke CR, Shah CV, Gallop R, Bellamy S, Ancukiewicz M, Eisner MD, et al. A simple clinical predictive index for objective estimates of mortality in acute lung injury. *Crit Care Med.* 2009 Jun;37(6):1913–20.
85. Brower RG, Lanken PN, MacIntyre N, Matthay MA, Morris A, Ancukiewicz M, et al. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 2004 Jul 22;351(4):327–36.

86. Donahoe M. Acute respiratory distress syndrome: A clinical review. *Pulm Circ.* 2011 Jun;1(2).
87. Calfee CS, Ware LB, Glidden DV, Eisner MD, Parsons PE, Thompson BT, et al. Use of risk reclassification with multiple biomarkers improves mortality prediction in acute lung injury. *Crit Care Med.* 2011 Apr;39(4):711–7.
88. Rouby JJ, Puybasset L, Cluzel P, Richecoeur J, Lu Q, Grenier P. Regional distribution of gas and tissue in acute respiratory distress syndrome. II. Physiological correlations and definition of an ARDS Severity Score. CT Scan ARDS Study Group. *Intensive Care Med.* 2000 Aug;26(8):1046–56.
89. Gattinoni L, Caironi P, Valenza F, Carlesso E. The role of CT-scan studies for the diagnosis and therapy of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med.* 2006 Dec;27(4):559–570; abstract vii.
90. Gao L, Barnes KC. Recent advances in genetic predisposition to clinical acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009 May;296(5):L713–725.
91. Pratt PC, Vollmer RT, Shelburne JD, Crapo JD. Pulmonary morphology in a multihospital collaborative extracorporeal membrane oxygenation project. I. Light microscopy. *Am J Pathol.* 1979 Apr;95(1).
92. Piantadosi CA, Schwartz DA. The acute respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med.* 2004 Sep 21;141(6):460–70.
93. Greene KE, Wright JR, Steinberg KP, Ruzinski JT, Caldwell E, Wong WB, et al. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Dec;160(6):1843–50.
94. Gibbs DF, Shanley TP, Warner RL, Murphy HS, Varani J, Johnson KJ. Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. Evidence for alveolar macrophage as source of proteinases. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Jun;20(6):1145–54.
95. Domenici-Lombardo L, Adembri C, Consalvo M, Forzini R, Meucci M, Romagnoli P, et al. Evolution of endotoxin induced acute lung injury in the rat. *Int J Exp Pathol.* 1995 Oct;76(5):381–90.
96. Grau GE, Mili N, Lou JN, Morel DR, Ricou B, Lucas R, et al. Phenotypic and functional analysis of pulmonary microvascular endothelial cells from patients with acute respiratory distress syndrome. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* 1996 Apr;74(4):761–70.
97. Moraes TJ, Zurawska JH, Downey GP. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr Opin Hematol.* 2006 Jan;13(1):21–7.
98. Moriuchi H, Zaha M, Fukumoto T, Yuizono T. Activation of polymorphonuclear leukocytes in oleic acid-induced lung injury. *Intensive Care Med.* 1998 Jul;24(7):709–15.
99. Chabot F, Mitchell JA, Gutteridge JM, Evans TW. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J.* 1998 Mar;11(3):745–57.
100. Matute-Bello G, Liles WC, Radella F 2nd, Steinberg KP, Ruzinski JT, Hudson LD, et al. Modulation of neutrophil apoptosis by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during the course of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2000 Jan;28(1).

101. Kuhn C 3rd, Boldt J, King TEJ, Crouch E, Vartio T, McDonald JA. An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis.* 1989 Dec;140(6):1693–703.
102. Lotz M, Guerne PA. Interleukin-6 induces the synthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases-1/erythroid potentiating activity (TIMP-1/EPA). *J Biol Chem.* 1991 Feb 5;266(4):2017–20.
103. Meduri GU. The role of the host defence response in the progression and outcome of ARDS: pathophysiological correlations and response to glucocorticoid treatment. *Eur Respir J.* 1996 Dec;9(12):2650–70.
104. Lazenby AJ, Crouch EC, McDonald JA, Kuhn C 3rd. Remodeling of the lung in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. An immunohistochemical study of laminin, type IV collagen, and fibronectin. *Am Rev Respir Dis.* 1990 Jul;142(1):206–14.
105. Matthay MA, Wiener-Kronish JP. Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans. *Am Rev Respir Dis.* 1990 Dec;142(6 Pt 1):1250–7.
106. Rhodes GC, Lykke AW, Tapsall JW, Smith LW. Abnormal alveolar epithelial repair associated with failure of resolution in experimental streptococcal pneumonia. *J Pathol.* 1989 Nov;159(3):245–53.
107. Rhodes GC, Tapsall JW, Lykke AW. Alveolar epithelial responses in experimental streptococcal pneumonia. *J Pathol.* 1989 Apr;157(4):347–57.
108. Geiser T, Jarreau PH, Atabai K, Matthay MA. Interleukin-1beta augments in vitro alveolar epithelial repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Dec;279(6):L1184–1190.
109. Geiser T, Atabai K, Jarreau PH, Ware LB, Pugin J, Matthay MA. Pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury augments in vitro alveolar epithelial repair by an IL-1beta-dependent mechanism. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 May;163(6):1384–8.
110. Usha S, Maya A, Balakrishnan A. Mitogenic stimulation of primary cultures of lung epithelial cells by linoleic acid. *Biochem Cell Biol Biochim Biol Cell.* 1996;74(2):289–93.
111. Ware LB, Matthay MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 May;282(5):L924–940.
112. Ulrich K, Stern M, Goddard ME, Williams J, Zhu J, Dewar A, et al. Keratinocyte growth factor therapy in murine oleic acid-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 Jun;288(6):L1179–1192.
113. Bardales RH, Xie SS, Schaefer RF, Hsu SM. Apoptosis is a major pathway responsible for the resolution of type II pneumocytes in acute lung injury. *Am J Pathol.* 1996 Sep;149(3):845–52.
114. Fehrenbach H, Kasper M, Tschernig T, Pan T, Schuh D, Shannon JM, et al. Keratinocyte growth factor-induced hyperplasia of rat alveolar type II cells in vivo is resolved by differentiation into type I cells and by apoptosis. *Eur Respir J.* 1999 Sep;14(3):534–44.
115. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol.* 1995 Jan;146(1).
116. Toews GB. Cellular alterations in fibroproliferative lung disease. *Chest.* 1999 Jul;116(1 Suppl).

117. Hofstra J-JH, Haitisma JJ, Juffermans NP, Levi M, Schultz MJ. The role of bronchoalveolar hemostasis in the pathogenesis of acute lung injury. *Semin Thromb Hemost.* 2008 Jul;34(5):475–84.
118. Corbel M, Boichot E, Lagente V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol Soc Bras Biofisica Al.* 2000 Jul;33(7):749–54.
119. Bitterman PB. Pathogenesis of fibrosis in acute lung injury. *Am J Med.* 1992 Jun 22;92(6A).
120. Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis.* 1974 Nov;110(5):556–65.
121. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis.* 1988 May;137(5):1159–64.
122. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med.* 2013 Feb;41(2).
123. Esteban A, Frutos-Vivar F, Muriel A, Ferguson ND, Penuelas O, Abaira V, et al. Evolution of mortality over time in patients receiving mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Jul 15;188(2):220–30.
124. 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 Jan 15;165(2):242–9.
125. Parsons PE, Eisner MD, Thompson BT, Matthay MA, Ancukiewicz M, Bernard GR, et al. Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury. *Crit Care Med.* 2005 Jan;33(1):1–6; discussion 230–232.
126. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, et al. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *Jama J Am Med Assoc.* 1999 Jul 7;282(1):54–61.
127. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest.* 1997 Mar 1;99(5):944–52.
128. Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, de Perrot M, Fischer S, Edwards V, et al. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *Jama J Am Med Assoc.* 2003 Apr 23;289(16):2104–12.
129. Gurkan OU, O'Donnell C, Brower R, Ruckdeschel E, Becker PM. Differential effects of mechanical ventilatory strategy on lung injury and systemic organ inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Sep;285(3):L710–718.
130. Boussarsar M, Thierry G, Jaber S, Roudot-Thoraval F, Lemaire F, Brochard L. Relationship between ventilatory settings and barotrauma in the acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 2002 Apr;28(4):406–13.

131. Mercat A, Richard J-CM, Vielle B, Jaber S, Osman D, Diehl J-L, et al. Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *Jama J Am Med Assoc.* 2008 Feb 13;299(6):646–55.
132. Esteban A, Ferguson ND, Meade MO, Frutos-Vivar F, Apezteguia C, Brochard L, et al. Evolution of mechanical ventilation in response to clinical research. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008 Jan 15;177(2):170–7.
133. Hickling KG, Henderson SJ, Jackson R. Low mortality associated with low volume pressure limited ventilation with permissive hypercapnia in severe adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 1990;16(6):372–7.
134. Muscedere JG, Mullen JB, Gan K, Slutsky AS. Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994 May;149(5):1327–34.
135. Richard JC, Maggiore SM, Jonson B, Mancebo J, Lemaire F, Brochard L. Influence of tidal volume on alveolar recruitment. Respective role of PEEP and a recruitment maneuver. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Jun;163(7):1609–13.
136. Meade MO, Cook DJ, Guyatt GH, Slutsky AS, Arabi YM, Cooper DJ, et al. Ventilation strategy using low tidal volumes, recruitment maneuvers, and high positive end-expiratory pressure for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *Jama J Am Med Assoc.* 2008 Feb 13;299(6):637–45.
137. Briel M, Meade M, Mercat A, Brower RG, Talmor D, Walter SD, et al. Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. *Jama J Am Med Assoc.* 2010 Mar 3;303(9):865–73.
138. Fujino Y, Goddon S, Dolhnikoff M, Hess D, Amato MB, Kacmarek RM. Repetitive high-pressure recruitment maneuvers required to maximally recruit lung in a sheep model of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 2001 Aug;29(8):1579–86.
139. Halter JM, Steinberg JM, Schiller HJ, DaSilva M, Gatto LA, Landas S, et al. Positive end-expiratory pressure after a recruitment maneuver prevents both alveolar collapse and recruitment/derecruitment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Jun 15;167(12):1620–6.
140. Allen GB, Suratt BT, Rinaldi L, Petty JM, Bates JHT. Choosing the frequency of deep inflation in mice: balancing recruitment against ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Oct;291(4):L710–717.
141. Hansen LK, Sloth E, Nielsen J, Koefoed-Nielsen J, Lambert P, Lunde S, et al. Selective recruitment maneuvers for lobar atelectasis: effects on lung function and central hemodynamics: an experimental study in pigs. *Anesth Analg.* 2006 May;102(5):1504–10.
142. Thammanomai A, Hueser LE, Majumdar A, Bartolak-Suki E, Suki B. Design of a new variable-ventilation method optimized for lung recruitment in mice. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2008 May;104(5):1329–40.
143. Cannizzaro V, Berry LJ, Nicholls PK, Zosky GR, Turner DJ, Hantos Z, et al. Lung volume recruitment maneuvers and respiratory system mechanics in mechanically ventilated mice. *Respir Physiol Neurobiol.* 2009 Dec 31;169(3):243–51.
144. Grasso S, Mascia L, Del Turco M, Malacarne P, Giunta F, Brochard L, et al. Effects of recruiting maneuvers in patients with acute respiratory distress syndrome ventilated with protective ventilatory strategy. *Anesthesiology.* 2002 Apr;96(4).

145. Brower RG, Morris A, MacIntyre N, Matthay MA, Hayden D, Thompson T, et al. Effects of recruitment maneuvers in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome ventilated with high positive end-expiratory pressure. *Crit Care Med*. 2003 Nov;31(11):2592–7.
146. Oczenski W, Hormann C, Keller C, Lorenzl N, Kepka A, Schwarz S, et al. Recruitment maneuvers after a positive end-expiratory pressure trial do not induce sustained effects in early adult respiratory distress syndrome. *Anesthesiology*. 2004 Sep;101(3):620–5.
147. Fan E, Wilcox ME, Brower RG, Stewart TE, Mehta S, Lapinsky SE, et al. Recruitment maneuvers for acute lung injury: a systematic review. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Dec 1;178(11):1156–63.
148. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Sep;295(3):L379–399.
149. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990 Sep 21;249(4975):1431–3.
150. Martin TR, Mathison JC, Tobias PS, Leturcq DJ, Moriarty AM, Maunder RJ, et al. Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lungs. *J Clin Invest*. 1992 Dec;90(6):2209–19.
151. O’Grady NP, Preas HL, Pugin J, Fiuza C, Tropea M, Reda D, et al. Local inflammatory responses following bronchial endotoxin instillation in humans. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Jun;163(7):1591–8.
152. Reutershan J, Basit A, Galkina EV, Ley K. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005 Nov;289(5):L807–815.
153. Smith LS, Gharib SA, Frevert CW, Martin TR. Effects of age on the synergistic interactions between lipopolysaccharide and mechanical ventilation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Oct;43(4):475–86.
154. Altemeier WA, Matute-Bello G, Gharib SA, Glenny RW, Martin TR, Liles WC. Modulation of lipopolysaccharide-induced gene transcription and promotion of lung injury by mechanical ventilation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Sep 1;175(5):3369–76.
155. Altemeier WA, Matute-Bello G, Frevert CW, Kawata Y, Kajikawa O, Martin TR, et al. Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 Sep;287(3):L533–542.
156. O’Mahony DS, Liles WC, Altemeier WA, Dhanireddy S, Frevert CW, Liggitt D, et al. Mechanical ventilation interacts with endotoxemia to induce extrapulmonary organ dysfunction. *Crit Care Lond Engl*. 2006;10(5).
157. Krebs J, Pelosi P, Tsagogiorgas C, Zoeller L, Rocco PRM, Yard B, et al. Open lung approach associated with high-frequency oscillatory or low tidal volume mechanical ventilation improves respiratory function and minimizes lung injury in healthy and injured rats. *Crit Care Lond Engl*. 2010;14(5).

158. Schreiber T, Hueter L, Gaser E, Schmidt B, Schwarzkopf K, Rek H, et al. PEEP has beneficial effects on inflammation in the injured and no deleterious effects on the noninjured lung after unilateral lung acid instillation. *Intensive Care Med.* 2006 May;32(5):740–9.
159. Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, O'Mahony DS, Glenny RW, Martin TR, et al. Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 2006 Aug;86(8):790–9.
160. Vaporidi K, Voloudakis G, Priniannakis G, Kondili E, Koutsopoulos A, Tsatsanis C, et al. Effects of respiratory rate on ventilator-induced lung injury at a constant PaCO₂ in a mouse model of normal lung. *Crit Care Med.* 2008 Apr;36(4):1277–83.
161. Tomashefski JFJ, Davies P, Boggis C, Greene R, Zapol WM, Reid LM. The pulmonary vascular lesions of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Pathol.* 1983 Jul;112(1):112–26.
162. Schnells G, Voigt WH, Redl H, Schlag G, Glatzl A. Electron-microscopic investigation of lung biopsies in patients with post-traumatic respiratory insufficiency. *Acta Chir Scand Suppl.* 1980;499.
163. Sabharwal AK, Bajaj SP, Ameri A, Tricomi SM, Hyers TM, Dahms TE, et al. Tissue factor pathway inhibitor and von Willebrand factor antigen levels in adult respiratory distress syndrome and in a primate model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 Mar;151(3 Pt 1):758–67.
164. Ware LB, Eisner MD, Thompson BT, Parsons PE, Matthay MA. Significance of von Willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Oct 1;170(7):766–72.
165. Casey L, Krieger B, Kohler J, Rice C, Oparil S, Szidon P. Decreased serum angiotensin converting enzyme in adult respiratory distress syndrome associated with sepsis: a preliminary report. *Crit Care Med.* 1981 Sep;9(9):651–4.
166. Orfanos SE, Armaganidis A, Glynos C, Psevdi E, Kaltsas P, Sarafidou P, et al. Pulmonary capillary endothelium-bound angiotensin-converting enzyme activity in acute lung injury. *Circulation.* 2000 Oct 17;102(16):2011–8.
167. Bhandari V, Choo-Wing R, Harijith A, Sun H, Syed MA, Homer RJ, et al. Increased hyperoxia-induced lung injury in nitric oxide synthase 2 null mice is mediated via angiotensin 2. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 May;46(5):668–76.
168. Calfee CS, Gallagher D, Abbott J, Thompson BT, Matthay MA. Plasma angiotensin-2 in clinical acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Crit Care Med.* 2012 Jun;40(6):1731–7.
169. Ong T, McClintock DE, Kallet RH, Ware LB, Matthay MA, Liu KD. Ratio of angiotensin-2 to angiotensin-1 as a predictor of mortality in acute lung injury patients. *Crit Care Med.* 2010 Sep;38(9):1845–51.
170. Albelda SM, Smith CW, Ward PA. Adhesion molecules and inflammatory injury. *Faseb J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 1994 May;8(8):504–12.
171. Azuma A, Takahashi S, Nose M, Araki K, Araki M, Takahashi T, et al. Role of E-selectin in bleomycin induced lung fibrosis in mice. *Thorax.* 2000 Feb;55(2):147–52.

172. Folch E, Salas A, Panes J, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Anderson DC, et al. Role of P-selectin and ICAM-1 in pancreatitis-induced lung inflammation in rats: significance of oxidative stress. *Ann Surg.* 1999 Dec;230(6):792–8; discussion 798–799.
173. Sato N, Suzuki Y, Nishio K, Suzuki K, Naoki K, Takeshita K, et al. Roles of ICAM-1 for abnormal leukocyte recruitment in the microcirculation of bleomycin-induced fibrotic lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 May;161(5):1681–8.
174. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007 Sep;7(9):678–89.
175. Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Apr;280(4):C719–741.
176. Hordijk PL. Endothelial signalling events during leukocyte transmigration. *Febs J.* 2006 Oct;273(19):4408–15.
177. Zarbock A, Singbartl K, Ley K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. *J Clin Invest.* 2006 Dec;116(12):3211–9.
178. Scarpati EM, Sadler JE. Regulation of endothelial cell coagulant properties. Modulation of tissue factor, plasminogen activator inhibitors, and thrombomodulin by phorbol 12-myristate. *J Biol Chem.* 1989 Dec 5;264(34):20705–13.
179. Kiefmann R, Heckel K, Schenkat S, Dorger M, Wesierska-Gadek J, Goetz AE. Platelet-endothelial cell interaction in pulmonary micro-circulation: the role of PARS. *Thromb Haemost.* 2004 Apr;91(4):761–70.
180. Morel DR, Dargent F, Bachmann M, Suter PM, Junod AF. Pulmonary extraction of serotonin and propranolol in patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1985 Sep;132(3):479–84.
181. Brandt E, Petersen F, Ludwig A, Ehlert JE, Bock L, Flad HD. The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *J Leukoc Biol.* 2000 Apr;67(4):471–8.
182. Powe JE, Short A, Sibbald WJ, Driedger AA. Pulmonary accumulation of polymorphonuclear leukocytes in the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 1982 Nov;10(11):712–8.
183. Yoshida K, Kondo R, Wang Q, Doerschuk CM. Neutrophil cytoskeletal rearrangements during capillary sequestration in bacterial pneumonia in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Sep 15;174(6):689–98.
184. 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 Mar;34(3):871–7.
185. Levi M, ten Cate H, van der Poll T. Endothelium: interface between coagulation and inflammation. *Crit Care Med.* 2002 May;30(5 Suppl):S220–224.
186. 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. *Thromb Haemost.* 1997 Mar;77(3):585–90.

187. Hill JD, Ratliff JL, Parrott JC, Lamy M, Fallat RJ, Koeniger E, et al. Pulmonary pathology in acute respiratory insufficiency: lung biopsy as a diagnostic tool. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1976 Jan;71(1).
188. Zapol WM, Kobayashi K, Snider MT, Greene R, Laver MB. Vascular obstruction causes pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *Chest.* 1977 Feb;71(2 suppl):306–7.
189. Bachofen M, Weibel ER. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis.* 1977 Oct;116(4).
190. Greene R, Zapol WM, Snider MT, Reid L, Snow R, O’Connell RS, et al. Early bedside detection of pulmonary vascular occlusion during acute respiratory failure. *Am Rev Respir Dis.* 1981 Nov;124(5).
191. Dudek SM, Garcia JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2001 Oct;91(4):1487–500.
192. Stasek JEJ, Patterson CE, Garcia JG. Protein kinase C phosphorylates caldesmon⁷⁷ and vimentin and enhances albumin permeability across cultured bovine pulmonary artery endothelial cell monolayers. *J Cell Physiol.* 1992 Oct;153(1).
193. Angelini DJ, Hyun S-W, Grigoryev DN, Garg P, Gong P, Singh IS, et al. TNF-alpha increases tyrosine phosphorylation of vascular endothelial cadherin and opens the paracellular pathway through fyn activation in human lung endothelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Dec;291(6):L1232–1245.
194. Sinclair DG, Braude S, Haslam PL, Evans TW. Pulmonary endothelial permeability in patients with severe lung injury. Clinical correlates and natural history. *Chest.* 1994 Aug;106(2):535–9.
195. Brimiouille S, LeJeune P, Naeije R. Effects of hypoxic pulmonary vasoconstriction on pulmonary gas exchange. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1996 Oct;81(4):1535–43.
196. Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2005 Jan;98(1).
197. Brimiouille S, Julien V, Gust R, Kozlowski JK, Naeije R, Schuster DP. Importance of hypoxic vasoconstriction in maintaining oxygenation during acute lung injury. *Crit Care Med.* 2002 Apr;30(4):874–80.
198. Bernard GR, Reines HD, Halushka PV, Higgins SB, Metz CA, Swindell BB, et al. Prostacyclin and thromboxane A₂ formation is increased in human sepsis syndrome. Effects of cyclooxygenase inhibition. *Am Rev Respir Dis.* 1991 Nov;144(5):1095–101.
199. Peterson MB, Huttemeier PC, Zapol WM, Martin EG, Watkins WD. Thromboxane mediates acute pulmonary hypertension in sheep extracorporeal perfusion. *Am J Physiol.* 1982 Sep;243(3):H471–479.
200. Huttemeier PC, Watkins WD, Peterson MB, Zapol WM. Acute pulmonary hypertension and lung thromboxane release after endotoxin infusion in normal and leukopenic sheep. *Circ Res.* 1982 May;50(5):688–94.
201. Gillis CN, Pitt BR, Wiedemann HP, Hammond GL. Depressed prostaglandin E₁ and 5-hydroxytryptamine removal in patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1986 Oct;134(4):739–44.

202. Wort SJ, Evans TW. The role of the endothelium in modulating vascular control in sepsis and related conditions. *Br Med Bull.* 1999;55(1).
203. Dupuis J, Stewart DJ, Cernacek P, Gosselin G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation.* 1996 Oct 1;94(7):1578–84.
204. Mawji IA, Marsden PA. Perturbations in paracrine control of the circulation: role of the endothelial-derived vasomediators, endothelin-1 and nitric oxide. *Microsc Res Tech.* 2003 Jan 1;60(1).
205. Wort SJ, Ito M, Chou P-C, Mc Master SK, Badiger R, Jazrawi E, et al. Synergistic induction of endothelin-1 by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma is due to enhanced NF-kappaB binding and histone acetylation at specific kappaB sites. *J Biol Chem.* 2009 Sep 4;284(36):24297–305.
206. Druml W, Steltzer H, Waldhausl W, Lenz K, Hammerle A, Vierhapper H, et al. Endothelin-1 in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Nov;148(5):1169–73.
207. Sanai L, Haynes WG, MacKenzie A, Grant IS, Webb DJ. Endothelin production in sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 1996 Jan;22(1):52–6.
208. Langleben D, DeMarchie M, Laporta D, Spanier AH, Schlesinger RD, Stewart DJ. Endothelin-1 in acute lung injury and the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Dec;148(6 Pt 1):1646–50.
209. Hubloue I, Biarent D, Abdel Kafi S, Bejjani G, Melot C, Naeije R, et al. Endothelin receptor blockade in canine oleic acid-induced lung injury. *Intensive Care Med.* 2003 Jun;29(6):1003–6.
210. Fagan KA, Tyler RC, Sato K, Fouty BW, Morris KG Jr, Huang PL, et al. Relative contributions of endothelial, inducible, and neuronal NOS to tone in the murine pulmonary circulation. *Am J Physiol.* 1999 Sep;277(3 Pt 1):L472–478.
211. Lange M, Connelly R, Traber DL, Hamahata A, Nakano Y, Esechie A, et al. Time course of nitric oxide synthases, nitrosative stress, and poly(ADP ribosylation) in an ovine sepsis model. *Crit Care Lond Engl.* 2010;14(4).
212. Griffiths MJ, Liu S, Curzen NP, Messent M, Evans TW. In vivo treatment with endotoxin induces nitric oxide synthase in rat main pulmonary artery. *Am J Physiol.* 1995 Mar;268(3 Pt 1):L509–518.
213. Aaronson PI, Robertson TP, Ward JPT. Endothelium-derived mediators and hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respir Physiol Neurobiol.* 2002 Aug 22;132(1):107–20.
214. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 1988 Jun 16;333(6174):664–6.
215. Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation.* 1994 May;89(5):2035–40.
216. Liu SF, Crawley DE, Barnes PJ, Evans TW. Endothelium-derived relaxing factor inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *Am Rev Respir Dis.* 1991 Jan;143(1):32–7.
217. Peng HB, Rajavashisth TB, Libby P, Liao JK. Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995 Jul 14;270(28):17050–5.

218. Garrean S, Gao X-P, Brovkovich V, Shimizu J, Zhao Y-Y, Vogel SM, et al. Caveolin-1 regulates NF-kappaB activation and lung inflammatory response to sepsis induced by lipopolysaccharide. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2006 Oct 1;177(7):4853–60.
219. Kaminski A, Kasch C, Zhang L, Kumar S, Sponholz C, Choi Y-H, et al. Endothelial nitric oxide synthase mediates protective effects of hypoxic preconditioning in lungs. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007 Mar 15;155(3):280–5.
220. Kaminski A, Pohl CB, Sponholz C, Ma N, Stamm C, Vollmar B, et al. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase inhibits pulmonary leukocyte migration following lung ischemia-reperfusion in mice. *Am J Pathol*. 2004 Jun;164(6):2241–9.
221. Takenaka K, Nishimura Y, Nishiuma T, Sakashita A, Yamashita T, Kobayashi K, et al. Ventilator-induced lung injury is reduced in transgenic mice that overexpress endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Jun;290(6):L1078–1086.
222. Yamashita T, Kawashima S, Ohashi Y, Ozaki M, Rikitake Y, Inoue N, et al. Mechanisms of reduced nitric oxide/cGMP-mediated vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension*. 2000 Jul;36(1).
223. Zhang L, Kumar S, Kaminski A, Kasch C, Sponholz C, Stamm C, et al. Importance of endothelial nitric oxide synthase for the hypothermic protection of lungs against ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 May;131(5):969–74.
224. Forstermann U, Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 2006 Apr 4;113(13):1708–14.
225. Gow AJ, Thom SR, Ischiropoulos H. Nitric oxide and peroxynitrite-mediated pulmonary cell death. *Am J Physiol*. 1998 Jan;274(1 Pt 1):L112–118.
226. Peng X, Abdulnour R-EE, Sammani S, Ma S-F, Han EJ, Hasan EJ, et al. Inducible nitric oxide synthase contributes to ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Aug 15;172(4):470–9.
227. Brett SJ, Evans TW. Measurement of endogenous nitric oxide in the lungs of patients with the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Mar;157(3 Pt 1):993–7.
228. Fischer LG, Horstman DJ, Hahnenkamp K, Kechner NE, Rich GF. Selective iNOS inhibition attenuates acetylcholine- and bradykinin-induced vasoconstriction in lipopolysaccharide-exposed rat lungs. *Anesthesiology*. 1999 Dec;91(6):1724–32.
229. Frank DU, Lowson SM, Roos CM, Rich GF. Endotoxin alters hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat lungs. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1996 Sep;81(3):1316–22.
230. Griffiths MJ, Curzen NP, Mitchell JA, Evans TW. In vivo treatment with endotoxin increases rat pulmonary vascular contractility despite NOS induction. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Aug;156(2 Pt 1):654–8.
231. Fullerton DA, McIntyre RCJ, Hahn AR, Agrafojo J, Koike K, Meng X, et al. Dysfunction of cGMP-mediated pulmonary vasorelaxation in endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Physiol*. 1995 Jun;268(6 Pt 1):L1029–1035.
232. Menendez C, Martinez-Caro L, Moreno L, Nin N, Moral-Sanz J, Morales D, et al. Pulmonary vascular dysfunction induced by high tidal volume mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 2013 Aug;41(8):e149–155.

233. Sheridan BC, Dinarello CA, Meldrum DR, Fullerton DA, Selzman CH, McIntyre RCJ. Interleukin-11 attenuates pulmonary inflammation and vasomotor dysfunction in endotoxin-induced lung injury. *Am J Physiol*. 1999 Nov;277(5 Pt 1):L861–867.
234. Kandilci HB, Gumusel B, Topaloglu E, Ucar G, Korkusuz P, Ugur Y, et al. Effects of ischemic preconditioning on rat lung: role of nitric oxide. *Exp Lung Res*. 2006 Aug;32(7).
235. Fuhrman BP, Smith-Wright DL, Venkataraman S, Howland DF. Pulmonary vascular resistance after cessation of positive end-expiratory pressure. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1989 Feb;66(2):660–8.
236. Venkataraman ST, Fuhrman BP, Howland DF, DeFrancis M. Positive end-expiratory pressure-induced, calcium-channel-mediated increases in pulmonary vascular resistance in neonatal lambs. *Crit Care Med*. 1993 Jul;21(7):1066–76.
237. Leeman M, Lejeune P, Closset J, Vachiere JL, Melot C, Naeije R. Nature of pulmonary hypertension in canine oleic acid pulmonary edema. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1990 Jul;69(1):293–8.
238. Leeman M, Lejeune P, Closset J, Vachiere JL, Melot C, Naeije R. Effects of PEEP on pulmonary hemodynamics in intact dogs with oleic acid pulmonary edema. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1990 Dec;69(6):2190–6.
239. WHITTENBERGER JL, MCGREGOR M, BERGLUND E, BORST HG. Influence of state of inflation of the lung on pulmonary vascular resistance. *J Appl Physiol*. 1960 Sep;15:878–82.
240. Snow RL, Davies P, Pontoppidan H, Zapol WM, Reid L. Pulmonary vascular remodeling in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1982 Nov;126(5):887–92.
241. May M, Strobel P, Preissshofen T, Seidenspinner S, Marx A, Speer CP. Apoptosis and proliferation in lungs of ventilated and oxygen-treated preterm infants. *Eur Respir J*. 2004 Jan;23(1):113–21.
242. Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, Mark EJ, Hales CA, Waxman AB. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2009 Jan 30;104(2):236–244, 28p following 244.
243. Wedgwood S, Dettman RW, Black SM. ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001 Nov;281(5):L1058–1067.
244. Meyrick B, Brigham KL. Repeated *Escherichia coli* endotoxin-induced pulmonary inflammation causes chronic pulmonary hypertension in sheep. Structural and functional changes. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 1986 Aug;55(2):164–76.
245. Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1997 Jan 9;336(2):111–7.
246. Berger M, Haimowitz A, Van Tosh A, Berdoff RL, Goldberg E. Quantitative assessment of pulmonary hypertension in patients with tricuspid regurgitation using continuous wave Doppler ultrasound. *J Am Coll Cardiol*. 1985 Aug;6(2):359–65.
247. Dabestani A, Mahan G, Gardin JM, Takenaka K, Burn C, Allfie A, et al. Evaluation of pulmonary artery pressure and resistance by pulsed Doppler echocardiography. *Am J Cardiol*. 1987 Mar 1;59(6):662–8.

248. Zapol WM, Snider MT. Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *N Engl J Med.* 1977 Mar 3;296(9):476–80.
249. Laver MB, Strauss HW, Pohost GM. Herbert Shubin Memorial Lecture. Right and left ventricular geometry: adjustments during acute respiratory failure. *Crit Care Med.* 1979 Dec;7(12):509–19.
250. Jardin F, Gurdjian F, Fouilladieu JL, Goudot B, Margairaz A. Pulmonary and systemic haemodynamic disorders in the adult respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 1979 Sep;5(3):127–33.
251. Jardin F, Gueret P, Dubourg O, Farcot JC, Margairaz A, Bourdarias JP. Right ventricular volumes by thermodilution in the adult respiratory distress syndrome. A comparative study using two-dimensional echocardiography as a reference method. *Chest.* 1985 Jul;88(1):34–9.
252. Vieillard-Baron A, Schmitt JM, Augarde R, Fellahi JL, Prin S, Page B, et al. Acute cor pulmonale in acute respiratory distress syndrome submitted to protective ventilation: incidence, clinical implications, and prognosis. *Crit Care Med.* 2001 Aug;29(8):1551–5.
253. Pagnamenta A, Bouckaert Y, Wauthy P, Brimiouille S, Naeije R. Continuous versus pulsatile pulmonary hemodynamics in canine oleic acid lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Sep;162(3 Pt 1):936–40.
254. Vieillard-Baron A, Charron C, Caille V, Belliard G, Page B, Jardin F. Prone positioning unloads the right ventricle in severe ARDS. *Chest.* 2007 Nov;132(5):1440–6.
255. Jardin F, Vieillard-Baron A. Is there a safe plateau pressure in ARDS? The right heart only knows. *Intensive Care Med.* 2007 Mar;33(3):444–7.
256. Lheritier G, Legras A, Caille A, Lherm T, Mathonnet A, Frat J-P, et al. Prevalence and prognostic value of acute cor pulmonale and patent foramen ovale in ventilated patients with early acute respiratory distress syndrome: a multicenter study. *Intensive Care Med.* 2013 Oct;39(10):1734–42.
257. Osman D, Monnet X, Castelain V, Anguel N, Warszawski J, Teboul J-L, et al. Incidence and prognostic value of right ventricular failure in acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* 2009 Jan;35(1).
258. Broccard AF, Hotchkiss JR, Kuwayama N, Olson DA, Jamal S, Wangenstein DO, et al. Consequences of vascular flow on lung injury induced by mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998 Jun;157(6 Pt 1):1935–42.
259. Guery BP, DeBoisblanc BP, Fialdes P, Sarphy TG, Nelson S, Chidiac C, et al. Pulmonary stress injury within physiological ranges of airway and vascular pressures. *J Crit Care.* 1998 Jun;13(2).
260. Lopez-Aguilar J, Piacentini E, Villagra A, Murias G, Pascotto S, Saenz-Valiente A, et al. Contributions of vascular flow and pulmonary capillary pressure to ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med.* 2006 Apr;34(4):1106–12.
261. McIntyre KM, Sasahara AA. Determinants of right ventricular function and hemodynamics after pulmonary embolism. *Chest.* 1974 May;65(5):534–43.
262. Kerbaul F, Rondelet B, Motte S, Fesler P, Hubloue I, Ewalenko P, et al. Effects of norepinephrine and dobutamine on pressure load-induced right ventricular failure. *Crit Care Med.* 2004 Apr;32(4):1035–40.

263. Jardin F, Farcot JC, Boisante L, Curien N, Margairaz A, Bourdarias JP. Influence of positive end-expiratory pressure on left ventricular performance. *N Engl J Med*. 1981 Feb 12;304(7):387–92.
264. Dhainaut JF, Devaux JY, Monsallier JF, Brunet F, Villemant D, Huyghebaert MF. Mechanisms of decreased left ventricular preload during continuous positive pressure ventilation in ARDS. *Chest*. 1986 Jul;90(1).
265. Sibbald WJ, Driedger AA. Right ventricular function in acute disease states: pathophysiologic considerations. *Crit Care Med*. 1983 May;11(5):339–45.
266. Vlahakes GJ, Turley K, Hoffman JI. The pathophysiology of failure in acute right ventricular hypertension: hemodynamic and biochemical correlations. *Circulation*. 1981 Jan;63(1).
267. Potkin RT, Hudson LD, Weaver LJ, Trobaugh G. Effect of positive end-expiratory pressure on right and left ventricular function in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*. 1987 Feb;135(2):307–11.
268. Mekontso Dessap A, Charron C, Devaquet J, Aboab J, Jardin F, Brochard L, et al. Impact of acute hypercapnia and augmented positive end-expiratory pressure on right ventricle function in severe acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med*. 2009 Nov;35(11):1850–8.
269. BORST HG, WHITTENBERGER JL, BERGLUND E, MCGREGOR M. Effects of unilateral hypoxia and hypercapnia on pulmonary blood flow distribution in the dog. *Am J Physiol*. 1957 Dec;191(3):446–52.
270. Balanos GM, Talbot NP, Dorrington KL, Robbins PA. Human pulmonary vascular response to 4 h of hypercapnia and hypocapnia measured using Doppler echocardiography. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2003 Apr;94(4):1543–51.
271. Kiely DG, Cargill RI, Lipworth BJ. Effects of hypercapnia on hemodynamic, inotropic, lusitropic, and electrophysiologic indices in humans. *Chest*. 1996 May;109(5):1215–21.
272. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science*. 1992 Jul 17;257(5068):387–9.
273. Price LC, Wort SJ, Finney SJ, Marino PS, Brett SJ. Pulmonary vascular and right ventricular dysfunction in adult critical care: current and emerging options for management: a systematic literature review. *Crit Care Lond Engl*. 2010;14(5).
274. Zuurbier CJ, Emons VM, Ince C. Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Jun;282(6):H2099–2105.
275. Lachmann B. Open up the lung and keep the lung open. *Intensive Care Med*. 1992;18(6):319–21.
276. Lim S-C, Adams AB, Simonson DA, Dries DJ, Broccard AF, Hotchkiss JR, et al. Transient hemodynamic effects of recruitment maneuvers in three experimental models of acute lung injury. *Crit Care Med*. 2004 Dec;32(12):2378–84.
277. Nielsen J, Nilsson M, Freden F, Hultman J, Alstrom U, Kjaergaard J, et al. Central hemodynamics during lung recruitment maneuvers at hypovolemia, normovolemia and hypervolemia. A study by echocardiography and continuous pulmonary artery flow measurements in lung-injured pigs. *Intensive Care Med*. 2006 Apr;32(4):585–94.

278. Odenstedt H, Aneman A, Karason S, Stenqvist O, Lundin S. Acute hemodynamic changes during lung recruitment in lavage and endotoxin-induced ALI. *Intensive Care Med.* 2005 Jan;31(1):112–20.
279. Raaz U, Kuhn H, Wirtz H, Hammerschmidt S. Rapamycin reduces high-amplitude, mechanical stretch-induced apoptosis in pulmonary microvascular endothelial cells. *Microvasc Res.* 2009 May;77(3).
280. Birukova AA, Chatchavalvanich S, Rios A, Kawkitinarong K, Garcia JGN, Birukov KG. Differential regulation of pulmonary endothelial monolayer integrity by varying degrees of cyclic stretch. *Am J Pathol.* 2006 May;168(5):1749–61.
281. Birukova AA, Rios A, Birukov KG. Long-term cyclic stretch controls pulmonary endothelial permeability at translational and post-translational levels. *Exp Cell Res.* 2008 Nov 15;314(19):3466–77.
282. Iwaki M, Ito S, Morioka M, Iwata S, Numaguchi Y, Ishii M, et al. Mechanical stretch enhances IL-8 production in pulmonary microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Nov 20;389(3):531–6.
283. Silva PL, Moraes L, Santos RS, Samary C, Ramos MBA, Santos CL, et al. Recruitment maneuvers modulate epithelial and endothelial cell response according to acute lung injury etiology. *Crit Care Med.* 2013 Oct;41(10):e256–265.
284. Zagorski J, Sanapareddy N, Gellar MA, Kline JA, Watts JA. Transcriptional profile of right ventricular tissue during acute pulmonary embolism in rats. *Physiol Genomics.* 2008 Jun 12;34(1):101–11.
285. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J.* 1998 Sep 1;334 (Pt 2).
286. Jones MR, Quinton LJ, Simms BT, Lupa MM, Kogan MS, Mizgerd JP. Roles of interleukin-6 in activation of STAT proteins and recruitment of neutrophils during *Escherichia coli* pneumonia. *J Infect Dis.* 2006 Feb 1;193(3):360–9.
287. Dalrymple SA, Slattery R, Aud DM, Krishna M, Lucian LA, Murray R. Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun.* 1996 Aug;64(8):3231–5.
288. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 1998 Jan 15;101(2):311–20.
289. O'Malley K, Moldawer LL. Interleukin-6: Still crazy after all these years. *Crit Care Med.* 2006 Oct;34(10):2690–1.
290. Peters M, Blinn G, Solem F, Fischer M, Meyer zum Buschenfelde KH, Rose-John S. In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1998 Oct 1;161(7):3575–81.
291. Arikian AA, Yu B, Mastrangelo M-A, Tweardy DJ. Interleukin-6 treatment reverses apoptosis and blunts susceptibility to intraperitoneal bacterial challenge following hemorrhagic shock. *Crit Care Med.* 2006 Mar;34(3):771–7.

292. Tasaka S, Inoue K-I, Miyamoto K, Nakano Y, Kamata H, Shinoda H, et al. Role of interleukin-6 in elastase-induced lung inflammatory changes in mice. *Exp Lung Res.* 2010 Aug;36(6):362–72.
293. Schrader LI, Kinzenbaw DA, Johnson AW, Faraci FM, Didion SP. IL-6 deficiency protects against angiotensin II induced endothelial dysfunction and hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Dec;27(12):2576–81.
294. Kinugawa K, Takahashi T, Kohmoto O, Yao A, Aoyagi T, Momomura S, et al. Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on $[Ca^{2+}]_i$ and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. *Circ Res.* 1994 Aug;75(2):285–95.
295. Yu X, Kennedy RH, Liu SJ. JAK2/STAT3, not ERK1/2, mediates interleukin-6-induced activation of inducible nitric-oxide synthase and decrease in contractility of adult ventricular myocytes. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):16304–9.
296. Yu X-W, Chen Q, Kennedy RH, Liu SJ. Inhibition of sarcoplasmic reticular function by chronic interleukin-6 exposure via iNOS in adult ventricular myocytes. *J Physiol.* 2005 Jul 15;566(Pt 2):327–40.
297. Bhagat K, Hingorani AD, Palacios M, Charles IG, Vallance P. Cytokine-induced venodilatation in humans in vivo: eNOS masquerading as iNOS. *Cardiovasc Res.* 1999 Mar;41(3):754–64.
298. Vaughan DJ, Brogan TV, Kerr ME, Deem S, Luchtel DL, Swenson ER. Contributions of nitric oxide synthase isozymes to exhaled nitric oxide and hypoxic pulmonary vasoconstriction in rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 May;284(5):L834–843.
299. Nin N, Lorente JA, De Paula M, Fernandez-Segoviano P, Penuelas O, Sanchez-Ferrer A, et al. Aging increases the susceptibility to injurious mechanical ventilation. *Intensive Care Med.* 2008 May;34(5):923–31.
300. Gomez CR, Hirano S, Cutro BT, Birjandi S, Baila H, Nomellini V, et al. Advanced age exacerbates the pulmonary inflammatory response after lipopolysaccharide exposure. *Crit Care Med.* 2007 Jan;35(1):246–51.
301. Setzer F, Oschatz K, Hueter L, Schmidt B, Schwarzkopf K, Schreiber T. Susceptibility to ventilator induced lung injury is increased in senescent rats. *Crit Care Lond Engl.* 2013 May 27;17(3).
302. Turnbull IR, Clark AT, Stromberg PE, Dixon DJ, Woolsey CA, Davis CG, et al. Effects of aging on the immunopathologic response to sepsis. *Crit Care Med.* 2009 Mar;37(3):1018–23.
303. Saito H, Sherwood ER, Varma TK, Evers BM. Effects of aging on mortality, hypothermia, and cytokine induction in mice with endotoxemia or sepsis. *Mech Ageing Dev.* 2003 Dec;124(10-12):1047–58.
304. Turnbull IR, Wlczorek JJ, Osborne D, Hotchkiss RS, Coopersmith CM, Buchman TG. Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture. *Shock Augusta Ga.* 2003 Apr;19(4):310–3.
305. FRANK NR, MEAD J, FERRIS BGJ. The mechanical behavior of the lungs in healthy elderly persons. *J Clin Invest.* 1957 Dec;36(12):1680–7.
306. Turner JM, Mead J, Wohl ME. Elasticity of human lungs in relation to age. *J Appl Physiol.* 1968 Dec;25(6):664–71.

307. Janssens JP, Pache JC, Nicod LP. Physiological changes in respiratory function associated with ageing. *Eur Respir J*. 1999 Jan;13(1).
308. Sharma G, Goodwin J. Effect of aging on respiratory system physiology and immunology. *Clin Interv Aging*. 2006;1(3):253–60.
309. Ranga V, Kleinerman J, Ip MP, Sorensen J. Age-related changes in elastic fibers and elastin of lung. *Am Rev Respir Dis*. 1979 Mar;119(3):369–76.
310. Takubo Y, Hirai T, Muro S, Kogishi K, Hosokawa M, Mishima M. Age-associated changes in elastin and collagen content and the proportion of types I and III collagen in the lungs of mice. *Exp Gerontol*. 1999 Jun;34(3):353–64.
311. Hirai T, Hosokawa M, Kawakami K, Takubo Y, Sakai N, Oku Y, et al. Age-related changes in the static and dynamic mechanical properties of mouse lungs. *Respir Physiol*. 1995 Dec;102(2-3).
312. Huang K, Rabold R, Schofield B, Mitzner W, Tankersley CG. Age-dependent changes of airway and lung parenchyma in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2007 Jan;102(1):200–6.
313. Huang K, Mitzner W, Rabold R, Schofield B, Lee H, Biswal S, et al. Variation in senescent-dependent lung changes in inbred mouse strains. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2007 Apr;102(4):1632–9.
314. Krabbe KS, Bruunsgaard H, Hansen CM, Moller K, Fonsmark L, Qvist J, et al. Ageing is associated with a prolonged fever response in human endotoxemia. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001 Mar;8(2):333–8.
315. Parikh SM, Mammoto T, Schultz A, Yuan H-T, Christiani D, Karumanchi SA, et al. Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *Plos Med*. 2006 Mar;3(3).
316. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med*. 2006 Feb;12(2):235–9.
317. Starr ME, Ueda J, Yamamoto S, Evers BM, Saito H. The effects of aging on pulmonary oxidative damage, protein nitration, and extracellular superoxide dismutase down-regulation during systemic inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2011 Jan 15;50(2):371–80.
318. Tucsek Z, Gautam T, Sonntag WE, Toth P, Saito H, Salomao R, et al. Aging exacerbates microvascular endothelial damage induced by circulating factors present in the serum of septic patients. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2013 Jun;68(6):652–60.
319. Tankersley CG, Shank JA, Flanders SE, Soutiere SE, Rabold R, Mitzner W, et al. Changes in lung permeability and lung mechanics accompany homeostatic instability in senescent mice. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2003 Oct;95(4):1681–7.
320. Zhang Y-W, Bi L-T, Hou S-P, Zhao X-L, Song Y-L, Ma T-H. Reduced lung water transport rate associated with downregulation of aquaporin-1 and aquaporin-5 in aged mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009 Jul;36(7):734–8.
321. Otto C, Hein L, Brede M, Jahns R, Engelhardt S, Grone H-J, et al. Pulmonary hypertension and right heart failure in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *Circulation*. 2004 Nov 16;110(20):3245–51.

322. Champion HC, Villnave DJ, Tower A, Kadowitz PJ, Hyman AL. A novel right-heart catheterization technique for in vivo measurement of vascular responses in lungs of intact mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Jan;278(1):H8–H15.
323. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest*. 2011 Sep;121(9):3375–83.
324. Nechemia-Arbely Y, Barkan D, Pizov G, Shriki A, Rose-John S, Galun E, et al. IL-6/IL-6R axis plays a critical role in acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol Jasn*. 2008 Jun;19(6):1106–15.
325. Gomez MI, Sokol SH, Muir AB, Soong G, Bastien J, Prince AS. Bacterial induction of TNF-alpha converting enzyme expression and IL-6 receptor alpha shedding regulates airway inflammatory signaling. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2005 Aug 1;175(3):1930–6.
326. Rabe B, Chalaris A, May U, Waetzig GH, Seegert D, Williams AS, et al. Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1021–8.
327. Armanios MY, Chen JJ-L, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med*. 2007 Mar 29;356(13):1317–26.
328. Savale L, Chaouat A, Bastuji-Garin S, Marcos E, Boyer L, Maitre B, et al. Shortened telomeres in circulating leukocytes of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009 Apr 1;179(7):566–71.
329. Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A. Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Oct 15;174(8):886–93.

CURRICULUM VITAE

Guillaume VOIRIOT

Né le 26.12.1980 à Nancy (54)

Nationalité française

Adresse personnelle:

17 rue Soleillet - 75020 Paris

Adresse professionnelle:

Hôpital Bichat, AP-HP

Service de Réanimation Médicale

46 rue Henri-Huchard

75018 Paris

Tel: 01 40 25 77 95

Portable: 07 61 31 56 54

E-mail: guillaumevoirirot@hotmail.com

TITRES ET FORMATIONS

- 1998** Baccalauréat série S mention Bien, Lycée Henri Poincaré (Nancy)
- 1999** Concours de fin de première année de médecine : classé 9^{ème} (Nancy I)
- 1999 à 2004** 2^{ère} à 6^{ème} années de médecine (Nancy I)
- 2001** Certificat de Maitrise : *Biochimie métaboliques et régulations* (Nancy I)
- 2004** Examen Classant National : classé 34^{ème}
- 2004-2010** Internat de médecine en spécialités médicales (Ile de France)
DES de *Pneumologie* (Paris VI)
DESC de *Réanimation Médicale* (Paris VI)
- 2005** Certificat de maitrise : *Epidémiologie et méthodologie de la recherche clinique* (Paris VI)
- 2006** Maîtrise de Sciences Biologiques et Médicales équivalente à la première année de spécialité de Master (M1) (Paris VI)
- 2007** Diplôme universitaire de "*Ventilation artificielle*" (Paris XII)
- 2008** Deuxième année de spécialité de Master (M2) "*Biologie, physiologie et pharmacologie cardiovasculaire, de l'hémostase et respiratoire*", option *Respiratoire*, à la Faculté de Médecine de Créteil (Paris XII)
- 2008** Diplôme universitaire de "*Antibiotiques et Antibiothérapie*" (Paris VII)
- 2010** Diplôme d'Etudes Spécialisées en Pneumologie (Paris VI), mention très honorable
- 2010** Thèse de Doctorat en Médecine (Paris VI), médaille d'argent
- 2011** Certificat d'aptitude à l'expérimentation animale de niveau I (Ecole Vétérinaire d'Alfort)
-

POSITIONS

- 2001 à 2004** Ecole de Médecine et Externat, Université Nancy I, CHU de Nancy
- 2004 à 2010** Interne de médecine en spécialité médicale
Semestres en:
- Cardiologie, Hôpital St Michel (Dr Baudouy)
 - Réanimation Médicale, Hôpital Tenon - AP-HP (Pr Mayaud)
 - Réanimation Médicale, Hôpital Mondor - AP-HP (Pr Brun-Buisson)
 - Pneumologie, Hôpital Tenon - AP-HP (Pr Cadranet)
 - Hématologie, Hôpital Necker - AP-HP (Pr Varet)
 - Pneumologie, Hôpital Bécclère - AP-HP (Pr Simmoneau)
 - Pneumologie, Hôpital Saint-Louis - AP-HP (Pr Tazi)
 - Réanimation Médicale, Hôpital Bichat - AP-HP (Pr Wolff)
- 2008-2014** Doctorant *es Sciences* :
- INSERM U955 Eq08 Dir. Pr Adnot, Créteil (2008-2011)
 - Institute for Personalized Respiratory Medicine, Dir. Pr Garcia, Team of Pr Yuan, University of Illinois at Chicago, Chicago - IL (2011-2012)
- Depuis 2012** Chef de Clinique - Assistant, Réanimation Médicale, Hôpital Bichat - AP-HP, Paris VII

TRAVAUX

Publications dans des journaux à comité de lecture

- H. Lioté, B. Séroussi, J. Bouaud, G. Voiriot et C. Mayaud. Formalisation de la démarche diagnostique des pneumopathies médicamenteuses : le système PneumoDoc. *Rev Pneumol Clin.* 2007;63:193-201.
- A. Mekontso Dessap, JR. Zahar, G. Voiriot, F. Ali, N. Aissa, M. Kirsch, C. Brun-Buisson. Influence of preoperative antibiotherapy on valve culture results and outcome of endocarditis requiring surgery. *J Infect.* 2009;59(1):42-8.
- G. Voiriot, S. Dury, A. Parrot, C. Mayaud, M. Fartoukh. Non-steroidal anti-inflammatory drugs may affect the presentation and course of community-acquired pneumonia. *Chest.* 2011;139:387-394.
- A. Mekontso Dessap*, G. Voiriot*, T. Zhou, E. Marcos, SM. Dudek, JR. Jacobson, R. Machado, S. Adnot, L. Brochard, B. Maitre, JGN. Garcia. Conflicting physiological and genomic cardiopulmonary effects of recruitment maneuvers in murine acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;46(4):541-50. *Both authors contributed equally to the job.
- J. Wan, A. Yamamura, AM. Zimnicka, G. Voiriot, KA. Smith, H. Tang, RJ. Ayon, MS. Choudhury, EA. Ko, J. Wang, C. Wang, A. Makino, JX. Yuan. Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca²⁺ channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013;305(2):L154-64.
- G. Voiriot, K. Razazi, V. Amsellem, J. Tran Van Nhieu, M. Latiri, A. Hervé, S. Adnot, A. Mekontso Dessap, B. Maitre. Interleukin-6 exerts lung protective anti-inflammatory and hemodynamic effects in a double-hit murine acute lung injury. *Intensive Care Med Experimental 2014.* (submitted)
- G. Voiriot, D. Contou, J. Tran Van Nhieu, V. Amsellem, M. Latiri, S. Adnot, B. Maitre, A. Mekontso Dessap. Aging exacerbates acute respiratory distress syndrome in a double hit murine model. *Crit Care Med* 2014; (submitted)

Autres publications

- G. Voiriot, G. Carreaux. Cas clinique : rupture d'anévrisme de l'aorte abdominale. *Le praticien en anesthésie réanimation.* 2006;10(3):225-228.
- M. Fartoukh, G. Carreaux, G. Voiriot. L'année 2008 en pneumologie, réanimation. *Rev Mal Respir.* 2009;26:2S151-2S188.
-

Présentations / Posters / Résumés

- A. Mekontso-Dessap, G. Voiriot, H. Jouault, S. Giraudier, B. Maitre, C. Brun-Buisson. Circulating progenitor cells in septic patients. *Intensive Care Med.* 2006;32:S151 [Summary].
- G. Voiriot, S. Dury, A. Parrot, C. Mayaud et M. Fartoukh. La prescription d'anti-inflammatoires non stéroïdiens modifie la présentation initiale et l'évolution des pneumonies aiguës communautaires de l'adulte immunocompétent. Congrès SRLF 2007. (Poster)
- G. Voiriot, A. Hulin, A. Mekontso Dessap, A Thille, A. Si Larbi, R Leon, L Brochard, C. Brun-Buisson et F. Schortgen. Quelle posologie de vancomycine faut-il administrer aux patients anuriques en choc septique ? Congrès SRLF 2007. (Poster)
- A. Khalil, G. Voiriot, A. Parrot, M. Fartoukh, M.F. Carette. Transcatheter embolization of pulmonary artery aneurysms in Behçet's disease: report of six cases and literature review. Oral session. Radiologic Society of North America Meeting 2009. (Poster)
- G. Voiriot, K. Razazi, A. Hervé, S. Adnot, L. Brochard, B. Maitre, A. Mekontso Dessap. Etude des effets respiratoires et hémodynamiques ventriculaires droits de manœuvres de recrutement alvéolaire dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë en ventilation mécanique prolongée. Congrès SRLF 2010. (Poster)
- A. Hervé, G. Voiriot, K. Razazi, R. Souktani, D. Rideau, S. Adnot, A. Mekontso Dessap, B. Maitre. Caractérisation d'un modèle murin de Syndrome Thoracique Aigu et évaluation de l'effet d'un inhibiteur de la Phosphodiesterase 5. Congrès SRLF 2010. (Poster)
- G. Voiriot, K. Razazi, A. Herve, R. Souktani, S. Adnot, L. Brochard, B. Maitre, A. Mekontso Dessap. Etude du rôle de l'interleukine 6 au cours du syndrome de détresse respiratoire aiguë dans un modèle murin d'agression pulmonaire aiguë en ventilation mécanique prolongée. Congrès SRLF 2010. (Poster)
- A. Hervé, G. Voiriot, K. Razazi, S. Adnot, B. Maitre, A. Mekontso Dessap. Characterization of a murine model of acute chest syndrome. ATS Meeting 2010. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181:A2678. (Poster)
- G. Voiriot, A. Herve, K. Razazi, R. Souktani, G. Gary-Bobo, S. Adnot, L. Brochard, B. Maitre, A. Mekontso Dessap. Role of interleukin 6 during acute lung injury: study in a lipopolysaccharide-induced murine model under mechanical ventilation. ATS Meeting 2010. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;181:A3770. (Presentation)
- G. Voiriot, A. Parrot, M. Fartoukh, A. Khalil, M.F. Carette, J. Cadranel. Vaso-occlusion d'anévrismes artériels pulmonaires au cours de la maladie de Behçet. Congrès CPLF 2011. (Poster)
- A. Mekontso Dessap, G. Voiriot, T. Zhou, E. Marcos, S. Adnot, S.M. Dudek, J.R. Jacobson, R.F. Machado, L. Brochard, B. Maitre, J.G.N. Garcia. Cardiopulmonary effects of recruitment maneuvers in murine acute lung injury highlight conflicting physiological and genomic indices. ATS Meeting 2011. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183:A4004. (Poster)
- E. Guivarch, G. Voiriot, A. Rouze, J. Tran Van Nhieu, B. Maitre, A. Mekontso-Dessap, M. Desmard, J. Boczkowski. Effects of adjusting tidal volume on actual or ideal body weight in ventilated obese mice. ATS Meeting 2012. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185:A5457 (Poster)
- A. Rouzé, G. Voiriot, E. Guivarch, J. Tran Van Nhieu, F. Roux, D. Isabey, L. Brochard, B. Maitre, A. Mekontso-Dessap, J. Boczkowski. Non injurious mechanical ventilation aggravates pre-existing pulmonary inflammation in elastase-induced emphysema in mice. ATS Meeting 2012. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185:A5437. (Poster)
- G. Voiriot, D. Contou, J. Tran Van Nhieu, S. Adnot, B. Maitre, A. Mekontso Dessap. Effects of advanced age in a murine model of acute lung injury. ATS Meeting 2012. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185:A1041 (Presentation)
- G. Voiriot, A.M. Zimmnicka, M.S. Choudhury, K.A. Smith, J. Wan, S. Adnot, B. Maitre, A. Mekontso Dessap, J.X.J. Yuan. High PEEP mechanical ventilation enhances pulmonary vasoconstriction induced by Ca²⁺ influx through VDCC. ATS Meeting 2013. *Am J Respir Crit Care Med* 187;2013:A1138. (Poster)
- G. Voiriot, K.A. Smith, M. Tauseef, D. Mehta, J.X.J. Yuan. Notch signaling is involved in acute hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction. ATS Meeting 2013. *Am J Respir Crit Care Med* 187;2013:A2255. (Poster)

BOURSES

- 2007** Bourse de Master / Année Recherche - AP-HP (38 K€)
2008 Bourse de Thèse - Fondation pour la Recherche Médicale (28 K€)
2010 Bourse de Thèse - Fonds de Dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire (28 K€)
2011 Bourse de Mobilité - Fonds de Dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire (20 K€)
-

RESUME

Etude de déterminants de la dysfonction vasculaire pulmonaire au cours du syndrome de détresse respiratoire aigue.

La physiopathologie du syndrome de détresse respiratoire aigue (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) inclut une dysfonction vasculaire pulmonaire, résultant de phénomènes de thrombose, hyperperméabilité endothéliale, dysrégulation de la vasomotricité et remodelage. La ventilation en pression positive est un facteur aggravant. Il en résulte une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires, à l'origine d'une hypertension pulmonaire et à risque de cœur pulmonaire aigu, associés à un pronostic péjoratif au cours de l'ARDS. Mais les déterminants de cette dysfonction vasculaire pulmonaire demeurent largement méconnus. Un modèle murin d'agression pulmonaire aigue *two hit* a été développé, associant une instillation orotrachéale de lipopolysaccharide bactérien à une ventilation mécanique protectrice, avec explorations physiologiques respiratoires et hémodynamiques invasives. Trois déterminants potentiels de la dysfonction vasculaire pulmonaire ont été étudiés. Dans le premier travail, nous avons établi que l'utilisation de manœuvres de recrutement alvéolaire, consistant en l'application transitoire et répétée de hauts niveaux de pression positive, limitait la dégradation de la mécanique ventilatoire mais induisait une hypertension pulmonaire. Une analyse transcriptomique pulmonaire a montré une dysrégulation d'un grand nombre de gènes impliqués dans les principales fonctions endothéliales. Dans le deuxième travail, une déficience en interleukine-6 a été montrée associée à une inflammation et un œdème pulmonaires majorés. Une élévation des résistances pulmonaires totales était aussi observée, prévenue par l'injection d'interleukine-6 recombinante et au moins partiellement attribuable à une dysrégulation de la vasomotricité pulmonaire impliquant la voie des nitric oxide synthases. Dans le troisième travail, nous avons comparé des souris adultes jeunes et d'âge mature et illustré une gravité âge-dépendante, caractérisée par une inflammation systémique et pulmonaire et une fuite alvéolocapillaire accrues, ainsi qu'un dosage bronchoalvéolaire d'angiopoïétine 2 élevé, suggérant une atteinte endothéliale sévère. Nos résultats pourraient contribuer à l'identification de nouvelles voies thérapeutiques ciblant la microvascularisation pulmonaire au cours de l'ARDS.

Mots clés: syndrome de détresse respiratoire aigue, ventilation mécanique, hypertension pulmonaire, dysfonction vasculaire pulmonaire, vieillissement, interleukine-6, manœuvre de recrutement.

Study of factors determining the pulmonary vascular dysfunction during acute respiratory distress syndrome.

The pathophysiology of the acute respiratory distress syndrome (ARDS) includes a pulmonary vascular dysfunction, which is attributable to thrombosis, endothelial hyperpermeability, dysregulation of the pulmonary vasomotor tone and remodeling. Positive pressure ventilation is an exacerbating factor. The result is an increase in the pulmonary vascular resistances, which lead to an acute pulmonary hypertension and may cause acute cor pulmonale, both associated with an altered prognosis during ARDS. But the factors determining the pulmonary vascular dysfunction are poorly known. A murine model of two hit acute lung injury, combining an orotracheal aspiration of bacterial lipopolysaccharide to a protective mechanical ventilation, with physiological respiratory and invasive hemodynamic monitoring. Three factors which might determine pulmonary vascular dysfunction were studied. In the first work, we established that the use of alveolar recruitment maneuvers, consisting in a transient and repetitive application of high positive pressure level, minimized the alteration of lung mechanics but induced a pulmonary hypertension. A transcriptomic lung analysis showed a dysregulation of many genes involved in main endothelial functions. In the second work, a interleukin-6 deficiency was shown to be associated with higher pulmonary inflammation and edema. An increase in total pulmonary resistances was also observed, but prevented with a human recombinant interleukin-6 treatment and at least partially attributed to a nitric oxide synthase-dependent dysregulation of the pulmonary vasoreactivity. In the third work, we compared young adult and mature adult mice and we observed an age-dependent severity, including a higher systemic and pulmonary inflammation, a higher alveolocapillary leak and a higher bronchoalveolar angiopoietin 2, suggestive for a severe endothelial injury. Our results might contribute to identify new therapeutic pathways targeting pulmonary microvessels during ARDS.

Key words: acute respiratory distress syndrome, mechanical ventilation, pulmonary hypertension, pulmonary vascular dysfunction, aging, interleukin-6, recruitment maneuvers.