



**HAL**  
open science

# Analyse et modulation de la réponse inflammatoire au cours de l'agression pulmonaire liée à l'infection bactérienne et à la ventilation mécanique

Laure-Anne Pauchard

## ► To cite this version:

Laure-Anne Pauchard. Analyse et modulation de la réponse inflammatoire au cours de l'agression pulmonaire liée à l'infection bactérienne et à la ventilation mécanique. Biologie cellulaire. Université de Bourgogne, 2015. Français. NNT : 2015DIJOMU05 . tel-02104478

**HAL Id: tel-02104478**

**<https://theses.hal.science/tel-02104478>**

Submitted on 19 Apr 2019

**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.



**UNIVERSITE DE BOURGOGNE**



**INRA- UMR 1347 Agroécologie  
(Pôle Microbiologie Environnementale et Risque Sanitaire)**

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Bourgogne**

Discipline : Sciences Vie

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

Le lundi 12 octobre 2015

par

**Laure-Anne PAUCHARD**

**Analyse et modulation de la réponse inflammatoire au cours de l'agression  
pulmonaire liée à l'infection bactérienne et à la ventilation mécanique.**

Directeur de thèse

**Pr. Pierre-Emmanuel CHARLES**

**Membres du jury :**

Pr. Laurent PAPAZIAN

Pr. Jean-Christophe RICHARD

Pr. Gilles CAPELLIER

Pr. Jérôme PUGIN

Pr. Pascal CHAVANET

Pr. Pierre TISSIERES

Pr. Pierre-Emmanuel CHARLES

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Comité de suivi de thèse

Comité de suivi de thèse

Directeur de thèse







**UNIVERSITE DE BOURGOGNE**



**INRA- UMR 1347 Agroécologie  
(Pôle Microbiologie Environnementale et Risque Sanitaire)**

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Bourgogne**

Discipline : Sciences Vie

Spécialité : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

Le lundi 12 octobre 2015

par

**Laure-Anne PAUCHARD**

**Analyse et modulation de la réponse inflammatoire au cours de l'agression  
pulmonaire liée à l'infection bactérienne et à la ventilation mécanique.**

Directeur de thèse

**Pr. Pierre-Emmanuel CHARLES**

**Membres du jury :**

Pr. Laurent PAPAZIAN  
Pr. Jean-Christophe RICHARD  
Pr. Gilles CAPELLIER  
Pr. Jérôme PUGIN  
Pr. Pascal CHAVANET  
Pr. Pierre TISSIERES  
Pr. Pierre-Emmanuel CHARLES

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Comité de suivi de thèse  
Comité de suivi de thèse  
Directeur de thèse



*"Plus grand est l'obstacle et plus grande est la gloire de le surmonter."*

Molière

*" La vie est un mystère qu'il faut vivre, et non un problème à résoudre."*

Gandhi

Je dédie cette thèse à mes parents chéris.

# REMERCIEMENTS

## Remerciements

---

Je tiens à adresser mes premiers remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail de thèse malgré des emplois du temps très chargés et leurs obligations professionnelles. Je remercie plus particulièrement mes deux rapporteurs, les Professeurs Laurent Papazian et Jean-Christophe Richard, pour l'examen minutieux de mon manuscrit. Leurs précieux conseils m'auront permis d'améliorer la qualité de mon travail rédactionnel. Je remercie également les Professeurs Pascal Chavanet et Pierre Tissières pour avoir chaque année suivi mon travail et permis de bien l'orienter. Enfin, je remercie les membres examinateurs de ce jury, les professeurs Gilles Capellier et Jérôme Pugin. J'espère que ce travail saura vous satisfaire.

J'adresse des remerciements tout particulier au Professeur Pugin pour m'avoir permis de collaborer sur les projets de son équipe. Dans votre laboratoire à Genève j'ai appris de très belles techniques, je me suis passionnée pour vos projets et j'ai humainement fait de très belles rencontres en particulier Irène. C'est un véritable honneur pour moi que vous puissiez lire mon travail, j'espère qu'il sera conforme à vos attentes.

Je tiens à remercier le Professeur Alain Bonnin pour m'avoir permis d'effectuer mon travail de thèse dans son unité de recherche, à l'époque le Laboratoire interactions muqueuses-agents transmissibles, rattaché par la suite à l'UMR1347 Agroécologie de l'INRA.

Je tiens ensuite à exprimer toute ma reconnaissance à mon chef, le Professeur Pierre-Emmanuel Charles qui m'a accueillie dans son équipe et pour qui j'ai beaucoup de sympathie et de respect. Même s'il y a eu des périodes difficiles durant ma thèse (surtout la fin) j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler sous votre direction. Vous m'avez fait confiance depuis mon premier jour de stage en Master 2 et pendant toutes ces années. Vous m'avez permis d'apprendre beaucoup de choses et de travailler sur des projets passionnants en me laissant une grande autonomie. J'ai apprécié votre curiosité scientifique et votre éternel optimisme.

Vous avez toujours fait preuve d'une grande humanité envers moi. Je garderai toujours un très bon souvenir de ma thèse.

Mes remerciements les plus sincères vont au docteur Saber Barbar. Tu m'as prise sous ton aile quand je suis arrivée au laboratoire en Master 2. Tu m'as appris toutes les techniques que je connais maintenant, tu m'as également enseigné la patience et à surmonter la frustration à laquelle on doit souvent faire face en science. Tu es pour moi comme un maître Jedi!!! Tu auras été un modèle de persévérance et pugnacité pour moi. Merci également pour ton soutien sans faille, même à distance, sous le soleil de Nîmes, durant toutes mes années de thèse. Nos échanges m'ont toujours redonné la patate, l'envie d'avancer et de boucler cette thèse! Et pour tout ça je te dois un sacré paquet de bières :)

Pour toute la team Vivexia (les deux Delphine et Davy) un énorme merci, pour votre précieuse aide technique et votre soutien tout au long de ce travail de thèse. Sans vous, évidemment, ce travail n'aurait pas été réalisable. Merci pour votre bonne humeur et vos sourires. C'est toujours un moment agréable de venir vous voir et travailler avec vous. Une mention spéciale à votre chef, Delphine Croisier. Merci pour ton soutien, tes précieux conseils techniques et tes mots réconfortants toutes ces années. Tu es un exemple de femme manager/chercheur avec un grand coeur.

Merci à Marianne ou la Goyette. Tu as toujours été de bons conseils. On a beaucoup ri toutes les trois avec Sandoche. Tu es la preuve qu'on peut être une maman comblée et être également brillante. Merci d'être également aussi folle que Sandoche et moi...à mes débuts au labo je pensais vraiment que tu n'étais qu'une première de la classe mais tu m'as vite rassurée. Grâce à toi aussi je garderai toujours un super souvenir de ma thèse. Ha oui et j'allais oublier...merci de m'avoir appris que les Chlamydias ne sont pas des fleurs :)

Mes remerciements vont ensuite à mes amis d'amour qui de près ou de loin ont participé à la concrétisation de ce travail. Mes copines chéries (Dreynousse, Nanou, Maéva, Sarah, Flo, Sandoche, Déborah, Elodie) et mes copains adorés (Pierre, Coch, Denis) qui m'ont toujours soutenue plus que possible et ont toujours cru en moi. Vous avez à chaque fois été une bouffée d'air frais pour moi.



Merci ma Nanou d'avoir relu tout mon manuscrit, de m'avoir presque tenu la main pour les impressions du manuscrit, merci de tous tes mots réconfortants, apaisants et de me faire tant rire.

Ma Flo, on se suit depuis le lycée. Tu as toujours été présente dans ma vie malgré la petite distance géographique qui nous éloignait! Merci pour tous nos fous rires depuis toutes ses années, j'ai toujours l'impression d'avoir 18 ans avec toi! On est une sacrée équipe de Sipoue et nos aventures vont continuer avec les deux minis Sipou(e)s qui pointeront bientôt le boût de leur nez.

Sandoche....que te dire...déjà PARDON pour ce surnom dont je t'ai affublé...et que tout le monde utilise maintenant...C'est presque devenu ton vrai prénom en fait!!!! Je n'aurais pas assez de pages ni assez de mots pour te dire combien je te remercie pour ton soutien que ce soit dans le boulot de thèse ou dans ma vie perso. Tu es LA GRANDE DECOUVERTE de ma thèse, tu es devenue très vite en fait une amie chère à mon coeur. On a partagé de très grands moments de rire (avec la Goyette aussi) au labo (bon en plus du travail bien sûr...). Merci d'être venue me tenir compagnie pendant mes quelques nuits de surveillance au labo...on y a battu de beaux records de sauts en vélo avec notre tremplin! Merci de m'avoir redonné le sourire quand je déprimais sur ma vie en me faisant une banane flambée et finalement en flambant tes cheveux et tes sourcils. Tu fais même partie de mon vocabulaire, je vais te proposer pour les nouvelles expressions de l'année. ***Se faire une Sandoche***: "*expression signifiant que l'on se brise un doigt en rebouchant son stylo ou en faisant ses lacets, qu'on se coupe le bras de manière démesurée avec une simple tranche de pain de mie...*" Bref, il faut t'éviter de toucher même ce qui est autorisé à un enfant de 6 mois. Tu es une amie en or et pour tout ça MERCI.

Merci également à Corinne, Christian et Florence. Merci de m'avoir si bien accueillie dans vos vies et de me soutenir dans la réalisation de cette thèse. Merci également de nous accompagner Nicolas et moi dans notre vie au quotidien. Je ne pouvais rêver mieux comme belle famille. Christian, ça fait du bien de pouvoir parler de science avec vous, je ne me sens pas extraterrestre et merci pour vos précieux conseils.

Je remercie également ma famille, mes tantes Joss et Béatrice, mes oncles Norbert, Gilles et Pascal pour leur soutien tout au long de mes études. Merci Béatrice et Pascal pour

tous les supers moments de décompression et de fêtes vers vous à Toulouse ou à Roses. C'est toujours un grand bonheur de tous vous voir.

Merci ma Caro, même à l'autre bout du monde tu m'envoies plein de bonnes ondes positives et d'amour qui me donnent le moral.

Karine, Xav, Paul et Théo vous êtes mon bol d'air Dijonnais. Merci pour tous ces bons moments passés avec vous, c'est toujours du pur bonheur d'être avec vous et de voir les zouzous grandir! Merci ma Karine d'être ma grande soeur, de m'écouter et me conseiller, de m'avoir inculqué de vrais bons goûts en matière de mode et merci à toi et Xavier de me faire partager depuis longtemps vos moments en famille, chez vous, cela participe depuis longtemps à mon équilibre. Tu es un exemple pour moi Karine de super woman: super maman et super working-girl.

Pépé....c'est bon cette fois tu peux être rassuré je passe ma thèse. Je l'ai enfin terminée!!! Merci à toi et Eliane pour votre soutien et votre amour depuis que je suis enfant. J'espère vous combler de bonheur comme vous le faites pour moi. On fera la chouille pour fêter ça!!

Maman, Papa, vous dire merci est évident mais ne sera jamais suffisant. Votre foi indéfectible en moi quoi que je fasse m'a toujours portée et poussée à aller plus loin. Vous avez mis en moi beaucoup de persévérance et d'endurance qui me permettent aujourd'hui d'arriver là où je voulais aller, même si le chemin a été parfois chaotique. Votre amour inconditionnel et votre soutien ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui et j'espère simplement que vous êtes fiers de moi, c'est le seul moyen que j'ai de vous remercier de tout ce que vous faites pour moi.

A mon "petit" frère, Mimi ou Marmouzet, qui même TRES LOIN a toujours su me motiver et être là pour moi. Tu es un exemple. J'admire ton courage d'être parti si loin vivre ton rêve et l'acharnement que tu mets dans ton travail pour continuer de vivre ce rêve. Je serai toujours là pour toi moi aussi. Je te souhaite d'être encore plus heureux. Continue de croire en toi, le reste suivra et profite de la Big Apple!!!!

Enfin, un dernier mot pour toi Nicolas. Depuis que l'on est ensemble on forme une sorte de ménage à trois: toi, moi et ma thèse. Je sais la part prépondérante qu'elle a occupée dans ma vie et donc dans la tienne, en tout cas depuis deux ans. Moi je la vis avec un affect tout particulier puisque je la vis de l'intérieur et toi tu vois les choses de bien plus haut. Aussi c'est vrai, parfois, on a du mal à s'entendre sur ce point. Pourtant, même si tu le fais à ta manière, un peu brutale et maladroite par moment, tu es derrière moi depuis tout ce temps. Tu sais me remettre les pieds sur terre, me faire arrêter de me plaindre et me faire avancer mieux que quiconque. Tu as été un soutien hors pair pour moi dans cette aventure. Tu es l'homme que je rêvais de rencontrer. Je te remercie de m'avoir supportée dans mes plus mauvais jours, de m'apporter tant de réconfort et d'amour et de me pousser toujours plus haut. Tu m'apportes une telle joie dans mon quotidien. Je n'ai jamais connu autant de bonheur que depuis que je partage ma vie avec toi. Maintenant c'est bon, YOUPIIIII, on quitte la vie à trois avec ma thèse...pour la reprendre autrement, mais toujours à trois, dans quelques mois! Je suis si heureuse de vivre ça avec toi. Tu es l'amour de ma vie et je t'aime de tout mon coeur.

# RÉSUMÉ

## Résumé

---

Nonobstant d'immenses progrès accomplis depuis des décennies dans la prise en charge des patients soumis à la ventilation mécanique (VM), les pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) continuent de compliquer le séjour en réanimation de près de 28% des patients recevant une assistance respiratoire invasive prolongée. Parmi les malades des unités de soins intensifs, le risque de développer une pneumonie est de 3 à 10 fois supérieur chez les intubés sous ventilation. Elle reste cependant bien souvent le seul moyen de venir en aide aux patients souffrant de graves détresses respiratoires. Il a maintenant été clairement démontré que la ventilation mécanique, en particulier lorsqu'elle est mise en place selon des stratégies dites agressives, active les cellules pulmonaires conduisant alors à une réponse pro-inflammatoire même en l'absence de pathogène. Ce phénomène est connu sous le terme de bio-trauma, et serait responsable en partie des lésions induites sur le poumon par la ventilation mécanique (VILI de l'anglais ventilator-induced lung injury). En quelques sortes, la ventilation mécanique prépare les cellules épithéliales pulmonaires à répondre massivement à une seconde agression pro-inflammatoire par la libération de grandes quantités de cytokines (comme l'IL-8 notamment), accentuant alors les lésions du tissu pulmonaire essentiellement par le recrutement de polynucléaires neutrophiles attirés par la sécrétion massive d'IL-8. L'immunité innée joue donc un rôle très important dans le développement du VILI. L'implication des Toll Like Récepteurs (TLRs) a été suggérée par plusieurs études expérimentales. Par ailleurs, la ventilation en décubitus ventral a été décrite pour avoir des effets bénéfiques sur les patients ventilés souffrant de graves lésions pulmonaires particulièrement chez ceux souffrant du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA).

Notre équipe s'est particulièrement intéressée au TLR2, qui reconnaît les bactéries à Gram-positif, car elle a montré dans des études précédentes *in vitro* que l'étirement cyclique de cellules pulmonaires humaines augmentait principalement l'expression de TLR2 ainsi que la réactivité de cellules pulmonaires à des composants de la paroi de bactéries à Gram positif. Ces données ont par la suite été confirmées dans un modèle *in vivo* de lapins ventilés dont la réponse immunitaire innée était stimulée par du Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>.

Dans un premier projet, nous avons évalué l'impact d'une ventilation mécanique en décubitus ventral chez des lapins avec pneumonie unilatérale à *Enterobacter aerogenes* soumis à la ventilation mécanique. Nos résultats montrent que le décubitus ventral peut être protecteur si l'hôte est soumis à la ventilation mécanique dans le contexte d'une pneumonie bactérienne unilatérale.

Pour vérifier la pertinence de nos hypothèses sur le TLR2 dans notre modèle animal de pneumonie acquise sous ventilation mécanique, nous avons mené des expériences avec des bactéries vivantes reconnues par le TLR2 (une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline SARM). Notre étude met en évidence qu'une ventilation mécanique modérément agressive impacte sur la clairance bactérienne pulmonaire en la diminuant, aggrave les lésions sur le tissu pulmonaire et favorise une réponse inflammatoire systémique. La surexpression du TLR2 tant au niveau pulmonaire que systémique pourrait expliquer ces résultats.

Le troisième projet s'est attaché à évaluer l'impact d'une thérapie aux statines dans le contexte d'une pneumonie acquise sous ventilation mécanique à SARM, conjointement traitée par le linezolide, dans notre modèle animal de lapins ventilés. Nos résultats suggèrent qu'une pré-exposition aux statines pourrait avoir un effet anti-inflammatoire au niveau pulmonaire et systémique dans ce modèle, qui pourrait passer par une régulation négative de l'expression de TLR2, contre-balançant les effets de l'étirement cyclique. Néanmoins, malgré l'amélioration de la clairance bactérienne pulmonaire par

le linezolide, la diminution de la réponse inflammatoire systémique de l'hôte par les statines pourrait empêcher une défense efficace dans ce compartiment face aux SARM. Ces améliorations pourraient en partie être dues à une amélioration des défenses antibactériennes et de la mécanique pulmonaire atténuant alors le surcroît d'inflammation.

Dans le dernier projet , nous avons testé, en collaboration avec le laboratoire du Pr Pugin (Université de Genève), dans quelle mesure les alarmines mitochondriales étaient libérées pendant le VILI et si elles génèrent de l'inflammation dans le compartiment pulmonaire. Les résultats confirment notre hypothèse et montrent qu'effectivement les alarmines sont libérées pendant l'étirement cyclique de cellules épithéliales humaines. Elles sont également retrouvées dans les liquides de lavage bronchoalvéolaires de lapins soumis à une ventilation agressive, de même que chez des patients atteints de SDRA. Ces alarmines stimulent la production d'IL-1 $\beta$  active par les cellules pulmonaires, et pourraient être les médiateurs endogènes du VILI et SDRA libérés par les cellules pulmonaires lésées.

Mots clés : ventilation mécanique, pneumonie, lésions pulmonaires, pneumonie acquise sous ventilation mécanique, infection, inflammation, statines, décubitus ventral, alarmines

# ABSTRACT



## Abstract

---

Despite major advances since decades in the management of ventilated patients, ventilator-associated pneumonia (VAP) continues to complicate the course of approximately 28% of the patients receiving mechanical ventilation (MV). Among patients hospitalized in intensive care units, the risk of pneumonia is 3- to 10-fold increased in MV patients. However, MV is often the only way to care for critically ill patients with respiratory failure. It has now been clearly demonstrated that MV, in particular adverse ventilatory strategies could activate lung cells, thus leading to a proinflammatory response, even in the absence of pathogen. This is the biotrauma paradigm, which accounts, at least in part, for the ventilator induced lung injury (VILI). In one way, MV primes airway cells to respond massively to a second proinflammatory insult, through the subsequent release of large amounts of cytokines (as interleukin (IL)-8), thus leading to additional lung injury, particularly through the recruitment of neutrophils attracted by the massive release of IL-8. Accordingly, innate immunity plays an important role in the development of VILI. The involvement of toll-like receptors has been suggested by several experimental studies. Ventilation in the prone position (PP) has been described to have beneficial effects on patients under MV, especially in those with lobar involvement.

Our team focused particularly on the TLR2, which interacts with Gram-positive bacteria, and we have previously demonstrated *in vitro* that cyclic stretch of human pulmonary cells resulted in TLR2 overexpression and enhanced TLR2 reactivity to Gram-positive cell wall components. We confirmed these data in an *in vivo* model of ventilated rabbits which immune response had been stimulated with Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>.

In a first project, we assessed the impact of the PP on unilateral pneumonia to *Enterobacter aerogenes* in rabbits subjected to MV. Our results shows that the prone

position could be protective if the host is subjected to MV and unilateral bacterial pneumonia. To ensure the relevance of our hypothesis on TLR2 in our animal model of VAP, we conducted experiments using live bacteria specifically recognized by TLR2 (Methicilin resist. *aureus*). We demonstrate that mild-stretch MV impaired lung bacterial clearance, hastened tissue injury and promoted a systemic inflammatory response. Both pulmonary and peripheral blood TLR2 overexpression could account for such an impact.

The third project assessed the impact of a statins therapy in the context of MRSA VAP, treated with linezolid, in our model of ventilated rabbits. Our results suggest that statin exposure prior to pneumonia provides an anti-inflammatory effect within the lung and the systemic compartment of rabbits with MRSA VAP. Although LNZ enhances pulmonary bacterial clearance, dampening the host systemic inflammatory response with statin could impede defense against MRSA in this compartment. It could be subsequent to enhanced antibacterial defences and improvements in lung mechanics, thereby blunting overwhelming inflammation.

In the last project, in collaboration with the University of Geneva, we assessed whether mitochondrial alarmins are released during VILI and can generate lung inflammation. Our results confirmed the hypothesis made and showed indeed that alarmins are released during during cyclic stretch of human epithelial cells, as well as in BAL fluids from rabbits ventilated with an injurious ventilatory regimen. These alarmins stimulate lung cells to produce bioactive IL-1, and are likely to represent the proximal endogenous mediators of VILI and ARDS, released by injured pulmonary cells.

Key words : mechanical ventilation, pneumonia, lung injury, ventilator-associated pneumonia, infection, inflammation, statins, prone position, alarmins

## Sommaire

---

RESUME.....	11
ABSTRACT.....	15
LISTE DES TABLEAUX.....	20
LISTE DES FIGURES.....	21
LISTE DES ABREVIATIONS.....	23
INTRODUCTION.....	26
Préambule.....	27
I. Généralités sur le poumon .....	29
1. Anatomie du poumon.....	29
2. Les échanges gazeux.....	34
II. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë .....	36
1. Pathogénèse du syndrome de détresse respiratoire aiguë.....	37
2. Traitement du syndrome de détresse respiratoire aiguë.....	41
III. La ventilation mécanique .....	41
1. Historique .....	41
2. Les lésions induites par la ventilation mécanique .....	44
IV. La réponse immune innée: étape clé dans le contrôle d'une infection .....	55
1. Le système immunitaire : généralités.....	55
2. L'immunité innée.....	58
V. Les pneumonies acquises sous ventilation mécanique.....	84
1. Epidémiologie.....	85

2. Les microorganismes responsables des pneumonies acquises sous ventilation mécanique .....	87
3. Physiopathologie des pneumonies acquises sous ventilation mécanique .....	89
4. Facteurs de risques liés à la ventilation mécanique .....	93
VI. Objectifs du travail de thèse .....	95
<b>RESULTATS .....</b>	<b>99</b>
I. Article 1 .....	100
II. Article 2 .....	141
III. Article 3 .....	195
IV. Article 4 .....	230
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>275</b>
I. Impact du décubitus ventral dans un modèle animal de pneumonie bactérienne unilatérale acquise sous ventilation mécanique .....	278
II. Impact d'une ventilation mécanique modérément agressive sur le développement d'une pneumonie à <i>Staphylococcus aureus</i> .....	282
III. Impact d'une pré-exposition à l' Atorvastatine sur l'efficacité du Linézolide dans un modèle de pneumonie acquise sous ventilation mécanique à <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la methicilline chez le lapin.....	283
IV. Les alarmines mitochondriales sont des médiateurs tissulaires du VILI et du SDRA. ....	288
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>292</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>296</b>

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1.</b> Représentation schématique et classification des PRRs et de leurs ligands.....	65
--	----

## Liste des figures

---

<b>Figure 1.</b> Place du poumon dans la cage thoracique.....	28
<b>Figure 2.</b> Segmentation des poumons, des bronches aux alvéoles.....	30
<b>Figure 3.</b> L'espace alvéolaire.....	32
<b>Figure 4.</b> Caractéristiques de base des cellules épithéliales alvéolaires.....	33
<b>Figure 5.</b> Echanges d'O <sub>2</sub> et de CO <sub>2</sub> entre les alvéoles et les capillaires sanguins pulmonaires.....	35
<b>Figure 6.</b> L'induction de la perméabilité repose exclusivement sur la phosphorylation des VE- cadhérines-Y685, alors que l'extravasation efficace des leucocytes ne dépend que de la phosphorylation d'Y731.....	38
<b>Figure 7.</b> Dessin schématique d'un des premiers respirateur breveté par Alfred Jones en 1864.....	42
<b>Figure 8.</b> Représentation d'un des premiers poumon d'acier.....	43
<b>Figure 9.</b> Aspect macroscopique du poumon de rats après une ventilation mécanique à 45cmH <sub>2</sub> O de pression inspiratoire.....	45
<b>Figure 10.</b> Poumons de rat vus en coupe microscopique.....	45
<b>Figure 11.</b> Observation des cellules pulmonaires et phréniques en apoptose par la technique de marquage TUNEL.....	50
<b>Figure 12.</b> Synapse immunologique.....	56
<b>Figure 13.</b> Représentation schématique de l'hématopoïèse aboutissant à la génération des principaux acteurs cellulaires de l'immunité innée et adaptative.....	59

<b>Figure 14.</b> La reconnaissance des signaux de danger par les onze TLRs.....	72
<b>Figure 15.</b> Les voies de signalisation dépendantes de MyD88 et de TRIF.....	75
<b>Figure 16.</b> Reconnaissance par TLR2 et réponse aux lipoprotéines bactériennes.....	79
<b>Figure 17.</b> Voie de signalisation à partir de TLR2.....	81
<b>Figure 18.</b> Etiologie des pneumonies acquises sous ventilation mécanique documentées par techniques bronchoscopiques lors de 24 études portant sur 1689 épisodes et 2490 pathogènes.....	86

## Liste des abréviations

---

### A

Ac: Anticorps  
ADN: Acide Désoxy-riboNucléique  
Ag: Antigène  
Akt:  
ALI: Acute Lung Injury  
AP-2: Adaptator Protein-2  
AP1: Activator Protein 1  
ARNm: Acide RiboNucléique messenger  
ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD  
ATP: Adenosie Tri-Phosphate

### B

BCR: B-Cell Receptor

### C

C: Complément  
CARD: Caspase Recruitment Domain-containing protein  
CCAE: Conférence Consensus Américano-Européenne  
CD: Cluster of Differentiation  
CLR: C-type Lectin Receptor  
CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CO<sub>2</sub>: Dioxyde de carbone  
CPA: Cellule Présentatrice d'Antigène  
CRF: Capacité Résiduelle Fonctionnelle  
C<sub>RS</sub>: Compliance du Système Respiratoire  
CSK: C-terminal Src Kinase

### D

DAMP: Danger-Associated Molecular Pattern  
DD: Death Domain  
DD: Décubitus Dorsal  
DV: Décubitus Ventral  
DW: Dry Weight

### E

ERK: Extracellular-Reulated Kinase

### F

FADD: FAS associated Death Domain  
FADD: FAS-associated Death Domain containing protein  
fMLP: N-Formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-L-Phenylalanine

### H

HKSA: Heat-Killed *Staphylococcus aureus*  
HMGB: High-Mobility Group Box  
HSP: Heat Shok Protein

### I

IFN: Interferon  
Ig: ImmunoGlobuline  
IKK: IκB Kinase  
IL-1β: Interleukine-1-béta  
IL-8: Interleukine-8  
IRAK: Interleukine-1 Receptor-Associated Kinase  
IRF: Interferon REgulatory Factor  
IκB: Inhibitor ok Kappa B

### J



JNK: c-Jun N-terminal Kinase

## L

LB: Lymphocyte B

LBA: Lavage Broncho-Alvéolaire

LPS: LipoPolySaccharide

LRR: Leucine-rich repeat domain

LRR: Leucine-Rich Repeats

LT: Lymphocyte T

LTA: LipoTeichoic Acid

## M

MAL: MyD88-Adaptator-Like

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MBL: Mannose Binding Lectin

MV: Mechanical ventilation

MyD88: Myeloid Differentiation primary response protein 88

## N

NACHT: NAIP, CIITA, HET-E et TP-1

NAIP: Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein

NEMO: NF- $\kappa$ B Essential MOdulator

NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor-kappa B

NK: Natural Killer

NKT: Natural Killer T

NLR: NOD-Like Receptor

NLRP: NACHT, LRR and PYD domains-containing Proteins

NOD: Nuclear Oligomerisation Domain

## O

O<sub>2</sub>: Oxygène

## P

PAMP: Pathogen-Associated-Molecular Pattern

PAVM: Pneumonie Acquisée sous Ventilation Mécanique

PDPK: Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase

PEEP: Positive End Expiratory Pressure

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase

PIP: Peak Inspiratory Pressure

PNN: PolyNucléaire Neutrophile

PRR: Pathogen-Recognition Receptor

PYD: PYrin Domain

## R

Rac1:

RIP: Receptor-Interacting Protein

ROS: Reactive Oxygen Species

## S

SARM: *Staphylococcus aureus* Résistant à la Methicilline

SB: Spontaneous Breathing

SDRA: Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë

SH2: Src-Homology 2

SHP2: Src Homology-2-domain-containing Protein tyrosine phosphatase

Src: Steroid Receptor Coactivator

## T

TCR: T-Cell Receptor

Th: T Helper

TIR: Toll/Interleukin-1 Receptor

TIRAP: (MAL)/TIR domain-containing Adaptator Protein

TLR: Toll Like Receptor

TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha  
TRADD: TNFR-Associated Death Domain  
TRAM: TRIF-Related Adaptor Molecule  
Treg: T régulateurs  
TRIF: TIR domain-containing adaptor protein inducing interferon beta  
TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling  
Tyr: Tyrosine

## **V**

VE-cadhérine: Cadhérine Endothéliale-Vasculaire  
VEGF: Vascular endothelial Groxth Factor  
VILI: Ventilation Induced Lung Injury  
VM: Ventilation Mécanique  
VT: Volume courant

## **W**

WW: Wet Weight

# INTRODUCTION

## Préambule

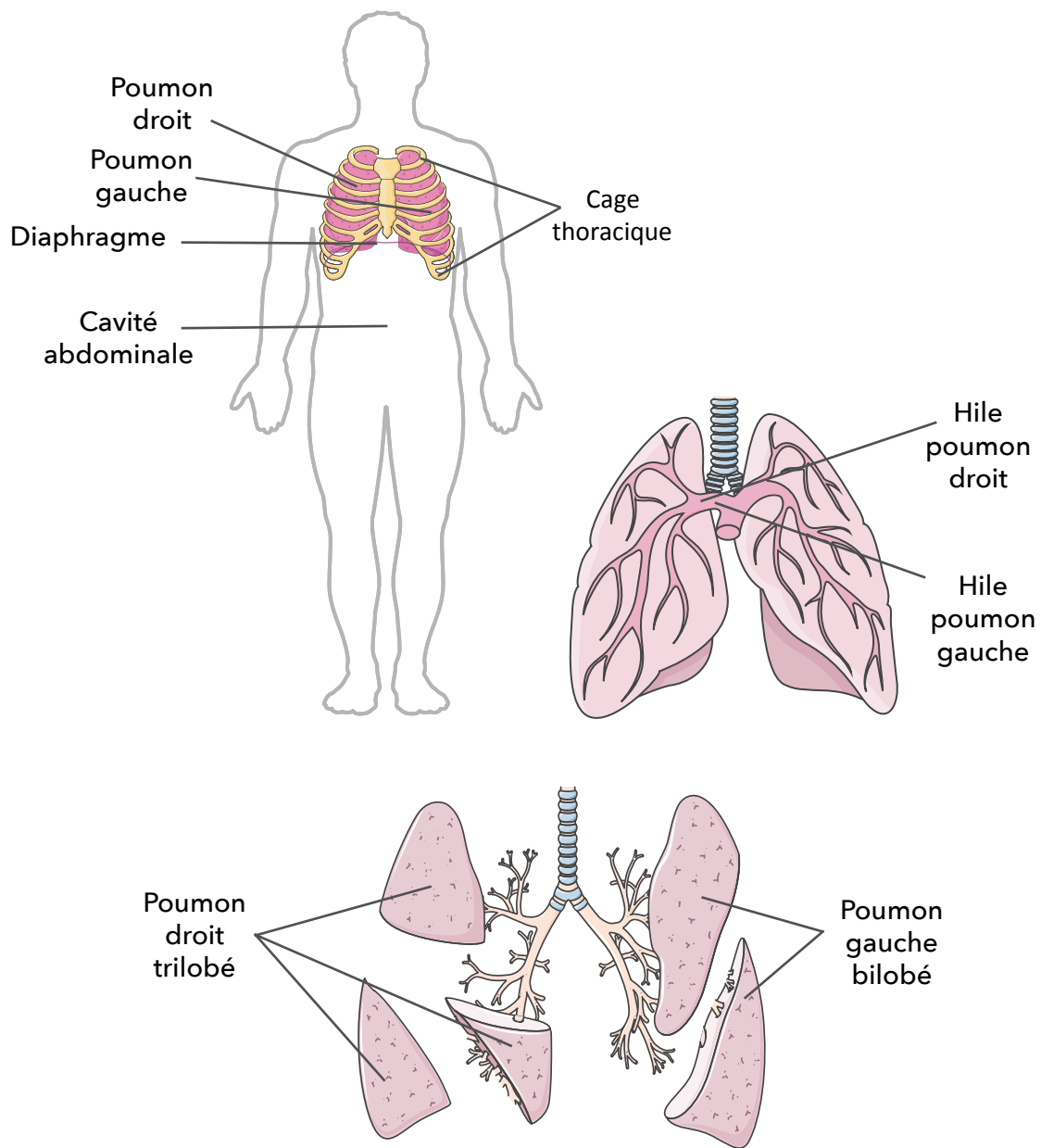
---

Les pneumonies acquises sous ventilation mécanique sont les infections nosocomiales les plus courantes en unité de soins intensifs. Leur survenue est en partie liée à la réponse de l'hôte. Près de 30% des patients mis sous ventilation mécanique prolongée, développent une pneumonie acquise sous ventilation mécanique. Elle est associée avec une forte morbidité et mortalité malgré la mise en place d'une antibiothérapie adaptée.

La ventilation mécanique favorise l'inflammation pulmonaire (par le bio-traumatisme). Cette inflammation favorise la formation de lésions induites par la ventilation mécanique (VILI), en particulier si cette ventilation mécanique est mise en place dans des poumons infectés.

La ventilation en décubitus ventral apporte des améliorations chez les patients souffrant de graves lésions pulmonaires en particulier chez ceux dont un seul lobe est touché. Des traitements anti-inflammatoires sont d'un certain intérêt dans le contexte d'une PAVM.

Enfin il existe également un lien entre le devenir d'un patient souffrant de PAVM et le degré d'inflammation retrouvé dans leur poumon et leur compartiment systémique.



**Figure 1. Place du poumon dans la cage thoracique.**

Le poumon droit trilobé et le poumon gauche bilobé sont séparés l'un de l'autre par le médiastin et reposent sur le diaphragme dans la cage thoracique

# Introduction

---

## I. Généralités sur le poumon

Le poumon assure une fonction essentielle : les échanges gazeux, notamment ceux en oxygène et dioxyde de carbone. On dit communément que l'Homme respire grâce à ses deux poumons. Cette respiration ou plus justement ventilation pulmonaire, consiste au renouvellement de l'air contenu dans les poumons par l'action des muscles respiratoires dont le plus important, le diaphragme. Le terme de respiration désignant en biologie la production d'énergie par la cellule, nous parlerons ici de ventilation pulmonaire pour éviter toute confusion.

### 1. Anatomie du poumon

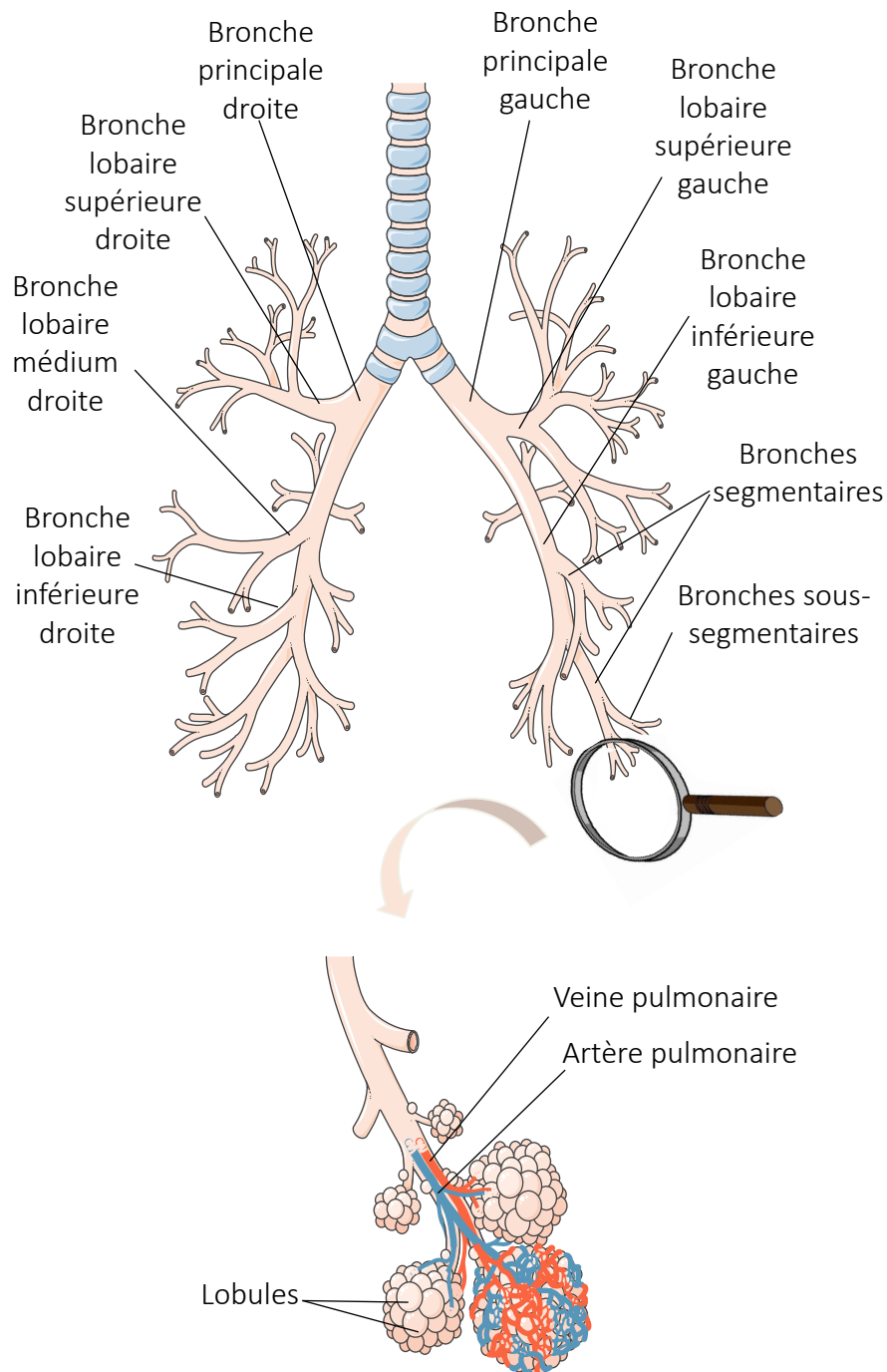
#### 1.1. Les parties conductrices

Le poumon est un organe invaginé appartenant à l'appareil respiratoire. Chez l'Homme on trouve deux poumons, situés dans la cage thoracique :

- un poumon droit trilobé (un lobe supérieur, un moyen et un inférieur)
- un poumon gauche bilobé (un lobe supérieur et un inférieur).

Ils sont séparés l'un de l'autre au centre par le médiastin et sont posés sur le diaphragme qui sépare la cavité thoracique de la cavité abdominale.

Chaque poumon a une disposition globale pyramidale, sommet en haut et face en bas. Sur la face médiale de chacun, du côté du cœur, se situe le hile pulmonaire formant une petite dépression d'où entrent et sortent du poumon, des vaisseaux pulmonaires, des bronches, des vaisseaux lymphatiques et des nerfs (Figure 1).



**Figure 2. Segmentation des poumons des bronches aux alvéoles.**

La bronche principale se divise et se ramifie de nombreuses fois jusqu'à pénétrer le lobule, l'unité fonctionnelle du poumon.

Chaque poumon est segmenté en bronches. La bronche principale droite donne naissance à trois bronches lobaires et la gauche à deux bronches lobaires. Les bronches segmentaires (10 segments par poumon) puis sous-segmentaires donnent les bronchioles constituant l'ultime division qui pénètrent dans le lobule, l'unité fonctionnelle du poumon (lieu des échanges gazeux). L'artère pulmonaire suit cette ramification bronchique. On retrouve une artériole dans chaque lobule. A chaque lobule correspond une bronchiole qui s'y ramifie pour venir au contact des alvéoles. A chaque alvéole correspond une petite ramification de l'artériole c'est ainsi que se réalisent les échanges gazeux (Figure 2).

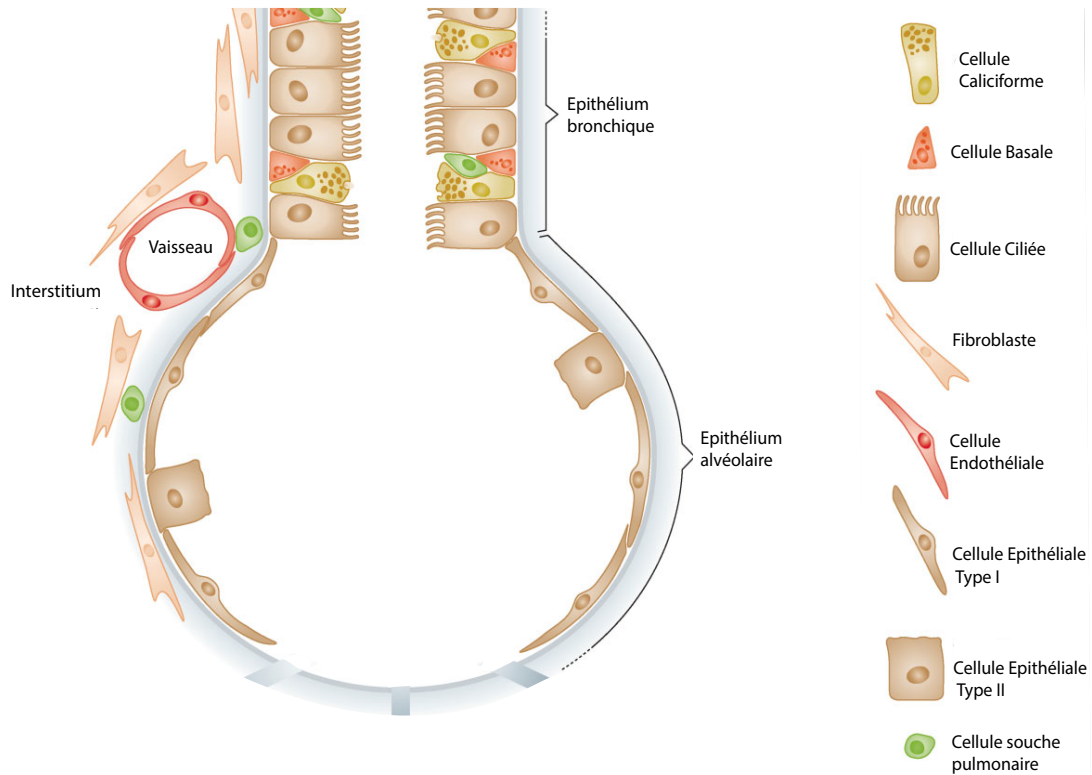
### *1.2. La partie purement respiratoire*

Cette partie intra-lobulaire est constituée des alvéoles, de très petits sacs aériens poreux où se déroulent les échanges gazeux avec le sang (Figure 3) (Konigshoff, Schwarz et al. 2011) . L'épithélium alvéolaire est formé de cellules épithéliales de type I et de type II. En raison de leur forme cubique et de leur taille, les cellules alvéolaires de type II aussi appelées pneumocytes type II, ne recouvrent que 5% de la surface alvéolaire alors qu'elles représentent 60% des cellules alvéolaires. Ces cellules secrètent le surfactant qui abaisse la tension de surface des alvéoles. Inversement, les pneumocytes de type I sont de larges cellules squameuses et extrêmement fines permettant ainsi la diffusion des gaz entre les alvéoles et les capillaires sanguins (Schlingmann, Molina et al. 2015).

Tout au long des septa interalvéolaires, on retrouve une alternance de zones minces et épaisses. Au niveau de la partie mince du septum, l'endothélium et l'épithélium ne sont séparés que par une membrane basale commune (fusion des membranes basales endothéliales et épithéliales). Dans la zone plus épaisse, l'endothélium et l'épithélium sont séparés par un interstitium contenant des fibres de collagène.

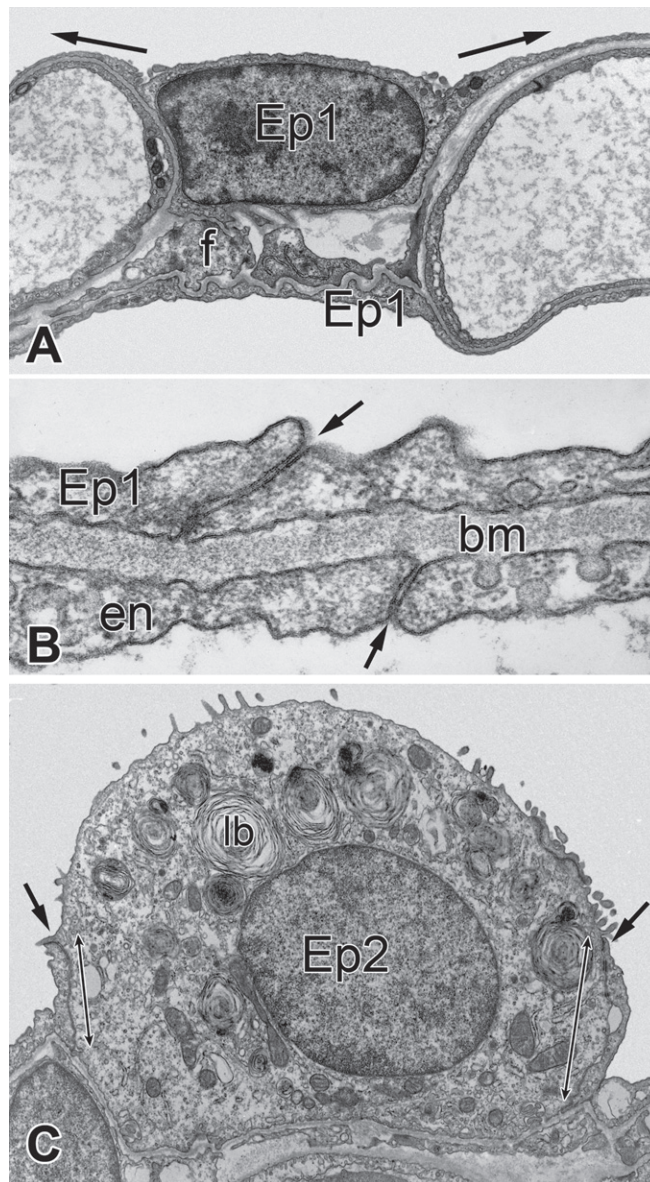
Les barrières épithéliales alvéolaires et endothéliales assurent la captation de l'oxygène ( $O_2$ ) alvéolaire et l'élimination du dioxyde de carbone ( $CO_2$ ) sanguin, mais interviennent





### Figure 3. L'espace alvéolaire.

L'espace alvéolaire est le lieu des échanges gazeux. Il est constitué principalement de cellules épithéliales de type I et de type II (pneumocytes I et II). Les pneumocytes de type II représentent 60% des cellules alvéolaires mais ils ne recouvrent que 5% de la surface alvéolaire. Ce sont ces cellules qui secrètent le surfactant qui abaisse la tension de surface des alvéoles. Les pneumocytes de type I sont des cellules très fines facilitant la diffusion des gaz entre les alvéoles et le sang dans les capillaires. D'après (Königshoff *et al.* 2011).



**Figure 4. Caractéristiques de base des cellules épithéliales alvéolaires.**

A. Un pneumocyte de type I au sein d'une niche de capillaires, étendant un bras cytoplasmique mince pour former la barrière air-sang (flèche longue). Un espace interstitiel (f) sépare cette cellule des autres cellules de type I tapissant la surface inférieure.

B. Vue à plus fort grossissement du bras cytoplasmique composé de la cellule de type I et des cellules endothéliales (en) séparées par la fusion des membranes basales (mb) en partie mince de la barrière. Les flèches indiquent les jonctions intercellulaires avec les jonctions serrées dans les deux couches de cellules.

C. Une cellule alvéolaire de type II (Ep2) est une cellule cuboïdale avec un cytoplasme riche en organites permettant la production d'éléments tensioactifs, tels que les phospholipides dans les corps lamellaires (lb) et les apoprotéines. Il y a une membrane latérale prolongée (double flèche) avec un complexe de jonction entre les cellules de type II et les cellules de type I (flèche noire épaisse). D'après (Weibel 2015).

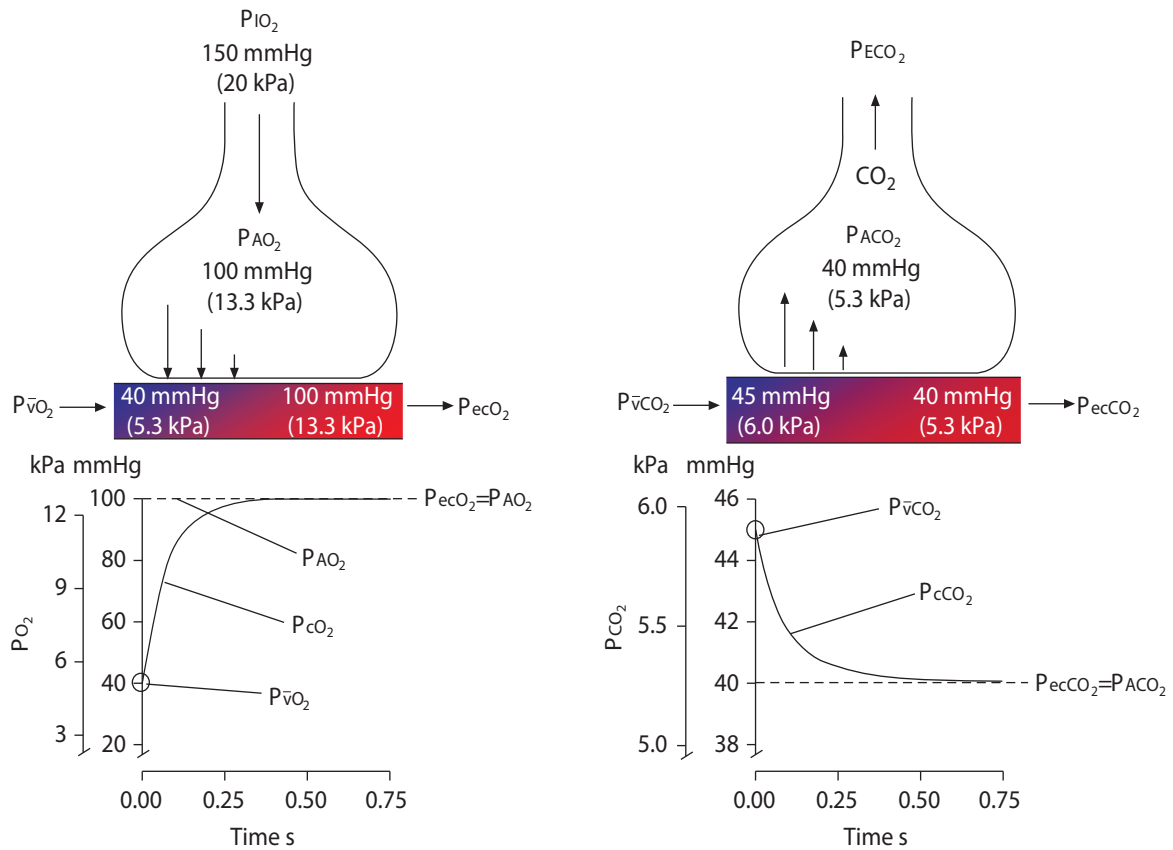
également dans la diffusion d'autres substances volatiles comme l'eau, l'alcool ou des gaz anesthésiques (Weibel 2015). La rupture de ces deux barrières, épithéliale et endothéliale, peut conduire à un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) et/ou à des œdèmes (Ware and Matthay 2001) (Figure 4).

## 2. Les échanges gazeux

La structure du poumon est faite de manière à permettre les échanges de gaz les plus efficaces possible. Par les voies respiratoires et l'arbre vasculaire, des gaz frais et du sang veineux sont livrés et enlevés jusqu'à une large surface capillaire qui recouvre 85 à 95% de la surface alvéolaire.

Grâce à la très fine membrane inter-alvéolaire, la diffusion rapide des gaz est permise entre l'espace alvéolaire et les capillaires sanguins. De plus, en raison du large volume de sang qui arrive dans les capillaires alvéolaires, le flux sanguin ralentit et le temps de transit du sang augmente, de 0.25 à 0.75 secondes (s), laissant ainsi plus de temps pour les échanges de gaz (Petersson and Glennly 2014).

Les capillaires de l'unité délivrent du sang veineux mélangé avec une faible pression partielle en  $O_2$  ( $P_{VO_2}$ ). La pression partielle en  $O_2$  ( $PO_2$ ) dans les gaz alvéolaires ( $PAO_2$ ) est plus haute que dans le sang des capillaires et l' $O_2$  diffuse passivement de l'espace alvéolaire au sang pendant le passage à travers les capillaires. La membrane séparant les gaz de l'espace alvéolaire du sang, cause une petite résistance à la diffusion donc la  $PO_2$  du sang à la fin des capillaires ( $P_{cO_2}$ ) s'équilibre avec la  $PAO_2$  avant que le sang quitte l'unité. L'oxygénation du sang artériel est donc premièrement dépendante de la  $PAO_2$ . Il faut remarquer que dans cette unité pulmonaire idéale il n'y a pas de différence entre  $PAO_2$  et  $PO_2$  dans le sang artériel ( $PaO_2$ ). Dans un poumon réel normal il y a un gradient alvéolo-capillaire normal de 1kPa environ ayant pour origine le shunt sanguin anatomique et les inégalités du rapport ventilation/perfusion. La pression partielle en  $CO_2$  ( $PCO_2$ ) est meilleure dans le sang veineux mêlé ( $P_{VCO_2}$ ) que dans les gaz alvéolaires ( $PACO_2$ ) et la diffusion à travers la membrane alvéolo-capillaire, résulte alors



**Figure 5. Echanges d'O<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> entre les alvéoles et les capillaires sanguins pulmonaires.**

A gauche, illustration de la valeur de PO<sub>2</sub> dans différents compartiments et comment l'O<sub>2</sub> diffuse le long des capillaires permettant que PeCO<sub>2</sub> soit égale à PAO<sub>2</sub>.

A droite, la PCO<sub>2</sub> est illustrée de la même manière.

L'échelle de temps sur le diagramme dans les deux panneaux se réfère au temps de transit de l'érythrocyte à travers les capillaires alvéolaires, normalement 0,25-0,75s. D'après (Pettersson and Glenny 2014).

en un flux net en direction opposée de celui de l'O<sub>2</sub>, du sang aux gaz alvéolaires (Petersson and Glenn 2014).

Le résultat est encore la même PCO<sub>2</sub> dans les gaz alvéolaires et le sang en fin de capillaires (PecCO<sub>2</sub>) parce que la résistance pour la diffusion est encore moins pour le CO<sub>2</sub> que pour l'O<sub>2</sub>. Enfin, la quantité d'O<sub>2</sub> prise en charge dans le sang est dépendante de la concentration en hémoglobine, de la fraction d'hémoglobine liée à l'O<sub>2</sub> et à la PaO<sub>2</sub>.

Les échanges gazeux alvéolo-capillaires sont une fonction essentielle de l'appareil respiratoire. Ils déterminent la quantité d'O<sub>2</sub> qui sera disponible pour les échanges gazeux tissulaires donc pour la respiration cellulaire (Figure 5).

Dans certaines pathologies comme les SDRA, les pneumonies ou lors de sepsis, les échanges gazeux deviennent moins efficaces entraînant une hypoxémie ou une hypercapnie.

## II. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë se manifeste sous forme clinique, radiologique et physiologique par une intense inflammation et une hyperperméabilité pulmonaire, en réponse à différentes agressions aiguës du parenchyme pulmonaire. C'est une pathologie très lourde qui engage le pronostic vital malgré 40 ans de recherche.

Il a été décrit pour la première fois en 1967, par Ashbaugh et ses collègues (Ashbaugh, Bigelow et al. 1967). En 1994, lors de la Conférence de Consensus Américano-Européenne (CCAE), une nouvelle définition est donnée établissant les critères diagnostiques (Bernard, Artigas et al. 1994). Le SDRA est alors défini par les critères suivants (Fanelli and Ranieri 2015) :

- une insuffisance respiratoire d'installation aiguë,
- des opacités parenchymateuses bilatérales sur une radiographie thoracique,

- une pression artérielle pulmonaire d'occlusion inférieure à 18mmHg ou absence d'évidence d'hypertension de l'oreillette gauche,
- une hypoxémie sévère (ratio  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200\text{mmHg}$  contre 500mmHg chez un sujet normal).

Un nouveau terme a également été défini, l'agression pulmonaire aiguë, de l'anglais Acute Lung Injury (ALI), caractérisée par les mêmes critères que le SDRA mais avec une hypoxémie plus modérée ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300\text{mmHg}$ ).

Depuis, des questions relatives à la fiabilité et à la validité de cette définition ont émergé et ont conduit en 2012 un panel d'experts à se réunir et à établir la définition de Berlin. Cette nouvelle définition révisé et ajuste les critères diagnostiques de la définition de la CCAE sur le SDRA (Force, Ranieri et al. 2012):

- pour pallier aux imprécisions sur la gravité des SDRA, trois catégories mutuellement exclusives sont proposées, en fonction du degré d'hypoxémie :

- légère :  $200 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$  (remplaçant la notion d'ALI)
- modérée :  $100 \text{ mmHg} < \text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200 \text{ mmHg}$
- sévère :  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100\text{mmHg}$

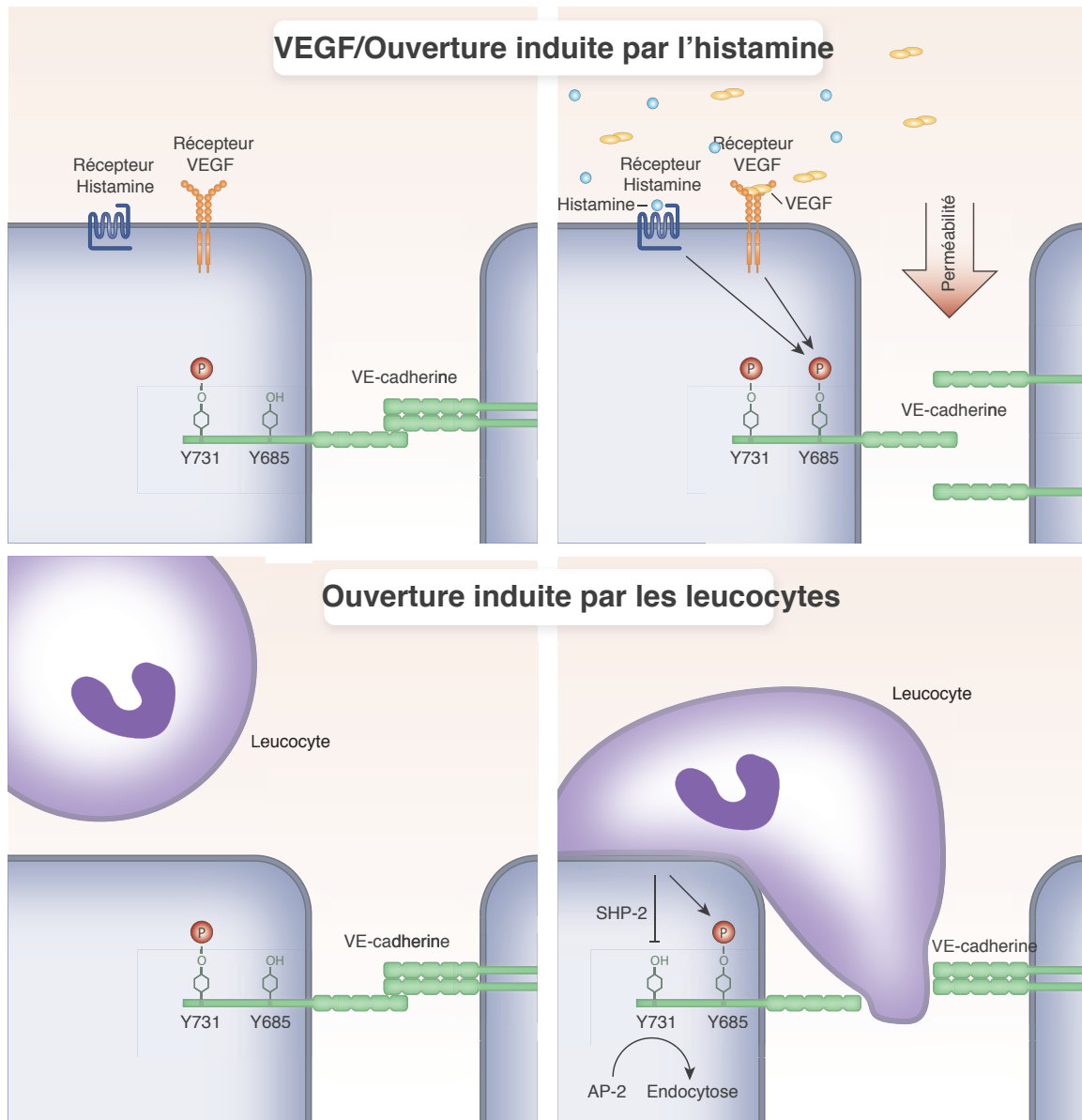
- la phase aiguë est plus précise et établie à une semaine ou moins.

- les critères radiographiques sont clarifiés afin de diminuer la variabilité inter-observateurs.

- abandon de la pression artérielle d'occlusion comme critère et une amélioration de la capacité à exclure les causes cardiaques d'infiltrats bilatéraux.

Selon le modèle conceptuel actuel, le SDRA est un type de lésion pulmonaire sévère et diffuse associée à un ou plusieurs facteurs de risque prédisposant. Il est caractérisé par une inflammation conduisant à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et au collapsus des alvéoles.

## 1. Pathogénèse du SDRA



**Figure 6. L'induction de la perméabilité repose exclusivement sur la phosphorylation des VE-cadhérine-Y685, alors que l'extravasation efficace des leucocytes ne dépend que de la phosphorylation d'Y731.**

**Panneau du haut.** Sous certaines conditions, les VE-cadhérines ne sont pas suffisamment phosphorylées sur le résidu Y685 mais le sont beaucoup plus sur l'Y731. Des facteurs induisant la perméabilité vasculaire comme le VEGF ou l'histamine augmentent la phosphorylation sur le résidu Y685 alors que le niveau de base de phosphorylation d'Y731 n'est pas altéré.

**Panneau du bas.** Au contraire de la perméabilité induite par des stimuli, les leucocytes déphosphorylent rapidement Y731. Seulement, Y731 et non Y685 permet l'extravasation des leucocytes *in vivo*. L'induction de la perméabilité et l'extravasation des leucocytes régulent la phosphorylation de différents résidus tyrosine sur les VE-cadhérines de différentes manières. D'après (Wessel, Winderlich *et al.* 2014)

## 1.1. Lésions de l'endothélium et de l'épithélium

### A. L'hyperperméabilité vasculaire

L'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire est essentielle pour empêcher la formation d'œdèmes alvéolaires et l'extravasation des leucocytes. Des lésions de la composante endothéliale de cette barrière, conduisent à l'augmentation de la perméabilité capillaire qui représente la principale anomalie physiopathologique initiant le SDRA. L'endothélium des capillaires est constitué de cadhérine endothéliale-vasculaire (VE-cadhérine) jouant un rôle très important dans l'adhésion cellulaire et sont donc primordiales pour la stabilité des jonctions endothéliales (Wessel, Winderlich et al. 2014). Ce sont des protéines transmembranaires de type I assurant un contact calcique dépendant entre les cellules vasculaires. La partie extracellulaire de la protéine est engagée dans un dimère via une interaction homophile alors que la queue cytoplasmique est associée à des protéines de la famille des caténines, servant d'intermédiaire de liaison avec le cytosquelette. La perméabilité vasculaire et l'extravasation des leucocytes sont très contrôlées que ce soit dans des conditions physiologiques ou lors de l'inflammation (Sidibe and Imhof 2014). Les échanges peuvent se produire par voie transcellulaire (à travers la cellule endothéliale) ou par voie paracellulaire c'est-à-dire entre les jonctions cellule-cellule. La voie para-cellulaire est régulée essentiellement par les protéines des jonctions serrées et adhérentes. Des facteurs pro-inflammatoires ou induisant la perméabilité comme le Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ou l'histamine induisent la phosphorylation des résidus Tyrosine 685 (Tyr685) des VE-cadhérines via la protéine steroid receptor coactivator (Src) conduisant à la perméabilité cellulaire en détruisant la liaison de la cadhérine à la caténine (Figure 6). De plus, les leucocytes activent la phosphatase SHP-2 (Src homology-2-domain-containing protein tyrosine phosphatase) qui conduit à la déphosphorylation du résidu Tyr731 phosphorylé des VE-cadhérine. Le résidu Tyr735



déphosphorylé associé au complexe adaptator Protein (AP)-2 conduit à l'endocytose de la VE-cadhérine permettant l'extravasation des leucocytes.

### **B. Rôle des cellules épithéliales alvéolaires**

Le degré de sévérité des lésions des cellules épithéliales alvéolaires est un prédicteur important de l'issue de la maladie. La monocouche de cellules épithéliales stabilise la barrière alvéolaire. Elle est plus imperméable que l'endothélium et permet de contenir l'œdème dans l'espace interstitiel. Les cellules de type I qui la composent sont les plus facilement abîmées. Les cellules de type II, les plus résistantes, produisent le surfactant pulmonaire qui maintient une tension de surface entre l'interface air-liquide dans les alvéoles empêchant qu'elles ne s'affaissent sur elles-mêmes. Elles assurent également la clairance des fluides alvéolaires, le transport des ions ainsi que la prolifération et la différenciation en cellules de type I après des lésions (Ware and Matthay 2000). Chez les patients souffrants de SDRA, lorsque la barrière épithéliale est rompue, la clairance est diminuée contribuant à l'engorgement des alvéoles. En effet, une hypoxie ou une hypercapnie lors de mauvais échanges gazeux, entraînent une diminution du nombre de pompes sodium-potassium ( $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase) sur la membrane baso-latérale, normalement responsables du maintien d'un gradient ionique par la réabsorption active des ions sodiques, chlorures ou de l'eau. La production et le renouvellement du surfactant pulmonaire sont également diminués.

#### **1.2. Implication des neutrophiles**

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont répartis entre le secteur circulant et le secteur marginal, dans lequel les PNN sont plaqués contre les parois des vaisseaux. C'est le cas dans les capillaires des poumons, qui stockent une grande proportion du pool des neutrophiles marginaux. Ceci s'explique par l'anatomie de la microcirculation pulmonaire, constituée d'un vaste réseau de capillaires de diamètre beaucoup plus petit

que les PNN. Les neutrophiles doivent donc se déformer, comme les érythrocytes, pour circuler dans ce réseau. Mais comme les neutrophiles sont larges et peu déformables ils circulent plus lentement dans les capillaires. De plus, l'activation des PNN diminue leur capacité à se déformer et augmente celle à adhérer à l'endothélium, ce qui augmente le nombre de PNN dans les poumons et diminue le nombre de ceux circulant (Hogg 1987). De nombreuses études fondamentales et cliniques ont montré que la constitution de certaines lésions pulmonaires aiguës était médiées par ces PNN. Dans la phase précoce du SDRA, une nette accumulation des PNN est retrouvée notamment sur des coupes histologiques de poumon (Ware and Matthay 2000).

## 2. Traitement du SDRA

La ventilation mécanique a été décrite dans le traitement du SDRA à partir de 1971. Elle est très souvent le seul recours face à l'hypoxémie présentée par ces patients.

Malheureusement, force est de constater pour les cliniciens au fil du temps, que la ventilation mécanique a un double rôle dans le SDRA : elle sauve des vies mais amplifie également la gravité des lésions sur le poumon (Frank and Matthay 2003)

## III. La ventilation mécanique

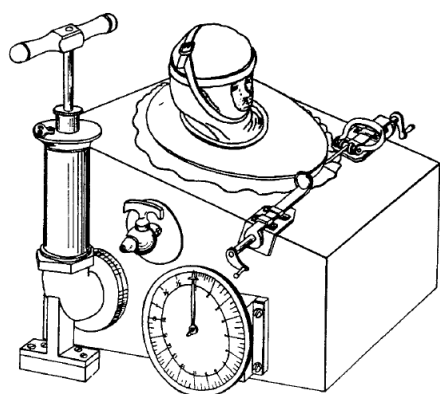
### 1. Historique

L'histoire de la ventilation mécanique commence avec un brillant physicien du 16<sup>ème</sup> siècle, Andreas Vesalius qui a écrit un traité d'anatomie dans lequel il décrit une expérience menée sur un cochon. Pour cette expérience il relate que la vie a été redonnée au cochon en introduisant un tube dans sa trachée et en soufflant dans ce tube jusqu'à ce que les poumons se gonflent et se remplissent d'air. Cette première

expérience décrite il y a plus de 500 ans, ressemble à ce qui se passe chaque jour dans les services de réanimation.

Il faut ensuite attendre quelques siècles pour que l'idée de « ressusciter » les patients intéresse de nouveaux les chercheurs tout en remettant leurs travaux dans le contexte de connaissances de l'époque, c'est-à-dire avant même que les concepts d'O<sub>2</sub>, de CO<sub>2</sub> et de ventilation pulmonaire soient connus. Pour ramener à la vie les patients, ils pensaient donc qu'une forte stimulation était nécessaire. Pour cela, ils faisaient rouler les patients dans des tonneaux ou ils les brûlaient avec du fer chaud ou même leur mettaient une lumière vive dans les yeux. Quand ces techniques ne fonctionnaient pas, ils en testaient une dernière, le fumigator, lors de laquelle des fumées de tabac étaient introduites à l'intérieur des patients. Si cette technique avait continué d'être utilisée, il y aurait eu plus de cancers du côlon que de cancers du poumon.

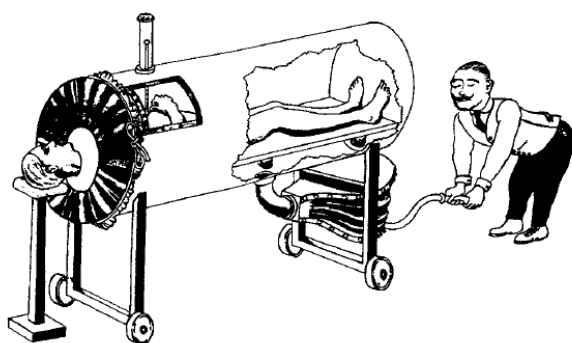
Dans les années 1800, Alfred Jones a mis au point le premier respirateur (Figure 7), le « tank respirator », sorte de cuve en bois dont émergeait la tête du malade. La cuve était équipée d'un levier qui augmentait la pression dans le respirateur lorsque l'on appuyait dessus. Cette augmentation de pression comprimait la cage thoracique du patient produisant une expiration. Il suffisait de relâcher le levier pour avoir une inspiration.



**Figure 7. Dessin schématique d'un des premiers respirateur breveté par Alfred Jones en 1864.**  
D'après (Slutsky 2005)

Alfred Woillez, dans les mêmes années a développé un respirateur beaucoup plus proche de ceux actuels (Figure 8). Il était placé sur les bords de la Seine pour aider les personnes qui s'étaient noyées. Le principe de base de ce respirateur était le même que celui décrit précédemment, c'est-à-dire que des changements de pression à l'intérieur

du respirateur permettait l'entrée et la sortie de gaz des poumons du patient. Ce qui est intéressant dans le modèle du Docteur Woillez, c'est qu'une tige en métal repose sur la cage thoracique du patient, ce qui représentait un indice approximatif du volume courant.



**Figure 8. Représentation d'un des premiers poumon d'acier.**

Ce respirateur a été construit par le Dr Woillez en 1876. D'après (Slutsky 2005)

En 1931, John Emerson a développé un poumon d'acier similaire à celui de Woillez mais en y ajoutant un moteur ce qui permettait au respirateur de gérer seul la ventilation du patient. Le problème se posait dans les soins à apporter aux patients qui restaient difficilement accessibles dans cet appareil. Pour contrer ce problème, les médecins et scientifiques de l'époque avaient créé une chambre de ventilation qui était en réalité la même chose que le poumon d'acier mais à l'échelle d'une pièce. Le patient avait la tête hors de cette chambre, mais le personnel soignant pouvait plus aisément pratiquer des soins et s'occuper de l'hygiène des patients. Il leur suffisait de rentrer par la porte de la chambre pour avoir accès au corps du malade.

La véritable ère de la ventilation mécanique et des unités de soins intensifs a commencé lors de l'épidémie de poliomyélite. En 1953, Lassen a publié un article sur l'utilisation de la ventilation mécanique chez les malades paralysés par la poliomyélite (Lassen 1953). Le taux de mortalité chez ces patients était très élevé, de l'ordre de 80% et tous mourraient des suites de l'insuffisance respiratoire aiguë. En Août 1953, Lassen a alors instauré la VM pour ces patients et a permis de diminuer de 50% la mortalité des patients en détresse respiratoire secondaire à la poliomyélite (Ibsen 1954). Des milliers de malades furent ainsi pris en charge par la VM à pression négative avec des poumons

d'acier. En 1954, Engström décrivit l'Engström universal ventilator et son utilisation dans le traitement des malades atteints d'une paralysie respiratoire (Engstrom 1954).

## 2. Les lésions induites par la ventilation mécanique

### *2.1. Historique-naissance de la notion de VILI*

Depuis des décennies, la ventilation mécanique est utilisée pour suppléer les personnes en détresse respiratoire. Cependant, bien qu'elle permette de sauver de nombreuses vies, elle est la source de graves complications appelées lésions induites par la ventilation mécanique (VILI de l'anglais Ventilation Induced Lung Injury).

Jusque dans les années 90, le traumatisme mécanique lié à la ventilation était considéré comme le seul initiateur du VILI en détériorant les parois de l'espace aérien (Todd, Franklin et al. 1989, Dreyfuss and Saumon 1998).

#### **A. Les oedèmes induits par la ventilation mécanique**

Depuis les toutes premières utilisations de la VM, un grand intérêt était porté à trouver une ventilation non agressive pour le poumon. Cependant l'opinion sur les effets délétères de la VM restait partagée.

Dans les années 60, Greenfield et son équipe ont montré que les poumons de chiens ventilés deux heures à hautes pressions inspiratoires (Greenfield, Ebert et al. 1964) présentaient des marques d'atélectasie et une tension de surface plus élevée.

Quelques années plus tard, Sladen et ses collègues ont mené une étude sur l'Homme, dans laquelle des patients avaient été ventilés de longues périodes. Ils ont montré que la fonction de leurs poumons s'était dégradée, que le gradient alvéolo-artériel en oxygène avait augmenté et que la compliance pulmonaire était diminuée (Sladen, Laver et al. 1968).

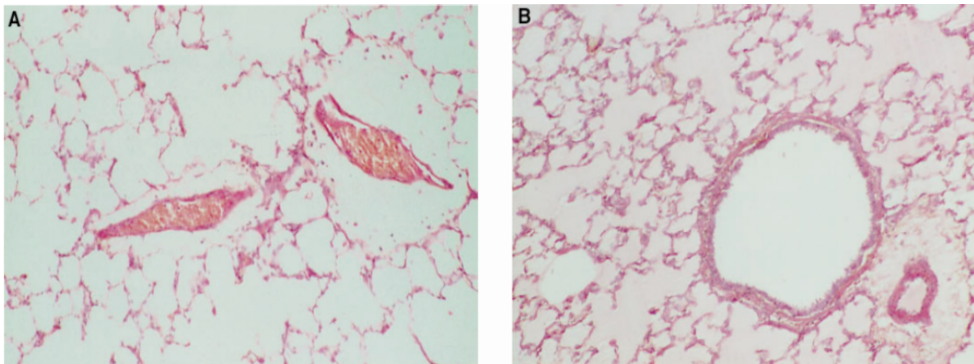


**Figure 9. Aspect macroscopique du poumon de rats après une ventilation mécanique à 45cmH<sub>2</sub>O de pression inspiratoire.**

A gauche se trouve le poumon à son état normal.

Au milieu se trouve le poumon après 5 minutes de ventilation mécanique à haute pression. Sur l'apex du poumon gauche, on observe des zones d'atélectasie.

A droite, après 20 minutes de ventilation mécanique, la taille des poumons a augmenté et ils apparaissent congestionnés. De plus, des fluides d'œdème remontent le long de la canule. D'après (Dreyfuss and Saumon 1998).



**Figure 10. Poumons de rat vus en coupe sous microscope.**

A. Après 5 minutes de ventilation mécanique à 45cmH<sub>2</sub>O de pression inspiratoire, l'œdème est contenu dans de larges espaces périvasculaires.

B. Après 20 minutes de ventilation mécanique, l'œdème s'étend à toute l'alvéole.

En 1971, Nash et son équipe, ont montré lors d'une étude chez la chèvre (Nash, Bowen et al. 1971) que la durée de ventilation n'est pas responsable des dommages sur le poumon lorsque de bas pics de pression inspiratoire sont utilisés. Par la suite, d'autres études dont celle de Webb et Tierney ont montré que la VM à de fortes pressions inspiratoires même sur de courtes durées génèrent de l'œdème pulmonaire (Webb and Tierney 1974).

#### **a. Quel type d'œdème : hydrostatique ou de perméabilité ?**

Durant leurs travaux, Webb et Tierney ont spéculé que l'œdème pulmonaire était d'origine hydrostatique. Mais leurs expériences ont montré la présence de quantités importantes de protéines dans les liquides d'œdèmes interstitiels récoltés laissant alors penser qu'il s'agissait plutôt d'œdèmes de perméabilité.

#### ***Les preuves expérimentales d'une augmentation de la pression transmurale vasculaire :***

Les premières explications avancées sur les œdèmes liés à la VM sont l'augmentation de la pression transmurale vasculaire à la fois au niveau alvéolaire et extra-alvéolaire mais peu de preuves ont permis de démontrer cette hypothèse.

#### ***Les preuves d'une altération de la perméabilité alvéolo-capillaire :***

Des modèles de poumons isolés, de cages thoraciques ouvertes ou encore d'animaux entiers soumis à la VM à de hautes pressions, ont permis de montrer une altération de la perméabilité épithéliale et endothéliale.

Il a été montré qu'il existe bien un lien entre la durée de la lésion et l'apparence globale du poumon (Figure 9). Les poumons abîmés par la VM présentent des marques d'atélectasie, de congestion importante et un élargissement des espaces aériens (Dreyfuss and Saumon 1998).

Une observation des poumons au niveau microscopique (Figure 10) confirme également que le degré d'œdème est intimement lié à la magnitude de la pression inspiratoire exercée sur les poumons. Après quelques minutes de ventilation un œdème se forme

mais reste confiné au niveau de l'espace interstitiel puis à presque une heure de VM il devient alvéolaire.

## 2.2. Conséquences des forces mécaniques appliquées par la VM sur des lésions pulmonaires préexistantes ou non

### A. Notion de biotraumatisme

Le concept de biotraumatisme a été inventé pour caractériser l'effet pro-inflammatoire de la ventilation mécanique et les lésions qu'il est susceptible de provoquer (Slutsky 2005).

L'hypothèse de départ était que des stratégies ventilatoires agressives pouvaient conduire à la libération de médiateurs inflammatoires comme les cytokines. Un premier modèle de poumons de rat isolés a été utilisé. Il permettait d'utiliser de grands volumes de ventilation mimant les distensions régionales qui se produisent dans les poumons des patients sans affecter l'hémodynamique (Tremblay, Valenza et al. 1997). Quatre stratégies ventilatoires différentes ont été utilisées :

- un groupe contrôle avec une faible PEEP (3cmH<sub>2</sub>O) et un VT de 7mL/Kg,
- un second groupe avec une PEEP de 10cmH<sub>2</sub>O et un VT de 15mL/Kg,
- un troisième groupe avec 0 PEEP et un VT de 15mL/Kg,
- un quatrième groupe avec 0 PEEP et un grand VT de 40mL/Kg.

Après deux heures de ventilation dans chacune de ces conditions, ils ont dosé le TNF- $\alpha$  dans les liquides de lavages broncho-alvéolaires (LBA) et ont trouvé des concentrations positives en TNF- $\alpha$  dans tous les groupes, avec des concentrations au moins deux fois jusqu'à soixante fois supérieures pour le quatrième groupe, comparé au groupe contrôle. Ceci prouve qu'en seulement deux heures de ventilation, il y a libération de médiateurs inflammatoires susceptibles d'induire des dysfonctionnements d'organes à distance. Tremblay et ses collègues (Tremblay, Miatto et al. 2002) ont montré que ces cytokines étaient produites et libérées par les cellules épithéliales pulmonaires.



De récentes études suggèrent que l'incidence du SDRA est supérieure à 5-15/100 000 cas par an. Quasiment tous les patients souffrant de SDRA nécessitent d'être mis sous VM et peuvent donc potentiellement développer de nouvelles lésions induites par cette VM (le VILI) (Frank and Matthay 2003).

L'augmentation locale de l'inflammation est un des mécanismes par lequel la ventilation induit des lésions sur le poumon. Des études expérimentales ont montré que l'utilisation d'un haut volume courant doublé d'une faible PEEP, induisaient la libération massive de cytokines inflammatoires dans les voies aériennes et dans le sang, augmentaient l'infiltration des neutrophiles dans les tissus pulmonaires et activaient les macrophages pulmonaires (Imanaka, Shimaoka et al. 2001). Tremblay et al ont également montré que la ventilation à grand volume courant augmentait l'expression de l'acide-ribonucléique messager (ARNm) de *cfos*, un facteur de transcription important dans la phase précoce de la réponse au stress (Tremblay, Valenza et al. 1997). Dans leur modèle de lésions pulmonaires induites par l'aspiration d'acide chez le rat, Chiumello *et al* ont également démontré que des stratégies ventilatoires agressives augmentaient les niveaux en TNF- $\alpha$  et en macrophage inflammatoire peptide 2 (MIP-2) dans le poumon (Chiumello, Pristine et al. 1999).

D'autres études expérimentales confirment l'hypothèse selon laquelle les médiateurs pro-inflammatoires ont une grande importance dans le développement du VILI. Des expériences utilisant des anticorps anti-TNF- $\alpha$  ainsi que des antagonistes des récepteurs à l'IL-1 ont montré que, utilisés en prétraitement chez des lapins déplétés en surfactant avant la mise en place de la VM, diminuaient les atteintes histologiques pulmonaires et préservaient l'oxygénation (Imai, Kawano et al. 1999) tout en réduisant également la perméabilité endothéliale à l'albumine ainsi que l'infiltration neutrophilique (Narimanbekov and Rozycki 1995).

Afin d'identifier les cellules à l'origine de la production des cytokines inflammatoires, Pugin et son équipe ont reproduit dans des modèles de cultures cellulaires *in vitro*, l'étirement cyclique imposé par la ventilation mécanique. Dans un premier temps, ils ont soumis des macrophages alvéolaires humains mis en culture, à un étirement

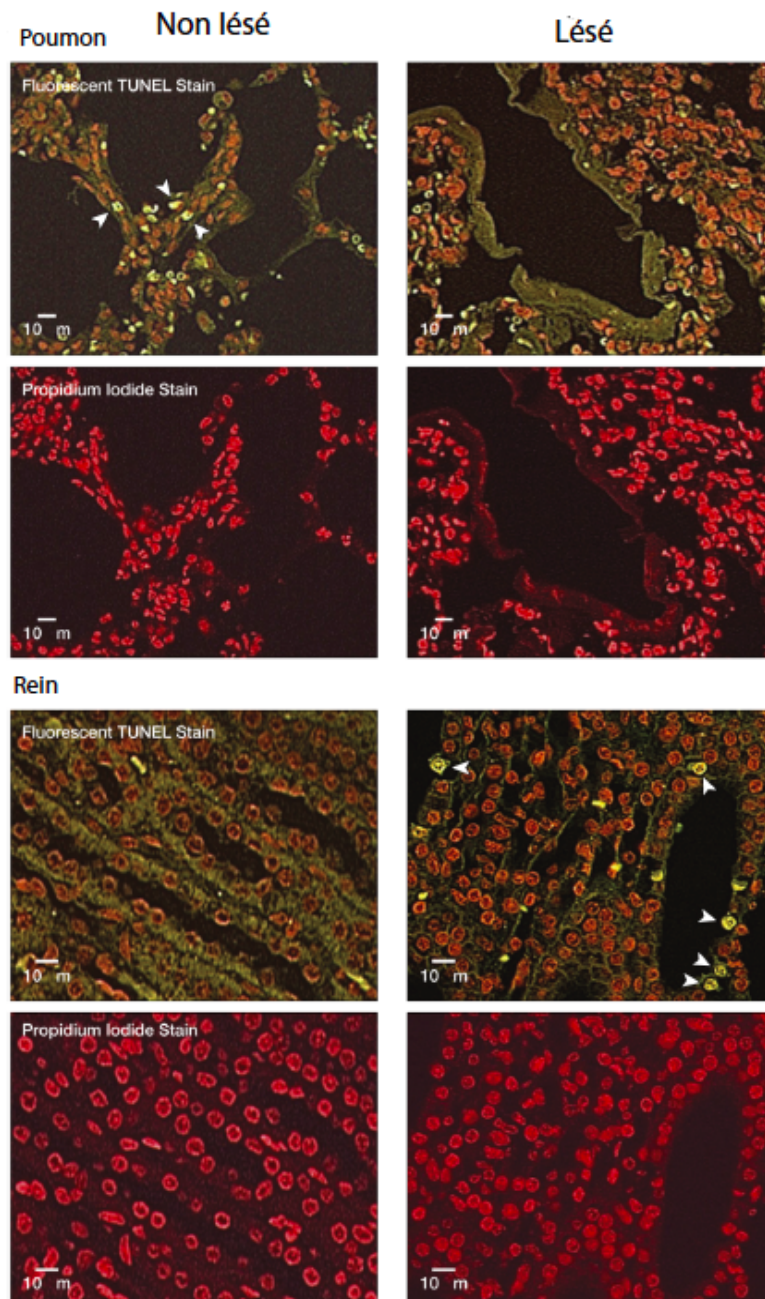
cyclique pendant 32h. Ils ont montré que cet étirement cyclique induisait l'augmentation de la sécrétion d'IL-8 ainsi que l'augmentation du NF-κB nucléaire dans les macrophages après seulement 30min d'étirement (Pugin, Dunn et al. 1998). Dans une autre de leur étude, la même équipe s'est attachée à soumettre au même étirement cyclique différents types cellulaires incluant des macrophages alvéolaires, des cellules A549 (lignée cellulaire transformée à partir de cellules d'un carcinome bronchioalvéolaire), deux lignées de cellules endothéliales, une lignée de cellules épithéliales bronchiques et des fibroblastes pulmonaires primaires. Ils ont trouvé que seulement les macrophages et les cellules A549 sécrétaient de l'IL-8 en réponse aux étirements, en quantité plus importante chez les macrophages. Des données cliniques (Kurdowska, Miller et al. 1996) (Miller, Cohen et al. 1996) corroborent ces résultats en montrant notamment des taux importants d'IL-8 dans les liquides d'œdèmes pulmonaires issus de patients souffrant de SDRA et soumis à la VM. Les macrophages alvéolaires semblent donc être des cellules importantes dans la réponse au stress mécanique induit par l'étirement, en initiant la réponse inflammatoire dans le VILI.

***Conséquences du biotraumatisme sur les autres organes :***

Dans un de leurs travaux, Slutsky et son équipe ont montré que la décompartmentalisation de l'inflammation au niveau systémique (Slutsky and Tremblay 1998), pouvait causer des lésions sur des organes distants du poumon. L'équipe de Chimulleo a utilisé un modèle de rats souffrant de graves lésions sur le poumon induites par une injection intra-trachéale d'acide qu'ils ont ensuite ventilé selon quatre protocoles différents :

- VT 16mL/Kg, 0 PEEP,
- VT16mL/Kg, 5cmH<sub>2</sub>O PEEP,
- VT 5mL/Kg, 0 PEEP,
- VT 5mL/Kg, 5cmH<sub>2</sub>O PEEP.

Ils ont observé que dans le groupe à haut VT et 0 PEEP, la concentration en TNF-α sérique était considérablement augmentée. En revanche, la PEEP a une action protectrice dans ce modèle car ils n'ont pas observé d'augmentation significative même



**Figure 11. Observation des cellules pulmonaires et phréniques en apoptose par la technique de marquage TUNEL.**

Les flèches blanches indiquent les noyaux des cellules marquées positivement par la technique TUNEL.

Les quatre photos du panneau supérieur montrent les cellules pulmonaires marquées par la technique TUNEL (deux du haut) et par l'iodure de propidium (deux du bas). Les noyaux les plus marqués par la technique TUNEL sont retrouvés chez le groupe non lésé par la ventilation mécanique.

En revanche, pour le rein (quatre photos du panneau inférieur) il y a plus de cellules épithéliales marquées par la technique TUNEL dans le groupe lésé par la ventilation mécanique. D'après (Imai, Parodo *et al.* 2003).

lorsqu'elle est associée à une ventilation à haut volume (VT 16mL/Kg) (Chiumello, Pristine et al. 1999). Cette étude a aussi permis de montrer que la ventilation mécanique peut également avoir un impact sur des organes distants du poumon en permettant la libération de nombreux médiateurs pro-inflammatoires dans la circulation sanguine.

Une étude autre menée chez le lapin en utilisant le modèle d'aspiration d'acide associée à une ventilation agressive (haut VT et 0 PEEP) ou plus protectrice (bas VT et petite PEEP) a montré que les reins des animaux soumis à la ventilation agressive présentaient de nombreuses cellules en apoptose (Imai, Parodo et al. 2003) (Figure 11).

### **B. Notion de barotraumatisme**

En plus de l'augmentation de l'inflammation dans le poumon, la rupture de la barrière alvéolo-capillaire participe également à la genèse du VILI.

Webb et Tierney ont été les premiers à montrer dans leur étude sentinelle chez le rat (Webb and Tierney 1974), que les animaux ventilés mécaniquement avec une pression de pic à 45cmH<sub>2</sub>O sans PEEP développaient significativement plus d'œdème que ceux ventilés avec la même pression de pic mais associée à une PEEP de 10cmH<sub>2</sub>O. De plus, le volume courant utilisé pour obtenir cette même pression de pic de 45cmH<sub>2</sub>O, était beaucoup plus faible lorsque la PEEP était ajoutée (15mL/Kg avec la PEEP contre 43mL/Kg sans PEEP).

Dreyfuss et son équipe ont par la suite montré que la ventilation à haut volume courant augmentait l'œdème de perméabilité et que la formation de ces œdèmes était principalement déterminée par la pression trans-pulmonaire plutôt que par la pression de pic (Dreyfuss, Soler et al. 1988). La cage thoracique et l'abdomen de rats ventilés étaient maintenus par du caoutchouc pour limiter leur amplitude de mouvement. La ventilation était effectuée avec la même pression de pic mais en diminuant brusquement le VT de moitié. Ils n'ont pas retrouvé la formation d'œdème.

Dans les années 80, Egan a montré dans ses travaux (Egan 1980, Egan 1982) sur poumon entier ou lobes isolés que la perméabilité épithéliale, comme endothéliale, augmentait avec l'augmentation du volume pulmonaire. Cependant, les travaux sur poumon entier montraient que l'augmentation de la perméabilité était plus modérée que sur lobe isolé certainement parce que les différences de pression trans-pulmonaires étaient empêchées. D'après ces travaux, il apparaît que la distension des poumons au-delà de la normale physiologique génère une hyperperméabilité épithéliale même dans des poumons sains. La ventilation mécanique avec des volumes courants proches de la normale physiologique, peut aussi entraîner des changements dans la perméabilité épithéliale de poumons déjà lésés. Ainsi, dans leur modèle de lésions pulmonaires induites par l'acide chez le rat, Frank et son équipe (Frank, Gutierrez et al. 2002) ont trouvé qu'une ventilation à 6mL/Kg entraînait moins de remplissage des alvéoles et moins de lésions de la barrière épithéliale comparée à une ventilation à 12mL/Kg avec le même niveau de PEEP. Lorsque le volume courant est abaissé à 3mL/Kg, il y a encore moins de lésions sur les cellules épithéliales et moins d'œdème dans les voies aériennes. Les mêmes conclusions sont retrouvées dans un modèle où les animaux ont été déplétés en surfactant pulmonaire (Imai, Nakagawa et al. 2001).

Des études ciblant particulièrement les cellules épithéliales alvéolaires de type II ont permis de mieux comprendre le mécanisme de lésions cellulaires dans le VILI. Dans une de ses études, dans un modèle *in vitro* d'étirement de cellules épithéliales alvéolaires, l'augmentation de l'amplitude et de la durée ou de la fréquence des étirements cycliques, entraînent de nombreuses lésions sur la membrane plasmique de ces cellules et leur mort (Tschumperlin, Oswari et al. 2000). Le taux de déformation de la cellule pendant une seule tension n'affecte pas la membrane plasmique. Dans une autre étude, la perturbation de la membrane induite par l'étirement cyclique *in vitro* est dépendante de la fréquence du trafic de la membrane plasmique vers la surface cellulaire (Vlahakis, Schroeder et al. 2001). L'inhibition du remodelage via le cytosquelette a peu d'impact sur les lésions de la cellule, indiquant que la perturbation mécanique du cytosquelette est moins importante que celle de la membrane plasmique. Ces résultats supportent

l'hypothèse selon laquelle la déformation de la membrane et la perturbation du trafic lipidique peuvent être des mécanismes majeurs dans le VILI sans toutefois exclure l'implication des signaux induits par l'étirement du cytosquelette.

La présence de fluide d'œdème dans l'espace aérien est à la fois une conséquence des lésions pulmonaires mais aussi un mécanisme potentiel par lequel le VILI est amplifié. En effet le liquide d'œdème remplissant les alvéoles conduit au collapsus des alvéoles en inactivant le surfactant (Wyszogrodski, Kyei-Aboagye et al. 1975). Cette diminution du volume pulmonaire conduit à une hétérogénéité du poumon, résultant en une surdistension des unités pulmonaires restantes. C'est ce que l'équipe de Dreyfuss a également montré chez le rat dont la partie distale des poumons était comblée par du sérum salé (Dreyfuss, Martin-Lefevre et al. 1999). Ils ont montré que ce comblement alvéolaire associé à une ventilation à haut volume courant agissait en synergie pour augmenter la perméabilité endothéliale à l'albumine. Ils ont également trouvé que la perméabilité à l'albumine augmentait quand la compliance pulmonaire elle, diminuait, suggérant que seule une petite partie des poumons étaient ventilée et qu'il en résulterait donc plus de lésions.

La clairance de l'œdème nécessite le transport actif des ions sodium à travers l'épithélium. Lecuona et son équipe ont montré que la ventilation à haut volume courant induisait une diminution des transports sodiques dépendant de l'énergie (Lecuona, Saldias et al. 1999) . Une instillation dans des poumons isolés d'agoniste  $\beta$ -adrénergiques restore les niveaux de clairance des œdèmes de l'espace aérien en augmentant l'activité et la quantité des transports sodium-potassium ATPase sur la membrane basolatérale. Des études cliniques sur des patients atteints de SDRA ont montré une corrélation entre la préservation de la clairance des fluides des espaces aériens et une meilleure survie (Ware and Matthay 2001). Mais ces résultats n'ont malheureusement pas été confirmés par la suite.

### **C. Notion de volotraumatisme**

Dreyfuss et son équipe ont par la suite montré que la ventilation à haut volume courant augmentait les oedèmes de perméabilité et que la formation de ces oedèmes était principalement déterminée par l'utilisation de ces hauts volumes plus que par la pression dans les voies respiratoires (Dreyfuss, Soler et al. 1988). La cage thoracique et l'abdomen de rats ventilés étaient maintenus par du caoutchouc pour limiter l'amplitude des mouvements respiratoires. Dans ces conditions, la pression dans les voies respiratoires était très forte alors que le VT était lui modéré, cependant ils n'ont observé aucune lésion sur les poumons. En revanche, la ventilation des animaux sans restriction de l'amplitude des mouvements respiratoires, à une pression donnée les volumes atteignent des valeurs très hautes et ils ont observé que les lésions sur le poumon étaient très sévères.

Cette étude a conduit à la conclusion que le volotraumatisme plus que le barotraumatisme est le premier déterminant du VILI.

Pour bien comprendre ce qui caractérise le VILI il faut avant tout bien comprendre ce qu'est la pression trans-pulmonaire (Raby, Le Boudier et al. 2009) qui est susceptible d'induire des dommages sur le poumon pendant la ventilation mécanique, comme lors de la ventilation spontanée (Kuchnicka and Maciejewski 2013). C'est en fait la différence entre la pression dans les voies aériennes respiratoires (Paw) et la pression pleurale (Ppl). Pendant la ventilation mécanique, la Paw augmente considérablement mais la Ppl également ce qui permet de garder une pression PL normale et donc aucune séquelle sur les poumons. Il est important de préciser que pour une pression des voies aériennes donnée, le développement du VILI va dépendre de la pression transmurale générée ainsi le terme volotraumatisme est plus adapté. PL est la véritable force de distension du poumon (Gattinoni 2011). Lorsqu'elle est appliquée au squelette du poumon elle entraîne la formation d'une force de réaction inverse et égale appelée « stress », le barotrauma. L'expansion du poumon qui en résulte par rapport à sa position initiale de repos, est appelée « strain », le volotrauma. Ces deux forces, dans la limite physiologique, sont reliées par une relation linéaire :  $stress = K \times strain$  où K est l'élastance spécifique du poumon qui apparaît quand le VT est égal à la capacité

résiduelle fonctionnelle (CRF). Des études ont montré que l'élastance du poumon valait (pour un volume pulmonaire équivalent à 2 CRF) environ 13 cmH<sub>2</sub>O/mL (Chiumello, Carlesso et al. 2008) aussi bien chez des sujets avec des poumons sains que chez des patients souffrant de SDRA. Même en cas de lésion pulmonaire, barotrauma (Network) et volotrauma (strain) restent dans une relation constante décrite par l'équation précédente. L'équivalent clinique du stress serait la pression transpulmonaire alors que celui de « strain » serait le ratio de la variation de volume sur la CRF.

L'adjonction d'une pression de fin d'expiration positive atténue la sévérité des lésions pulmonaires via deux principaux mécanismes décrits par l'équipe de Slutsky :

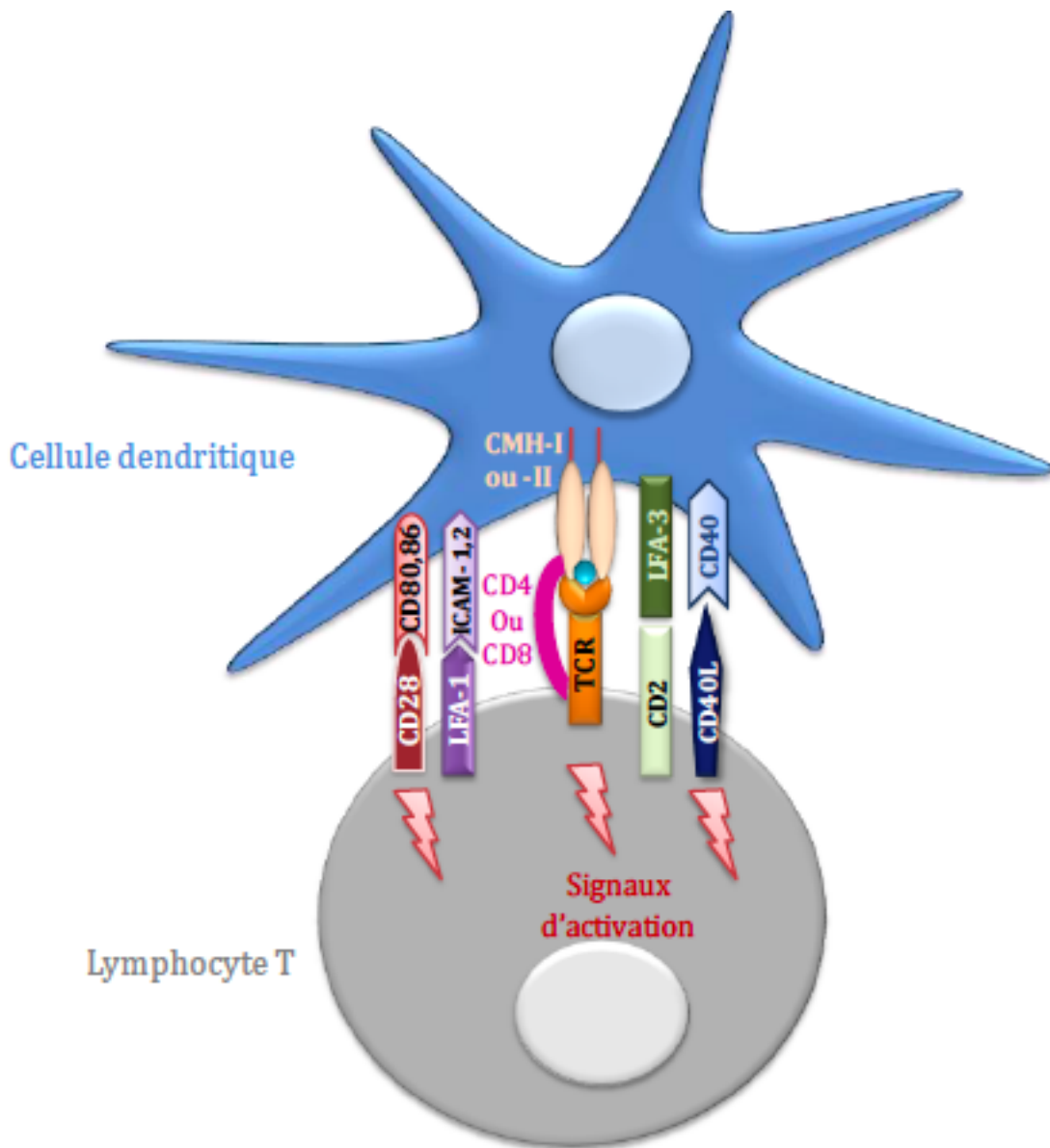
- en limitant les forces de cisaillement induites par les cycles de recrutement-dérecrutement alvéolaires, qui modifient le surfactant (Bilek, Dee et al. 2003) provoquant des lésions épithéliales (Tremblay and Slutsky 2006),
- et d'autre part via l'augmentation des pression intra-thoraciques qui réduit la précharge cardiaque et réduit ainsi l'œdème pulmonaire (Dreyfuss and Saumon 1993).

## **IV. La réponse immune innée : étape clé dans le contrôle d'une infection**

### **1. Le système immunitaire : généralités**

En 1859, Darwin initie la théorie de l'évolution au grand public en compilant le fruit de ses années de recherche et de son voyage à bord du Beagle s'attirant alors les foudres des défenseurs du créationnisme. Mais, n'en déplaise à ses détracteurs, une accumulation de données scientifiques (études géologiques, anatomiques, embryologiques ou moléculaires) atteste de la validité de la théorie de l'évolution.





**Figure 12. Synapse immunologique.**

Interactions entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques permettant d'activer les lymphocytes T et d'induire leur différenciation. Certaines molécules stabilisent leur interaction (LFA-1/ICAM-1,2 ; CD2/LFA-3) favorisant ainsi la liaison du TCR au complexe CMH-Ag (1er signal) puis l'interaction des molécules de costimulation (CD28/CD80, 86 ; CD40/CD40L) qui permettent l'activation complète du lymphocyte T (2ème signal).

Stephen Jay Gould, un paléontologue américain, a formulé la théorie des équilibres ponctués, selon laquelle les transitions évolutives entre les espèces au cours de l'évolution se font brutalement et non graduellement. L'immunité n'échappe pas à cette règle et est également soumise aux contraintes de pressions sélectives. De nombreuses voies de signalisation chez l'Homme étaient déjà évoluées au moment du dernier ancêtre commun entre l'Homme et les nématodes, il y a environ 600 millions d'années. La réponse immunitaire innée des mammifères possède des origines anciennes, présentant des points communs à celles des arthropodes et des nématodes. Les barrières physiques (comme la peau) sont les premières en contact avec les agents infectieux. Elles vont les empêcher d'envahir l'organisme. Mais en cas de rupture de ces premières barrières, les pathogènes pénétrant l'organisme vont alors rencontrer une deuxième ligne de défense, le système immunitaire. Les composantes innées et adaptatives de la réponse immunitaire vont permettre de protéger l'organisme, d'abord par la reconnaissance du signal de danger, puis par l'activation des fonctions effectrices, la régulation de la réponse et enfin la mise en mémoire du contact avec le pathogène pour permettre une réponse plus précoce et efficace lors d'un second contact.

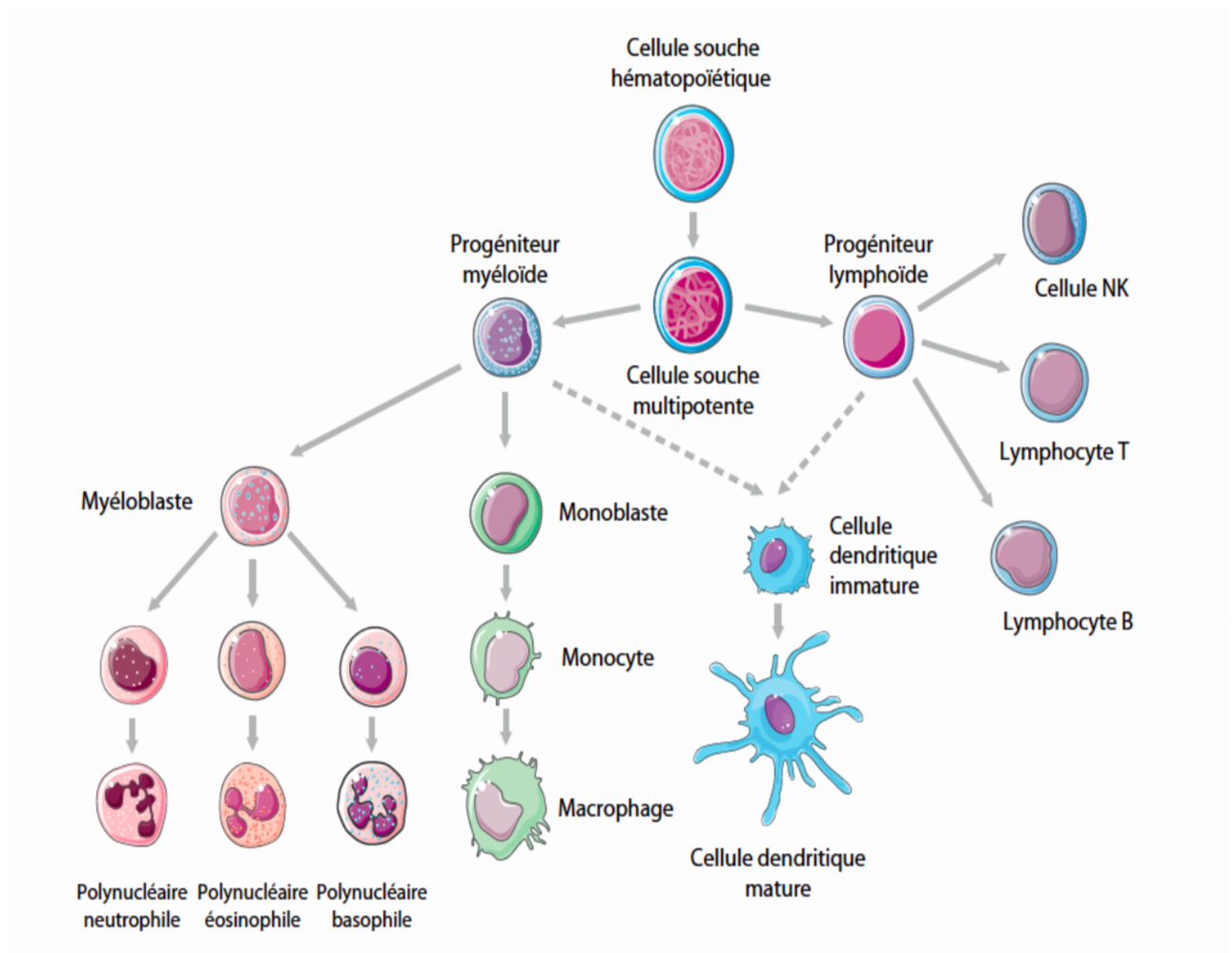
L'immunité innée se compose de nombreux effecteurs cellulaires. La promptitude de cette réponse innée dépend de la rapidité d'activation de ces différents acteurs parmi lesquels nous retrouvons les polynucléaires neutrophiles (PNN), les cellules de la lignée des monocytes/macrophages et les cellules épithéliales des différents tissus infectés. Toutes ces cellules ont la capacité très importante de reconnaître les pathogènes et vont permettre la mise en place de la réponse inflammatoire notamment en activant la production de molécules de l'inflammation. Elles sont également capables de phagocyter puis tuer les pathogènes par des mécanismes de cytotoxicité. Parmi ces cellules, certaines comme les macrophages ou les cellules dendritiques sont qualifiées de cellules présentatrices d'antigène (CPA) car, comme leur nom l'indique, elles sont capables de présenter l'antigène d'un pathogène à d'autres cellules du système immunitaire adaptatif au sein d'une véritable synapse immunologique (Figure 12) et permettre son activation. Ces CPA constituent donc un véritable trait d'union entre le

système immunitaire inné et adaptatif (Murphy et al. 2012). Je développerai plus en détail l'immunité innée dans le chapitre suivant.

L'immunité adaptative est une réponse plus tardive, secondaire à la réponse innée. Elle est principalement représentée par les lymphocytes. Il existe de très nombreuses sous-populations de lymphocytes, que l'on peut schématiquement classer en lymphocytes B ( $L_B$ ) et T ( $L_T$ ). Chaque type de lymphocytes présente à sa surface des récepteurs d'antigènes hautement spécialisés fixant des épitopes bien spécifiques, assurant ainsi la reconnaissance d'un vaste répertoire de pathogènes. Les  $L_B$  reconnaissent et fixent les pathogènes via leurs B-cell receptors (BCRs). Une fois le pathogène fixé et reconnu, les  $L_B$  s'activent et se différencient en cellules plasmacytoïdes, qui produisent alors des anticorps (Ac) dirigés contre le même antigène que le BCR. Des  $L_B$  ont également pour rôle de mémoriser les propriétés de l'antigène les ayant activés, on les appelle les  $L_B$  mémoires. Ils vont permettre une réponse immunitaire secondaire plus rapide, plus longue, plus intense et plus spécifique dans le cas d'une seconde infection par le même antigène. Ils ont également une durée de vie plus longue que les  $L_B$  plasmacytoïdes. Les  $L_T$  quant à eux peuvent être sous-classés en trois catégories : les lymphocytes cytotoxiques (Arbibe, Mira et al.), les T-helpers (Th) et les T-régulateur (Treg). Ils présentent à leur surface un T-cell receptor (TCR). Les signaux envoyés par les Th vont permettre aux Tc d'éliminer les cellules infectées tout ceci sous le contrôle des Treg (Belkaid et al 2006, Chung et al 2003, Happel 2005, Huang et al 2004). Les mécanismes de défense anti-infectieuse des lymphocytes sont fondés sur la cytotoxicité, la production d'immunoglobulines et la modulation des effecteurs de l'immunité innée (Kim et al 2007, Reim et al 2009).

## 2. L'immunité innée

Une fois l'assaut donné et le passage de la ligne de front (toutes les barrières physiques de notre corps), les pathogènes se retrouvent confrontés à l'immunité innée, véritable



**Figure 13. Représentation schématique de l'hématopoïèse aboutissant à la génération des principaux acteurs cellulaires de l'immunité innée et adaptative.**

Les cellules souches hématopoïétiques sont pluripotentes et donnent naissance à des progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes au niveau des organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus) dont dérivent plusieurs populations cellulaires.

Concernant les effecteurs des réponses adaptatives, l'ontogénie des lymphocytes T s'achève en périphérie au niveau des organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques, rate...) tandis que les lymphocytes B sont matures dans le thymus.

Général de nos défenses, qui va permettre en quelques minutes de mobiliser les différents acteurs de la réponse inflammatoire. Cette inflammation, sous couvert d'un certain contrôle, tend à éradiquer les pathogènes tout en limitant les lésions tissulaires et à initier les effecteurs de l'immunité adaptative.

### *2.1. Les acteurs cellulaires de l'immunité innée*

Les cellules du système immunitaire inné sont les macrophages, les granulocytes (PNN, éosinophiles et basophiles), les mastocytes, les cellules dendritiques et certains lymphocytes. A l'exception des lymphocytes, elles sont issues d'un précurseur commun: le progéniteur myéloïde commun (Figure 13). Provenant de la moelle, elles migrent vers la circulation sanguine (Gordon and Taylor 2005). Les monocytes et les macrophages constituent, avec les cellules dendritiques et les polynucléaires, les trois principaux types de cellules phagocytaires (Murphy et al, 2012)

Les macrophages sont en réalité la forme différenciée des monocytes, qui après migration par diapédèse dans le tissu cible se différencient soit en macrophage soit en cellule dendritique. Les monocytes contrairement aux macrophages et cellules dendritiques représentent la forme naïve et circulante de ces cellules. Ils contribuent essentiellement à l'inflammation, en plus de leur activité phagocytaire, par leur sécrétion de cytokines inflammatoires comme l'interleukine (IL)-1 ou l'interleukine (IL)-8 qui est une puissante cytokine chemoattractante pour les PNNs au site de l'infection.

Les cellules dendritiques sont à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Ce sont des CPA et elles exercent leur rôle dans les organes lymphoïdes, où elles mûrissent, présentant alors à leur surface des antigènes reconnus par les lymphocytes T qui passent d'un état inactif à actif (Murphy et al 2012, Galli et al 2008, Romani 2004, Tracey 2009, Ulevitch 2004). Elles vont également initier l'orientation de la réponse lymphocytaire vers des phénotypes TH1, TH2, TH17 ou Treg, par la libération de médiateurs inflammatoires et l'expression de molécules de co-stimulation.

Les granulocytes comprennent les PNNs, les éosinophiles et les basophiles. Au cours de la réponse immune, leur nombre augmente et ils sont attirés par diverses molécules inflammatoires comme les cytokines et migrent du sang vers les foyers infectieux ou inflammatoires. Au site inflammatoire, ils phagocytent les pathogènes et mènent également une action pro-inflammatoire en libérant des radicaux libres oxydants, des protéases mais également des cytokines pro-inflammatoires.

Les lymphocytes font partie de l'immunité adaptative, mais parmi eux, trois catégories particulières appartiennent à l'immunité innée : les lymphocytes Natural Killer (NK), les lymphocytes  $\gamma\delta$  et les lymphocytes NKT. Les cellules NK, non T, non B, ont un cytoplasme granulocyttaire. Ils reconnaissent et tuent les cellules anormales par une activité cytotoxique.

Les mastocytes se différencient dans les tissus. La dégranulation de leurs molécules pro-inflammatoires est impliquée dans la protection antiparasitaire des muqueuses.

## *2.2. Les effecteurs moléculaires de l'immunité innée*

### *A. Le système du complément*

Une partie du système du complément consiste en un ensemble de protéines qui, lorsqu'elles sont activées, forment des agrégats qui font des trous dans les membranes cellulaires des microbes, et les tuent en les lysant. Le système du complément comprend également des glycoprotéines sériques qui, lorsqu'elles sont activées, permettent la capture des micro-organismes par phagocytose (opsonisation). Le système du complément est à cheval entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif : la cascade d'activation du complément conduisant à l'opsonisation ou à la lyse des micro-organismes envahisseurs, peut être activée soit par des molécules reconnaissant des Pathogen-Associated-Molecular Patterns (PAMPs) (Wessel, Winderlich et al.) soit par des Ac (adaptatifs) qui se fixent à des Ag étrangers spécifiques. De plus, certains des

sous-produits de l'activation du complément entraînent l'inflammation et de ce fait apportent des leucocytes au site de l'infection, déclenchant un autre type de réponse.

Le système du complément aboutit à la libération des anaphylatoxines pro-inflammatoires C3a et C5a ainsi qu'à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (C5b-C9). Trois voies distinctes permettent l'activation du complément : la voie classique, la voie alterne et la voie des lectines. Chacune aboutit à l'activation de C3 qui est le composant central du système. Durant la cascade protéolytique, une C3 convertase est produite et clive le composant C3 en deux molécules solubles, C3a et C3b, qui se lient de manière covalente à la surface du pathogène.

La voie classique est activée par les immunoglobulines (Ig) G ou IgM fixées à la surface du pathogène. Dans la voie alterne, le C3 s'active spontanément au niveau des membranes microbiennes, qui contrairement aux cellules de l'hôte, sont dépourvues de protéines inhibitrices du complément comme le facteur H. La voie des lectines, quant à elle, implique la fixation des récepteurs aux mannanes des parois microbiennes, ce qui initie l'activation de la voie. Le C3b qui résulte de l'activation du C3 induit la formation d'un complexe d'attaque. En se fixant à la surface du pathogène il agit comme une opsonine. En parallèle, le C3b peut également se fixer à la C3 convertase pour induire un nouvel effecteur, la C5 convertase, qui clive le C5 en C5a et en C5b. D'autre part, les produits des clivages successifs (C3a et C5a) participent au recrutement des cellules inflammatoires, par chimiotactisme, ainsi qu'à l'opsonisation et à la phagocytose (C3b). Enfin, le C5b intervient tardivement dans la voie du complément en s'assemblant avec C6, C7, C8 et C9 pour former un complexe d'attaque membranaire qui endommage la paroi des pathogènes. Quant au C5a, il amplifie les phénomènes inflammatoires en potentialisant la production de MIF et de HMGB1. Il active aussi la cascade de coagulation, augmente l'apoptose des thymocytes et altère les propriétés phagocytaires des PNN (Denk et al 2012, Flierl et al 2008, Rittirsch et al 2008).

### ***B. Les protéines et peptides antimicrobiens***

Les peptides antimicrobiens inactivent rapidement les agents infectieux. Leur assemblage forme des pores transmembranaires qui rendent perméable la membrane bactérienne pour l'eau et les petites molécules, provoquant alors sa déstabilisation.

Deux grandes sous-familles composent la famille des peptides antimicrobiens, les  $\beta$ -défensines et les cathélicidines. Les  $\beta$ -défensines sont actives contre les bactéries, certains virus et les champignons (Zhao et al 1996). Leur mode d'action se fait via l'activation du système du complément et la production d'IL-8 notamment par les cellules épithéliales pulmonaires. Leur production est induite par la stimulation de certains TLRs par leurs agonistes, comme le TLR2 (Wang et al, 2003). Les cathélicidines, comme les défensines participent au chimiotactisme des PNNs et stimulent la production de cytokines par les épithéliums infectés. Elles exercent également un rôle immuno-modulateur en liant le LPS des parois bactériennes et en modulant la voie de signalisation entre les TLRs et le facteur transcriptionnel NF- $\kappa$ B (Mookherjee, Brown, 2006).

### *2.3. Mise en alerte du système immunitaire : la reconnaissance des signaux de danger*

Des mécanismes de surveillance, de défense et de réparation ont été développés chez les animaux multicellulaires pour détecter quand leurs cellules sont envahies par des microorganismes mais également pour distinguer leurs cellules mortes de celles encore vivantes. Ces mécanismes de surveillance, défense et réparation nécessitent la mise en place de signaux de danger, la présence de cellules qui réagissent via des récepteurs en réponse à ces signaux de dangers pour obtenir une réponse physiologique (Bianchi 2007).

Un sous-groupe de ces systèmes est maintenant bien connu, il s'agit des PAMPs, qui sont divers groupes de molécules microbiennes identifiables par différents traits biochimiques (molécule entière ou le plus souvent des portions ou des assemblages



polymériques de molécules) et qui vont alerter l'organisme d'une intrusion de pathogènes.

Cependant les pathogènes ne sont pas les seuls responsables de lésions sur les tissus et les cellules. Les traumatismes de type déchirure, écrasement ou étirement par des forces mécaniques peuvent aussi générer des lésions tissulaires. Des médicaments, comme les chimiothérapies tuent en plus des cellules tumorales des cellules saines de l'organisme. Ce genre de lésions génère de l'inflammation dans notre corps. Ces lésions vont induire la destruction des cellules et la libération de leur contenu dans le domaine extra-cellulaire. Ces molécules de nature extrêmement diverses et de localisation normalement intra-cellulaire vont générer de l'inflammation une fois déversées en dehors de la cellule. On les appelle alarmines, terme proposé en 2006 par Joost Oppenheim à la fin d'un workshop sur les signaux de danger et HMGB1 à Milan. Ce terme permet de distinguer les molécules endogènes qui signalent les lésions sur les tissus et cellules des PAMPs. Ensemble, alarmines et PAMPs constituent la vaste famille de Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs).

### **A. Les signaux de dangers infectieux**

Le système immunitaire inné reconnaît ses cibles principalement via les PAMPs (Janeway 1989). Ils possèdent tous des structures communes très importantes pour leur reconnaissance. Ce sont des structures moléculaires produites uniquement par les pathogènes et non par les cellules de l'organisme hôte. On peut citer par exemple le peptidoglycan et les lipopolysaccharide (LPS) qui sont produits uniquement par les bactéries et pas par les cellules eucaryotes. Cette reconnaissance très spécifique des PAMPs permet au système immunitaire inné de discriminer le soi du non soi (Medzhitov and Janeway 2000). Les PAMPs représentent également des motifs moléculaires très conservés essentiels à la survie du micro-organisme. Nous pouvons reprendre l'exemple du peptidoglycan devenu au fil de l'évolution une cible du système immunitaire inné. En effet les bactéries exprimant le peptidoglycan sont sensibles à la pénicilline, qui est

PRR	Structure	Localisation	Ligand	Source ligand
<b>TLR</b> → sensing des PAMP et DAMP				
TLR1		Membrane plasmique	Lipoprotéine triacylée	Bactéries
TLR2		Membrane plasmique	Lipoprotéine, HSP	Bactériens, virus, parasites, soi
TLR3		Endolysosome	ARN double brin	Virus
TLR4		Membrane plasmique	LPS, HSP, HMGB1, fibronectine, fibrinogène	Bactéries, virus, soi
TLR5		Membrane plasmique	Flagelline	Bactéries
TLR6		Membrane plasmique	Lipoprotéine diacylée	Bactéries, virus
TLR7 (TLR8 humain)		Endolysosome	ARN simple brin	Virus, bactéries, soi
TLR9		Endolysosome	ADN CpG non méthylé	Virus, bactéries, protozoaires, soi
TLR10		Endolysosome	Inconnu	Inconnu
TLR11		Membrane plasmique	Molécule Profilin-like	Protozoaires
<b>RLR</b> Cytoplasme → sensing des PAMP				
RIG-I			Court ARNdb, ARNdb 5'triphosphate	Virus à ARN ou à ADN
MDA5			Long ARNdb	Virus à ARN
LGP2			Inconnu	Virus à ARN
<b>NLR</b> Cytoplasme → sensing des PAMP et DAMP				
NLRP			MDP, ATP, cristaux d'acide urique	Bactéries, virus, soi
NOD1/2, NLRC			iE-DAP, MDP	Bactéries
NAIP			Flagelline	Bactéries
DAI			ADN	Virus
AIM2			ADN	Virus
<b>CLR</b> Membrane plasmique → sensing des PAMP et DAMP				
Dectine-1			β-glucane	Champignons
Dectine-2			β-glucane	Champignons
MINCLE			SAP130	Soi, champignons

Tableau 1. Représentation schématique et classification des PRRs et de leurs ligands.

capable d'inhiber la synthèse de peptidoglycan chez ces organismes. Or, certains mutants de bactéries sont capables par des mécanismes de résistances très développés, d'inactiver la pénicilline. Mais grâce au système immunitaire inné qui cible le peptidoglycan, ces mutants sont tout de même reconnus et éliminés évitant ainsi le développement d'une génération de mutants. Les PAMPs sont également partagés par un large groupe de micro-organismes. Par exemple, toutes les bactéries ont des peptidoglycans et des lipoprotéines. Cette propriété des PAMPs permet à un nombre limité de Pattern Recognition Receptors (PRRs) de reconnaître une vaste variété de micro-organismes. Les PAMPs représentent souvent la signature d'une classe de pathogènes. Par exemple le LPS, l'acide lipotéichoïque (Lopez Sastre, Perez Solis et al. 2006) ou les mannanes sont la signature des bactéries à Gram-négatif, à Gram-positif et des champignons, respectivement. La reconnaissance de ces PAMPs informe donc le système immunitaire inné de la présence mais également du type de pathogènes qui envahit l'organisme. Ceci permet à l'immunité innée de bien choisir quel mécanisme de défense adopter, quels effecteurs seront les plus efficaces sur une classe donnée de pathogènes.

Si un micro-organisme franchit l'une des barrières, il commence à se répliquer dans les tissus de l'hôte. Il y est immédiatement reconnu par les PRRs des cellules phagocytaires résidentes de ces tissus, via les PAMPs et il représente une des causes principales du sepsis (Denk, Perl et al. , Vance, Isberg et al. 2009). Parmi les PRRs, les principaux (Tableau 1) que nous pouvons citer sont les Toll-Like Receptors (TLRs), les C-type lectin receptors (CLRs), les NOD-Like receptors (NLRs), les protéines de la famille des galectines et les récepteurs *scavenger* de classe B. Suite à la fixation des PAMPs, les TLRs et les CLRs vont activer de multiples voies de signalisation aboutissant à l'expression de NF- $\kappa$ B, des NODs, à l'activation de l'inflammasome. Ces diverses voies de signalisation conduisent à la production de cytokines, de chémokines, de défensines, de radicaux libres oxydants ou de récepteurs du complément 3 (CR3).

### **B. Les signaux de dangers non infectieux et l'inflammasome**

### *a. Les alarmines*

En dehors des PAMPs, plusieurs hypothèses ont été soutenues quant à l'origine de l'activation de l'inflammation. En effet le système immunitaire de l'hôte doit également faire face à des signaux de dangers endogènes appelés alarmines ou DAMPs (damage associated molecular Patterns).

Deux études récentes soutiennent que l'origine est en grande partie mitochondriale. Les espèces réactives de l'oxygène (Lopez-Medrano, San Juan et al. 2013) et l'ADN mitochondrial libérés au cours du stress oxydatif, du dysfonctionnement mitochondrial puis de la mort cellulaire semblent jouer un rôle clé dans l'activation de l'inflammasome mais les mécanismes moléculaires restent encore imprécis (Zhou *et al.*, 2011). Il est en effet probable que le stress cellulaire, ou plus précisément la nécrose cellulaire, induits par la bactérie et les lésions tissulaires, occasionnent la libération dans le secteur extracellulaire d'alarmines. Physiologiquement intracellulaires et reconnues par l'hôte comme provenant du soi, ces alarmines sont reconnues comme non-soi dès lors qu'elles migrent en position extra-cellulaire (Matzinger, 2002). Ces signaux endogènes sont capables de produire une réaction pro-inflammatoire en attirant sur le site de l'infection, les cellules effectrices comme les macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Les alarmines mitochondriales représentent un sous groupe des DAMPs, capable de générer une inflammation stérile. Elles comprennent de l'ADN mitochondrial (mtADN) et du fMLP (N-formyl-L-méthionyl-L-leucyl-L-phenylalanine) mitochondrial, normalement situé dans la membrane des mitochondries, qui agissent en synergie avec l'ATP extracellulaire (Zhang *et al.*, 2010). Chacune de ces alarmines a un mode d'action différent : l'ADNmt active la transcription du gène du pro-IL-1 $\beta$  via la liaison à TLR9 et l'activation de NF- $\kappa$ B; l'ATP active l'inflammasome résultant dans la maturation du pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$ ; le fMLP agit comme un puissant chémoattractant pour les PNNs en liant un récepteur spécifique présent à leur surface (PRP1), blocable *in vivo* par la ciclosporine (McDonald *et al.*, 2010).

Parmi tous les NLRs qu'il existe, cinq ont été décrits comme étant à l'origine d'un complexe moléculaire appelé inflammasome. Il s'agit des inflammasomes assemblés autour de protéines Nlrp1, Nlrp3, AIM2, Nlrc4 et tout récemment Nlrp6. Ces inflammasomes sont des complexes protéiques cytoplasmiques capables d'activer des caspases pro-inflammatoires et d'activer les cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18. Seule sera abordée ici la description de l'inflammasome NLRP3.

### **b. L'inflammasome NLRP3**

NLRP3 (anciennement NALP3 pour NACHT-, LRR and PYD-containing proteins 3) est un complexe inactif qui nécessite le recrutement de ASC et Caspase-1 active pour la maturation de l'IL-1 $\beta$  (Agostini, Martinon et al. 2004). Cet inflammasome est capable de répondre à un nombre très important de molécules endogènes ou exogènes et de situations différentes. Même si l'inflammasome NLRP3 peut être activé par une large variété de stimuli, des études récentes ont montré que tous les activateurs de cet inflammasome engagent un petit nombre de voies partagées comme l'efflux d'ions potassium à travers le canal ionique P2X7 (Kahlenberg and Dubyak 2004), la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) par la membrane plasmique ou la mitochondrie (Cruz, Rinna et al. 2007, Dostert, Petrilli et al. 2008), ou encore des dysfonctionnements mitochondriaux conduisant à la libération dans le cytosol du contenu mitochondrial (Halle, Hornung et al. 2008, Shimada, Crother et al. 2011).

### **c. Les récepteurs capables de reconnaître les différents motifs moléculaires des pathogènes**

Ces récepteurs ou PRRs sont capables de reconnaître des motifs moléculaires particuliers retrouvés chez les pathogènes, les PAMPs. Grâce à la restriction de la reconnaissance innée aux profils moléculaires présents sur les microbes, la réponse innée reste focalisée sur les entités pouvant occasionner des infections plutôt que sur

des substances qui seraient simplement du non Soi. La capacité des PRRs à distinguer le Soi du non Soi est parfaite car les PAMPs sont produits uniquement par les pathogènes et jamais par les cellules de l'hôte. Ceci contraste avec la reconnaissance occasionnelle d'antigènes du Soi par les cellules de l'immunité adaptative ayant comme lourdes conséquences le développement de maladies auto-immunes, ce qui est impossible avec l'immunité innée.

Les PRRs sont des protéines que l'on peut qualifier d'hétérogènes, tant sur le plan structurel que fonctionnel (Medzhitov and Janeway 1997). Plusieurs types de domaines protéiques sont impliqués dans la reconnaissance des motifs moléculaires dont les plus importants sont le domaine C-type lectin, le domaine scavenger receptor cystein-rich et les domaines leucine-rich repeat (LRR). Les PRRs peuvent être retrouvés sous forme de protéines sécrétées libres dans les fluides corporels. Ils peuvent également être exprimés à la surface des cellules ou dans le cytoplasme. Ils possèdent 3 fonctions :

- ils sont impliqués dans l'opsonisation des bactéries et des virus permettant leur phagocytose ou l'activation de la voie des lectines du complément (Fraser, Koziel et al. 1998);
- permettent la prise en charge des pathogènes par les cellules phagocytaires et les cellules dendritiques (Stahl and Ezekowitz 1998);
- ils déclenchent les voies de signalisation qui aboutissent à l'induction de la transcription de nombreux gènes de la réponse immune comme ceux des cytokines inflammatoires ou des peptides antimicrobiens.

Ces PRRs sont apparus très tôt au cours de l'évolution ce qui explique que l'on retrouve de nombreuses homologues fonctionnelles et structurelles avec des récepteurs dans diverses espèces allant de la drosophile à l'Homme. L'exemple de la famille des TLRs illustre parfaitement ce constat. En effet, l'identification et la caractérisation des TLRs chez les mammifères (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997) (Rock, Hardiman et al. 1998) ont révélé de nombreuses ressemblances avec leurs homologues chez la Drosophile. Chez les deux espèces les TLRs sont des récepteurs transmembranaires constitués d'un domaine extra-cellulaire LRR et un domaine de signalisation

cytoplasmique, qui est similaire au domaine cytoplasmique retrouvé dans les récepteurs à l'interleukine-1 (IL-1R), et est donc appelé pour cette raison domaine Toll/IL-1R (TIR) (Kopp and Medzhitov 1999).

#### **D. Les TLRs**

Les protéines Toll ont d'abord attiré l'attention pendant les années 1980, lorsque les chercheurs en Allemagne ont trouvé que les mouches en cours de développement ne pouvaient pas établir un axe dorso-ventral correct en absence de Toll (Toll se référant aux mouches mutantes ayant bizarrement une anatomie brouillée). Toll est un récepteur de signalisation transmembranaire ; les molécules apparentées ayant un rôle dans l'immunité innée ont été appelées les récepteurs Toll-like. Trois découvertes majeures ont apporté des connaissances sur le rôle central des TLRs dans l'immunité innée. En 1996, Jules Hoffman et Bruno Lemaitre ont trouvé, à partir de leurs observations chez la drosophile, que des mutations dans Toll, connu pour avoir un rôle dans le développement de la mouche, rendaient les mouches très sensibles à des infections létales par *Aspergillus fumigatus*, un champignon contre lequel les mouches étaient immunisées (Lemaitre, Nicolas et al. 1996). Elles ne parvenaient plus à induire l'expression d'un peptide antifongique majeur, la drosomycine. Cette découverte suggérait que les protéines Toll de la drosophile sont en fait impliquées dans la reconnaissance des pathogènes fongiques mais pas dans celle des pathogènes bactériens puisque les réponses antibactériennes chez les mêmes mutants étaient normales. Cette expérience a démontré l'importance des réponses immunitaires déclenchées par un pathogène chez un organisme non vertébré. Les mouches porteuses de mutations sur un autre TLR de drosophile, le 18-Wheeler (18W), ont montré un phénotype complémentaire, dans lequel la mutation affectait principalement leur capacité à reconnaître les bactéries à Gram-négatif et à induire un peptide contre ces bactéries, l'attacine (Williams, Rodriguez et al. 1997). Cette observation suggère qu'il existe différents membres au sein de la famille des Tolls chez la drosophile et que

chacun est spécialisé dans la reconnaissance de différentes classes de pathogènes. Cette reconnaissance est supposément médiée par la reconnaissance de PAMPs caractéristiques d'une classe donnée de pathogènes. Ces notions ont été reprises ensuite dans de nouvelles expériences chez des mouches de phénotype sauvage infectées avec différentes classes de pathogènes. Ces expériences ont montré que les infections induisaient majoritairement l'expression de peptides antimicrobiens ayant une activité correspondant au type d'infection, par exemple, la drosomycine (peptide anti-fongique) est majoritairement produite en réponse à une infection par un champignon. La conclusion importante de ces études est que la drosophile, un organisme dépourvu de système immunitaire adaptatif, est capable uniquement grâce à son immunité innée, non seulement de détecter la présence d'une infection mais en plus de déterminer le type du pathogène qui l'envahit. En 1997, Ruslan Medzhitov et Charles Janeway ont découvert qu'une certaine protéine humaine, identifiée par homologie entre son domaine cytoplasmique et celui de Toll, activait l'expression des gènes de la réponse immunitaire quand elle était transfectée dans une lignée cellulaire humaine expérimentale. Cette protéine humaine a ensuite été appelée TLR4. Cette découverte était la première preuve qu'une voie de la réponse immunitaire était conservée entre les drosophiles et les humains. La question était alors de savoir si comme chez la drosophile les Toll des mammifères étaient capables de discriminer différentes classes de pathogènes. La preuve la plus forte est arrivée avec le clonage positionnel du locus responsable de l'hypo-sensibilité aux LPS des souris de la souche C3H/HeJ qui a révélé l'existence d'une mutation perte de fonction dans le gène *tlr4* (Poltorak, He et al. 1998). En effet, les souris C3H/HeJ ne répondent pas au LPS et présentent une sensibilité plus importante aux infections à bactérie à Gram-négatif (Qureshi, Lariviere et al. 1999). Ainsi, une seule protéine Toll, TLR4, apparaît comme étant responsable pour la détection d'une classe donnée de pathogènes, les bactéries à Gram-négatif. Dans ce cas, la détection est médiée par la reconnaissance du LPS, la signature moléculaire des bactéries à Gram-négatif. Un autre membre de la famille des TLRs, le TLR2, est impliqué dans la reconnaissance des bactéries à Gram-positif par la





reconnaissance du LTA et du peptidoglycane, deux PAMPs caractéristiques de cette classe de bactéries (Schwandner, Dziarski et al. 1999, Yoshimura, Lien et al. 1999). D'autres membres de la famille des TLRs des mammifères sont spécifiques de PAMPs caractéristiques d'autres classes de pathogènes, comme les lipopeptides tri-acylés bactériens (TLR1), di-acylés (TLR6), les peptidoglycanes bactériens, les zymosan de levure ou les lipoprotéines de mycobactéries (TLR2), les ARNs double brin des virus (TLR3), la flagelline des bactéries (TLR5), ou encore les motifs CpG non méthylés (TLR9) (Akira 2003). Certains TLRs peuvent former des hétérodimères leur permettant ainsi d'élargir le champ des molécules reconnues. On peut prendre comme exemple l'association de TLR1 et TLR2 lors d'une activation cellulaire par les lipopeptides tri-acylés (Figure 14). En revanche la réponse aux lipopeptides di-acylés implique un dimère entre TLR2 et TLR6. Certains TLRs, comme TLR3, -4, -5 ou -9 fonctionnent en homodimères mais pourraient avoir besoin de s'associer avec des molécules accessoires pour permettre une reconnaissance et une signalisation optimale.

Les TLRs sont largement exprimés par différents types cellulaires chez de nombreuses espèces animales (Akira, Uematsu et al. 2006). A ce jour, dix différents TLRs (TLR1 à 10) ont été identifiés chez l'Homme (Beutler 2009).

#### ***a. Les voies de signalisation des TLRs***

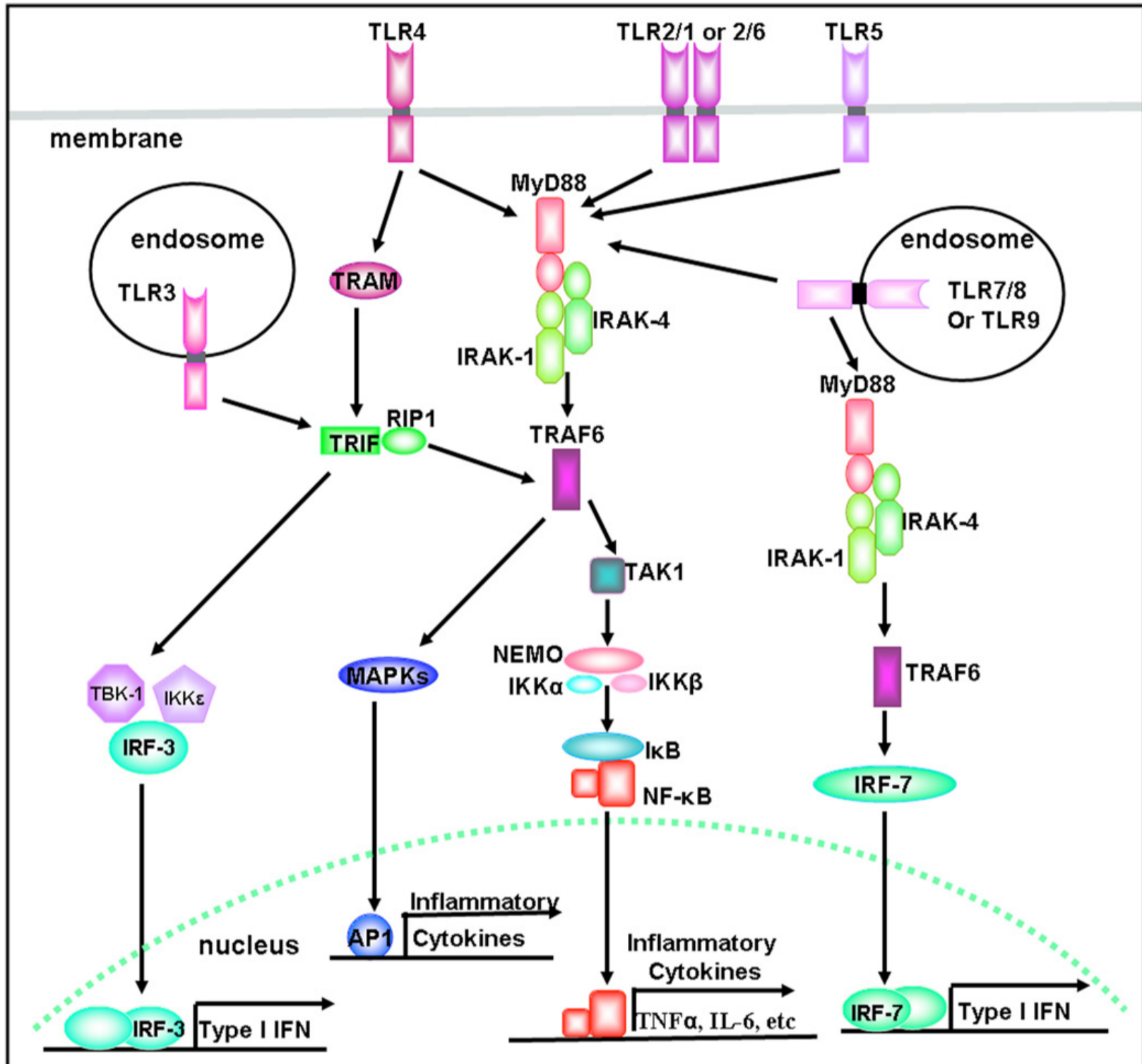
Les récepteurs de la surface cellulaire reçoivent des signaux initiaux qui activent des réponses complexes du système immunitaire inné. L'étape suivante est la transmission des signaux à l'intérieur de la cellule, appelée transduction du signal. La réponse aux signaux nécessite trois éléments : le signal lui-même, un récepteur, et une voie de transduction du signal qui connecte le détecteur aux mécanismes effecteurs. Dans le cas de l'immunité innée, le signal sera un produit microbien, le récepteur un PRR et le signal sera transduit par des interactions entre molécules intracellulaires spécifiques. Le but ultime étant la clairance de l'organisme pathogène.

Les TLRs activent une voie de signalisation menant à l'activation de deux facteurs de transcription, NF- $\kappa$ B et AP1, qui régulent ensuite l'expression de cytokines inflammatoires dont TNF- $\alpha$  et IL-8 par exemple ainsi que l'expression des molécules co-stimulatrices telles-que CD80 et CD86 (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997).

***La voie de signalisation dépendante de MyD88 :***

Le domaine TIR des TLRs, joue un rôle critique dans l'activation des facteurs de transcriptions. En effet des études ont montré qu'une mutation ponctuelle dans les séquences codant ce domaine du récepteur pouvait bloquer la réponse à un signal activateur (Poltorak, He et al. 1998). Les TLRs interagissent via ce domaine TIR, avec le domaine TIR du facteur MyD88, une molécule retrouvée dans le cytoplasme. Dans sa partie amino-terminale, cette molécule est composée d'un domaine de mort (DD pour Death Domain) via lequel elle va interagir avec les sérine-thréonine kinases à domaine DD de la famille IRAK (IL1R Associated Kinase), IRAK4 (Janssens and Beyaert 2002). MyD88 fonctionne comme un adaptateur entre les récepteurs à domaine TIR et des kinases impliquées dans la signalisation en aval. Le rôle majeur de MyD88 dans l'induction NF- $\kappa$ B dépendante des gènes codant pour le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 a été confirmé lors d'expériences menées chez des souris déficientes pour le gène codant MyD88 (Imler and Hoffmann 2003). Lors de ces expériences chez ces souris mutantes, une voie de signalisation indépendante de MyD88 a été révélée. En effet, chez ces souris MyD88-/-, l'induction de NF- $\kappa$ B (et AP1) par le LPS (TLR4) et les ARNs double brins (TLR3) n'est pas abolie mais seulement retardée. Il a ainsi pu être démontré qu'il existe deux groupes de TLRs, dont l'un, qui inclut TLR3 et TLR4, ne dépend pas seulement de MyD88 pour la signalisation. On sait également que TLR3 et TLR4 peuvent utiliser une autre molécule à domaine TIR, connue sous le nom de TRIF, pour activer NF- $\kappa$ B et APA et le facteur IRF3, qui régule l'expression de l'IFN- $\beta$  (Hoebe, Du et al. 2003, Yamamoto, Sato et al. 2003). La voie de signalisation dépendante de TRIF sera détaillée par la suite.

Deux autres molécules cytoplasmiques à domaine TIR sont impliquées dans la signalisation par certains TLRs. Une d'elle, TIRAP ou MAL, fonctionne comme cofacteur de MyD88 en aval de TLR2 et TLR4 uniquement (Yamamoto, Sato et al. 2002). La



**Figure 15. Les voies de signalisation dépendantes de MyD88 et de TRIF.**

Après la stimulation par un ligand adapté, les TLRs, excepté TLR3, recrutent MyD88, IRAKs et TRAF6 pour activer leur voie de signalisation.

Par la suite, la voie de signalisation des TLRs diverge à partir de TRAF6 en deux voies différentes pour produire les cytokines inflammatoires.

TLR3 utilise TRIF pour l'activation de la voie dépendante de TRIF pour produire l'interféron de type I et les cytokines inflammatoires.

seconde, appelée TRAM, fonctionne comme un cofacteur de TRIF en aval de TLR4 (mais pas de TLR3) (Yamamoto, Sato et al. 2003). Un réseau complexe de molécules cytoplasmiques à domaine TIR est impliqué dans la signalisation via par les TLRs.

En aval de MyD88, on trouve la kinase IRAK4 (IL1R Associated Kinase 4) qui, en réponse à l'activation des TLRs, active d'autres membres de la famille IRAK, IRAK1 et IRAK2, qui s'autophosphorylent, se dissocient alors de MyD88 et interagissent avec le facteur TRAF6 (Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 6) (Suzuki, Suzuki et al. 2002). TRAF6 est une molécule à domaine RING qui active à son tour les facteurs Uev1 et Ubc13 qui catalysent la polyubiquitination de TRAF6. Cette polyubiquitination implique une polymérisation de l'ubiquitine sur la lysine en position 63 (K63) et non sur la lysine en position 48, habituellement utilisée pour marquer les protéines dégradées par le protéasome (Wilkinson 2003). TRAF6 catalyse également la formation d'une chaîne d'ubiquitines libre. Un complexe, composé par TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase), TAB1 (TAK1-binding protein), TAB2 et TAB3, est activé par la chaîne d'ubiquitines libre de TRAF6. Il phosphoryle alors IKK $\beta$  (Ik $\beta$  Kinase) et la MAPK kinase 6 (MAPKK6). D'autre part, il résulte de la phosphorylation d'IKK $\beta$ , que le complexe IKK (composé d'IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator) phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$ , une protéine inhibitrice de la voie NF- $\kappa$ B. La phosphorylation d'I $\kappa$ B induit sa dégradation par le système ubiquitine protéasome, ce qui libère NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B se transloque alors dans le noyau et active la transcription des gènes codant pour des cytokines, des mécanismes pro-inflammatoires (Takahashi, Kawai et al. 2006) mais aussi les costimulateurs déclenchant l'induction de la réponse adaptative (CD40, CD80, CD86). La phosphorylation de MAPKK6 active la voie des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase), qui est composée de trois sous-familles, les JNKs (c-Jun-N-terminal Kinase), les ERKs (Extracellular-Regulated Kinase) et les p38. Cette activation est responsable de l'engagement d'un autre facteur de transcription, AP1 qui cible des gènes codants pour des cytokines (Takeuchi and Akira 2010). Ce facteur de transcription est composé de protéines Jun et Fos qui forment des homo- ou des hétérodimères (Figure 15).

***La voie de signalisation dépendante de TRIF :***

Comme abordée plus haut, l'étude des souris déficientes pour MyD88 (*myd88*<sup>-/-</sup>) a révélé l'existence d'une voie indépendante de MyD88. Cette voie est engagée suite à la liaison de TLR3 et TLR4 avec leurs agonistes (ARN double brin ou LPS). Chez ces souris on observe une diminution de l'activation de NF- $\kappa$ B après injection intra-péritonéale de LPS, mais en revanche la production d'IFN- $\beta$  et l'expression des gènes régulés par IRF3 sont conservées (Kawai, Adachi et al. 1999). La molécule adaptatrice TRIF (Tir-containing adaptater producing IFN- $\beta$ ) s'est avérée être impliquée dans la voie indépendante de MyD88 (Hoebe, Du et al. 2003).

En réponse à la stimulation, TLR4 recrute TRIF par l'intermédiaire de TRAM contrairement à TLR3 qui le recrute directement. TRIF est associée à TRAF3 et TRAF6 à travers ses motifs TRAF-binding dans la partie amino-terminale. TRIF est constituée également d'un motif RHIM (RIP (Receptor-interacting protein) homotypic interaction motif), qui interagit ainsi avec RIP1 et RIP3 (Carty, Goodbody et al. 2006). TRAF6 et RIP1 activent NF- $\kappa$ B alors que TRAF3 active TBK1 (TANK (TRAF family member-Associated NF-KappaB activator)-Bonding Kinase)/IKK-i par l'intermédiaire de NAP1 et SINTBAD. TRAF3 phosphorylée est transloquée dans le noyau pour y induire l'expression des gènes des IFNs de type I (Tenoever, Ng et al. 2007, Takeuchi and Akira 2010).

En parallèle, TRADD (TNFR (TNF Receptor) associated death domain), un adaptateur essentiel de la voie des TNF récepteurs est impliqué dans la voie de signalisation de TRIF. TRADD va former un complexe avec FADD (FAS-associated death domain containing protein) et RIP1 (Figure 15). Ce complexe est impliqué dans la voie de signalisation dépendante de TRIF. Par la suite, l'ubiquitination de RIP1 sera essentielle à l'activation de NF- $\kappa$ B pour permettre à FADD d'activer la caspase 8 ou la caspase 10 dont la forme clivée activera NF- $\kappa$ B (Takahashi, Kawai et al. 2006)

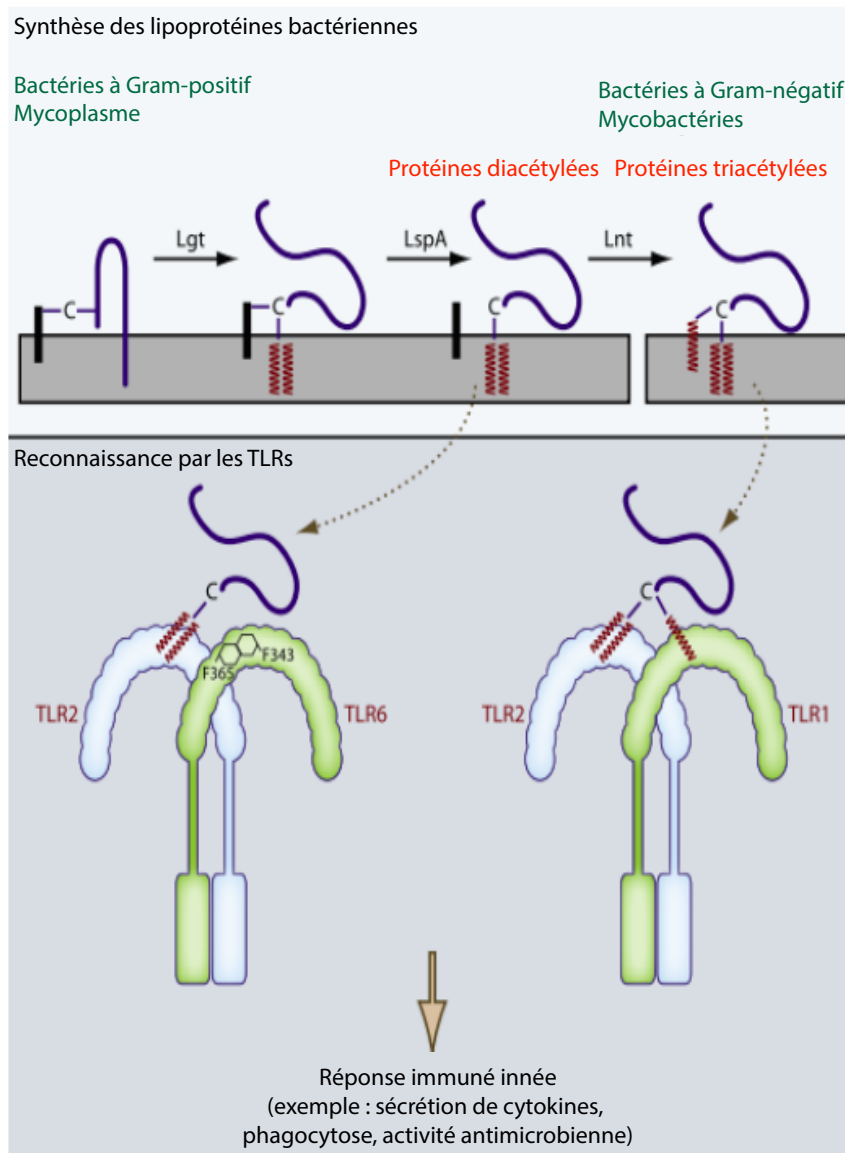
Depuis la découverte du rôle critique joué par Toll chez la drosophile en 1996, il a été clairement établi que les TLRs contrôlent de multiples aspects de la réponse immunitaire, à la fois innée et adaptative. De ce fait ces récepteurs sont potentiellement impliqués dans plusieurs types de pathologies affectant le système immunitaire, allant du choc septique à l'asthme ou aux maladies auto-immunes.

### **b. Le TLR2 en particulier**

L'identification, la caractérisation moléculaire et le clonage de TLR2 ont été publiés pour la première fois en 1998 (Rock, Hardiman et al. 1998). Des années de recherche intensive ont permis de démontrer l'importance de TLR2 dans l'immunité des vertébrés. Il est le seul capable de former des hétérodimères fonctionnels avec plus de deux autres types de TLRs. Il est également capable d'interagir avec de nombreuses molécules non-TLRs, permettant ainsi la reconnaissance d'une grande variété de PAMPs d'origine bactérienne, fongique, virale ou parasitaire (Zahringer, Lindner et al. 2008). Son expression est ubiquitaire, on le retrouve aussi bien sur des cellules immunitaires, endothéliales ou encore épithéliales ce qui lui confère un large éventail de rôles et de fonctions (Flo, Halaas et al. 2001).

#### ***Les ligands du TLR2 :***

Les TLRs sont regroupés en six familles principales en fonction du nombre de LRR, et TLR2 fait partie de la sous famille TLR1 (Matsushima, Tanaka et al. 2007). La reconnaissance spécifique de ligands entraîne l'hétérodimérisation de TLR2 avec TLR1 ou TLR6 et la transduction du signal. Cette aptitude résulte en la formation de poches de fixation distinctes qui facilitent la reconnaissance des lipopeptides diacétylés et triacétylés. Les lipopeptides sont fixés de manière forte mais non spécifique au TLR2. Les hétérodimères TLR2/TLR1 et TLR2/TLR6 seraient préformés à la surface des cellules. En l'absence de TLR1 et TLR6, TLR2 formerait un homodimère (Jin, Kim et al. 2007) mais ceci n'a pour le moment jamais été observé. Au sein des deux hétérodimères, les modules LRR confèrent une structure en forme de fer à cheval à l'ecto-domaine et chaque hétérodimère forme un complexe en forme de « M » avec le ligand, stabilisant alors les deux récepteurs. Sans le ligand, il n'y a pas d'interaction entre les domaines intracellulaires des hétérodimères préformés et pas d'activation en conséquence de la voie de signalisation. L'interaction entre ligand et TLR2 se fait au niveau des LRR9 à LRR12, par les résidus hydrophobes, entre les ponts ester des acides gras et la poche interne de TLR2. Cette conformation suffit à l'induction du signal intracellulaire par la



**Figure 16. Reconnaissance par TLR2 et réponse aux lipoprotéines bactériennes.**

TLR2 forme un hétérodimère avec TLR1 ou TLR6. TLR1 a un canal hydrophobe qui fixe le troisième acétyl, ce qui lui permet de lier les lipopeptides triacétylés. Ce canal hydrophobe est clos dans TLR6 par la présence de phénylalanine, de manière à ce que l'hétérodimère TLR2/TLR6 reconnaisse les lipopeptides diacétylés. Chacun de ces hétérodimères induit une cascade d'activation aboutissant à l'induction du système immunitaire inné, incluant l'induction de la réponse immunitaire adaptative par la libération de cytokines, de la phagocytose et de la réponse antimicrobienne. D'après (Schenk *et al.* 2009).



fixation des lipopeptides di-acétylés. La reconnaissance du lipopeptide tri-acétylé par TLR2 et l'hétérodimérisation requièrent l'interaction entre un acide gras en C-terminal du lipopeptide et un canal hydrophobe d'une LRR de TLR1. Ce canal hydrophobe est bloqué pour TLR6, par deux phénylalanines ce qui l'empêche de se fixer à la troisième acétylation d'un lipopeptide (Schenk, Belisle et al. 2009) (Figure 16).

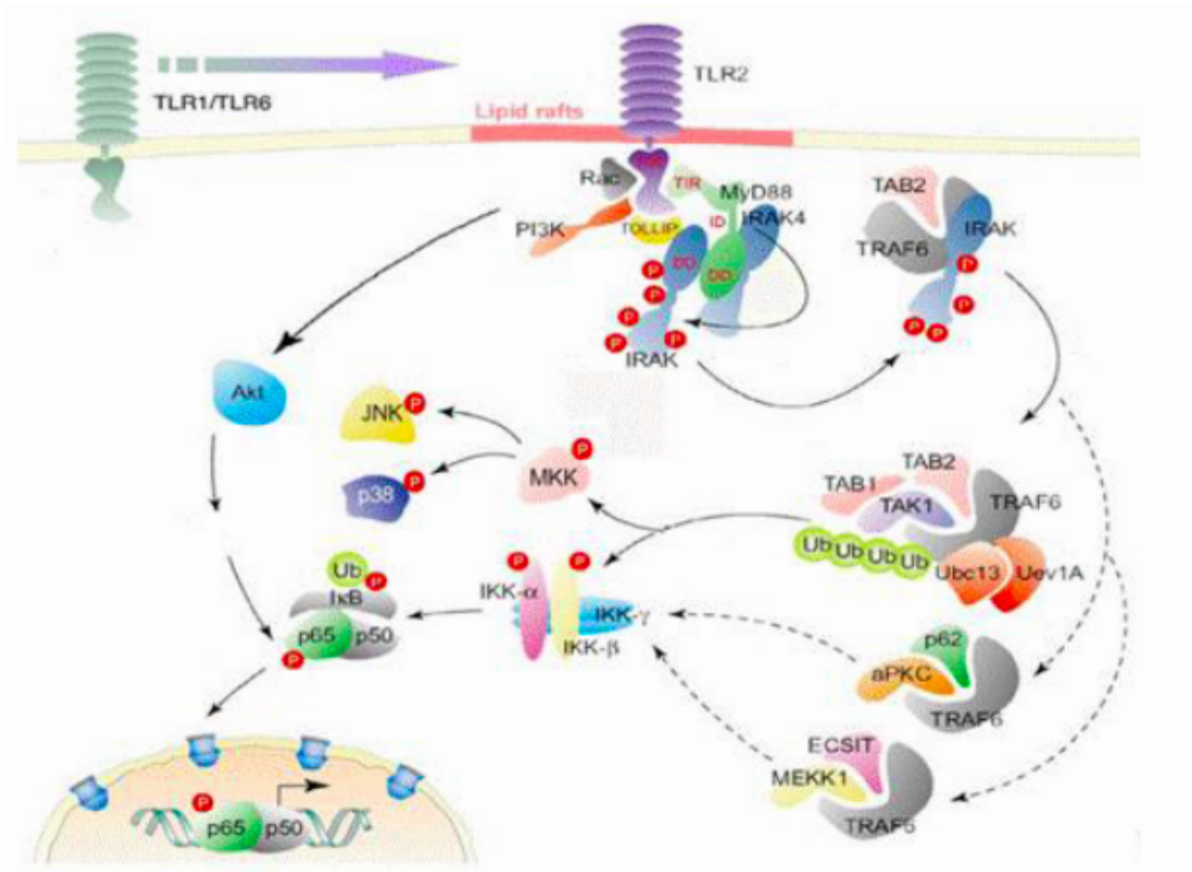
Les principaux ligands du TLR2 sont les lipoprotéines retrouvées sur toutes les bactéries et en particulier sur la membrane externe des bactéries à Gram-positif. Elles présentent un unique acide aminé NH<sub>3</sub>-terminal, la N-acyl-S-diacyl-glycérol-cystéine, et trois chaînes lipidiques (sauf les lipoprotéines des mycobactéries qui possèdent seulement deux chaînes lipidiques). Les triacyl-lipoprotéines sont reconnues par le complexe TLR2/TLR1 et les diacyl-lipoprotéines par le complexe TLR2/TLR6 (Beutler, Jiang et al. 2006).

Des complexes endogènes peuvent également activer le TLR2. Ils sont libérés en cas de lésions tissulaires, de nécrose ou en présence de cellules tumorales (comme les heat shock proteins (HSP), la high mobility group box 1 (HMGB1) (Curtin, Liu et al. 2009), la  $\beta$ -defensine 3 (Funderburg, Lederman et al. 2007), des fragments d'acide hyaluronique (Scheibner, Lutz et al. 2006)) correspondant aux alarmines décrites précédemment.

#### ***La signalisation par le TLR2 :***

Les hétérodimères TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6 reconnaissent leurs agonistes. Ils engagent alors deux voies de signalisation, qui aboutissent à l'activation de l'hétérodimère p50/p65 de NF- $\kappa$ B (Akira and Takeda 2004). La première voie est MyD-88 dépendante. La seconde voie nécessite l'engagement de Rac1, de la PI3-K et Akt (Arbibe, Mira et al. 2000).

Suite à la stimulation par son agoniste, le domaine TIR de TLR2 est phosphorylé induisant le recrutement rapide de Rac1, ainsi que de la PI3-K. La PI3-K de type IA est composée de deux sous-unités : la sous-unité régulatrice p85a et la sous-unité catalytique p110. La sous-unité p85a de la PI3-K porte des domaines SH2 qui lui permettent de se lier aux motifs phosphorylés au niveau des tyrosines des domaines TIR de TLR2 (Arbibe, Mira et al. 2000, Neel, Gu et al. 2003, Troutman, Bazan et al. 2012). La



**Figure 17. Voie de signalisation à partir de TLR2.**

Les hétérodimères TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6 reconnaissent leurs agonistes ce qui engage deux voies de signalisation. Ces voies aboutissent à l'activation de l'hétérodimère p50/p65 de NF-κB. La première voie est la voie MyD88-dépendante. La seconde voie nécessite l'engagement de Rac1, de la PI3-K et Akt. Cette voie conduit à la phosphorylation de sous-unité p65 de NF-κB. D'après (Aribe et al. 2000).

sous-unité catalytique phosphoryle le PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) en PIP3 (Phosphatidylinositol 3, 4,5-triphosphate). Le domaine PH (Pleckstrin Homology) de la sérine/thréonine kinase Akt est très affiné pour le PIP3. Ce recrutement membranaire d'Akt permet aux kinases PDK1 (Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase) et PDK2 de phosphoryler sur ses sérines 308 et 473 (Cantley 2002). Akt, ainsi activée, induit la phosphorylation de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B sur sa sérine 536. Cette étape est indispensable à l'activation de NF- $\kappa$ B, sans pour autant influencer la translocation nucléaire du facteur de transcription (Arbibe, Mira et al. 2000) (Figure 17).

***Le complexe TLR2-molécules accessoires :***

Il existe un certain nombre de corécepteurs et de molécules accessoires du TLR2 qui ont la fonction de concentrer les produits microbiens au niveau de la surface cellulaire ou à l'intérieur de phagosomes pour faciliter la réponse du TLR2.

Les lipopeptides sont concentrés et transportés par la molécule CD14 (Cluster of Differentiation 14) vers l'hétérodimère TLR2/TLR1 (Nakata, Yasuda et al. 2006). Le CD14 ne se lie pas directement au dimère et peut contribuer à la réponse inflammatoire des phagocytes.

Le CD36 lui, peut interagir avec des diacylglycérol-lipopéptides et les transférer vers la molécule accessoire CD14 (Hoebe, Georgel et al. 2005) qui à son tour facilite leur interaction avec les hétérodimères TLR2/TLR6 (Drage, Pecora et al. 2009) (Jimenez-Dalmaroni, Xiao et al. 2009). Bien que non indispensables pour l'interaction entre TLR2 et son ligand ou pour la signalisation, les molécules accessoires CD14 et CD36 ont pour rôle de stimuler les réponses en abaissant le seuil de concentration du ligand, nécessaire pour l'activation du récepteur et la signalisation (Hoebe, Georgel et al. 2005, Nakata, Yasuda et al. 2006).

La reconnaissance des bactéries entières par le système immunitaire inné, repose sur la phagocytose, étape grâce à laquelle sont produits des phagosomes pouvant recruter les TLRs de différents complexes réceptoriels. Il est possible que le CD36 maintienne son rôle de transporteur à l'intérieur des phagosomes, sa présence étant indispensable à la phagocytose de *S. aureus* (Stuart, Deng et al. 2005)

La molécule soluble MBL (Mannose Binding Lectin) peut interagir avec l'acide lipotéichoïque de la membrane de *Staphylococcus aureus* (ainsi qu'avec le peptidoglycane (Ip, Takahashi et al. 2009) et activer de manière synergique le complexe TLR2/TLR6 avec internalisation du complexe, ce qui augmente la réponse inflammatoire (Ip, Takahashi et al. 2008).

La Dectine-1, récepteur principal pour le  $\beta$ -Glucane (molécule retrouvée sur la plupart des levures), est la seule molécule non-TLR pour laquelle a été prouvée une interaction physique avec le TLR2, capable d'activer la voie de signalisation. La signalisation dépendante de la Dectine-1 a une action synergique à celle du TLR2 et du TLR4 dans l'induction de la synthèse de TNF- $\alpha$  dans les monocytes humains circulants, quand ces trois récepteurs sont activés par leurs ligands respectifs (Ferwerda, Meyer-Wentrup et al. 2008).

Il est important de signaler que les réponses du TLR2 membranaire peuvent être modulées par le TLR2 soluble (Raby, Le Boudier et al. 2009), retrouvé dans le plasma humain, dans le lait ainsi que dans le liquide amniotique (Dulay, Buhimschi et al. 2009). Son rôle dans la défense contre les infections reste peu clair à ce jour, mais il semble que les variations des niveaux circulants de TLR2 soluble puissent moduler la réponse immunitaire.

#### ***TLR2 et la ventilation mécanique :***

Dans un contexte d'infection pulmonaire bactérienne à Gram-positif, il apparaît que le niveau d'expression de TLR2 est déterminant quant à l'amplitude et l'efficacité de la réponse inflammatoire, ce qui implique une régulation fine. Il a été montré dans un modèle *in vitro*, que cette régulation positive de TLR2 était induite par l'étirement cyclique des cellules pulmonaires (Charles, Tissières et al. 2005).

Des études chez l'animal ont montré que la ventilation mécanique pouvait fortement augmenter l'expression pulmonaire de certains TLRs, en particulier le TLR2 (Charles, Tissières et al. 2011). Une autre étude chez la souris a montré le rôle de la signalisation via le TLR4 dans le développement d'une inflammation induite par la VM (Vaneker, Joosten et al. 2008). Cette étude a révélé que la VM à faible volume courant augmente

l'expression de ligands endogènes du TLR4 dans les LBA des souris et augmente les niveaux d'ARNm de TLR4 dans les homogénats de poumon. D'autres études dans des modèles animaux de VILI (Hillman, Moss et al. 2007, Villar, Cabrera et al. 2010) ont en effet montré que les ARNm des TLR2 et 4 entre autres étaient retrouvés en plus grande concentration dans les LBA de fœtus de moutons ayant reçu une ventilation mécanique brève mais à haut volume courant. Ils ont également démontré que la sur-expression de TLR2/TLR4 semblait dépendante de la ventilation mécanique. Tous les TLRs dont le TLR2 ont en commun MyD88 comme protéine adaptatrice intracellulaire (hormis l'hétérodimère TLR3 dont le signal est relayé par la molécule TRIF). L'activation de MyD88 recrute des kinases et facteurs activateurs tels que IRAK et TRAF qui stimulent rapidement les voies de NF- $\kappa$ B et des MAPK (p38, p44/42, JNK). De cette activation de la voie des MAPK dépend la production et sécrétion de cytokines inflammatoires comme l'IL-8. Oudin et Pugin ont montré que l'étirement cyclique de cellules humaines épithéliales bronchiques induisait une sécrétion d'IL-8 dépendante de la voie des MAPK. En effet la kinase p38 est rapidement activée après l'initiation de l'étirement cyclique. De plus ils ont montré que le blocage de p38 par un composé pharmacologique abolissait la production d'IL-8 (Oudin and Pugin 2002)

## V. Les pneumonies acquises sous ventilation mécanique

Dans les services de réanimation, les pneumonies infectieuses sont la première cause d'infection nosocomiale. Une pneumonie infectieuse nosocomiale est définie comme une infection pulmonaire acquise après au minimum 48 heures d'hospitalisation.

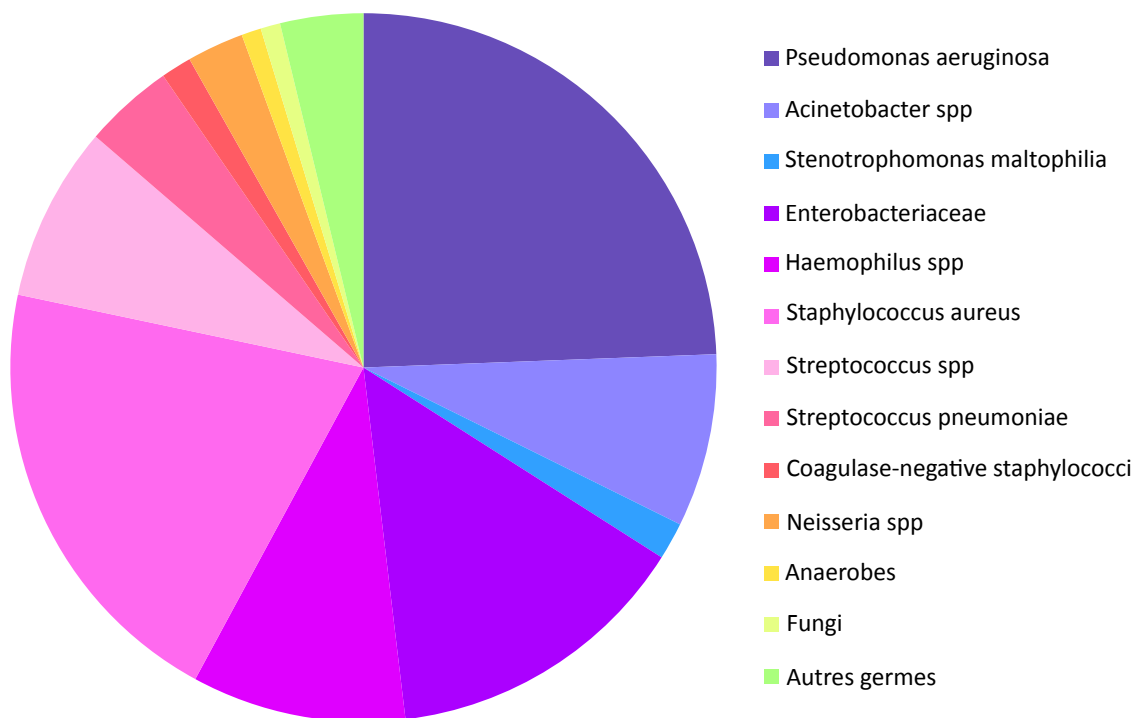
Le terme de pneumonies acquises sous ventilation mécanique (PAVM) caractérise des infections acquises après au moins 48 heures de ventilation mécanique invasive (c'est-à-dire avec une intubation orotrachéale). Le risque de développer une pneumonie chez le malade intubé est corrélé notamment à la durée de la VM. Le risque de pneumonie nosocomiale peut en revanche être diminué si le malade est ventilé de manière non

invasive, avec un masque par exemple au lieu d'une sonde d'intubation (Antonelli, Conti et al. 1998).

## 1. Epidémiologie

Le développement d'une PAVM implique généralement trois étapes. Tout d'abord la colonisation des voies aériennes par des bactéries. Elle se produit suite à la colonisation oropharyngée ou gastrique. Ensuite, l'altération des mécanismes de défense va permettre à ces germes présents au niveau trachéobronchique de persister. Enfin, si ces pathogènes atteignent les alvéoles pulmonaires, une véritable pneumopathie va se développer.

Les pneumonies acquises sous ventilation mécanique se produisent chez 30 à 60% des patients admis en unité de soins intensifs (Craven, Kunches et al. 1986). Malgré de nombreux progrès dans les techniques de gestion des patients sous VM et la mise en place de procédures de prévention efficaces, les PAVM continuent de compliquer la prise en charge de beaucoup de patients recevant une ventilation mécanique (Chastre and Fagon 2002) et sont responsables d'une surmortalité (Fagon, Chastre et al. 1993). Les taux de pneumonie sont beaucoup plus élevés parmi les patients hospitalisés en unité de soin intensif en comparaison à ceux dans les autres services hospitaliers, et le risque de pneumonie est augmenté de 3 à 10 fois chez les patients soumis à la VM (Chevret, Hemmer et al. 1993, Chastre and Fagon 2002). Le taux de mortalité des PAVM, définit comme étant une pneumonie se produisant plus de 48h après l'intubation endotrachéale et l'initiation de la VM, s'étend de 24 à 50% et peut dépasser les 76% dans certaines conditions particulières ou lorsque l'infection des poumons est causée par des pathogènes à haut risque (Celis, Torres et al. 1988, Rello, Rue et al. 1997). De nombreuses études ont montré que le traitement par un antibiotique approprié des patients souffrant de PAVM améliorerait leur devenir, à condition d'identifier le plus rapidement possible les patients infectés et de sélectionner précisément l'agent antimicrobien (Torres, Aznar et al. 1990, Rello, Gallego et al. 1997, Kollef 1999).



**Figure 18. Etiologie des pneumonies acquises sous ventilation mécanique documentées par techniques bronchoscopiques lors de 24 études portant sur 1689 épisodes et 2490 pathogènes.**

Pseudomonas aeruginosa 24,4%; Acinetobacter spp. 7,9%; Stenotrophomonas maltophilia 1,7%; Enterobacteriaceae 14,1%; Haemophilus spp. 9,8%; Staphylococcus aureus 20,4%; Streptococcus pneumoniae 4,1%; Coagulase-negative staphylococci 1,4%; Neisseria spp. 2,6%; Anaerobes 0,9%; Fungi 0,9%; autres germes dont les virus 3,8%. D'après (Chastre and Fagon 2002).

## 2. Les microorganismes responsables des pneumonies acquises sous ventilation mécanique

Les microorganismes responsables des PAVM peuvent différer en fonction de la population de patients étudiée dans les services de soins intensifs, la durée de l'hospitalisation et le séjour en soins intensifs, et enfin en fonction de la méthode diagnostique utilisée. Il existe également d'importantes différences écologiques d'un pays à l'autre, d'une région à l'autre, d'une ville à l'autre et d'un service de réanimation à un autre (Papazian PDF ECM).

### 2.1. Les bactéries

La distribution des germes responsables des PAVM (Figure 18) (Chastre and Fagon 2002) est également influencée par le délai d'apparition de la pneumonie. En effet, une pneumonie est dite précoce si elle se développe avant le 5<sup>ème</sup> jour de VM (on retrouve les germes suivant : *Staphylococcus aureus* résistant à l'oxacilline, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*). Une pneumonie acquise pendant ou après le 5<sup>ème</sup> jour de VM est dite tardive (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* sp, *Stenotrophomonas* sp, *Staphylococcus aureus* résistant à l'oxacilline).

Le taux élevé d'infections respiratoires dues à des bactéries à Gram-négatif dans le cadre des PAVM a été de nombreuses fois documenté (Fagon, Chastre et al. 1989, Torres, Aznar et al. 1990, Horan, Culver et al. 1993, Rello, Ausina et al. 1993, Spencer 1996). Beaucoup d'études ont montré que plus de 60% des PAVM sont causées par des bactéries aérobies à Gram-négatif. Par la suite, d'autres études ont rapporté que les bactéries à Gram-positif devenaient plus communes dans cette pathologie, *Staphylococcus aureus* étant le principal Gram-positif isolé.

Cependant, dans près de 50% des cas de PAVM, la cause est polymicrobienne (Rouby, Martin De Lassale et al. 1992).



En fonction de toutes ces différences, il est très important d'identifier précisément et rapidement les agents responsables de PAVM et de bien différencier ceux responsables de pneumonies précoces ou tardives pour adapter au mieux les antibiothérapies.

Certaines PAVM peuvent être dues à des bactéries multirésistantes comme *Staphylococcus aureus* résistant à l'oxacilline, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas* spp et les entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre élargi.

Les bactéries anaérobies sont rarement mises en évidence en raison des difficultés techniques pour les identifier (conditions de cultures difficiles) et sont en fait le plus souvent des co-pathogènes dans la phase précoce des PAVM (Dore, Robert et al. 1996).

Les bactéries intracellulaires comme *Legionella* species (Kirby, Snyder et al. 1980), les anaérobies (Dore, Robert et al. 1996) et aussi *Pneumocystis carinii* peuvent être considérés comme des agents potentiellement en cause dans les PAVM mais ils sont surtout les causes principales des pneumonies communautaires.

## 2.2. Les champignons

L'isolation de champignons, le plus fréquemment ceux de l'espèce *Candida*, à des concentrations significatives pose des problèmes d'interprétation. Des maladies invasives ont été reportées dans les PAVM mais le plus souvent, les levures sont isolées à partir d'échantillons des voies respiratoires en l'absence de toute maladie. Une étude prospective a examiné la pertinence d'isoler *Candida* spp à partir de 25 patients non-neutropéniques qui ont été ventilés mécaniquement pendant au moins 72 heures (el-Ebiary, Torres et al. 1997). Cette étude a révélé que les méthodes d'échantillonnage respiratoire couramment utilisées (bronchoscopiques ou non) chez les patients soumis à la VM sont insuffisantes pour diagnostiquer une pneumonie à *Candida*. La seule méthode vraiment fiable pour établir que *Candida* est bien le primo pathogène responsable de la PAVM, est de trouver des levures ou des pseudo-hyphes dans des biopsies pulmonaires.

### 2.3. Les virus

Soixante-dix pour cent des pneumonies nosocomiales virales seraient causées par des virus respiratoires tels que Influenza, Parainfluenza ou encore Adenovirus (American Thoracic and Infectious Diseases Society of 2005). En pratique ils sont rarement recherchés.

Dans une étude menée sur une période de cinq ans, le cytomegalovirus (CMV) a été identifié comme une cause possible des PAVM chez 25 des 86 patients de l'étude en se basant sur l'examen histologique des tissus pulmonaires obtenus à l'autopsie ou lors des biopsies de poumon (Papazian, Fraisse et al. 1996). Le CMV ne doit donc pas être exclu des pathogènes potentiellement responsables de PAVM chez les patients de réanimation, même chez ceux sans syndrome d'immunodéficience acquise, sans hémopathie maligne ou sans thérapie immunosuppressive en particulier dans le cas de PAVM tardives. Il s'agit alors d'une réactivation virale le plus souvent.

## **3. Physiopathologie des pneumonies acquises sous ventilation mécanique**

Les PAVM résultent de l'association de trois mécanismes nécessaires :

- la colonisation trachéobronchique : des pathogènes colonisent les voies respiratoires basses, normalement stériles;
- la persistance des germes : une pathogénicité particulière des germes ayant pénétré l'arbre aérien est nécessaire au développement de l'infection;
- l'altération des mécanismes de défense de l'hôte.

### 3.1. La colonisation trachéobronchique

### **A. Implication de la colonisation oropharyngée**

La colonisation oropharyngée semble être la porte d'entrée la plus courante à la colonisation trachéobronchique et semble impliquée de manière prépondérante dans la genèse d'une PAVM. En effet comme suggérée par la rare association entre PAVM et bactériémie, la majorité de ces infections apparaît résulter de l'aspiration de potentiels pathogènes naturellement présents à la surface des muqueuses de l'espace oropharyngé, et non d'une dissémination pulmonaire par voie hématogène. Plusieurs études plaident d'ailleurs en faveur de ce mécanisme de colonisation et ont montré que dans 76% des cas de PAVM en moyenne, on retrouve la même bactérie aussi bien au niveau buccal que pulmonaire (Brennan, Bahrani-Mougeot et al. 2004). La flore buccale composée majoritairement de bactéries anaérobies peut être modifiée par différents facteurs aboutissant à la colonisation de la cavité oropharyngée par des germes impliqués dans les PAVM. L'intubation des patients ne compromet pas seulement la barrière naturelle entre l'oropharynx et la trachée, mais facilite également l'entrée des bactéries dans le poumon par la fuite de sécrétions contaminées le long de la sonde endotrachéale (Craven and Steger 1996, American Thoracic and Infectious Diseases Society of 2005). La position en décubitus dorsal des patients intubés facilite ce phénomène.

L'hospitalisation de manière générale mais surtout le séjour en réanimation favorise la colonisation par *Staphylococcus aureus* et certaines bactéries à Gram-négatif aérobies et anaérobies. On retrouve dans la flore colonisante essentiellement les bactéries à Gram-positif en début de séjour. Ces bactéries sont ensuite progressivement remplacées par des bactéries à Gram-négatif dont la proportion croît avec la durée de séjour (Bonten, Gaillard et al. 1994).

### **B. Implication de la colonisation gastrique**

Les PAVM peuvent survenir d'une autre manière (Craven 2000). Les entérobactéries à Gram-négatif sont les germes les plus fréquemment impliqués dans le développement

des PAVM. Cette observation a conduit à penser que le tractus digestif pouvait jouer un rôle majeur dans la genèse des PAVM. Une prolifération bactérienne existe dans l'estomac des patients de réanimation mais le rôle du tractus gastro-intestinal comme source de la colonisation oropharyngée et trachéobronchique par les bactéries à Gram-négatif est très controversé (Torres, el-Ebiary et al. 1993, Bonten, Gaillard et al. 1997, Garrouste-Orgeas, Chevret et al. 1997). Cette colonisation a différentes origines possibles : reflux duodéno-gastrique (présence d'entérobactéries à Gram-négatif, augmentation du pH lié à une forte concentration de bilirubine), une contamination par la sonde gastrique et une contamination par les liquides instillés dans cette sonde gastrique. Le mécanisme par lequel les voies respiratoires peuvent être colonisées via le tractus digestif est le suivant : les germes progressent de manière rétrograde de l'estomac vers l'œsophage puis l'oropharynx. Ensuite, l'arbre trachéobronchique est contaminé parce que des troubles de la déglutition se produisent avec micro- ou macro-inhalations répétées et ceci même lorsqu'une sonde avec ballonnet gonflé est mise en place. Un pH gastrique au-dessus de 4,5 dont l'élévation est principalement due à l'utilisation d'antiulcéreux (Donowitz, Page et al. 1986), favorise cette colonisation (Atherton and White 1978, du Moulin, Paterson et al. 1982, Hillman, Riordan et al. 1982).

### **C. Autres voies de colonisation**

De nombreux travaux ont montré une colonisation trachéale première qui pourrait concerner jusqu'à la moitié des colonisations. On retrouve une contamination exogène par inoculation intratrachéale directe de germes manuportés par le personnel soignant (transmission horizontale croisée). En effet des études comme celle de Maki, montrent que 64% du personnel soignant des soins intensifs ont les mains contaminées par *Staphylococcus aureus* (Maki 1978). Ou encore dans l'étude de Larson, où il est montré que 21% des personnels hospitaliers étaient porteurs de germes à Gram-négatif au niveau des mains (Larson 1981). D'autres sources de contamination existent comme les

vêtements portés par le personnel soignant, leurs stéthoscopes, les brassards à pression artérielle, mais leur implication est difficilement appréciable. Enfin les sources de contamination environnementales (air, surfaces, eau) en réanimation peuvent également être à l'origine de PAVM.

### 3.2. La persistance des germes

Une fois pénétrées dans l'arbre aérien, pour que l'infection puisse se développer, les bactéries doivent adhérer aux cellules épithéliales. Certains micro-organismes comme *Pseudomonas aeruginosa* ou encore *Klebsiella pneumoniae* ont des capacités d'adhérence particulières. Les immunoglobulines A (Bernard, Artigas et al. 1994) sécrétoires sont capables de diminuer cette adhérence. L'adhérence est également plus marquée sur l'épithélium cilié de la trachée que sur l'épithélium squameux de l'oropharynx. En comparant des patients de réanimation à des sujets sains, les travaux de Johanson ont montré une adhérence préférentielle des bactéries sur les cellules buccales des patients (Johanson, Higuchi et al. 1980). Il a mis au point un index d'adhésion de l'épithélium. Plus cet index est élevé plus les patients ont une incidence élevée de PAVM (Todd, Franklin et al. 1989). Dans le cas d'un index élevé il est beaucoup plus probable que la séquence adhésion-colonisation-infection se produise, liée en majeure partie à une modification des surfaces cellulaires et du glycocalyx hydrocarboné protecteur qui tapisse l'épithélium. En effet, il a été montré que chez les patients soumis à la VM, on retrouvait une élévation de l'activité des exoglycosidases dans leur salive et leur trachée. Ces enzymes sont responsables de la libération des monosaccharides du glycocalyx. L'élévation de l'activité des exoglycosidases s'accompagnait d'une augmentation de l'adhésion des bactéries à Gram-négatif. (Donati and Papazian 2008).

### 3.3. L'altération des mécanismes de défense

Les voies aériennes supérieures des patients intubés ne sont plus capables de filtrer les particules de plus de 10µm de diamètre. De plus, les réflexes de toux sont diminués voire complètement inhibés si les patients sont fortement sédatés ou sous curare. Ces sujets présentent également un dysfonctionnement mucociliaire et l'évacuation des sécrétions est altérée. Des lésions sur la muqueuse en sont la cause, conséquences de la présence de matériel étranger, d'aspirations trachéales et d'inhalations répétées de liquide gastrique. La dysfonction mucociliaire est de plus majorée en cas d'insuffisance d'humidification des gaz inspirés ou par des concentrations élevées en oxygène. Les moyens de défense locaux, cellulaires et biochimiques, sont également altérés lors d'une PAVM. Chez un sujet sain, l'action conjointe des macrophages (action bactéricide par la phagocytose), des leucocytes et des lymphocytes par l'intermédiaire de cytokines ou d'immunoglobulines opsonisantes, empêchent le développement d'une infection. Parmi les Ig impliquées, les IgA sécrétoires seraient les plus importantes dans les processus de défense contre les infections pulmonaires. Des études ont montré une augmentation croissante avec la durée de VM, du rapport IgA/albumine dans les sécrétions bronchiques. Or il a été observé une élévation 6 fois moins importante de ce rapport en comparant les patients développant une PAVM à ceux qui n'en développent pas (Annane, Clair et al. 1996). Il a également été rapporté, qu'une des composantes du surfactant pulmonaire, la protéine A, principalement impliquée dans les processus alvéolaires de destruction bactérienne, serait significativement diminuée dans les liquides de lavages bronchoalvéolaires des patients souffrant de PAVM, en comparaison à des sujets sains et à des malades atteints de fibrose idiopathique (Baughman, Sternberg et al. 1993).

#### **4. Facteurs de risques liés à la ventilation mécanique**

Les patients soumis à la VM sont immobilisés en décubitus dorsal. Cette position entraîne une diminution de la CRF liée à la fermeture alvéolaire et à l'accumulation de mucus dans les zones dépendantes, par diminution de la clairance mucociliaire. Ces

ouvertures fermetures cycliques des alvéoles ainsi que la surdistension des espaces alvéolaires, favorisent l'atélectasie et par conséquent les infections pulmonaires. Le décubitus dorsal favorise également l'inhalation. De surcroît, l'étirement du poumon conduirait à la libération massive de cytokines inflammatoires causant à leur tour des lésions sur le tissu pulmonaire, en particulier par le recrutement de PNN via l'IL-8 (Kawano, Mori et al. 1987, Charles, Tissieres et al. 2011). Enfin, d'autres études montrent que la capacité de l'hôte de limiter la croissance bactérienne peut être altérée par les forces mécaniques appliquées sur le poumon soumis à la VM (Charles, Piroth et al. 2002, Pugin, Dunn-Siegrist et al. 2008). Néanmoins, en limitant les contraintes sur les alvéoles en réduisant le VT et en évitant que les alvéoles ne se collapsent par l'application d'une PEEP, des expériences ont montré une protection des poumons dans des modèles animaux mais également chez des patients souffrant de graves lésions pulmonaires (Whitehead, Zhang et al. 2004, Villar 2006). Cependant il a été montré que malgré la mise en place d'une ventilation protectrice, les lésions et l'inflammation sont inégalement distribuées dans le poumon (Pavone, Albert et al. 2007, Otto, Markstaller et al. 2008). Ainsi, les zones non gravito-dépendantes ont tendance à être plus distendues, et les régions pulmonaires dépendantes sont susceptibles d'être faiblement aérées. Des lésions lobaires causées par une pneumonie bactérienne pourraient aggraver ces caractéristiques.

Il a été montré que le décubitus ventral (Arendrup, Chryssanthou et al.) améliorerait les échanges gazeux et la mécanique du poumon chez les patients souffrant de SDRA (Blanch, Mancebo et al. 1997). Ceci semble particulièrement vrai pour les patients souffrant de SDRA lobaire (Galiatsou, Kostanti et al. 2006). Toutefois, des modèles animaux de lésions pulmonaires diffuses montrent que le DV peut améliorer le recrutement alvéolaire grâce à une meilleure distribution de la ventilation dans le poumon, retardant ainsi si ce n'est pas en les atténuant, le développement de lésions de VILI (Broccard, Shapiro et al. 2000, Richard, Bregeon et al. 2008).

## VI. Objectifs du travail de thèse

Les pneumopathies bactériennes acquises sous ventilation mécanique font partie des infections nosocomiales les plus fréquentes en réanimation. Une mortalité de l'ordre de 40% est généralement observée chez ces patients, et ce malgré l'administration d'une antibiothérapie active sur le germe responsable. Parmi ces bactéries, *Staphylococcus aureus* occupe une place importante. En effet, *S. aureus* est impliqué dans près de 20% des PAVM. La mortalité associée à ces infections est particulièrement élevée, témoignant notamment de la virulence de ce microorganisme. Il semblerait de plus que les souches résistantes à la méthicilline (SARM) seraient responsables d'infections plus sévères, avec des taux de succès clinique de l'antibiothérapie de l'ordre de 57%. Le linézolide est en passe de devenir l'antibiothérapie de référence des PAVM à SARM (ECCMID 2011). Certaines données cliniques montrent que le degré d'inflammation systémique associé à la survenue d'une PAVM pourrait conditionner le devenir des patients qui en sont atteints. De plus, les PAVM bactériémiques seraient plus sévères que celles au cours desquelles les hémocultures restent négatives. Ainsi, sur la base de ces données cliniques, la décompartmentalisation de la réponse inflammatoire pulmonaire et des microorganismes qui l'ont induite déterminerait la gravité de la PAVM.

Au cours d'une pneumopathie bactérienne, l'efficacité et la promptitude de la réponse immune de l'hôte conditionnent le contrôle de l'infection. La reconnaissance des pathogènes responsables par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires est une étape précoce et cruciale dans le déterminisme de cette réponse inflammatoire. Elle met notamment en jeu les récepteurs Toll-Like capables de lier spécifiquement certains motifs moléculaires présents à la surface des microorganismes puis d'induire via l'activation de voies de signalisation intracellulaires une réponse inflammatoire à travers la libération de différents médiateurs dont le TNF- $\alpha$ , l'IL-8, l'IL-6, etc... Au cours des infections bactériennes pulmonaires, les TLRs 2 et 4 semblent jouer un rôle majeur sachant que TLR2 reconnaît spécifiquement les bactéries à Gram-positif dont *S. aureus*.



Les études expérimentales montrent que selon les modèles, TLR2 peut être protecteur ou délétère pour l'hôte au cours d'une infection à Gram-positif. Ces résultats suggèrent que le niveau d'expression de TLR2 chez l'hôte est déterminant quant à son devenir dans ce contexte et qu'une régulation fine est requise. De façon récente et intéressante, il a été observé que des molécules de la classe des statines pouvaient expérimentalement réduire l'inflammation médiée par TLR2 et TLR4. Les mécanismes sous-jacents restent peu clairs. Cet effet anti-inflammatoire des statines pourrait néanmoins rendre compte de leur effet bénéfique décrit en clinique humaine au cours de diverses situations inflammatoires, dont les états septiques incluant les pneumonies. En outre, de nombreuses observations suggèrent que la VM, support vital indispensable dans les situations de détresse respiratoire, peut être délétère pour le poumon de l'hôte, notamment en aggravant des lésions pulmonaires préexistantes. De plus, il semblerait que les contraintes mécaniques anormales et notamment l'étirement que la VM impose au poumon, aient un effet pro-inflammatoire à la fois local et systémique. Enfin, des données expérimentales incluant nos travaux montrent que la VM pourrait diminuer les défenses antibactériennes du poumon et promouvoir le passage systémique des produits bactériens et des bactéries elles-mêmes au cours des pneumonies.

L'objectif du premier travail a été de regarder, dans un modèle animal de pneumopathie bactérienne unilatérale, si la position en décubitus ventral pouvait réduire la sévérité des lésions sur le poumon infecté. Nous avons également évalué l'impact du DV sur les caractéristiques du VILI sur le poumon controlatéral non infecté.

Le second projet a eu pour but de tester l'hypothèse selon laquelle la VM module l'expression de TLR2. Ce projet fait suite à une première étude montrant que l'étirement cyclique *in vitro* reproduisant la VM augmente l'expression de TLR2 et augmente la réactivité de TLR2 au Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> des cellules épithéliales humaines.

Ces résultats *in vitro* sont en partie reproduits dans le modèle animal où la VM augmente les lésions sur le poumon en réponse au Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>.

Le projet suivant s'est fixé plusieurs objectifs. Il s'est inscrit dans la suite du travail de notre groupe ayant montré que l'étirement cyclique des cellules pulmonaires *in vitro* comme *in vivo* était susceptible d'induire l'hyperexpression de TLR2 avec pour conséquence une augmentation de la réponse inflammatoire à ses agonistes (Charles et al, 2011). Nous nous sommes demandés dans quelle mesure ces phénomènes pouvaient impacter le développement d'une pneumopathie à *S. aureus* sous VM. C'est pourquoi dans un premier temps nous avons mis au point un modèle de pneumonie à SARM et nous nous sommes attachés à regarder si la VM altérait la réponse immunitaire de l'hôte et le rôle éventuel de TLR2. Après 24 heures de VM non protectrice (VT=12mL/Kg et PEEP=0cmH<sub>2</sub>O et F<sub>i</sub>O<sub>2</sub>=50%), les animaux ont reçu un inoculum calibré de SARM (9LogCFU/mL). La pneumonie a été évaluée 24 heures plus tard à l'issue du sacrifice des animaux. L'hypothèse de cette première partie d'étude était qu'une VM non protectrice qui induit un étirement modéré des alvéoles puisse amorcer une réponse inflammatoire latente au niveau pulmonaire via l'hyperexpression de TLR2, qui deviendrait rapidement patente voire excessive en cas d'exposition des voies aériennes à *S. aureus*. Les premiers résultats ont montré que la VM non protectrice pourrait réduire la clairance bactérienne et promouvoir la translocation systémique des bactéries. La VM apparaît de plus comme un facteur accélérant la survenue des lésions pulmonaires, sachant que celles-ci étaient plus importantes que dans le modèle d'agression pulmonaire par l'agoniste TLR2 (Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>) décrit précédemment.

Dans la seconde partie de ce projet, l'objectif était d'explorer le possible effet protecteur sur l'hôte d'une thérapie préalable aux statines dans notre modèle de pneumonie à SARM en association avec une antibiothérapie au linezolid. Nous avons regardé quel était l'impact sur la réponse inflammatoire ainsi que sur les lésions pulmonaires et la clairance bactérienne. Des expériences *in vivo* ont encore été

réalisées chez le lapin, avec un groupe soumis à la ventilation mécanique et un groupe témoin en respiration spontanée. Les résultats démontrent qu'une exposition préalable aux statines, avant le développement d'une pneumonie, a des effets anti-inflammatoires aussi bien à l'étage pulmonaire que systémique chez les lapins souffrant d'une pneumonie à SARM traités par linézolide.

Afin de mieux comprendre les effets pro-inflammatoires et délétères de la VM par le biais de l'étirement cyclique des voies aériennes, une autre voie de l'inflammation a été explorée. Ce projet mené parallèlement aux précédents s'est intéressé aux rôles éventuels de certaines alarmines, les alarmines mitochondriales, dans les deux modèles de stretch cellulaire pulmonaire, *in vitro* et *in vivo* (Vlahakis and Hubmayr 2000, Stroetz, Vlahakis et al. 2001, Zhang, Raoof et al. 2010, Gross, Thomas et al. 2011). Ce projet a été réalisé à l'initiative de l'équipe du Professeur Jérôme Pugin à l'Hôpital de Genève, avec lequel nous avons activement collaboré. Ainsi nous avons réalisé dans notre laboratoire à Dijon, la partie *in vivo* de l'étude, dans un modèle de VILI chez le lapin. Les lapins ont été ventilés (VT=12mL/Kg ; PEEP=0cmH<sub>2</sub>O ; F<sub>i</sub>O<sub>2</sub>=50%) pendant 4 ou 8 heures. Les résultats du modèle *in vivo* de VILI montrent que l'ADN mitochondrial et les concentrations d'ATP dosés dans les LBA de lapins sont plus élevées que chez les animaux non ventilés. Ces alarmines semblent induire la production d'IL-1 $\beta$  par les cellules pulmonaires. Ainsi, ces médiateurs pourraient représenter le lien entre l'étirement cyclique des cellules pulmonaires et la libération de cytokines inflammatoires. Libérées par les cellules épithéliales pulmonaires, ces alarmines agiraient comme des médiateurs endogènes dans le VILI et le SDRA.

# RÉSULTATS

## Résultats

---

### I. Article 1

#### **« Impact of the prone position in an animal model of unilateral bacterial pneumonia undergoing mechanical ventilation. »**

Un premier travail, initié par le Professeur Charles et le Docteur Ladoire, a consisté en l'étude de l'impact de la position en décubitus ventral sur le développement d'une pneumonie bactérienne unilatérale sous ventilation mécanique. J'ai pu y participer activement lors de ma première année de thèse de Recherche. Ce travail a abouti à la publication d'un article scientifique en Mai 2013 dans le journal *Anesthesiology*.

Pour cette étude, nous avons utilisé des lapins non immunodéprimés chez lesquels nous avons induit une pneumonie à *Enterobacter aerogenes* puis dans une première série d'expériences nous avons évalué l'impact du DV lors d'une VM agressive (PIP= 30cmH<sub>2</sub>O ; PEEP= 0cmH<sub>2</sub>O). Enfin dans une deuxième série d'expériences, pour se rapprocher des pratiques cliniques, nous avons évalué l'impact du DV lors d'une VM protectrice (VT= 8mL/kg ; PEEP= 5cmH<sub>2</sub>O).

Ces travaux mettent en évidence qu'une ventilation mécanique en décubitus ventral peut être protectrice pour l'hôte dans le cas d'une pneumonie bactérienne unilatérale. Cette position améliore les lésions sur le poumon et ceci même si elle est mise en place après que les lésions se soient développées et dans le cadre d'une ventilation mécanique non protectrice.

Au niveau des paramètres physiologiques des animaux, nous avons observé que la compliance du système respiratoire ( $C_{RS}$ ) était améliorée en position DV dans le cas où une VM agressive était appliquée. Nous avons également montré que les concentrations sanguines en lactate restaient dans des valeurs normales tout au long de l'expérience lorsque les animaux sont ventilés en position DV, tandis que ces concentrations augmentent chez les animaux ventilés en décubitus dorsal (DD) (Table 1).

Au niveau microbiologique, nous montrons que les concentrations bactériennes pulmonaires sont plus faibles dans les groupes ventilés en DV en comparaison aux groupes ventilés en DD, que la ventilation mécanique soit protectrice ou non (Figure 2A). Nous avons également évalué l'impact extra-pulmonaire de la pneumonie en prenant comme marqueur de diffusion des pathogènes la dissémination splénique. Ainsi, nous avons retrouvé dans les cultures de rate des concentrations bactériennes plus faibles dans le groupe DV en ventilation agressive que chez les animaux ventilés sur le dos (Figure B). En revanche nous n'observons pas ces résultats dans le cas d'une ventilation protectrice.

Sur le plan inflammatoire, nous retrouvons des concentrations pulmonaires en IL-8 plus faibles dans le groupe DV quel que soit le type de ventilation mécanique, que dans le groupe DD (Figure 3A-a). Nous avons observé des concentrations plus faibles en IL-8 dans le groupe DV lorsque les lapins sont soumis à une ventilation agressive. Chez les animaux soumis à une ventilation protectrice, nous n'observons pas de diminution significative dans le groupe DV (Figure 3A-b). Au contraire, même si une ventilation protectrice diminue significativement les concentrations pulmonaires en TNF- $\alpha$  quelle que soit la position de ventilation, la position DV ne la diminue pas plus (Figure 3B-a). Les concentrations en TNF-  $\alpha$  dans la rate sont similaires dans les deux groupes quelle que soit la stratégie ventilatoire (Figure 3B-b). Dans le sang des animaux, nous avons observé que les concentrations en IL-8 augmentaient plus lentement au cours du temps chez les animaux ventilés en position DV (Figure 4A).

Au niveau du poumon controlatéral non infecté, nos observations microscopiques ont révélé que les lésions sur ce poumon dépendaient à la fois de la stratégie ventilatoire et de la position (Figure 5). La ventilation protectrice est associée à moins de lésions sur le tissu (Table 2). Nous n'avons pas mis en évidence de différence dans le ratio WW/DW en fonction de la position du corps quelle que soit la stratégie de ventilation. En revanche, nous avons montré que ce ratio est significativement plus bas dans le groupe DV lorsqu'une ventilation protectrice est appliquée, ce qui correspond probablement à une diminution des lésions de VILI.

# Anesthesiology

## Impact of the Prone Position in an Animal Model of Unilateral Bacterial Pneumonia undergoing Mechanical Ventilation

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	ALN201202051R2
<b>Full Title:</b>	Impact of the Prone Position in an Animal Model of Unilateral Bacterial Pneumonia undergoing Mechanical Ventilation
<b>Article Type:</b>	Critical Care Medicine
<b>Corresponding Author:</b>	Pierre Emmanuel Charles, M.D., Ph.D. Hopital Bocage Central, Centre Hospitalier et Universitaire De Dijon Dijon, 21000 FRANCE
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Hopital Bocage Central, Centre Hospitalier et Universitaire De Dijon
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Sylvain Ladoire, M.D., Ph.D.
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Sylvain Ladoire, M.D., Ph.D. Laure Anne Pauchard, M.Sc. Saber Davide Barbar, M.D., M.Sc. Pierre Tissières, M.D., Ph.D. Delphine Croisier-Bertin, Pharm.D., Ph.D. Pierre Emmanuel Charles, M.D., Ph.D.
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p><b>Background:</b> The prone position (PP) has proven beneficial in the patients with severe lung injury subjected to mechanical ventilation (MV), especially in those with lobar involvement. We assessed the impact of the PP on unilateral pneumonia in rabbits subjected to MV.</p> <p><b>Methods:</b> After endobronchial challenge with <i>Enterobacter aerogenes</i>, adult rabbits were subjected to either "adverse" (peak inspiratory pressure = 30 cm H<sub>2</sub>O, zero end-expiratory pressure; n = 10) or "protective" (tidal volume = 8 mL/kg, 5 cm H<sub>2</sub>O positive end-expiratory pressure; n = 10) MV and then randomly kept supine or turned to the PP. Pneumonia was assessed 8 hours later. Data are presented as median [Inter-Quartile Range].</p> <p><b>Measurements and main results:</b> Compared with the supine position, the PP was associated with significantly lower bacterial concentrations within the infected lung, even if a "protective" MV was applied (5.93 [0.34] vs. 6.66 [0.86] log<sub>10</sub> cfu/g, respectively; p = 0.008). Bacterial concentrations in the spleen were also decreased by the PP if the "adverse" MV was used (3.62 [1.74] vs. 6.55 [3.67] log<sub>10</sub> cfu/g, respectively; p = 0.038). In addition, the non-infected lung was less severely injured in the PP group. Finally, lung and systemic inflammation as assessed through Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math> measurement was attenuated by the PP.</p> <p><b>Conclusions:</b> The prone position could be protective if the host is subjected to MV and unilateral bacterial pneumonia. It could be subsequent to enhanced antibacterial defences and improvements in lung mechanics, thereby blunting overwhelming inflammation.</p>



Answers to reviewers :

1 Reviewer 1 :

2 We thank the reviewer for his comments.

- 3 a) we agree with the reviewer that our adverse strategy is far from the clinical  
4 practice. However, since we report now the same results, to a lesser extent if a  
5 « protective » MV is applied, the « adverse MV » group allows us to consider that  
6 lung bacterial impairment is related to the degree of mechanical stretch applied  
7 to the lung through MV. This point is now developed within the discussion  
8 section (p. 14).  
9  
10 b) We agree with the fact that sample size is slow. This appears now more clearly as  
11 a limitation within the discussion section (p. 14).  
12  
13 c) We have checked our data and found the same results.  
14  
15 d) The Figure 1 has been corrected.

16  
17 Reviewer 3 :

18 We agree with the reviewer when he is suggesting that the abstract can be improved.

19 Accordingly, quantitative data have been added to the results section.

20 « pneumonia main features » : we mean bacterial lung and extra-pulmonary  
21 concentrations, histological aspects, lung mechanics, etc... We did not develop this point  
22 in order to shorten the abstract.

23  
24 “antibacterial defense enhancement”: We mean that in the prone position, since lung  
25 bacterial clearance is likely to be increased together with a modulation of the  
26 proinflammatory lung response, we hypothesize that the lung mechanics improvements  
27 resulting from PP enhance the pulmonary innate immune response.  
28  
29

30  
31 Introduction, l. 18: “irrelevant settings”: this has been clarified in the text.

32  
33 P.6 l.5-20: we have used a pressure-controlled ventilator for the first set of experiments.  
34 We have then acquired a new ventilator (a volume-controlled one), which allowed us to  
35 apply clinically relevant settings in the second set of experiments (i.e., to set the VT  
36 according to the body weight of each animal). A sentence has been added in the Methods  
37 section in order to clarify this point.  
38  
39

40  
41 p.6 l.25: PV-curves were constructed immediately after sacrifice because we wanted to  
42 avoid any adverse effect from apnea and lung inflation which could have lead to the  
43 animal death.  
44

45  
46 p.6 l.31: “most” = 7 animals out of 9. This information has been added to the text.  
47

48  
49 p.6 l.58: “bacteria concentration calculation” We thank the reviewer for this comment.  
50 Accordingly, we should deem that when comparing 2 animals, despite the same bacterial  
51 growth within their lung, if greater amounts of edema have been produced, lower lung  
52 bacterial concentrations would be measured. However, it is worth noting that in our  
53 study, the WW/DW ratio was the same regarding the position in the “adverse MV”  
54 group. Differences in bacterial concentrations between these animals (PP vs. SP) could  
55 not be thus explained. In contrast, we should acknowledge that since a lesser amount of  
56 permeability edema was measured in SP than in PP animals subjected to the “protective  
57 MV”, one cannot exclude that bacteria were more “diluted” in these latter rabbits.  
58 However, this should be considered as a conservative bias, likely to blunt the differences  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 of bacterial concentrations we report within the infected lungs. Given the high  
2 variability of the lung weight from one animal to another, considering the control  
3 rabbits (i.e., without lung edema) for such calculation is not realistic.

4  
5 P.7, L.29: Given the high variability of the lung weight from one animal to another, we  
6 have chosen to use this ratio rather than the total lung weight.

7  
8 P.9, l.20 to 31: Once more, given the high variability of these parameters from one  
9 animal to another, it was more informative to present the results like this (i.e.,  
10 differences rather than absolute values). We considered therefore that presenting the  
11 data as kinetics was more relevant. In addition, the reviewer 4 preferred that we present  
12 our findings in terms of mean differences.  
13  
14

15  
16 Reviewer 4:

17 We thank the reviewer for his comments.

- 18 1. We agree with the reviewer about the best way to present our findings within the  
19 abstract. We have checked the manuscript accordingly. Our main findings are  
20 now clearly presented and numeric data are shown.
- 21 2. The number of animals is now given in the abstract.
- 22 3. We apologize. The name of our software is now given.
- 23 4. All our tests were 2-tailed as now indicated in the text.
- 24 5. We apologize for such a mistake which has been corrected.
- 25 6. "significant use": the results section has been revised accordingly.
- 26 7. We agree with the reviewer comment and we apologize for such missing data.  
27 Accordingly, we have changed the legend of the Table 1 since as written in the  
28 text, arterial blood gases were not obtained in all the animals of the "adverse MV"  
29 group but in 7 of them.
- 30 8. The "+" have been deleted from the text and the Table 1 as well.
- 31 9. Since most of our analysis compared groups included 5 animals, to ensure  
32 uniformity of the presentation of our findings, we prefer to keep the same plots.
- 33 10. The "#" symbols and the corresponding p values greater than 0.05 have been  
34 removed from the figures 3, 4 and 6, but also from the Table 2.

35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42 "missing parts"

43  
44 TITLE PAGE:

- 45 1. "the" has been deleted
- 46 2. Academic titles have been added
- 47 3. This work comes from my own affiliation that is: U.M.R. 1347, pôle « Microbiologie  
48 Environnementale et Risque Sanitaire » (M.E.R.S.), EA562, Université de Bourgogne, Faculté  
49 de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 DIJON, FRANCE
- 50 4. The acknowledgments have been moved to the title page
- 51 5. Full name, etc... have been added to the acknowledgment section
- 52 6. An abbreviated titled has been added
- 53 7. A summary statement is now available
- 54 8. Fundings used for this study are now detailed

55  
56  
57  
58  
59 REFERENCES:

- 60 1. the requested typographical changes have been made

2. journal abbreviations have been corrected when mandatory
3. the reference has been updated
4. the reference list is now double spaced

#### ABBREVIATIONS

The guidelines have been followed.

#### STRUCTURED ABSTRACT:

The requested changes have been made in addition to the reviewers 's ones. Some parts of sentences have been deleted thereafter in order to keep the abstract within the 250 words range.

The key words have been deleted.

#### TABLES:

1. Tables have been uploaded as single word files
2. One brief title has been added to each table.
3. Abbreviations have been listed within the Table legends in alphabetical order. In table 1, the double\* has been deleted since the exact number of animals with available measurements is now provided as demanded by one reviewer.
4. Tables 'legends have been double-spaced

#### TEXT

1. Drug names have been checked and the generic name is given. The drugs brand name have however been deleted because we considered them as useless. The exact location and the full name of any mentioned manufacturer are now given. Primer3 is however not a manufacturer but a free downloaded app. The www address has been added as a footnote.
2. The web address is now given into a footnote. However, the last date accessed is unknown.
3. The text has been modified when mandatory to avoid using grammatical forms such as "see above, etc..."

#### FIGURES:

1. Figures have been uploaded as single files
2. All abbreviations are now properly defined and symbols as well.
3. Figures legends are now double spaced
4. Guidelines for creating art works have been followed

# IMPACT OF THE PRONE POSITION IN AN ANIMAL MODEL OF UNILATERAL BACTERIAL PNEUMONIA UNDERGOING MECHANICAL VENTILATION

*Running title:*

Prone position and pneumonia in ventilated rabbits

*Summary statement:*

Mechanical ventilation promotes tissue damages and inflammation if applied to preinjured lungs, worsening in turn bacterial pneumonia. Prone position improved bacterial clearance, decreased injury and inflammatory mediators release as well in ventilated rabbits.

LADOIRE Sylvain, MD, PhD<sup>1</sup> (Associate Professor)  
PAUCHARD Laure Anne, MSc<sup>1\*</sup> (Research Assistant)  
BARBAR Saber Davide, MD, MSc<sup>1</sup> (Medical Assistant)  
TISSIERES Pierre, MD, PhD<sup>2</sup> (Professor)  
CROISIER-BERTIN Delphine, PharmD, PhD<sup>1,3</sup> (Research Manager)  
CHARLES Pierre Emmanuel, MD, PhD<sup>1</sup> (Professor)

\*equal contribution with SL

## Acknowledgments

The authors are grateful to Sonia Da Silva<sup>3</sup> and Davy Hayez<sup>3</sup> (Lab Technicians) for their technical contribution, and Amandine Bataille<sup>4</sup> (Lab Technician) for the histological section preparation.

<sup>1</sup>U.M.R. 1347, pôle « Microbiologie Environnementale et Risque Sanitaire » (M.E.R.S.), EA562, Université de Bourgogne, Faculté de Médecine, 7 boulevard Jeanne d'Arc, 21000 DIJON, FRANCE

<sup>2</sup>Intensive Care Laboratory, University Hospitals of Geneva, and Department of Microbiology and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, SWITZERLAND.

<sup>3</sup>Vivexia® biotech (DIJON, FRANCE)

<sup>4</sup>Cellimap (Université de Bourgogne, DIJON, FRANCE)

## Corresponding author:

Pr. Pierre-Emmanuel Charles  
[Pierre-emmanuel.charles@chu-dijon.fr](mailto: pierre-emmanuel.charles@chu-dijon.fr)

+33 3 80 29 31 27

Medical Intensive Care Unit.

Hôpital Bocage Central

14 rue Gaffarel

Centre Hospitalier et Universitaire de Dijon

21000 DIJON

FRANCE

## *Funding:*

Supported by the “Bourse Qualité Recherche” from the Université de Bourgogne obtained in 2007 in addition to institutional sources.

## Abstract

*Background:* The prone position (PP) has proven beneficial in the patients with severe lung injury subjected to mechanical ventilation (MV), especially in those with lobar involvement. We assessed the impact of the PP on unilateral pneumonia in rabbits subjected to MV.

*Methods:* After endobronchial challenge with *Enterobacter aerogenes*, adult rabbits were subjected to either “adverse” (peak inspiratory pressure = 30 cm H<sub>2</sub>O, zero end-expiratory pressure; n = 10) or “protective” (tidal volume = 8 mL/kg, 5 cm H<sub>2</sub>O positive end-expiratory pressure; n = 10) MV and then randomly kept supine or turned to the PP. Pneumonia was assessed 8 hours later. Data are presented as median [Inter-Quartile Range].

*Measurements and main results:* Compared with the supine position, the PP was associated with significantly lower bacterial concentrations within the infected lung, even if a “protective” MV was applied (5.93 [0.34] vs. 6.66 [0.86] log<sub>10</sub> cfu/g, respectively;  $p = 0.008$ ). Bacterial concentrations in the spleen were also decreased by the PP if the “adverse” MV was used (3.62 [1.74] vs. 6.55 [3.67] log<sub>10</sub> cfu/g, respectively;  $p = 0.038$ ). In addition, the non-infected lung was less severely injured in the PP group. Finally, lung and systemic inflammation as assessed through Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  measurement was attenuated by the PP.

*Conclusions:* The prone position could be protective if the host is subjected to MV and unilateral bacterial pneumonia. It could be subsequent to enhanced antibacterial defences and improvements in lung mechanics, thereby blunting overwhelming inflammation.

243 words

## Introduction

Mechanical ventilation (MV) is widely used in critically ill patients with respiratory failure. Cumulative evidence suggests however that MV could be harmful for the lung. Thus, both overdistension of the airways and intra-tidal alveolar cyclic opening and closing are likely to cause tissue damage, called ventilator-induced lung injury (VILI) <sup>1</sup>. In addition, lung stretch could lead to the release of inflammatory cytokines, thereby causing additional injury, particularly through the recruitment of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) mediated by interleukin (IL)-8<sup>2-4</sup>. Finally, some experimental findings have raised the possibility that the ability of the host to keep bacterial growth in check could be hampered by the mechanical forces applied to the lung subjected to MV <sup>5-9</sup>. Although these VILI features were primarily described in animals with preinjured lungs subjected to **ventilator settings never applied to the patients** (i.e., very large tidal volumes [ $V_T$ ]), more recent data support the hypothesis that mild but consistent tissue damages as well as activation of pulmonary inflammation could appear with usual MV parameters <sup>10,11</sup>.

Nonetheless, limiting alveolar strain by reducing  $V_T$  as well as preventing alveolar expiratory collapse through the application of positive end-expiratory pressure (PEEP) have proven to be lung protective in animals as well as in patients with severe lung injury <sup>8,12,13</sup>. However, it has been shown that despite “protective” MV, both injury and inflammation were unevenly distributed within the lung <sup>14,15</sup>. Thus, while the non-dependent areas tend to be overdistended, the dependent lung regions are likely to be poorly aerated. Lobar injury caused by bacterial pneumonia could worsen these features <sup>16</sup>. In addition, although some experimental studies have shown that “protective” MV strategy was likely to improve the outcome of pneumonia, if compared with an “adverse” one (high  $V_T$  plus ZEEP), some issues remain unsolved <sup>17-21</sup>. First, despite being considered “protective” MV is not necessarily safe since it could worsen tissue damage and increase bacterial growth in animals with pneumonia <sup>5,6</sup>. In addition, setting the right level of PEEP remains a great matter of concern. Actually, raising the PEEP could lead to lung overdistension in patients with lobar ARDS <sup>22,23</sup>. Animal models have shown that high PEEP was associated with overdistension around pneumonia foci and within the contralateral lung as well, thereby promoting lung inflammation and pulmonary-to-systemic bacterial translocation <sup>24,25</sup>.

The prone position (PP) has been shown to improve gas exchanges and lung mechanics in the patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) <sup>26</sup>. This seems especially true in patients with lobar ARDS <sup>27</sup>. However, available animal models of diffuse lung injury showed

1 that the PP could safely improve alveolar recruitment through a better tidal ventilation  
2 distribution within the lung, thereby delaying if not attenuating VILI features<sup>28-31</sup>. However,  
3 it has not been tested in models of lung injury with lobar involvement so far.  
4  
5

6  
7 We hypothesized therefore that the PP could reduce the severity of unilateral bacterial  
8 pneumonia in rabbits subjected to either “adverse” or “protective” MV.  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Materials and methods

### Objectives

An experimental study was carried out in order to assess the impact of the prone position on bacterial pneumonia with 2 main endpoints:

- the severity of the unilateral pneumonia;
- the VILI features within the non-infected contralateral lung.

### Animals

Male New Zealand White rabbits (body weight, 2.7–3.0 kg) were obtained from Elevage scientifique des Dombes (Romans, France). These animals were not immunosuppressed and were free of both virus antibodies and specific pathogens. They were placed in individual cages and had free access to water and fed in accordance with current recommendations mentioned in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Institutes of Health No. 92–23, revised 1985. The Dijon Faculty of Medicine Ethical Committee approved the experimental protocol.

A central venous catheter was surgically inserted into every rabbit the day before MV.

### Experimental protocol

The animals were intubated as previously described<sup>5</sup>. Briefly, under general anaesthesia provided by iterative intravenous injections of propofol, a cuff tube of 3.0 mm was orally inserted into the trachea under view control. The animal was put in the supine position and connected to a pressure-controlled respirator. During the first 30 minutes, the  $V_T$  was set at 8 mL/kg with zero end-expiratory pressure (ZEEP), a respiratory rate of 30 bpm and an inspired fraction of  $O_2$  ( $FIO_2$ ) of 0.5 (Figure 1). Throughout the experiment, a continuous infusion of ketamine (1 mg·kg<sup>-1</sup>·hr<sup>-1</sup>) and pancuronium bromide (0.3 mg·kg<sup>-1</sup>·hr<sup>-1</sup>), was given. Hydration with isotonic serum was provided intravenously so that the rabbits remained at a constant weight.

*Enterobacter aerogenes* pneumonia was induced as previously described<sup>5,24</sup>. Briefly, one 10 log<sub>10</sub> cfu inoculum of a clinical strain of *E. aerogenes* was instilled through the left stem bronchus. According to previous data, it takes 3 hours for histologically proven lobar pneumonia to develop.



1  
2 Then, in the first set of experiments, the impact of the PP was tested in animals subjected to  
3 “adverse” MV strategy. Thus, 1 hour after bacterial challenge, the PIP was set at 30 cm H<sub>2</sub>O  
4 and the animals were randomly kept in the supine position (SP)(*n* = 4) or turned to the PP (*n* =  
5 5). The animals were subjected to MV for 8 hours before being killed by an overdose of  
6 thiopental.  
7  
8  
9

10  
11  
12 In the second set of experiments, **in order to match with the clinical practice**, the animals were  
13 subjected to “protective” MV (*V<sub>T</sub>* = 8 mL/kg; PEEP = 5 cm H<sub>2</sub>O), once inoculated and kept in  
14 either the SP (*n* = 5) or turned to the PP (*n* = 5), **similarly to the first set of experiments**.  
15  
16  
17  
18  
19

### 20 **Assessment of respiratory system compliance and other physiological measurements**

21 Inspiratory pressure-volume (PV) curves were constructed *post mortem* according to the  
22 supersyringe method. Respiratory system compliance (*C<sub>RS</sub>*) was deduced from the slope of the  
23 linear portion of the PV curve.  
24  
25

26  
27 An arterial catheter was inserted in most of the animals subjected to “adverse” MV for blood  
28 sampling and blood pressure monitoring in order to ascertain the safety of our protocol (***n* =**  
29 **7**). Thus, arterial blood gases and lactate levels were measured at randomization and before  
30 sacrifice. Variations in PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub> from H0 (randomization to the SP or the PP group) to  
31 H8 (sacrifice) were thus measured as surrogates for the alveolar recruitment. Arterial blood  
32 lactate was measured to ascertain the safety of our “adverse” MV.  
33  
34  
35  
36  
37

38 It is worth noting that none of the animals subjected to “protective” MV was thus monitored.  
39  
40 Actually, we had previously checked the safety of these settings as well as the lack of  
41 hypoxemia and hyperlactatemia in mechanically ventilated rabbits with this type of  
42 pneumonia<sup>5,24</sup>.  
43  
44  
45  
46

### 47 **Evaluation of unilateral pneumonia**

48  
49 The animals were exsanguinated by venous puncture. Autopsies were carried out and the  
50 lungs and spleen were harvested aseptically.  
51

52 Each lung was isolated and homogenized in sterile water. Ten-fold dilution cultures were then  
53 performed. The mean bacterial concentration of the infected lung was calculated according to  
54 the lung weight. The spleen of each rabbit was also crushed and cultured since a positive *E.*  
55 *aerogenes* spleen culture was considered a marker of bacteremia.  
56  
57  
58  
59

60 The remaining lung and spleen homogenates were then frozen, batched and stored at -80°C  
61  
62  
63  
64  
65

1 until tissue concentrations of cytokines were measured. Accordingly, Interleukin (IL)-8 and  
2 Tumour Necrosis Factor-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were assessed using a rabbit specific enzyme-linked  
3 immunosorbent assay (ELISA) following the manufacturer's instructions (Euromedex®,  
4 Strasbourg, France).  
5

6  
7 Blood samples were obtained before bacterial inoculation (H0), at H1 and H8 only in animals  
8 in the 2<sup>nd</sup> set of experiments (i.e., “protective” MV), in order to assess systemic inflammation  
9 according to the position. Thus, IL-8 and TNF- $\alpha$  blood concentrations were measured using  
10 the above-mentioned ELISA test.  
11  
12  
13  
14  
15

### 16 **Assessment of ventilator-induced lung injury and inflammation within the non-infected** 17 **lung**

18 For microscopic examination, approximately 1 cm<sup>3</sup> of tissue was fixed in formalin and  
19 embedded in paraffin. Four- $\mu$ m sections were obtained and stained with hematoxylin-eosin. A  
20 pulmonary pathologist blinded to the treatment group examined ten fields of each section and  
21 an injury score was calculated as previously described<sup>28</sup>. Briefly, lung injury assessment was  
22 based on the degree of neutrophilic infiltration, haemorrhage and oedema. Lung injury was  
23 considered absent (0), mild (1), moderate (2) or severe (3). In addition, the presence or the  
24 absence of hyaline membranes as well as emphysema-like lesions was systematically sought.  
25

26 Another lung sample was harvested for RNA extraction using the GenElute kit (Sigma®,  
27 Dorset, UK) according to the manufacturer's instructions. RNA extraction was performed  
28 using the RNA GenElute kit accordingly. Complementary DNA (cDNA) was obtained by  
29 reverse transcription using random primers, RNAsin treatment, and ImProm II reverse  
30 transcriptase (Promega®, Madison, WI). Quantitative PCR was performed using the IQ5  
31 thermocycler (Biorad®, Hercules, CA) and the IQ Sybergreen Supermix (Biorad®) and  
32 rabbit-specific primers, designed using Primer3 (version 0.4.0)<sup>a</sup>, and the rabbit (*Oryctolagus*  
33 *cuniculus*) sequence database<sup>b</sup>. Melting curves were plotted to check the specificity of the  
34 amplifications. The following primers were used: *rGapdh* forward: 5'-ATG TTT GTG ATG  
35 GGC GTG AAC C-3', reverse: 5'-CCC AGC ATC GAA GGT AGA GGA-3'; *rIl-8* forward:  
36 5'-AAC CTT CCT GCT GCT TCT GA-3', reverse: 5'-TCT GCA CCC ACT TTT TCC TTG-  
37 3'. The results were expressed as expression levels normalized to a reference gene (*rGapdh*).  
38 The corresponding protein assessment could not however be achieved since the all of the  
39 remaining tissue had to be used for gravimetric evaluation of the lung as described below.  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57

58  
59 <sup>a</sup> [www.primer3plus.com](http://www.primer3plus.com)

60 <sup>b</sup> [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)  
61  
62  
63  
64  
65

1 The remaining fresh tissue was weighed in order to measure the lung wet weight (WW) and  
2 warmed to 37°C until desiccation before recording the dry weight (DW). The wet weight to  
3 dry weight ratio (WW/DW) was then calculated as a surrogate for lung permeability oedema.  
4  
5 Previously healthy rabbits with normal lung tissue ( $n = 4$ ) were killed and used as controls.  
6  
7

## 8 **Statistical analysis**

9

10  
11  
12 Data are presented as median [Inter-Quartile Range (IQR)] except otherwise stated. The **Mann**  
13 **Whitney U** test was used to compare continuous variables between groups. **All tests were two-**  
14 **tailed.** A  $p \leq 0.05$  was considered significant. **The Statview software was used (SAS Institute,**  
15 **Cary, N.C., USA) for all analysis.**  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Results

### Respiratory system compliance, gas exchanges and hemodynamics

Respiratory system compliance ( $C_{RS}$ ) was measured *post mortem* in all rabbits with pneumonia (Table 1).  $C_{RS}$  was greater in the animals that had undergone “protective” MV than in the others but remained unchanged by the body position. In addition,  $C_{RS}$  was improved by PP if “adverse” MV strategy was applied (2.8 [1.4] vs. 5.2 [1.1] mL/cm H<sub>2</sub>O;  $p = 0.001$ ).

**Differences** were also observed regarding gas exchanges in the animals subjected to “adverse” MV **in which blood gases could be obtained**. An increase of 235 [244] mmHg in the PaO<sub>2</sub>/FIO<sub>2</sub> ratio was recorded in the PP group whereas a decrease of 69 [77] mmHg was measured in the supine animals ( $p = 0.04$ ). No difference was seen regarding blood arterial pressure and heart rate measured just before sacrifice. However, the blood lactate level in the SP increased throughout the experiment while it remained within the normal range in the PP ( $\Delta$ [lactate]= 2.1 [3.1] vs. -0.4 [0.7] mmol/L, respectively;  $p = 0.034$ ) (Table 1).

### Assessment of unilateral pneumonia

All of the animals but one (SP) survived until they were killed 8 hours after having being turned prone or kept supine.

The size of the *E. aerogenes* inoculum in the SP and PP groups was found to be comparable, regardless of the MV strategy (data not shown).

Quantitative lung culture results showed high mean concentrations of *E. aerogenes* 8 hrs after inoculation (figure 2). **Lower** concentrations were found in the PP group than in the SP group (8.38 [0.91] vs. 9.81 [0.52] log<sub>10</sub> cfu/g of tissue, respectively;  $p = 0.002$ ) when an “adverse” MV strategy was used. Although “protective” MV decreased the bacterial pulmonary burden regardless of the position, the lowest bacterial concentrations within this group were found in animals in the PP (5.93 [0.34] vs. 6.66 [0.86] log<sub>10</sub> cfu/g, respectively;  $p = 0.008$ ). When the lung inflammatory response was considered, the PP was associated with the release of smaller

1 amounts of IL-8, regardless of the MV strategy (Figure 3). In contrast, although a “protective”  
2 MV significantly decreased pulmonary concentrations of TNF- $\alpha$  regardless of the position  
3 (2155 [830] vs. 3955 [1412] pg/g of tissue, respectively;  $p = 0.014$ ), the PP did not decrease  
4 cytokine release further.  
5

6  
7 The extra-pulmonary impact of the pneumonia was also assessed. Like the lung, spleen  
8 culture results showed lower bacterial concentrations in the animals turned to the PP than in  
9 those kept supine within the “adverse” MV group (3.62 [1.74] vs. 6.55 [3.67] log<sub>10</sub> cfu/g,  
10 respectively;  $p = 0.038$ ). However, pulmonary-to-systemic translocation of *E. aerogenes* was  
11 not lower in prone than in supine animals subjected to “protective” MV (2.93 [1.59] vs. 3.24  
12 [1.51] log<sub>10</sub> cfu/g, respectively;  $p = 0.684$ ). The systemic inflammatory response was  
13 evaluated by the measurement of two of its key mediators within the blood compartment  
14 (Figure 3). Although concentrations of TNF- $\alpha$  in the spleen were similar in both groups  
15 regardless of the MV strategy, lower amounts of IL-8 were found in the PP than in the SP  
16 group when the rabbits underwent “adverse” MV (1910 [784] vs. 3005 [1290] pg/g of tissue,  
17 respectively;  $p = 0.038$ ). In the animals subjected to “protective” MV, only a trend towards  
18 lower IL-8 release was found in the PP group (1561 [274] vs. 1930 [1022] pg/g of tissue,  
19 respectively;  $p = 0.124$ ). Similarly, blood concentrations of IL-8 rose more slowly with time  
20 when the rabbits were turned to the PP than when they were kept supine (Figure 4).  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

### 33 34 **Assessment of lung injury and inflammation in the non-infected lung**

35  
36  
37  
38 The microscopic examination revealed that lung injury within the non-infected lung depended  
39 on both the MV strategy and the body position (Figure 5). As expected, “protective” MV was  
40 associated with less tissue damage. The histologic scores tended to be greater in the animals  
41 from the SP group than in those from the PP group, regardless of the MV strategy (Table 2).  
42 Thus, there was an obvious loss of aeration within the lower lobe in the animals kept supine  
43 while the airspaces within the upper lobe appeared enlarged, especially if the MV was  
44 “adverse”. In contrast, lung aeration in the upper and lower lobes of the animals ventilated in  
45 the PP was quite similar. In addition, features like hyaline membranes and emphysema-like  
46 lesions were mainly seen in the animals kept supine.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

54 However, no difference was found according to the body position regarding the WW/DW  
55 ratio when the animals were ventilated adversely. This suggests the formation of comparable  
56 amounts of permeability oedema in the two groups since far lower values were measured in  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 the healthy rabbits (Table 2). In contrast, the WW/DW ratio was significantly lower in the PP  
2 than in the SP when “protective” MV was applied.

3 The evaluation of pulmonary inflammation within the non-infected lung was based on IL-8  
4 gene expression. We observed that there was a stronger induction of IL-8 gene expression in  
5 the non-infected lung from SP animals than in those from PP animals regardless of the MV  
6 strategy (Figure 6).  
7  
8  
9

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Discussion

1  
2 In the present study, we showed that turning animals from the supine to the prone position  
3 was likely to improve the features of *E. aerogenes* unilateral pneumonia regardless of the MV  
4 strategy (i.e., “adverse” or “protective”). Most of all, bacterial concentrations within both the  
5 instilled lung and the spleen were found to be lower in rabbits from the PP group than in those  
6 kept supine. In addition, IL-8 concentrations, a powerful chemoattractant for PMNs, were  
7 greater in the infected lung of the supine animals, as well as in an extra-pulmonary organ, the  
8 spleen, suggesting that both lung and systemic inflammation were blunted by the PP. Taken  
9 together, these findings suggest that in our model, the PP improved lung bacterial clearance,  
10 reduced pulmonary-to-systemic translocation of bacteria and mitigated the host inflammatory  
11 response. In addition, we showed that in this model of lobar lung injury, the PP was likely to  
12 diminish the damage inflicted by MV to the non-infected lung and to modulate inflammation  
13 as well. Moreover, our findings illustrate the hypothesis that although pneumonia is less  
14 severe when using clinically relevant ventilator settings, further improvements could be  
15 obtained by turning the animals to the PP.  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

29 The best way to ventilate patients with lung injury remains a matter of concern. Improving  
30 gas exchanges and optimizing alveolar recruitment are key issues in this setting. However,  
31 animal models of VAP similar to ours have shown that pneumonia could induce airway  
32 overdistension within the infected as well as the “healthy” lung in animals subjected to MV  
33 <sup>16,32</sup>. This deleterious effect of MV has been attributed to the loss of aeration within the  
34 infected pulmonary area, which could not be easily recruited by positive pressure. The  
35 magnitude of the local inflammatory response could account for this decrease in lung  
36 compliance <sup>33</sup>. As a result, although protective if set at a moderate level, PEEP may become  
37 harmful if higher levels are reached since it could create lung overdistension <sup>25,34</sup>.

38 Prone positioning has been proposed primarily as an efficient way to improve gas exchanges  
39 in patients with the most severe forms of acute lung injury <sup>35</sup>. More recently, it has been  
40 shown that the PP allows better distribution of lung inflation along the cranio-caudal axis  
41 through improvement in respiratory system compliance, together with lung recruitment <sup>27,36</sup>.  
42 Interestingly, some authors have shown that the patients in whom compliance of the  
43 respiratory system improved once turned to the PP were more likely to present with lobar lung  
44 injury including pneumonia <sup>27</sup>. In addition, some recently published clinical studies showed  
45 that PP could either prevent VAP or improve the outcome of existing VAP, whenever patients  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 had lung injury prior to pneumonia<sup>37-39</sup>. Altogether, these findings suggest that PP could be of  
2 particular interest in the setting of lobar lung injury including bacterial pneumonia. Our  
3 results provide additional insights likely to improve our understanding of such data since they  
4 draw a link between the well-known beneficial effects of the PP on lung mechanics, and a  
5 possible improvement in the host response against bacterial infection. We were however  
6 unable to determine the underlying mechanisms as far as the host innate immunity is  
7 concerned. Further studies are necessary since as shown by our group and others the toll-like  
8 receptors pathway could be altered by the unusual mechanical stretch applied to the lung  
9 subjected to MV<sup>4,40,41</sup>. One could only speculate that the PP attenuates lung distension  
10 leading in turn to the release of smaller amount of IL-8, thereby protecting the host from the  
11 detrimental effects of an overwhelming inflammatory response.  
12

13 In addition to such beneficial effects of the PP on the infected lung regarding bacterial  
14 clearance and the inflammatory response, we showed that the PP was likely to reduce lung  
15 injury within the non-infected lung. The decrease in PCO<sub>2</sub> subsequent to the increase in tidal  
16 ventilation (i.e., when PIP was set from 12 to 30 cm H<sub>2</sub>O) was the same regardless of the  
17 body position, indicates that the PP did not necessarily increase the end expiratory volume, as  
18 reported previously in ARDS patients<sup>35,42</sup>. However, strikingly, the distribution of lung  
19 aeration appeared to be different in the SP and the PP groups. In the SP group, there was a  
20 marked loss of aeration within the lower lobe whereas the airspaces of the upper lobe were  
21 enlarged. This resulted in the presence of emphysema-like lesions. In addition, the presence of  
22 hyaline membranes, one of the hallmarks of VILI was encountered exclusively in the animals  
23 that were ventilated supine. Similar findings were obtained when the “protective” ventilator  
24 settings were applied, though tissue injury was less severe. Interestingly, IL-8 gene expression  
25 was markedly higher in the non-infected lung of the supine animals than in those turned to the  
26 PP, and this was independent of the MV strategy. This could be considered a surrogate for  
27 bio-trauma induced by MV, thereby indicating a greater level of lung distension in the SP  
28 group<sup>43</sup>. Surprisingly, there was no difference between SP and PP animals subjected to the  
29 “adverse” MV regarding the formation of lung permeability oedema within the non-infected  
30 lung as assessed by gravimetric measurements. We can only hypothesize that its distribution  
31 within the lung was different between groups since our approach (i.e., WW/DW  
32 measurement) provided only an overall assessment. However, as expected, V<sub>T</sub> reduction  
33 together with PEEP probably decreased the WW/DW ratio. In addition, we showed that  
34 further improvement was achieved by turning the animals in the PP. Altogether, these  
35 findings suggest that the PP improves V<sub>T</sub> distribution within the lung and in turn reduces  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

airspace overdistension thus preventing VILI, as already demonstrated in animal models of diffuse lung injury<sup>28,30,44</sup>.

Our study has several limitations. First, any extrapolation of our findings should be done very cautiously since small animals are known to be more prone to VILI than larger ones. **Moreover the MV settings used in the “adverse MV “ group is far from the clinical practice.** The way the pneumonia was induced as well as the short duration of MV were also specific to our model and further experimental studies are necessary before our findings can be generalized. Second, one could argue that bacterial growth was better controlled in the PP because of improved drainage of bronchial secretions regardless of any alteration of lung strain<sup>45</sup>. However, this could hardly account for the worsening of the lung injury within the contralateral lung. Third, the hemodynamic assessment was not performed extensively. As a result, we cannot exclude the possibility that the lower pulmonary-to-systemic translocation of both bacteria and mediators was subsequent to a drop in cardiac output in the PP group. However, previous clinical and experimental studies failed to show any difference regarding this point<sup>26,30,36,46</sup>. Finally, we should acknowledge the small size of our experimental groups and the lack of any *a priori* calculation. **Our study is therefore underpowered, making therefore statistics difficult to interpret.**

## Conclusion

In a model of lobar lung injury, the prone position may not only improve lung mechanics and blood oxygenation, but also enhance antibacterial defences and mitigate inflammation while protecting the contralateral lung.

## Competing interests

None to declare.

## Authors' contributions

PEC, SL and ALP carried out the study with equal contribution. PEC and ALP drafted the manuscript. PT, SDB and DCB participated in the study. All the authors read and approved the final version of the manuscript.

1  
2 **References**  
3  
4  
5  
6  
7

- 8  
9 1. Dreyfuss D, Saumon G: Ventilator-induced lung injury: Lessons from  
10 experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:294-323  
11  
12  
13 2. Kawano T, Mori S, Cybulsky M, Burger R, Ballin A, Cutz E, Bryan AC: Effect of  
14 granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *J Appl Physiol* 1987;  
15 62:27-33  
16  
17  
18 3. Pugin J, Dunn I, Jolliet P, Tassaux D, Magnenat JL, Nicod LP, Chevrolet JC:  
19 Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *Am J Physiol* 1998;  
20 275:L1040-50  
21  
22  
23 4. Charles PE, Tissieres P, Barbar SD, Croisier D, Dufour J, Dunn-Siegrist I, Chavanet  
24 P, Pugin J: Mild-stretch mechanical ventilation up-regulates toll-like receptor 2 and  
25 sensitizes the lung to bacterial lipopeptide. *Crit Care* 2011; 15:R181  
26  
27  
28 5. Charles PE, Piroth L, Desbiolles N, Lequeu C, Martin L, Portier H, Chavanet P: New  
29 model of ventilator-associated pneumonia in immunocompetent rabbits. *Crit Care Med*  
30 2002; 30:2278-83  
31  
32  
33 6. Marquette CH, Wermert D, Wallet F, Copin MC, Tonnel AB: Characterization of an  
34 animal model of ventilator-acquired pneumonia. *Chest* 1999; 115:200-9  
35  
36  
37 7. Charles PE, Etienne M, Croisier D, Piroth L, Lequeu C, Pugin J, Portier H, Chavanet  
38 P: The impact of mechanical ventilation on the moxifloxacin treatment of experimental  
39 pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Crit Care Med* 2005; 33:1029-35  
40  
41  
42 8. Whitehead TC, Zhang H, Mullen B, Slutsky AS: Effect of mechanical ventilation on  
43 cytokine response to intratracheal lipopolysaccharide. *Anesthesiology* 2004; 101:52-8  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
9. Pugin J, Dunn-Siegrist I, Dufour J, Tissieres P, Charles PE, Comte R: Cyclic stretch of human lung cells induces an acidification and promotes bacterial growth. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38:362-70
10. Bregeon F, Roch A, Delpierre S, Ghigo E, Autillo-Touati A, Kajikawa O, Martin TR, Pugin J, Portugal H, Auffray JP, Jammes Y: Conventional mechanical ventilation of healthy lungs induced pro-inflammatory cytokine gene transcription. *Respir Physiol Neurobiol* 2002; 132:191-203
11. Wolthuis E, Vlaar A, Choi G, Roelofs J, Juffermans N, Schultz M: Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care* 2009; 13:R1
12. 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; 342:1301-8
13. Villar J: Low vs high positive end-expiratory pressure in the ventilatory management of acute lung injury. *Minerva Anesthesiol* 2006; 72:357-62
14. Otto CM, Markstaller K, Kajikawa O, Karmrodt J, Syring RS, Pfeiffer B, Good VP, Frevert CW, Baumgardner JE: Spatial and temporal heterogeneity of ventilator-associated lung injury after surfactant depletion. *J App Physiol* 2008; 104:1485-94
15. Pavone L, Albert S, DiRocco J, Gatto L, Nieman G: Alveolar instability caused by mechanical ventilation initially damages the nondependent normal lung. *Crit Care* 2007; 11:R104
16. Sartorius A, Lu Q, Vieira S, Tonnellier M, Lenaour G, Goldstein I, Rouby JJ: Mechanical ventilation and lung infection in the genesis of air-space enlargement. *Crit Care* 2007; 11:R14

17. Nahum A, Hoyt J, Schmitz L, Moody J, Shapiro R, Marini JJ: Effect of mechanical ventilation strategy on dissemination of intratracheally instilled *Escherichia coli* in dogs. *Crit Care Med* 1997; 25:1733-43
18. Cakar N, Akinçi O, Tugrul S, Ozcan PE, Esen F, Eraksoy H, Cagatay A, Telci L, Nahum A: Recruitment maneuver: Does it promote bacterial translocation? *Crit Care Med* 2002; 30:2103-6
19. Bouadma L, Schortgen F, Ricard JD, Martet G, Dreyfuss D, Saumon G: Ventilation strategy affects cytokine release after mesenteric ischemia-reperfusion in rats. *Crit Care Med* 2004; 32:1563-9
20. Schortgen F, Bouadma L, Joly-Guillou ML, Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G: Infectious and inflammatory dissemination are affected by ventilation strategy in rats with unilateral pneumonia. *Intensive Care Med* 2004; 30:693-701
21. Savel RH, Yao EC, Gropper MA: Protective effects of low tidal volume ventilation in a rabbit model of *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 2001; 29:392-8
22. Terragni PP, Rosboch G, Tealdi A, Corno E, Menaldo E, Davini O, Gandini G, Herrmann P, Mascia L, Quintel M, Slutsky AS, Gattinoni L, Ranieri VM: Tidal hyperinflation during low tidal volume ventilation in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:160-6
23. Constantin JM, Grasso S, Chanques G, Afort S, Futier E, Sebbane M, Jung B, Gallix B, Bazin JE, Rouby JJ, Jaber S: Lung morphology predicts response to recruitment maneuver in patients with acute respiratory distress syndrome. *Critical Care Med* 2010; 38:1108-17
24. Charles PE, Martin L, Etienne M, Croisier D, Piroth L, Lequeu C, Pugin J, Portier H, Chavanet P: Influence of positive end-expiratory pressure (PEEP) on histopathological

1 and bacteriological aspects of pneumonia during low tidal volume mechanical  
2 ventilation. Intensive Care Med 2004; 30:2263-70  
3

4 25. Kurahashi K, Ota S, Nakamura K, Nagashima Y, Yazawa T, Satoh M, Fujita A,  
5 Kamiya R, Fujita E, Baba Y, Uchida K, Morimura N, Andoh T, Yamada Y: Effect of lung-  
6 protective ventilation on severe Pseudomonas aeruginosa pneumonia and sepsis in rats.  
7 Am J Physiol. Lung cellular and molecular physiology 2004; 287: L402-10  
8  
9

10 26. Blanch L, Mancebo J, Perez M, Martinez M, Mas A, Betbese AJ, Joseph D, Ballus J,  
11 Lucangelo U, Bak E: Short-term effects of prone position in critically ill patients with  
12 acute respiratory distress syndrome. Intensive Care Med 1997; 23:1033-9  
13  
14

15 27. Galiatsou E, Kostanti E, Svarna E, Kitsakos A, Koulouras V, Efremidis SC, Nakos G:  
16 Prone position augments recruitment and prevents alveolar overinflation in acute lung  
17 injury. Am J Respir Crit Care Med 2006; 174:187-97  
18  
19

20 28. Broccard A, Shapiro RS, Schmitz LL, Adams AB, Nahum A, Marini JJ: Prone  
21 positioning attenuates and redistributes ventilator-induced lung injury in dogs. Crit Care  
22 Med 2000; 28:295-303  
23  
24

25 29. Valenza F, Guglielmi M, Maffioletti M, Tedesco C, Maccagni P, Fossali T, Aletti G,  
26 Porro GA, Irace M, Carlesso E, Carboni N, Lazzerini M, Gattinoni L: Prone position delays  
27 the progression of ventilator-induced lung injury in rats: Does lung strain distribution  
28 play a role? Crit Care Med 2005; 33:361-367  
29  
30

31 30. Nakos G, Batistatou A, Galiatsou E, Konstanti E, Koulouras V, Kanavaros P, Doulis  
32 A, Kitsakos A, Karachaliou A, Lekka ME, Bai M: Lung and 'end organ' injury due to  
33 mechanical ventilation in animals: comparison between the prone and supine positions.  
34 Criti Care 2006; 10:R38  
35  
36

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
31. Richard JC, Bregeon F, Costes N, Bars DL, Tourvieille C, Lavenne F, Janier M, Bourdin G, Gimenez G, Guerin C: Effects of prone position and positive end-expiratory pressure on lung perfusion and ventilation. *Crit Care Med* 2008; 36:2373-80
  32. Goldstein I, Bughalo MT, Marquette CH, Lenaour G, Lu Q, Rouby JJ: Mechanical ventilation-induced air-space enlargement during experimental pneumonia in piglets. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:958-64
  33. Brackenbury AM, McCaig LA, Yao LJ, Veldhuizen RA, Lewis JF: Host response to intratracheally instilled bacteria in ventilated and nonventilated rats. *Crit Care Med* 2004; 32:2502-7
  34. Croisier D, Etienne M, Bergoin E, Charles PE, Lequeu C, Piroth L, Portier H, Chavanet P: Mutant selection window in levofloxacin and moxifloxacin treatments of experimental pneumococcal pneumonia in a rabbit model of human therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1699-707
  35. Gattinoni L, Pelosi P, Vitale G, Pesenti A, D'Andrea L, Mascheroni D: Body position changes redistribute lung computed-tomographic density in patients with acute respiratory failure. *Anesthesiology* 1991; 74:15-23
  36. Pelosi P, Bottino N, Chiumello D, Caironi P, Panigada M, Gamberoni C, Colombo G, Bigatello LM, Gattinoni L: Sigh in supine and prone position during acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167:521-7
  37. Guerin C, Gaillard S, Lemasson S, Ayzac L, Girard R, Beuret P, Palmier B, Le QV, Sirodot M, Rosselli S, Cadiergue V, Sainty JM, Barbe P, Combourieu E, Debatty D, Rouffineau J, Ezingard E, Millet O, Guelon D, Rodriguez L, Martin O, Renault A, Sibille JP, Kaidomar M: Effects of systematic prone positioning in hypoxemic acute respiratory failure: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 292:2379-87

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
38. Beuret P, Carton MJ, Nourdine K, Kaaki M, Tramoni G, Ducreux JC: Prone position as prevention of lung injury in comatose patients: a prospective, randomized, controlled study. *Intensive Care Med* 2002; 28:564-9
  39. Sud S, Friedrich JO, Taccone P, Polli F, Adhikari NK, Latini R, Pesenti A, Guerin C, Mancebo J, Curley MA, Fernandez R, Chan MC, Beuret P, Voggenreiter G, Sud M, Tognoni G, Gattinoni L: Prone ventilation reduces mortality in patients with acute respiratory failure and severe hypoxemia: systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* 2010; 36:585-99
  40. Villar J, Cabrera N, Casula M, Flores C, Valladares F, Muros M, Blanch L, Slutsky AS, Kacmarek R: Mechanical ventilation modulates Toll-like receptor signaling pathway in a sepsis-induced lung injury model. *Intensive Care Med* 2010; [36:1049-57](#)
  41. Charles PE, Barbar SD: Toll-like receptors: a link between mechanical ventilation, innate immunity and lung injury? *Intensive Care Med* 2010; 36:909-11
  42. Pelosi P, Tubiolo D, Mascheroni D, Vicardi P, Crotti S, Valenza F, Gattinoni L: Effects of the prone position on respiratory mechanics and gas exchange during acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:387-93
  43. Oudin S, Pugin J: Role of MAP kinase activation in interleukin-8 production by human BEAS-2B bronchial epithelial cells submitted to cyclic stretch. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27:107-14
  44. Valenza F, Guglielmi M, Maffioletti M, Tedesco C, Maccagni P, Fossali T, Aletti G, Porro GA, Irace M, Carlesso E, Carboni N, Lazzerini M, Gattinoni L: Prone position delays the progression of ventilator-induced lung injury in rats: Does lung strain distribution play a role? *Crit Care Med* 2005; 33:361-7

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

45. Panigada M, Berra L, Greco G, Stylianou M, Kolobow T: Bacterial colonization of the respiratory tract following tracheal intubation-effect of gravity: an experimental study. Crit Care Med 2003; 31:729-37

46. Jolliet P, Bulpa P, Chevrolet JC: Effects of the prone position on gas exchange and hemodynamics in severe acute respiratory distress syndrome. Critical Care Med 1998; 26:1977-85

Abbreviations:

PMN: Polymorphonuclear

ZEEP: Zero End-Expiratory Pressure

ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome

PIP: Peak Inspiratory Pressure

PV: Pressure-Volume

TNF-a: Tumor Necrosis Factor-alpha

cDNA: Complementary Deoxyribo-Nucleic Acid

PCR: Polymerase Chain Reaction

IQR: Inter-Quartile Range

VAP: Ventilator-Associated Pneumonia



## TABLES

**Table 1.** Physiological parameters recorded in rabbits with unilateral *Enterobacter aerogenes* pneumonia submitted to adverse MV in either supine (SP) or prone position (PP).

	C <sub>RS</sub> (mL/cm H <sub>2</sub> O)	ΔPaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> (mmHg)	ΔPaCO <sub>2</sub> (mmHg)	MAP (mmHg)	Heart rate (bpm)	Δ[lactate] (mmol/L)
Adverse MV						
Supine position (n = 3)	2.8 [1.4]	-69 [77]	-11 [4]	79.0 [12.7]	276 [30]	2.1 [3.1]
Prone position (n = 4)	5.2 [1.1]*	235 [244]*	-11 [2]	75.3 [4.7]	262 [24]	-0.4 [0.7]*
Protective MV						
Supine position (n = 5)	13.5 [0.9]					
Prone position (n = 5)	11.4 [3.8]					

Results are presented as median ± IQR. The delta values mean variation from H0

(randomization to the SP or the PP group) to H8 (sacrifice).

\* indicate *p* value lower than 0.05 between SP and PP.

IQR: Inter-Quartile Range; MV: mechanical ventilation; PP: prone position; SP: supine position.

**Table 2.** Lung injury assessment within the non-infected lung of rabbits with unilateral *Enterobacter aerogenes* pneumonia submitted to adverse or protective MV in either SP or PP.

	Histologic score	Hyaline membranes	Emphysema-like lesions	WW/DW
Control (n = 4)	-	-	-	1.7 [0.4] *
Adverse MV				
Supine position (n = 4)	4.0 [3.5]	3/4	2/4	5.3 [1.4]
Prone position (n = 5)	1.5 [2.7]	0/5	1/5	5.2 [1.4]
Protective MV				
Supine position (n = 5)	2.2 [1.0]	4/5	3/5	3.8 [1.3]
Prone position (n = 5)	1.1 [0.45]	1/5	0/5	2.7 [0.8]**

Results are presented as median  $\pm$  IQR. Healthy spontaneously breathing animals were used as controls.

\*indicates  $p$  value lower than 0.05 between C and either PP or SP; \*\*indicates  $p$  value lower than 0.05 between SP and PP.

MV: mechanical ventilation; SP: supine position; PP: prone position; WW: wet weight; DW: dry weight.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1.** Timeline representation of the experimental protocol.

MV: mechanical ventilation; PP: prone position; SP: supine position.

**Figure 2.** Bacterial burden (infected lung, *panel A*; spleen, *panel B*) in animals with *Enterobacter aerogenes* pneumonia submitted to an adverse ( $n = 9$ ) or a protective ( $n = 10$ ) MV in SP, or turned from supine to PP. There is a bacterial overgrowth in the lung of the animals from the SP group, whenever the MV is protective or not. The pulmonary-to-systemic translocation is increased by SP in the only animals submitted to an adverse MV strategy, as reflected by the larger amount of bacteria recovered from the spleen culture in this group. Results are expressed as median  $\pm$  IQR. \*indicates a  $p$  value lower than 0.05 between SP and PP groups.

IQR: Inter-Quartile Range; MV: mechanical ventilation; PP: prone position; SP: supine position.

**Figure 3.** Interleukin (IL)-8 (*panel A*) and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (*panel B*) concentrations in the infected lung (*a*), and the spleen (*b*) of rabbits with *Enterobacter aerogenes* unilateral pneumonia according to the MV strategy (i.e., “adverse” or “protective”), and the position (i.e., SP or PP). Results are expressed as median  $\pm$  IQR. It is worth noting that IL-8 release was decreased within the pulmonary and the systemic compartment in the animals turned into PP. In contrast, no significant difference was seen regarding TNF-  $\alpha$ .

\* indicates a  $p$  value lower than 0.05 between SP and PP groups.

IQR: Inter-Quartile Range; MV: mechanical ventilation; PP: prone position; SP: supine position.

**Figure 4.** Interleukin (IL)-8 (*panel A*) and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (*panel B*) serum concentrations in rabbits with *Enterobacter aerogenes* unilateral pneumonia submitted to the “protective” MV according to the position (i.e., SP or PP). Results are presented as median  $\pm$  IQR. There was a trend toward increased IL-8 levels within the blood compartment in the animals in PP compared to those kept supine.

IQR: Inter-Quartile Range; MV: mechanical ventilation; PP: prone position; SP: supine position.

**Figure 5.** Light photomicrographs of the non-infected lungs from animals with *Enterobacter aerogenes* pneumonia submitted to either an adverse (*Panel A*) or a protective (*Panel B*) MV in SP (upper lobe, *a*; lower lobe, *b*), or PP (upper lobe, *c*; lower lobe, *d*). (Original magnification,  $\times 10$ ; hematoxylin-eosin). Neutrophil infiltration was greater in the animals submitted to an adverse MV, especially if kept supine. In addition, SP lead to a significant loss of aeration within the lower lobe while the tidal volume looked evenly distributed in the animals turned into PP, regardless of the MV strategy.

MV: mechanical ventilation; PP: prone position; SP: supine position.

**Figure 6.** Interleukin (IL)-8 mRNA levels in the non-infected lung of rabbits with *Enterobacter aerogenes* unilateral pneumonia according to the MV strategy (i.e., “adverse” or “protective”), and the position (i.e., SP or PP). All values are reported as fold increase compared with control spontaneously breathing healthy animals normalized to 1. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. There was an obvious decrease of the IL-8 gene expression within the non-infected lung of the animals turned into PP, regardless of the MV settings.

\* indicates a *p* value lower than 0.05 between SP and PP groups.

MV: mechanical ventilation; mRNA: messenger Riboxynucleic Acid; PP: prone position; SP: supine position.

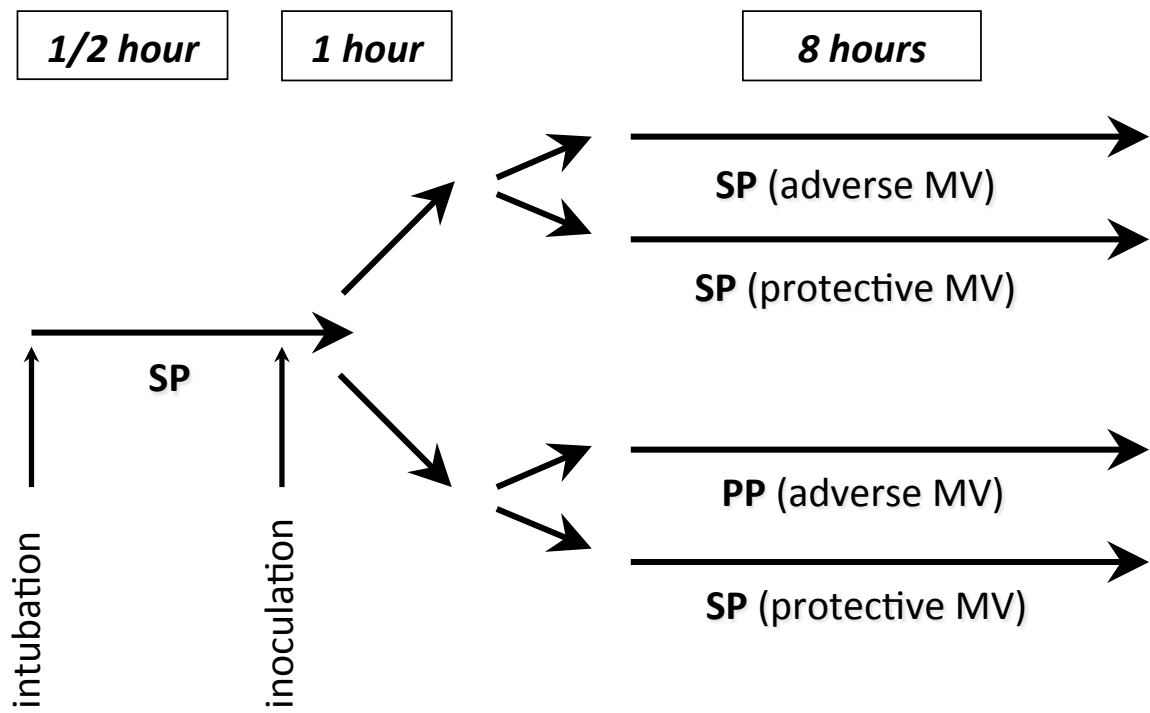
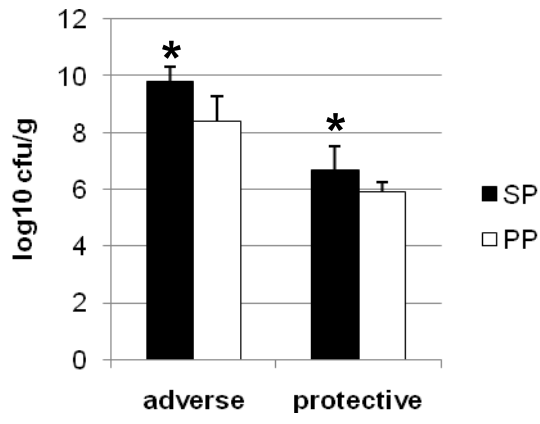
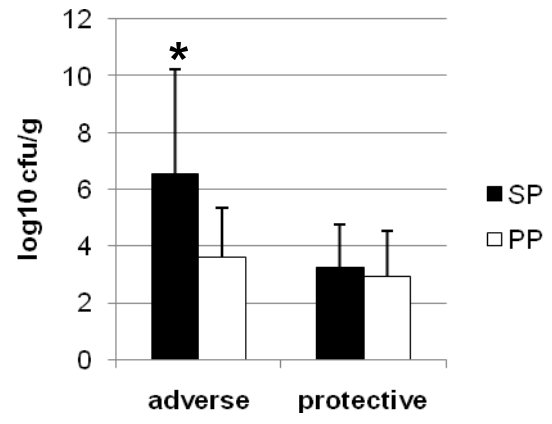


Figure 1.

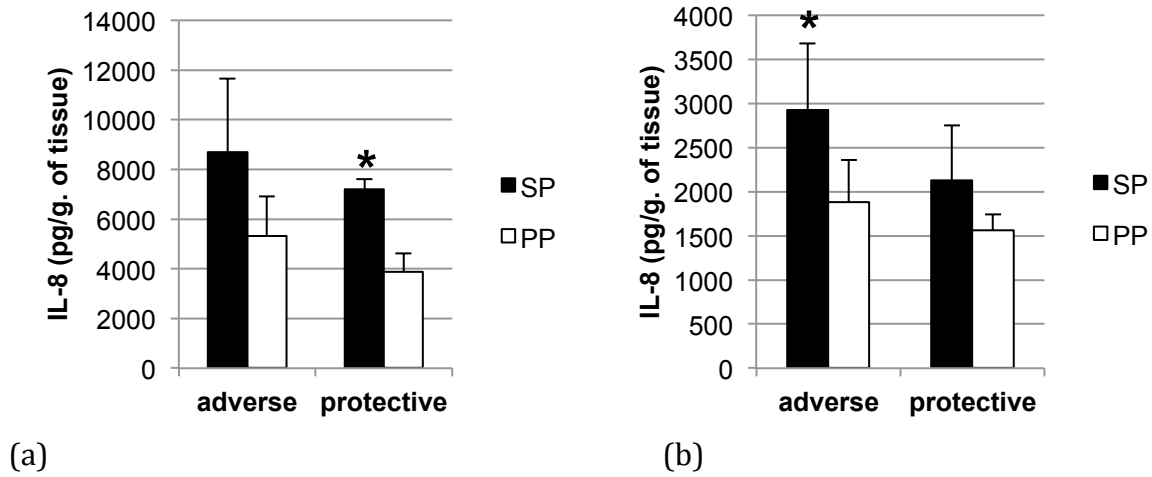


(A)



(B)

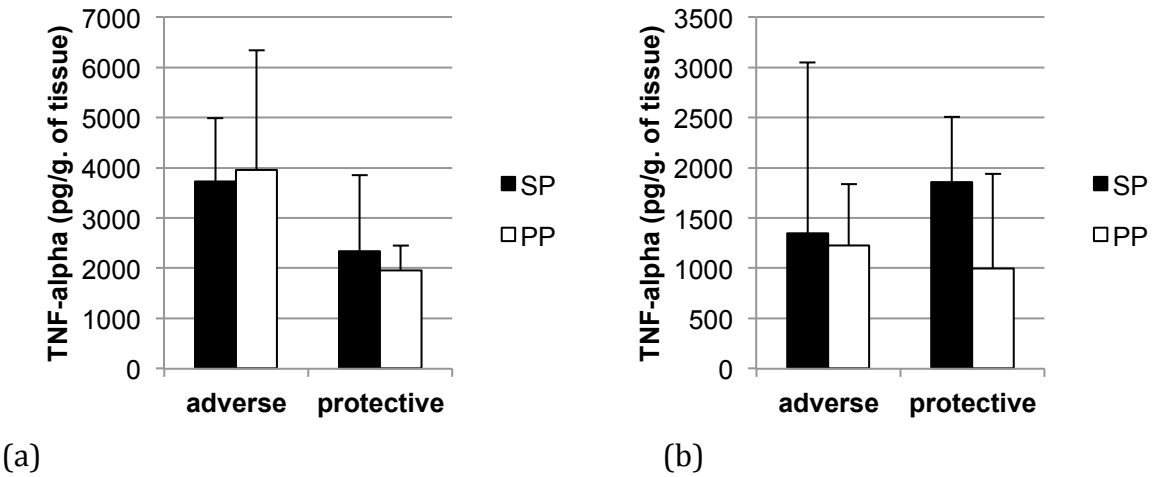
**Figure 2.**



(a)

(b)

(A)



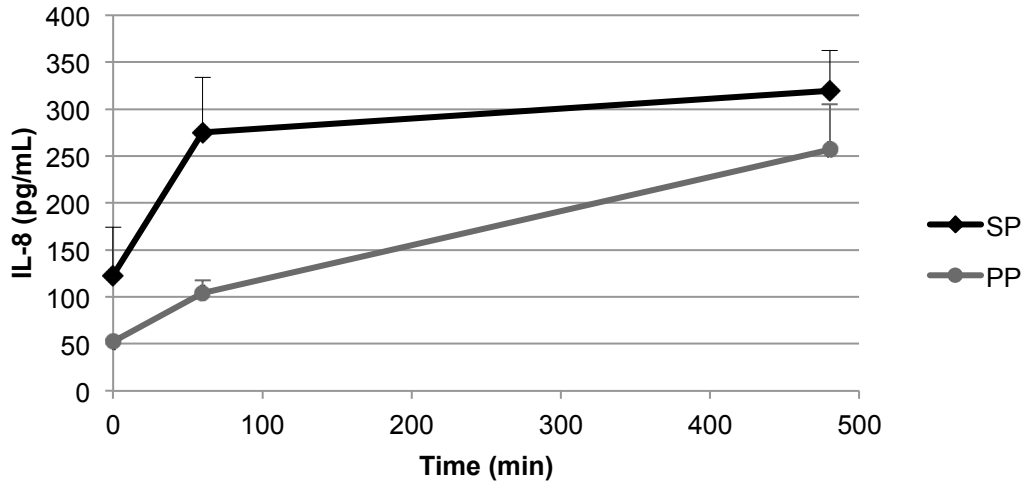
(a)

(b)

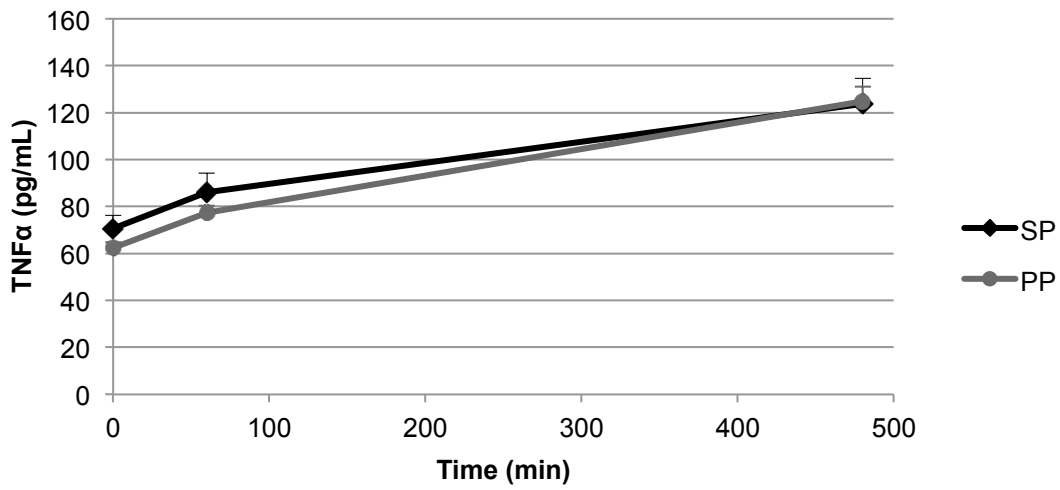
(B)

Figure 3.





(A)

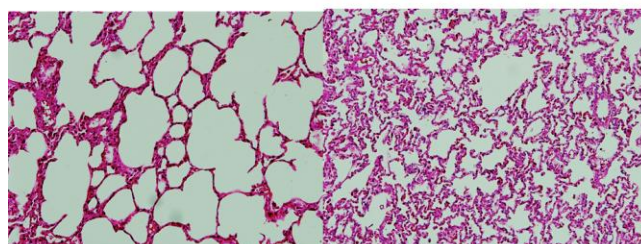


(B)

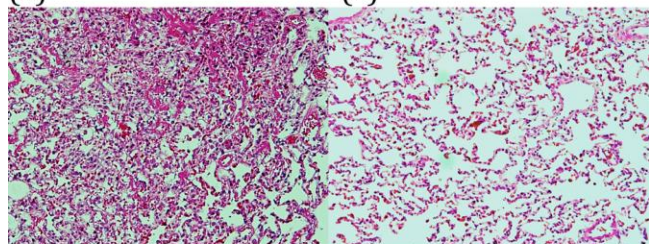
Figure 4.

Figure(s)

[Click here to download Figure\(s\): Figure5-DV-R2.ppt](#)

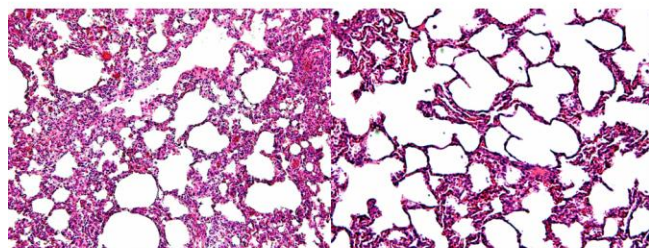


(c)

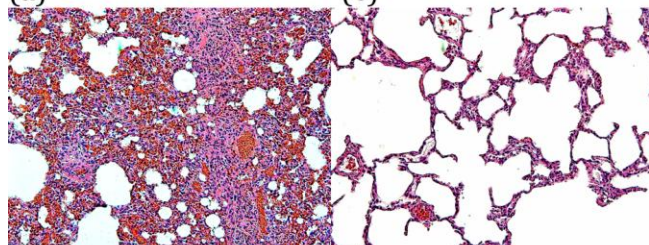


(d)

(A)



(c)



(d)

(B)

**Figure 5.**

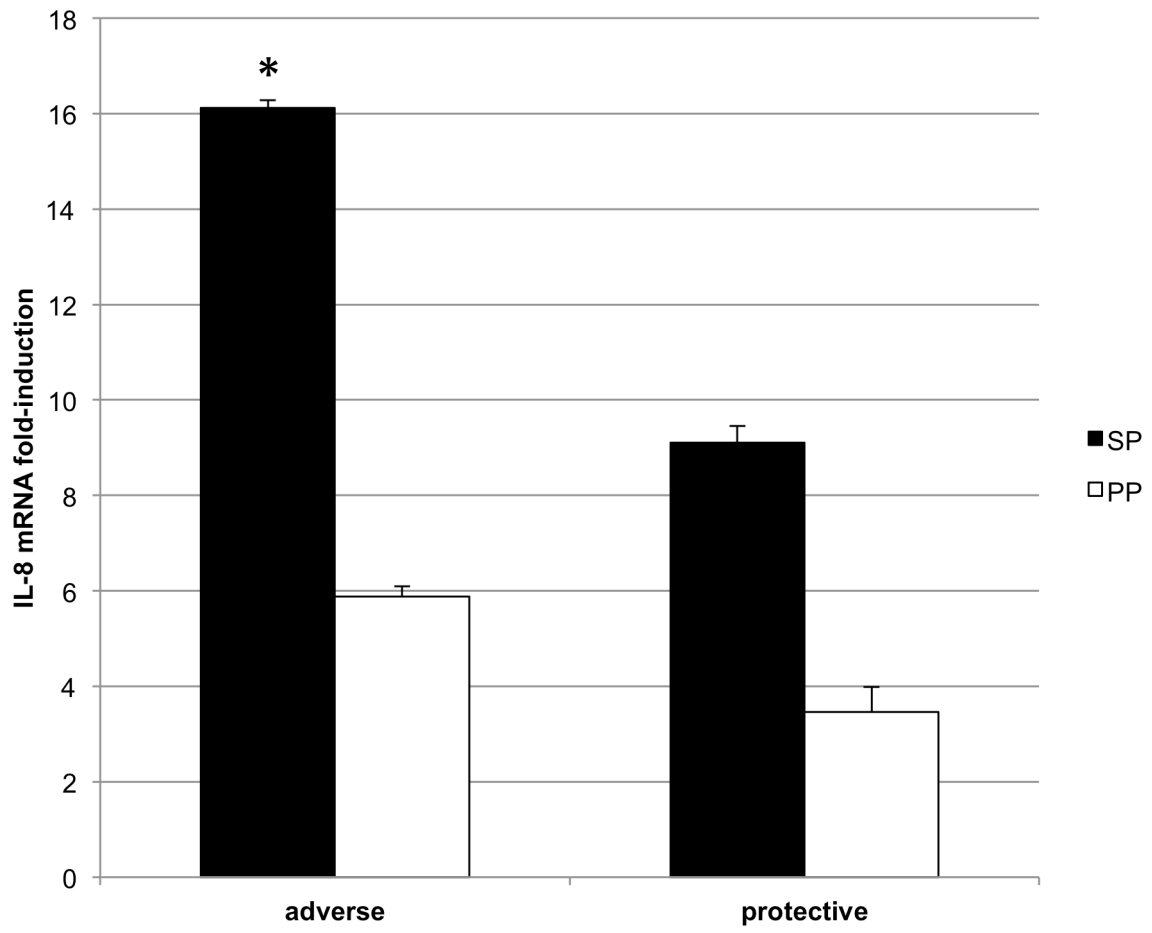
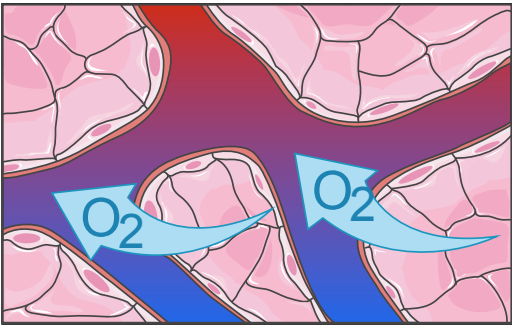
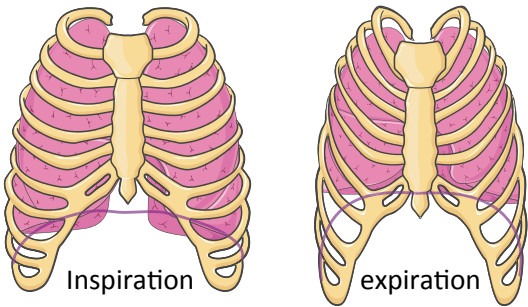


Figure 6.

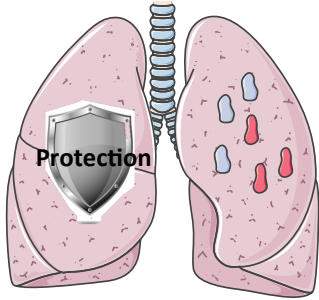
**Apport de la ventilation en décubitus ventral versus  
décubitus dorsal**



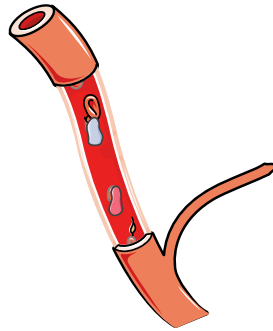
**Meilleure oxygénation  
du sang**



**Amélioration mécanique  
pulmonaire**

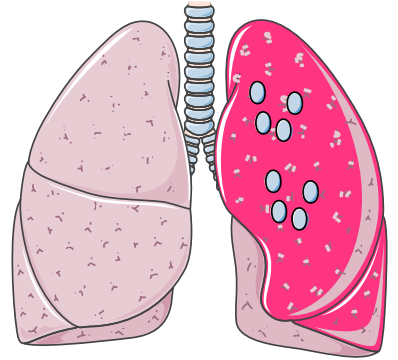


**Poumon  
controlatéral      Poumon  
infecté**

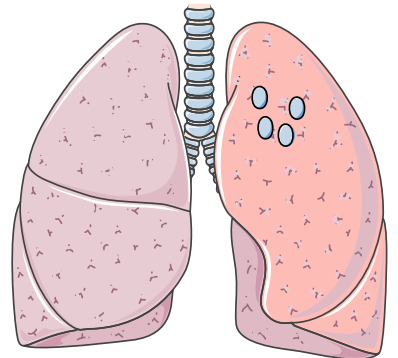
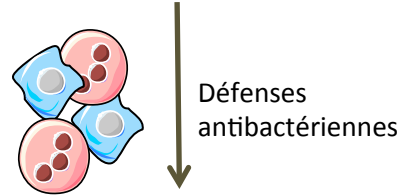


**Compartiment  
systémique**




**Diminution inflammation  
pulmonaire et systémique  
&  
protection poumon  
controlatéral**



**Poumon infecté**



**Augmentation  
des défenses  
antibactériennes**

-  bactéries
-  TNF- $\alpha$
-  IL-8



**Cellules immunitaires**

## Conclusion

Ce travail de recherche a permis de mettre en évidence que dans un modèle de pneumonie bactérienne unilatérale, la position DV :

- ✓ améliore la mécanique pulmonaire et l'oxygénation du sang,
- ✓ augmente les défenses antibactériennes,
- ✓ diminue l'inflammation tout en protégeant le poumon controlatéral.

## II. Article 2

### « Impact of mild-stretch mechanical ventilation on the development of *Staphylococcus aureus* pneumonia in rabbit »

Durant mon stage de Master 2 Recherche et lors de ma première année de Thèse, j'ai eu l'opportunité de collaborer sur le projet du Docteur Saber Barbar. Les recherches qu'il menait dans l'équipe du Professeur Charles visaient à évaluer l'impact de la ventilation mécanique sur l'expression du TLR2 et sur la réponse à *S. aureus*.

Dans un premier groupe d'expériences, après 24 heures de ventilation mécanique, les animaux ont reçu un inoculum de SARM (9Log CFU/mL) puis ont été sacrifiés au terme de 8 heures supplémentaires de VM. Dans un second groupe d'expériences, des animaux ventilés 24 heures et inoculés au SARM (9 Log CFU/mL), sont remis pour 24 heures sous VM puis sacrifiés. Nous avons également conduit des expérience *ex vivo* sur sang total de lapins, ventilés ou non, stimulé soit par un agoniste synthétique de TLR2, le Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, soit par une bactérie inactivée par la chaleur, à savoir *S. aureus* (HKSA).

Ainsi, nous avons observé que 32 heures de VM seule induisent des dommages sur le poumon incluant un épaississement des septa alvéolaires, des infiltrations de cellules inflammatoires et une perte d'aération dans les alvéoles (Figure 1A, 1B). Le groupe sous VM présente un score histologique significativement supérieur (Figure 2). Huit heures après l'instillation des SARM, nous avons pu observé dans le groupe en VM là encore, les marques d'une pneumonie (Figure 1C, 1D), avec des valeurs péjoratives du score histologique. Ces premières données nous ont montré que les dommages pulmonaires sont plus précoces et plus sévères chez les animaux soumis à la VM et à la pneumonie (Figure 1E, 1F) que chez ceux en ventilation spontanée. Nous avons également mis en évidence que la charge bactérienne est plus importante dans le groupe sous VM que ce

soit 8 ou 24 heures après l'inoculation (Figure 3A, 3B). De même chez les animaux ventilés la clairance bactérienne est diminuée (Figure 4). Une bactériémie précoce (8<sup>ème</sup> heure de VM) a été mise en évidence (Figure 3C, 3D) comme en témoignent les résultats des cultures quantitatives de rate positives pour le SARM.

De façon surprenante, il a également été observé dans notre modèle que la ventilation mécanique n'altère pas significativement la réponse inflammatoire pulmonaire à SARM. Les niveaux de transcrite *il-8* ainsi que les concentrations protéiques en IL-8 sont plus élevés chez les animaux ventilés pendant 8 heures que chez les contrôles en respiration spontanée (Figure 5A, 6A, 6C). Chez les animaux présentant la double agression, à la fois l'expression de l'ARNm et de la protéine IL-8 sont supérieures dans les homogénats du poumon et LBA, en comparaison au groupe non-infecté (Figure 5A, 6A, 6C). Nous n'avons en revanche pu mettre en évidence aucune différence significative entre les animaux du groupe en respiration spontanée et ceux du groupe en VM.

En nous intéressant à une autre cytokine inflammatoire, le TNF- $\alpha$ , nous avons trouvé que l'expression pulmonaire de son ARNm n'était pas significativement augmentée dans le groupe d'animaux soumis à la VM, infectés ou non par le SARM (Figure 5B). Cependant nous avons retrouvé dans les broyats de poumons, des concentrations protéiques en TNF- $\alpha$  supérieures dans le groupe des animaux ventilés en comparaison aux animaux en respiration spontanée et infectés (Figure 6B). Nous n'avons pas observé de différences significatives dans le dosage du TNF- $\alpha$  dans les LBA (Figure 6D).

Nous avons également mis en évidence que la VM exacerbe la réponse inflammatoire systémique à SARM. Les niveaux d'IL-8 dans le plasma à la 8<sup>ème</sup> heure post infection chez les animaux sous VM ont augmenté (de manière non significative) en comparaison au dosage réalisé au même temps chez les témoins non ventilés (Figure 7A). En revanche, nous avons trouvé une concentration sérique significativement plus haute en TNF- $\alpha$  chez les animaux sous VM en comparaison aux animaux en respiration spontanée (Figure 7B).

Dans une autre série d'expérimentations *ex vivo*, nous avons stimulé du sang obtenu d'animaux sous VM ou non, avec soit du Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> soit du HKSA mimant ainsi la

libération de produit de la paroi cellulaire et une bactériémie respectivement. En l'absence de toute stimulation microbienne, nous retrouvons une légère élévation non significative des concentrations sériques en IL-8 et TNF- $\alpha$  chez les animaux sous VM (Figure 8A et 8B). Le Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> induit une forte réponse inflammatoire dans le sang total d'animaux sous VM, ce que nous n'observons en revanche pas du tout dans le sang d'animaux non ventilés. De plus, nos données suggèrent un effet synergique de la combinaison VM et agoniste de TLR2 si l'on considère la libération de TNF- $\alpha$ . De la même manière, la libération de l'IL-8 et du TNF- $\alpha$  est significativement plus élevée chez les animaux sous VM lorsque leur sang est stimulé *ex vivo* par le HKSA.

Dans un souci d'explication concernant les différences sur la réponse inflammatoire à SARM entre les animaux en respiration spontanée et ceux sous VM, nous avons regardé dans les compartiments pulmonaire et systémique, l'expression du gène *tlr2* dans les homogénats de poumon et rate. Nous avons noté que l'expression pulmonaire du gène *tlr2* est significativement augmentée sous VM (Figure 9A). De la même manière, la VM augmente l'expression de l'ARNm TLR2 dans la rate (Figure 9B). Etrangement, le blocage *ex vivo* de TLR2 n'a pas empêché la libération massive de cytokines inflammatoires dans le sang obtenu de lapins soumis à la VM, excepté pour le TNF- $\alpha$  en réponse au SARM tué par la chaleur (HKSA) (Figure 8A et 8B).



# Anesthesiology

## Impact of mild-stretch mechanical ventilation on the development of Staphylococcus aureus pneumonia in rabbit

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	ALN-D-15-00356
<b>Full Title:</b>	Impact of mild-stretch mechanical ventilation on the development of Staphylococcus aureus pneumonia in rabbit
<b>Article Type:</b>	Critical Care Medicine
<b>Section/Category:</b>	
<b>Corresponding Author:</b>	Pierre Emmanuel Charles, M.D., Ph.D. Hopital Bocage Central, Centre Hospitalier et Universitaire De Dijon Dijon, FRANCE
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Hopital Bocage Central, Centre Hospitalier et Universitaire De Dijon
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Saber Davide Barbar, MD, MSc
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Saber Davide Barbar, MD, MSc Laure Anne Pauchard, MSc Rémi Bruyere, MD, MSc Caroline Brulliard, MD, MSc Davy Hayez Delphine Croisier, PharmD, PhD Jerome pugon, M.D., Ph.,D. Pierre Emmanuel Charles, M.D., Ph.D.
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p>Background: Ventilator-associated pneumonia (VAP) is common in patients subjected to mechanical ventilation (MV). Lung stretch could orient host immune response towards a pro-inflammatory pattern through toll-like receptor (TLRs) up-regulation. We tested this hypothesis in a rabbit model of Staphylococcus aureus VAP.</p> <p>Methods: Pneumonia was caused by airway challenge with one clinical S. aureus strain, in either spontaneously breathing (SB) or MV rabbits (12 mL/kg). Pneumonia assessment regarding both pulmonary and systemic bacterial burden, as well as inflammatory response was done 8 and 24 hours after S. aureus challenge. In addition, ex vivo stimulations of whole blood taken from SB or MV rabbits with either Pam3CSK4, a specific TLR2 agonist, or heat-killed S. aureus were performed.</p> <p>Measurements and main results: At the early stage of infection, lung injury was more severe in MV animals. MV animals also had lower lung bacterial clearance and a greater likelihood of systemic diffusion of S. aureus. In addition, although serum concentrations were similar during the first 8 hours following bacterial challenge, both circulating interleukin (IL)-8 and tumour necrosis factor (TNF)-<math>\alpha</math> rose significantly thereafter only in MV animals. Interestingly, whole blood obtained from MV animals released larger amounts of both cytokines if stimulated with either Pam3CSK4 or heat-killed S. aureus. Gene expression assays showed that MV induced TLR2 overexpression in both lung and spleen tissue.</p> <p>Conclusions: Mild-stretch MV impaired lung bacterial clearance, hastened tissue injury and promoted a systemic inflammatory response. Both pulmonary and peripheral blood TLR2 overexpression could account for such an impact.</p>

<b>Suggested Reviewers:</b>	<p>jean damien ricard, PhD          Professor, Colombes Hospital          jean-damien.ricard@lmr.aphp.fr          expert in the field of VILI and VAP</p>
	<p>jean michel constantin, PhD          Professor, Centre Hospitalier Universitaire de Clermont-Ferrand          jmconstantin@chu-clermontferrand.fr          expert in the field of VILI</p>
	<p>charles edouard luyt, PhD          professor, La Pitié-Salpêtrière Hospital          charles-edouard.luyt@psl.ap-hop-paris.fr          expert in the field of VAP</p>
<b>Opposed Reviewers:</b>	

## Cover Letter

**Names of Corresponding Author:** Pierre-Emmanuel CHARLES

**Manuscript Title:** Impact of mild-stretch mechanical ventilation on the development of *Staphylococcus aureus* pneumonia in rabbit

Dear Dr. Eisenach:

On behalf of my co-authors, I am submitting the enclosed material for possible publication in ANESTHESIOLOGY. It has not been submitted for publication nor has it been published in whole or in part elsewhere. I attest to the fact that all authors listed on the title page have read the manuscript, attest to the validity and legitimacy of the data and its interpretation, and agree to its submission to ANESTHESIOLOGY. I acknowledge that both I and the other authors have read the Instructions for Authors and agree with its contents. I acknowledge that if the enclosed manuscript is part of a larger whole or if the primary analysis has been previously published, this must be explicitly stated in the manuscript and the previous publication cited. **Possible conflicts of interest, sources of financial support, corporate involvement, patent holdings, etc. for each author are disclosed on the attached checklist or in an accompanying letter.**

Copyright transfer and the signatures of all authors will be requested prior to publication of accepted manuscripts.

Signature:

Date: March, 13<sup>th</sup> 2015

## Conflicts of Interest

ANESTHESIOLOGY is committed to publishing all reasonable information regarding relationships by a manuscript's authors that may produce bias or the appearance of bias. Information regarding financial relations or other possible conflicts of interest is needed when selecting reviewers or assessing their comments. Each author must disclose all funding sources supporting the submitted work and answer questions listed on the next page (yes/no). In the event of a yes answer on the part of any authors, please provide the appropriate information in an attached letter. Note that "funding" refers to gifts, research or educational grants, contracts, equity interest, stock option(s), direct or indirect salary support, consultant fee(s), lecture/travel fees or honoraria received within a period of three years of the date of submission of the manuscript from any source (including nonprofit foundations) that has or had financial interest in the subject matter, materials, equipment or devices discussed. "Financial interest" includes patent(s), patent licensing arrangement(s), stocks, equity interest, or any other arrangement(s) which may be of actual or potential financial benefit to any author or participant.

(1) Has the work been funded by any source(s) other than those described on the Title Page? **Yes/No**

(2) Does any author or participant have any financial interest in the subject matter, materials or equipment discussed or in competing materials? **Yes/No**

(3) Has the laboratory in which the research was performed been funded by, or has any participant in the planning, conduct, or reporting of the research been funded by or have financial interests in any source with a real or potential interest in the subject matter, materials, equipment or devices discussed or in any competing product or subject? **Yes/No**

(4) Has the laboratory in which the work was performed or any of the authors or participants been funded by any Foundation or other non-governmental source that has received funding from any organization with a real or potential interest in the subject matter, materials, equipment or devices discussed, or in any competing product or subject? **Yes/No**

If you answer yes to any of the above items, please provide details, including the name(s) of the supported authors as well as the corresponding names of the persons or organizations involved.

1  
2  
3  
4 **Impact of mild-stretch mechanical ventilation on the development of *Staphylococcus aureus***  
5  
6 **pneumonia in rabbit**  
7  
8

9  
10  
11 Saber-Davide Barbar, M.D., MSc<sup>1</sup>  
12

13 Laure-Anne Pauchard, MSc<sup>1</sup>  
14

15 Rémi Bruyère, M.D., MSc<sup>1</sup>  
16

17 Caroline Bruillard, M.D., MSc<sup>1</sup>  
18

19 Davy Hayez<sup>2</sup>  
20

21 Delphine Croisier-Bertin, PharmD, PhD<sup>2</sup>  
22

23 Jérôme Pugin, M.D., PhD<sup>3</sup>  
24

25 Pierre-Emmanuel Charles, M.D., PhD<sup>1</sup>  
26  
27  
28

29  
30  
31  
32  
33 <sup>1</sup>Laboratoire “Ventilation Immunité Poumon”, Pôle Microbiologie Environnementale et Risque  
34 Sanitaire (M.E.R.S.), U.M.R. 1347, I.N.R.A., Université de Bourgogne, DIJON, France  
35

36  
37  
38 <sup>2</sup>Vivexia S.A.R.L.  
39

40  
41 <sup>3</sup>Intensive Care Laboratory, University Hospitals of Geneva, and Department of Microbiology  
42 and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, 1211 Geneva 14, Switzerland.  
43  
44  
45

46  
47  
48 **Corresponding author:**  
49

50 Pr. Pierre-Emmanuel Charles  
51

52 +33 3 80 29 31 27  
53

54 Medical Intensive Care Unit.  
55

56 Hôpital Bocage Central  
57

58 Centre Hospitalier et Universitaire de Dijon  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

14, rue Gaffarel

21000 Dijon

France

Financial support: “Aspire” grant from Pfizer (50000 €)

**Word count:**

Abstract (248 words);

Introduction (585)

Discussion (2,098)

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7 **Abstract**  
8

9 **Background:** Ventilator-associated pneumonia (VAP) is common in patients subjected to  
10 mechanical ventilation (MV). Lung stretch could orient host immune response towards a pro-  
11 inflammatory pattern through toll-like receptor (TLRs) up-regulation. We tested this hypothesis  
12 in a rabbit model of *Staphylococcus aureus* VAP.  
13  
14  
15  
16  
17

18 **Methods:** Pneumonia was caused by airway challenge with one clinical *S. aureus* strain, in either  
19 spontaneously breathing (SB) or MV rabbits (12 mL/kg). Pneumonia assessment regarding both  
20 pulmonary and systemic bacterial burden, as well as inflammatory response was done 8 and 24  
21 hours after *S. aureus* challenge. In addition, *ex vivo* stimulations of whole blood taken from SB or  
22 MV rabbits with either Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, a specific TLR2 agonist, or heat-killed *S. aureus* were  
23 performed.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

33 **Measurements and main results:** At the early stage of infection, lung injury was more severe in  
34 MV animals. MV animals also had lower lung bacterial clearance and a greater likelihood of  
35 systemic diffusion of *S. aureus*. In addition, although serum concentrations were similar during  
36 the first 8 hours following bacterial challenge, both circulating interleukin (IL)-8 and tumour  
37 necrosis factor (TNF)- $\alpha$  rose significantly thereafter only in MV animals. Interestingly, whole  
38 blood obtained from MV animals released larger amounts of both cytokines if stimulated with  
39 either Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> or heat-killed *S. aureus*. Gene expression assays showed that MV induced  
40 TLR2 overexpression in both lung and spleen tissue.  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

52 **Conclusions:** Mild-stretch MV impaired lung bacterial clearance, hastened tissue injury and  
53 promoted a systemic inflammatory response. Both pulmonary and peripheral blood TLR2  
54 overexpression could account for such an impact.  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Key words:** ventilator-induced lung injury – stretch – ventilator-associated pneumonia –

Staphylococcus aureus –interleukin-8.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7 **Introduction**  
8

9 Although, mechanical ventilation (MV) is sometimes the only way to care for critically ill  
10 patients with respiratory failure, many adverse effects, including ventilator associated pneumonia  
11 (VAP), are common [1, 2]. Actually, VAP occurs in up to 27% of these patients (23.5 per 1,000  
12 ventilator-days) [3]. During bacterial pneumonia, a rapid immune lung response is necessary to  
13 ensure microbial clearance. In the airways, both bronchial and alveolar epithelial cells take part in  
14 the host innate immune response, mainly through their ability to produce inflammatory mediators  
15 [4]. It is now clearly recognised that innate immunity is activated through pattern recognition  
16 receptor (PRR)-related pathways [5]. Among the PRRs, toll-like receptors (TLRs) play a key role  
17 in the recognition of the so-called pathogen-associated microbial patterns (PAMPs). TLRs can  
18 recognize a wide range of PAMPs and generate inflammatory signals to modulate innate immune  
19 responses [6]. Among the bacteria causing VAP, Gram-positive bacteria, especially  
20 *Staphylococcus aureus*, are frequently responsible for infection and mortality [7]. Cell wall  
21 components of Gram-positive bacteria, such as bacterial lipopeptides (BLPs), activate TLR2.  
22 TLR2 expression has been detected in immune cells, as well as in endothelial or epithelial cells  
23 [8]. Ligand-specific recognition and signalling occurs via heterodimerisation with TLR1 or TLR6  
24 [6, 9]. Interestingly, TLR2 expression seems to be sensitive to mechanical stress, as shown in the  
25 endothelium [10].

26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50 Both *in vitro* and *in vivo* experimental studies have demonstrated that MV, in particular  
51 adverse ventilatory strategies with high tidal volume and zero end-expiratory pressure could  
52 activate lung cells, thus leading to a proinflammatory response, even in the absence of bacterial  
53 stimuli. This is the biotrauma paradigm, which is responsible, at least in part, for so-called  
54 Ventilator Induced Lung Injury (VILI), the hallmark of which is the infiltration of  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 polymorphonuclear neutrophils (PMNs) into the lungs [11]. Although low-stretch MV does not  
5  
6  
7 lead to such apparent tissue damage or inflammation, it could prime airway cells to respond  
8  
9  
10 massively to a second proinflammatory insult, through the subsequent release of large amounts of  
11  
12  
13 cytokines, thus leading to additional lung injury, particularly through the recruitment of  
14  
15  
16 neutrophils as a result of interleukin (IL)-8 secretion [12]. This has been clearly demonstrated in  
17  
18  
19 several animal models based on airway challenge with lipopolysaccharide (LPS) combined with  
20  
21  
22 MV. It has been shown that MV increased lung injury and promoted pulmonary-to-systemic  
23  
24  
25 endotoxin translocation [13-15]. Innate immunity activation thereby plays a major role in the  
26  
27  
28 development of VILI [5]. The involvement of toll-like receptors, especially TLR4, has been  
29  
30  
31 suggested by several experimental studies [16, 17]. Moreover, it has been hypothesized that MV-  
32  
33  
34 dependent lung priming depended on the TLR4 pathway when LPS models were used, thus  
35  
36  
37 illustrating the “two-hit” paradigm [13-15, 18]. However, little is known about the possible  
38  
39  
40 implication of other TLRs and related microbial ligands in MV-dependent lung injury.

41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
Indeed, we have previously demonstrated *in vitro* that cyclic stretch of human pulmonary  
cells resulted in TLR2 overexpression and enhanced TLR2 reactivity to Gram-positive cell wall  
components [19]. These findings were confirmed in a rabbit model since mild-stretch MV  
increased lung injury in response to the instillation of Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, a specific TLR2 agonist. Taken  
together, our findings provided new insights into the underlying mechanisms of lung priming.  
MV could thus promote the over-activation of pulmonary cells in the presence of either Gram-  
negative or Gram-positive bacteria within the airways in a TLR-dependent manner, and thus  
worsen lung injury.

In an attempt to determine the relevance of these hypotheses in our *in vivo* model of VAP,  
we conducted experiments using live bacteria specifically recognized by TLR2 (i.e., *S. aureus*).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5 **Materials and methods**  
6

7 **Bacterial Challenge**  
8

9  
10 The USA 300 PVL(-) clinical strain of *S. aureus* (kindly provided by G. Lina, Lyon, France) was  
11 used in this study. Working stock cultures were kept frozen in a 15% glycerol-supplemented  
12 brain-heart infusion (BioMérieux Laboratories, Marcy-l’Etoile, France). They were changed  
13 monthly. Colonies isolated from infected rabbits’ spleen cultures were used to preserve bacterial  
14 virulence. At 48 hours before experimentation began, several colonies were taken, cultured on  
15 MRSA2 agar plates (BioMérieux) and then incubated for 24 hours at 37°C. One colony was  
16 inoculated into 10 mL of brain-heart infusion and was incubated for 6 hours at 37°C before being  
17 cultured on MRSA2 agar plates for 18 hours at 37°C. The inocula concentration was estimated by  
18 optical densitometry, in reference to a standard curve, and systematically checked by a  
19 quantitative culture by plating successive ten-fold dilutions. A mean titer of 9.5 log<sub>10</sub> colony-  
20 forming units per millilitre (CFU/mL) was used in this study since pneumonia obtained with  
21 lower values was too mild and transient.  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

42 **Animal experiments**  
43

44 Male New Zealand White rabbits (body weight 2.8 to 3.2 kg) were obtained from the “Elevage  
45 scientifique des Dombes” (Romans, France). They were placed in individual cages and were fed  
46 ad libitum with water and food, according to current recommendations [20]. The Ethics  
47 Committee of Dijon Faculty of Medicine approved the experimental protocol. A central venous  
48 catheter was surgically inserted into the left jugular internal vein 24 hours before randomization  
49 [21].  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 The animals (n=50) were randomly allocated to the SB group (n = 25) or the MV group (n  
5 = 25).  
6  
7

8  
9 In the SB group, the rabbits were orally intubated as previously described [22, 23].  
10 Briefly, under general anaesthesia provided by an intravenous injection of ketamine 3.3 mg/kg  
11 (Panpharma, France) and xylazine 1mg/kg (Rompun<sup>®</sup>, Bayer, Germany), a cuff tube of 3.0 mm  
12 was orally inserted into the trachea under view control.  
13  
14  
15  
16  
17

18  
19 The rabbits then received an intrabronchial instillation of 9.5 log<sub>10</sub> cfu/mL of *S. aureus*  
20 diluted in 0.5 mL of saline (n=5), through a silicon catheter (Sigma Medical, Nanterre, France)  
21 inserted into the tracheal tube. The inoculum was gently flushed through the catheter until one  
22 lower lobe bronchus was reached. SB controls received 0.5 mL of saline (n=5). The catheter was  
23 immediately removed, the animals were rapidly extubated, and were then allowed to go back to  
24 their cage before being killed 8 or 24 hours later.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

33 In the MV group, the animals were intubated as described above, and then were connected  
34 to a volume-controlled ventilator (Servo ventilator 900C<sup>®</sup>, Siemens, Germany). MV was  
35 performed in the supine position with a continuous infusion of midazolam (0.06 mg.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)  
36 (Hypnovel<sup>®</sup>, Roche, Switzerland) and cisatracurium besilate (0.3 mg.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) (Nimbex<sup>®</sup>,  
37 GlaxoSmithKline, U.K.). The tidal volume was set at 12 ml/kg with zero end-expiratory pressure,  
38 the respiratory rate at 25/minute and the inspired fraction of oxygen at 0.5. During the MV, the  
39 animals were positioned on a heating blanket to maintain body normothermia, and hydration with  
40 isotonic serum was provided intravenously to maintain a stable hemodynamic status in the  
41 context of MV, anaesthesia, and paralysis. An arterial catheter was inserted in most of these  
42 animals for blood sampling and blood pressure monitoring. Arterial blood gas was analysed  
43 every 8 hours and the respiratory rate adjusted to keep PaCO<sub>2</sub> within a 35-45 mmHg range.  
44 Plateau pressure was monitored hourly.  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 The animals were subjected to MV for 24 hours before being given an intrabronchial  
5  
6 instillation of  $9.5 \log_{10}$  CFU/mL of *S. aureus* diluted in 0.5 mL of saline, as described above.  
7  
8  
9 MV controls received 0.5 mL of saline (n=5). The animals were then kept under MV for 8 or 24  
10  
11 hours before being killed.  
12  
13  
14  
15

### 16 **Material Harvesting**

17  
18  
19 Blood samples were collected from the arterial catheter (at the start of the experiment, after 24  
20  
21 hours of MV and then 1,2,4 and 8 hours after the intrabronchial instillation) and centrifuged at  
22  
23 1,000g for 15 minutes at 4°C; the supernatant was divided into 0.5 ml aliquots and stored at -  
24  
25 80°C for cytokine concentration measurements.  
26  
27

28  
29 At the end of the experiment, the animals were killed by an intravenous overdose of  
30  
31 thiopental.  
32

33  
34 In both groups, the animals were exsanguinated by venous puncture. Autopsies were  
35  
36 carried out so that the lungs and spleen were aseptically taken. Immediately after exsanguination,  
37  
38 the heart and lungs were carefully removed en block via midline sternotomy.  
39

40  
41 The left lung was lavaged with 2 mL of sterile saline. The broncho-alveolar lavage fluid  
42  
43 (BALF) was centrifuged at 400 g and 4°C to pellet the cells and the supernatant was stored at -  
44  
45 80°C for further cytokine determination.  
46

47  
48 The lungs were harvested for RNA extraction. Additional samples were obtained for microscopic  
49  
50 examination.  
51

52  
53 The remaining lung tissue was homogenized for the determination of cytokine  
54  
55 concentrations and for bacterial culture.  
56

57  
58 The spleen was harvested for RNA extraction, and the remaining spleen tissue was  
59  
60 homogenized for cytokine concentration measurements and bacterial culture.  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9 **Cytokine Measurements**

10  
11 TNF-alpha and IL-8 concentrations were measured in plasma, whole blood supernatants, lung  
12 homogenates and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) supernatants using rabbit specific  
13 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Uscn Life Science Inc., Wuhan, China). The  
14 lower limits of the assays were 15.6 pg/mL for both TNF-alpha and IL-8.  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

23 **Quantitative RT-PCR**

24  
25 All gene expression analyses were done 8 hours after lung exposure to either saline, Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>  
26 or *S. aureus*, since peak values were achieved within this timeframe in previous studies [19].  
27  
28 RNA was extracted from lung samples using the RNA GenElute kit (Sigma-Aldrich, St Louis,  
29 MO, USA). Quantitative PCR was performed using IQ Sybergreen Supermix (Bio-Rad, Hercules,  
30 CA, USA). Melting curves were performed to ensure the presence of a single amplicon. The  
31 following primers were used: rTlr2, forward 5'-TGT CTG TCA CCG AAC CGA ATC CAC-3'  
32 and reverse 5'-TCA GGT TTT TCA GCG TCA GCA GGG-3' [24]; rIl-8, forward 5'-AAC CTT  
33 CCT GCT GCT TCT GA-3' and reverse 5'-TCT GCA CCC ACT TTT TCC TTG-3'; TNF $\alpha$ ,  
34 forward 5'-CAA GCC TCT AGC CCA CGT A-3' and reverse 5'-GGC AAT GAT CCC AAA  
35 GTA G-3'; and rGapdh, forward 5'-ATG TTT GTG ATG GGC GTG AAC C-3' and reverse 5'-  
36 CCC AGC ATC GAA GGT AGA GGA-3'.  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51

52  
53 The results are expressed as the fold induction using the  $\Delta$ Ct method [25] since the  
54 spontaneously breathing (SB) animals were always considered as the baseline condition.  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Histological Analysis

A tissue sample of 1 cm<sup>3</sup> that focused on a macroscopic lesion from the cranial and caudal lobes was fixed in formalin and embedded in paraffin. Five-micrometre sections were obtained and coloured with haematoxylin and eosin. Two pathologists blinded to the group assignment examined all slides. After viewing approximately five fields per sector under low and high power, each section was assigned a numerical histologic score ranging from 0 to 3 as previously described [26] according to the degree of neutrophilic infiltration, haemorrhage, and oedema in the interstitial and alveolar spaces: 0 (normal), normal-appearing lung; 1 (mild), mild congestion, interstitial oedema, and interstitial neutrophilic infiltrate with occasional red blood cells and neutrophils in the alveolar spaces; 2 (moderate), moderate congestion and interstitial oedema with neutrophils partially filling the alveolar spaces but without consolidation; 3 (severe), marked congestion and interstitial oedema, with neutrophilic infiltrate nearly filling the alveolar spaces, or with frank lung consolidation. Atelectasis per se was disregarded and not scored as abnormal. For each criterion, when disagreements occurred between the observers, the definite score was defined as the mean of each pathologist's score.

## Microbiological Evaluation of Pneumonia

Each pulmonary lobe was isolated from the whole lung, homogenized in sterile H<sub>2</sub>O, and used for serial ten-fold dilution cultures. For each lobe, the bacterial concentration was adjusted to its weight.

The mean bacterial pulmonary concentration was calculated according to each lobar concentration with lobar weight (e.g., mean concentration =  $\Sigma$  [lobar concentration x lobar



1  
2  
3  
4 weight]/ lobar weights). The spleen of each rabbit was also removed, crushed, and cultured. An *S.*  
5  
6 *aureus*-positive spleen culture was considered a marker of bacteraemia.  
7  
8  
9

## 10 11 12 13 14 **Reagents**

15  
16 The  $\alpha$ -Human TLR2 monoclonal antibody (mAb) T2.5 (mouse IgG1 $\kappa$ ) was a gift from Novimmune  
17  
18 (Plan-les-Ouates, Switzerland), and its relevant isotype control was purchased from Becton  
19  
20 Dickinson Biosciences (Franklin Lakes, NJ, U.S.A.).  
21

22  
23 Synthetic triacyled lipoprotein Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> was purchased from Invivogen (San Diego, CA,  
24  
25 U.S.A.).  
26  
27  
28

## 29 30 31 **Whole blood assay**

32  
33 Fresh heparinized blood from either SB or MV rabbits (12 mL/kg, ZEEP over a 48 hour-period)  
34  
35 was obtained by venipuncture and diluted 1:2 with RPMI 1640. Blood was immediately plated at  
36  
37 120  $\mu$ L/well in a 96-well plate and incubated for 15 minutes at 37°C.  
38

39  
40 In some experiments, either mAb T2.5 or IgG1 $\kappa$  were diluted with RPMI 1640 (10  $\mu$ g/mL in 60  
41  
42  $\mu$ L final volume) and added to rabbit whole blood at room temperature [27]. One hour later 60  
43  
44  $\mu$ L of Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (100 ng/mL) or heat-killed *S. aureus* (USA300 strain; 9 log CFU warmed at  
45  
46 90°C for 60') were added and the blood was then incubated for 24 hours at 37°C. This  
47  
48 concentration corresponded to the maximal response observed with the TLR2 agonist in  
49  
50 preliminary experiments (data not shown). Cell culture supernatants were finally removed and  
51  
52 kept frozen at -80°C until IL-8 and TNF-  $\alpha$  concentrations were determined.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 **Statistical analysis**  
5

6 All data were expressed as the mean  $\pm$  SD or median [IQR] as specified.  
7

8  
9 Data were tested for normal distribution with the D'Agostino-Pearson normality omnibus K2 test  
10  
11 or with the Kolmogorov–Smirnov test when n was too small.  
12  
13

14 The differences in the values among the four study groups were compared using  
15  
16 parametric one-way analysis of variance for normally distributed data. When the difference  
17  
18 between groups was significant with the above tests, the group or groups that differed from the  
19  
20 others were identified using the Bonferroni multiple comparison test.  
21  
22

23  
24 When the data were not normally distributed, the medians were compared using the  
25  
26 nonparametric Kruskal–Wallis test. When the difference between groups was significant with the  
27  
28 above tests, the group or groups that differed from the others were identified using the Dunn  
29  
30 method for pairwise multiple comparisons.  
31  
32

33  
34 For temporally repeated data (i.e. for serum cytokine concentrations), changes over time  
35  
36 were assessed in each group using one-way repeated-measures analysis of variance for normally  
37  
38 distributed data. Differences between the times were identified using the Bonferroni multiple  
39  
40 comparison test after repeated-measures analysis of variance when significance was reached.  
41  
42

43 GraphPad Prism software was used (GraphPad Software, San Diego California, USA).  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7 **RESULTS**  
8

9 **Mechanical ventilation worsens lung damage and impairs bacterial lung clearance**  
10

11 We developed an animal model of *S. aureus* VAP in lungs previously subjected to mild-stretch  
12 MV.  
13  
14

15 As previously reported, 32 hours of MV alone induced lung damage, including inter-  
16 alveolar septa thickened by cell infiltrate and alveoli loss of aeration (Fig 1A, 1B). The  
17 histological score (Fig 2) was significantly greater in the MV group ( $0.13\pm 0.20$  vs.  $0.86\pm 0.10$ ,  
18  $p=0.002$ ). In the setting of pneumonia, 8 hours after tracheal instillation of *S. aureus*, we  
19 observed increased cellularity, predominantly neutrophils, and fibrin stranding in alveoli, once  
20 again predominantly in the MV group (Fig 1C, 1D), resulting in a worse histological score  
21 ( $1.40\pm 0.33$  vs.  $2.40\pm 0.55$ ,  $p=0.007$ ). Later during the course of infection, (i.e., 24 hours after  
22 bacterial challenge), lung injury was still greater in the MV group (Fig 1E, 1F), but the scores did  
23 not differ significantly anymore ( $2.35\pm 0.42$  vs.  $2.67\pm 0.49$ ,  $p=0.113$ ). Altogether, these findings  
24 suggest that lung damage was more severe and earlier in animals subjected to MV and  
25 pneumonia than in SB animals with pneumonia.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

43 The bacterial burden was higher in the MV group both after 8 hours ( $5.00\pm 1.02$  vs.  
44  $5.87\pm 0.38$  CFU/g,  $p=0.028$ ) and 24 hours of MV ( $4.96\pm 1.313$  vs.  $6.13\pm 0.63$  CFU/g,  $p=0.002$ )  
45 (Fig 3A, 3B).  
46  
47  
48  
49

50 Similarly, when *S. aureus* lung concentrations were expressed as percentages of the  
51 inoculum size, bacterial clearance was found to be impaired in MV animals (Fig 4).  
52  
53

54 In addition, MV probably promoted early pulmonary-to-systemic translocation during *S. aureus*  
55 pneumonia, as indicated by the quantitative spleen culture results, which reflected the occurrence  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 of bacteraemia (Fig 3C, 3D). Actually, cultures became positive as early as the 8<sup>th</sup> hour solely in  
5  
6  
7 some rabbits in the MV group. Interestingly, *S. aureus* spleen concentrations became comparable  
8  
9 thereafter ( $1.48 \pm 0.66$  vs.  $1.47 \pm 0.82 \log_{10} \text{CFU/g}$ ,  $p=0.440$ ).

10  
11  
12  
13  
14 **Mechanical ventilation does not significantly alter the lung inflammatory response to *S.***

15  
16 ***aureus***

17  
18  
19 In animals subjected to MV alone, lung expression of the inflammatory cytokine IL-8 gene (Fig  
20  
21 5A) was significantly greater than that in their SB counterparts ( $p=0.031$ ). The corresponding IL-  
22  
23 8 protein level within lung homogenates (Fig 6A) and BALF (Fig 6C) tended to be greater in MV  
24  
25 animals at the 8<sup>th</sup> hour. However, the difference was only significant for BALF ( $71.82 \pm 21.80$  vs.  
26  
27  $189.22 \pm 83.92$ ,  $p=0.010$ ) but not for lung homogenate ( $135.5 \pm 11.3$  vs.  $823.6 \pm 544.1$ ,  $p=ns$ ). In the  
28  
29 animals infected with *S. aureus*, both IL-8 gene expression and protein release were higher than  
30  
31 in non-infected ones (Fig 5A, 6A, 6C). However, we did not find any significant difference  
32  
33 between SB and MV groups.  
34  
35  
36  
37

38  
39 Regarding TNF- $\alpha$ , another inflammatory mediator of paramount importance, lung gene  
40  
41 expression was not significantly increased in animals subjected to MV, whether or not they were  
42  
43 infected with *S. aureus* (Fig 5B). However, the TNF- $\alpha$  protein level within lung homogenates  
44  
45 (Fig 6B) was higher in MV than in SB non-infected rabbits ( $150.5 \pm 24.3$  vs.  $533.1 \pm 198.8$ ,  
46  
47  $p=0.001$ ) but there was no difference between the two groups of *S. aureus*-infected rabbits at both  
48  
49 time points. In contrast, no significant difference was found when BALF concentrations were  
50  
51 considered (Fig 6D).  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## **Mechanical ventilation exacerbates the systemic inflammatory response to *S. aureus***

Plasma concentrations of IL-8 and TNF- $\alpha$  were measured in animals' plasma at baseline and several time-points thereafter (i.e., 1, 2, 4, 8, 12, 18 and 24 h after *S. aureus* instillation). Changes over time were assessed by repeated-measures analysis of variance. Time course analysis showed that levels of IL-8 (Fig 7A) at the 8<sup>th</sup> hour of MV had increased to a greater extent than those measured in SB rabbits, though the difference was not statistically significant. However, a significantly higher TNF- $\alpha$  level was measured in the serum of MV animals than in serum from their SB counterparts (95% CI: -104.7 to -7.547), in spite of the recovery of similar amounts of bacteria from spleen cultures at the last time-point, as described above (Fig 7B).

In another set of experiments, IL-8 and TNF- $\alpha$  were measured in whole blood obtained from either SB or MV rabbits. *Ex vivo* stimulations by the synthetic bacterial lipopeptide Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, a specific TLR2 agonist, as well as heat-killed *S. aureus* were performed in each group in an attempt to mimic *S. aureus* cell-wall products release from the lung and bacteraemia, respectively. As expected, in the absence of any microbial stimulation, a mild but not significant elevation of both IL-8 and TNF- $\alpha$  was measured in blood obtained from MV animals when compared to SB ones (Fig 8A & 8B). Whereas Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> alone failed to elicit the release of inflammatory mediators from the whole blood drawn in SB animals, it mounted a significant response in the MV group. Moreover, our data suggest a synergic effect of the combination of MV with the TLR2 agonist if considering TNF- $\alpha$  release. Similarly, the responsiveness of whole blood from MV animals to heat-killed *S. aureus*, in terms of both IL-8 and TNF- $\alpha$  elevation was significantly greater than in blood from SB animals.

1  
2  
3  
4 **Mechanical ventilation increases both lung and systemic expression of TLR2**  
5

6 Attempting to explain *in vivo* differences regarding inflammatory responsiveness to *S. aureus*  
7  
8 between SB and MV rabbits in both the pulmonary and systemic compartment, TLR2 gene  
9 expression was evaluated in lung and spleen homogenates, respectively. Spleen was actually  
10  
11 considered a surrogate for peripheral blood mononuclear cells [28]. In addition, TLR2 blockade  
12  
13 was achieved through media incubation with the T2.5 Mab prior to stimulation during *ex vivo*  
14  
15 experiments.  
16  
17  
18  
19

20  
21 It is worth noting that lung expression of the TLR2 gene was significantly increased under  
22  
23 MV (Fig 9A). Similarly, and to a greater extent, MV promoted TLR2 gene expression in spleen  
24  
25 homogenates (Fig 9B). However, interestingly, TLR2 *ex vivo* blockade failed to abrogate the  
26  
27 excessive release of inflammatory mediators by whole blood obtained from MV animals,  
28  
29 excepting TNF- $\alpha$  in response to heat-killed *S. aureus* (Fig 8A & 8B). These findings suggest that  
30  
31 TLR2 overexpression in MV animals could account, at least in part, for the overwhelming  
32  
33 systemic inflammatory response.  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7 **Discussion**  
8

9 In line with our previous data regarding stretch-dependent lung TLR2 overexpression, the aim of  
10 this study was to find out to what extent MV could alter the immune and inflammatory response  
11 to *S. aureus* in a rabbit model of VAP. To this purpose, we challenged the airways with a strong  
12 *S. aureus* inoculum in animals subjected to a 24 hour-MV prior to infection, and compared them  
13 to SB infected controls at both “early” (i.e., 8 hours), or “late” (24 hours) stages of pneumonia.  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

23 We report herein the following findings:  
24

- 25 - mild-stretch MV probably impairs bacterial lung clearance and to a lesser extent promotes early  
26 pulmonary-to-systemic translocation during *S. aureus* pneumonia  
27  
28
- 29 - mild-stretch MV worsens lung damage including PMN infiltration, without increasing the local  
30 release of inflammatory mediators including IL-8. It is therefore unclear whether stretch-  
31 dependent TLR2 up-regulation could account for this phenomenon, thus suggesting that other  
32 PMN chemoattractant mediators are involved;  
33  
34
- 35 - in contrast, systemic inflammation was strongly exacerbated by MV, perhaps reflecting an  
36 increased responsiveness to bacterial products within this compartment as suggested by the  
37 results of *ex vivo* experiments. Interestingly, TLR2 overexpression may not be the only  
38 underlying mechanism.  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

50 These results are consistent with our previous findings [19, 22, 23, 29, 30]. However, it is  
51 worth noting that some differences exist with respect to the pathogen involved. In addition, the  
52 present study provides new insights regarding the impact of MV on bacterial pneumonia.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 First, the present data show that the lung's ability to keep *S. aureus* growth in check is impaired  
5  
6 by MV. This deleterious effect of MV becomes obvious at the early stage of infection (i.e., at the  
7  
8 8<sup>th</sup> hour). Interestingly, these findings are in accordance with previous reports from our group  
9  
10 concerning other pathogens (e.g., *Enterobacter* sp. and *Streptococcus pneumoniae*). Moreover, to  
11  
12 the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate such major deleterious effects of  
13  
14 MV in a MRSA VAP model, thereby illustrating the peculiar severity of these infections.  
15  
16 Dhanireddy *et al.* failed to demonstrate any significant impact of lung stretch on *S. aureus*  
17  
18 clearance in mice with pneumonia subjected to 12 hours of MV [14]. Our model, however, is  
19  
20 more relevant to the clinical scenario of VAP since animals were subjected to 24 hours of MV  
21  
22 prior to bacterial challenge. In addition, it has been shown that rabbit TLRs are more closely  
23  
24 related to human TLRs than to mouse TLRs [24]. In addition, if translated into the clinical area,  
25  
26 our findings might reflect the reported quite high treatment failure rate despite the administration  
27  
28 of highly active drugs [31]. Similarly, we showed that MV could promote pulmonary-to-systemic  
29  
30 bacteria translocation but only at the earliest stage of infection. Actually, similar spleen bacterial  
31  
32 concentrations were found in SB and MV rabbits after 24 hours despite significantly greater lung  
33  
34 concentrations in MV animals. This result was not expected since cumulative experimental  
35  
36 evidence supports the hypothesis that MV promotes bacterial spill over from the lung [13, 22,  
37  
38 32]. Moreover, clinical data showed that *S. aureus* VAP was more likely to be associated with  
39  
40 bacteraemia than was pneumonia caused by other pathogens [33, 34]. Our findings are, however,  
41  
42 in line with those obtained previously in mice [14]. In addition, the propensity of bacteria to  
43  
44 reach the bloodstream depends on the host immune response as well as virulence factors [35].  
45  
46 Indeed, in this study we used a PVL-deleted USA300 strain. Interestingly, our group has recently  
47  
48 shown in rabbits that bacteraemia was achieved in every animal if pneumonia was caused by the  
49  
50 original USA300 strain (i.e., PVL+), thus emphasizing the role of the toxin [36].  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7 Regarding lung damage, the present findings confirmed previous ones, since *S. aureus* caused  
8 significantly greater injury in animals subjected to MV than in their SB counterparts. However,  
9 although this difference was obvious at the early stage of pneumonia (i.e., 8 hours after bacterial  
10 challenge), lung disease severity was similar at the 24<sup>th</sup> hour, suggesting that lung stretch might  
11 have hastened the spread of tissue injury, especially PMN infiltration. This phenomenon has  
12 already been described in animal models of VILI, which showed that the more adverse the MV  
13 settings, the earlier the VILI features became obvious [37]. Moreover, these findings provide  
14 evidence to support the hypothesis that MV primes the lung before bacterial challenge occurs  
15 within the airways, thus driving lung overreaction, in accordance with the “two-hit” paradigm  
16 [38]. We have hypothesized and demonstrated previously in both human cells and rabbit lung that  
17 stretch-dependent TLR2 overexpression in the lung could account for the phenomenon [19].  
18 Stretch-dependent TLRs 2 and 4 have also been demonstrated in other animal models of VILI  
19 [17, 39]. We should, however, admit that the data provided by the present study using live  
20 bacteria instead of one specific TLR2 agonist were not so consistent. Although pulmonary *S.*  
21 *aureus* concentrations were quite similar at the early time-point (i.e., 8<sup>th</sup> hour), it is worth noting  
22 that the release of neither IL-8 nor TNF- $\alpha$  in the lung was significantly increased by the  
23 combination of MV and infection, despite the fact that greater amounts of bacteria were  
24 simultaneously recovered from the lung. Several explanations could be considered. Firstly, some  
25 authors have discussed the relevance of biotrauma in animal models of VILI, arguing that the  
26 mechanical insult *per se* could account for tissue injury [40]. Secondly, lung reactivity to *S.*  
27 *aureus* might depend on the bacterial strain, as recently reported [41]. We cannot therefore  
28 exclude the possibility that lipoprotein expression within the *S. aureus* wall changes not only with  
29 time but also according to the underlying environmental conditions (e.g., according to lung  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 stretch). Moreover, it has been shown that the activation profile of circulating neutrophils in the  
5  
6 pulmonary and extra-pulmonary blood flow varies according to lung conditions [42]. It is  
7  
8 therefore possible that the excess lung damage was subsequent to primed neutrophil retention  
9  
10 rather than to TLR2 overexpression, as described in patients with acute respiratory distress  
11  
12 syndrome (ARDS). Finally, pro-inflammatory signals other than the usually assessed  
13  
14 chemokines and cytokines might have been released within the lung of animals subjected to MV.  
15  
16 Indeed, the involvement of so-called alarmins in the onset of VILI has recently been raised and  
17  
18 needs further investigation [43].  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

26 Our study also addressed the issue of systemic inflammatory response in the setting of *S. aureus*  
27  
28 VAP. As mentioned above, we failed to demonstrate clearly that MV associated with bacterial  
29  
30 challenge increased lung inflammation, as reflected by pulmonary gene expression or cytokine  
31  
32 concentrations. However, and in contrast, we observed a rising systemic inflammatory response  
33  
34 (i.e., plasma levels of IL-8 and TNF- $\alpha$ ), as early as the 8<sup>th</sup> hour only in animals with pneumonia  
35  
36 subjected to MV. It is worth noting that the amount of circulating live bacteria, according to  
37  
38 spleen cultures, was mild over this period, regardless of ventilation. One cannot exclude,  
39  
40 however, the possibility that lung stretch promoted the translocation of killed bacteria or bacterial  
41  
42 products (e.g., cell wall components) from the lung, as shown with LPS, since lung damage was  
43  
44 found to be more severe in the MV group [13]. Inflammatory mediator spill over from the lung  
45  
46 should not be ruled out but seems unlikely since similar concentrations were measured within the  
47  
48 tissue.  
49  
50  
51  
52  
53  
54

55 In order to investigate this issue, a second set of experiments was carried out, with special  
56  
57 emphasis on the role of TLR2. Our results suggest that the systemic inflammatory response  
58  
59 observed in this model of VAP depended, at least in part, on a TLR2 pathway in peripheral white  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 blood cells. Actually, we showed that MV alone led to TLR2 gene overexpression in the spleen.  
5  
6 Indeed, the results of *ex vivo* experiments suggest that the whole blood obtained from rabbits  
7  
8 subjected to MV overreacted to one TLR2 agonist and to heat-killed *S. aureus* as well. However,  
9  
10 blocking TLR2 with a specific monoclonal antibody did not completely abrogate the release of  
11  
12 IL-8 in this setting, in contrast with TNF- $\alpha$  which concentrations dramatically fell until reaching  
13  
14 levels near from baseline values.  
15  
16

17  
18  
19 Altogether, these data suggest that the activation of pathways different from TLRs could  
20  
21 also be involved, accounting thereby for the overwhelming and protracted systemic inflammatory  
22  
23 response we measured in animals with both MV and pneumonia. Indeed, we could hypothesize  
24  
25 that in the context of *S. aureus* pneumonia, other pro-inflammatory signals are released in much  
26  
27 larger amounts into the blood compartment of animals subjected to MV than in SB ones. These  
28  
29 could be alarmins, released by the injured lung and likely to activate the host response through  
30  
31 the inflammasome. Interestingly, as previously described, each pathway could drive the  
32  
33 production of different inflammatory mediators. Indeed, IL-8 and TNF- $\alpha$  behaved differently in  
34  
35 our *ex vivo* experiments when TLR2 was blocked, suggesting that IL-8 production did not depend  
36  
37 on the TLR2 pathway alone.  
38  
39  
40  
41

42  
43 In addition, a recently published study showed that if “primed” PMNs crossed the  
44  
45 alveolo-capillary barrier, they were “deprimed” thereafter as leaving the pulmonary circulation,  
46  
47 provided the lungs were healthy [42]. In contrast, the authors observed that in ARDS patients,  
48  
49 this depriming process was impaired, thus leading in turn to the circulation of activated  
50  
51 inflammatory cells toward extra-pulmonary organs. Of course, further experiments are necessary  
52  
53 to clarify these issues. It is worth noting for instance that the PMN activation profile was not  
54  
55 assessed in the present study.  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 Nevertheless, our data suggest that in addition to the lung, the systemic compartment was likely  
5  
6 to overreact to microbial challenge, thus accounting, at least in part, for the greater degree of  
7  
8 inflammation measured in MV animals.  
9

10  
11 Several limitations of our study should be mentioned. First, the “mild stretch” ventilation  
12  
13 without PEEP we used could be considered as non-clinically relevant. However, it has recently  
14  
15 been reported that such settings were still used, especially in the operating room [44]. In addition,  
16  
17 it is known that lung injury is heterogeneous in ARDS patients. As a result, poorly aerated areas  
18  
19 of the lung usually coexist with overstretched ones, even if “low- $V_T$ ” (i.e., 6 mL per ideal body  
20  
21 weight) is applied, as shown in human studies [45]. Although cautiously, one could assume that  
22  
23 such parts of the lung may react as described in the present study if bacterial challenge with *S.*  
24  
25 *aureus* occurred in patients subjected to MV. Second, TLR2 assessment was limited to gene  
26  
27 expression. We cannot therefore draw any strong conclusions regarding this point since the  
28  
29 corresponding protein was not measured directly within the lung or the spleen. Moreover, it is  
30  
31 uncertain whether epithelial cells, macrophages or PMNs expressed TLR2 the most. We should  
32  
33 also acknowledge that by using SB animals as controls, lung stretch was not the only factor  
34  
35 evaluated. Actually, one cannot exclude the possibility that other mechanisms, such as impaired  
36  
37 airway drainage, could account, at least in part, for the lower bacterial clearance rate we report  
38  
39 here. However, we have previously published data showing that when mild-stretch MV was  
40  
41 compared with low-stretch MV in a Gram-negative bacteria VAP model, the latter strategy was  
42  
43 likely to favour the host regarding this point [30]. Further experimental studies are therefore  
44  
45 needed.  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

54  
55 Even although the first experimental evidence of VILI was published 40 years ago [46],  
56  
57 the so-called lung-protective MV settings became the recommended standard of care only in the  
58  
59 early 2000s thanks to the ARDS network publication [47]. This strategy thus remains restricted  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4 to patients with ARDS. However, most preclinical studies showed that MV using low tidal  
5  
6 volumes was likely to dampen the injurious effects of MV in animals with previously healthy  
7  
8 lungs [48, 49]. Today, there is growing evidence that the use of lower tidal volumes also benefits  
9  
10 patients who do not have obvious lung injury. In a recent meta-analysis, some authors showed a  
11  
12 significantly lower incidence of pulmonary infection with the use of lung-protective ventilation  
13  
14 with lower tidal volumes [50]. Others showed a reduction in major pulmonary complications  
15  
16 requiring MV (i.e. pneumonia) with lung-protective MV in patients who underwent major  
17  
18 abdominal surgery [51]. Finally, despite the growing knowledge in this field, up to 16% of  
19  
20 patients continue to receive non-protective ventilation in the operating room [44]. Altogether,  
21  
22 these data strongly suggest that MV-related lung-stretch could be harmful, even if applied to  
23  
24 apparently healthy tissue, maybe because of an increased risk of severe pneumonia if the airways  
25  
26 are challenged with bacteria. Our findings thus send a word of warning to physicians who deal  
27  
28 with mechanically ventilated patients, especially if these patients develop bacterial pneumonia.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37

### 38 **Conclusions**

39  
40 In a rabbit model of *S. aureus* VAP, we showed that mild-stretch MV was likely to impair lung  
41  
42 bacterial clearance, hasten tissue injury, and promote a systemic inflammatory response. TLR2  
43  
44 overexpression in both pulmonary and peripheral blood may play a role, but other factors likely  
45  
46 to drive such overwhelming inflammation should be sought.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## References

1. Torres A, Ewig S, Lode H, Carlet J: **Defining, treating and preventing hospital acquired pneumonia: European perspective.** *Intensive Care Med* 2009, **35**(1):9-29.
2. Chastre J, Fagon JY: **Ventilator-associated pneumonia.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **165**(7):867-903.
3. Bouadma L, Mourvillier B, Deiler V, Le Corre B, Lolom I, Regnier B, Wolff M, Lucet JC: **A multifaceted program to prevent ventilator-associated pneumonia: impact on compliance with preventive measures.** *Crit Care Med* 2010, **38**(3):789-796.
4. Mourgeon E, Isowa N, Keshavjee S, Zhang X, Slutsky AS, Liu M: **Mechanical stretch stimulates macrophage inflammatory protein-2 secretion from fetal rat lung cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **279**(4):L699-706.
5. Xiang M, Fan J: **Pattern recognition receptor-dependent mechanisms of acute lung injury.** *Mol Med* 2010, **16**(1-2):69-82.
6. Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A: **Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2.** *Science* 1999, **285**(5428):736-739.
7. Rubinstein E, Kollef MH, Nathwani D: **Pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** *Clin Infect Dis* 2008, **46 Suppl 5**:S378-385.
8. Droemann D, Goldmann T, Branscheid D, Clark R, Dalhoff K, Zabel P, Vollmer E: **Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung.** *Histochem Cell Biol* 2003, **119**(2):103-108.

- 1  
2  
3  
4 9. Elson G, Dunn-Siegrist I, Daubeuf B, Pugin J: **Contribution of Toll-like receptors to**  
5 **the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria.** *Blood*  
6 2007, **109**(4):1574-1583.  
7  
8
- 9  
10  
11 10. Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, Tobias PS: **Toll-like receptor 4 functions**  
12 **intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14**  
13 **in mediating LPS responses.** *Faseb J* 2004, **18**(10):1117-1119.  
14  
15
- 16  
17 11. Slutsky AS, Tremblay LN: **Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a**  
18 **contributing factor?** *Am J Respir Crit Care Med* 1998, **157**(6 Pt 1):1721-1725.  
19  
20
- 21  
22 12. Oudin S, Pugin J: **Role of MAP kinase activation in interleukin-8 production by**  
23 **human BEAS-2B bronchial epithelial cells submitted to cyclic stretch.** *Am J Respir*  
24 *Cell Mol Biol* 2002, **27**(1):107-114.  
25  
26
- 27  
28 13. Murphy DB, Cregg N, Tremblay L, Engelberts D, Laffey JG, Slutsky AS, Romaschin A,  
29 Kavanagh BP: **Adverse ventilatory strategy causes pulmonary-to-systemic**  
30 **translocation of endotoxin.** *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **162**(1):27-33.  
31  
32
- 33  
34 14. Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, O'Mahony DS, Glenny RW, Martin TR,  
35 Liles WC: **Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-**  
36 **pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia.** *Lab Invest* 2006,  
37 **86**(8):790-799.  
38  
39
- 40  
41 15. Bregeon F, Delpierre S, Chetaille B, Kajikawa O, Martin TR, Autillo-Touati A, Jammes  
42 Y, Pugin J: **Mechanical ventilation affects lung function and cytokine production in**  
43 **an experimental model of endotoxemia.** *Anesthesiology* 2005, **102**(2):331-339.  
44  
45
- 46  
47 16. Vaneker M, Joosten LA, Heunks LM, Snijdelaar DG, Halbertsma FJ, van Egmond J,  
48 Netea MG, van der Hoeven JG, Scheffer GJ: **Low-tidal-volume mechanical ventilation**  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**induces a toll-like receptor 4-dependent inflammatory response in healthy mice.**

*Anesthesiology* 2008, **109**(3):465-472.

17. Villar J, Cabrera N, Casula M, Flores C, Valladares F, Muros M, Blanch L, Slutsky AS, Kacmarek R: **Mechanical ventilation modulates Toll-like receptor signaling pathway in a sepsis-induced lung injury model.** *Intensive Care Med* 2010, **in press**.
18. Altmeier WA, Matute-Bello G, Frevert CW, Kawata Y, Kajikawa O, Martin TR, Glenny RW: **Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, **287**(3):L533-542.
19. Charles PE, Tissieres P, Barbar SD, Croisier D, Dufour J, Dunn-Siegrist I, Chavanet P, Pugin J: **Mild-stretch mechanical ventilation up-regulates toll-like receptor 2 and sensitizes the lung to bacterial lipopeptide.** *Crit Care* 2011, **15**(4):R181.
20. National Research Council (U.S.). Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals., Institute for Laboratory Animal Research (U.S.), National Academies Press (U.S.): **Guide for the care and use of laboratory animals**, 8th edn. Washington, D.C.: National Academies Press; 2011.
21. Walsh TJ, Bacher J, Pizzo PA: **Chronic silastic central venous catheterization for induction, maintenance and support of persistent granulocytopenia in rabbits.** *Laboratory animal science* 1988, **38**(4):467-471.
22. Charles PE, Piroth L, Desbiolles N, Lequeu C, Martin L, Portier H, Chavanet P: **New model of ventilator-associated pneumonia in immunocompetent rabbits.** *Crit Care Med* 2002, **30**(10):2278-2283.
23. Charles PE, Etienne M, Croisier D, Piroth L, Lequeu C, Pugin J, Portier H, Chavanet P: **The impact of mechanical ventilation on the moxifloxacin treatment of experimental**



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**pneumonia caused by Streptococcus pneumoniae.** *Crit Care Med* 2005, **33**(5):1029-1035.

24. Kajikawa O, Frevert CW, Lin SM, Goodman RB, Mongovin SM, Wong V, Ballman K, Daubeuf B, Elson G, Martin TR: **Gene expression of Toll-like receptor-2, Toll-like receptor-4, and MD2 is differentially regulated in rabbits with Escherichia coli pneumonia.** *Gene* 2005, **344**:193-202.

25. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.

26. Broccard A, Shapiro RS, Schmitz LL, Adams AB, Nahum A, Marini JJ: **Prone positioning attenuates and redistributes ventilator-induced lung injury in dogs.** *Crit Care Med* 2000, **28**(2):295-303.

27. Elson G: **Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response to Gram-negative and Gram-positive bacteria.** *Blood* 2007 Feb 15;109(4):1574-83. Epub 2006 Oct 12..

28. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD, 2nd, Kreisel D, Krupnick AS *et al*: **Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure.** *Jama* 2011, **306**(23):2594-2605.

29. Charles PE, Martin L, Etienne M, Croisier D, Piroth L, Lequeu C, Pugin J, Portier H, Chavanet P: **Influence of positive end-expiratory pressure (PEEP) on histopathological and bacteriological aspects of pneumonia during low tidal volume mechanical ventilation.** *Intensive Care Med* 2004, **30**(12):2263-2270.

30. Ladoire S, Pauchard LA, Barbar SD, Tissieres P, Croisier-Bertin D, Charles PE: **Impact of the Prone Position in an Animal Model of Unilateral Bacterial Pneumonia Undergoing Mechanical Ventilation.** *Anesthesiology* 2013.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
31. Wunderink RG, Niederman MS, Kollef MH, Shorr AF, Kunkel MJ, Baruch A, McGee WT, Reisman A, Chastre J: **Linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a randomized, controlled study.** *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012, **54**(5):621-629.
  32. Schortgen F, Bouadma L, Joly-Guillou ML, Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G: **Infectious and inflammatory dissemination are affected by ventilation strategy in rats with unilateral pneumonia.** *Intensive Care Med* 2004, **30**(4):693-701.
  33. Luna CM, Videla A, Mattera J, Vay C, Famiglietti A, Vujacich P, Niederman MS: **Blood cultures have limited value in predicting severity of illness and as a diagnostic tool in ventilator-associated pneumonia.** *Chest* 1999, **116**(4):1075-1084.
  34. Magret M, Lisboa T, Martin-Loeches I, Manez R, Nauwynck M, Wrigge H, Cardellino S, Diaz E, Koulenti D, Rello J: **Bacteremia is an independent risk factor for mortality in nosocomial pneumonia: a prospective and observational multicenter study.** *Crit Care* 2011, **15**(1):R62.
  35. Christaki E, Giamarellos-Bourboulis EJ: **The complex pathogenesis of bacteremia: from antimicrobial clearance mechanisms to the genetic background of the host.** *Virulence* 2014, **5**(1):57-65.
  36. Croisier-Bertin D, Hayez D, Da Silva S, Labrousse D, Biek D, Badiou C, Dumitrescu O, Guerard P, Charles PE, Piroth L *et al*: **In vivo efficacy of ceftaroline fosamil in a methicillin-resistant panton-valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* rabbit pneumonia model.** *Antimicrob Agents Chemother* 2014, **58**(4):1855-1861.
  37. Valenza F, Guglielmi M, Irace M, Porro GA, Sibilla S, Gattinoni L: **Positive end-expiratory pressure delays the progression of lung injury during ventilator strategies**

1  
2  
3  
4 involving high airway pressure and lung overdistention. *Crit Care Med* 2003,  
5  
6 31(7):1993-1998.  
7

- 8  
9  
10 38. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS: **Injurious ventilatory strategies**  
11 **increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model.** *J Clin*  
12 *Invest* 1997, **99**(5):944-952.  
13  
14  
15 39. Hillman NH, Moss TJ, Kallapur SG, Bachurski C, Pillow JJ, Polglase GR, Nitsos I,  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000
38. 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, **99**(5):944-952.
39. Hillman NH, Moss TJ, Kallapur SG, Bachurski C, Pillow JJ, Polglase GR, Nitsos I, Kramer BW, Jobe AH: **Brief, large tidal volume ventilation initiates lung injury and a systemic response in fetal sheep.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **176**(6):575-581.
40. Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G: **Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **163**(5):1176-1180.
41. Hilmi D, Parcina M, Stollewerk D, Ostrop J, Josten M, Meilaender A, Zaehring U, Wichelhaus TA, Bierbaum G, Heeg K *et al*: **Heterogeneity of Host TLR2 Stimulation by Staphylococcus aureus Isolates.** *PLoS One* 2014, **9**(5):e96416.
42. Summers C, Singh NR, White JF, Mackenzie IM, Johnston A, Solanki C, Balan KK, Peters AM, Chilvers ER: **Pulmonary retention of primed neutrophils: a novel protective host response, which is impaired in the acute respiratory distress syndrome.** *Thorax* 2014, **69**(7):623-629.
43. Kuipers MT, van der Poll T, Schultz MJ, Wieland CW: **Bench-to-bedside review: Damage-associated molecular patterns in the onset of ventilator-induced lung injury.** *Crit Care* 2011, **15**(6):235.
44. Hess DR, Kondili D, Burns E, Bittner EA, Schmidt UH: **A 5-year observational study of lung-protective ventilation in the operating room: a single-center experience.** *J Crit Care* 2013, **28**(4):533 e539-515.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

45. Terragni PP, Rosboch G, Tealdi A, Corno E, Menaldo E, Davini O, Gandini G, Herrmann P, Mascia L, Quintel M *et al*: **Tidal hyperinflation during low tidal volume ventilation in acute respiratory distress syndrome.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **175**(2):160-166.
46. 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**(5):556-565.
47. **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**(18):1301-1308.
48. Serpa Neto A, Simonis FD, Barbas CS, Biehl M, Determann RM, Elmer J, Friedman G, Gajic O, Goldstein JN, Horn J *et al*: **Association between tidal volume size, duration of ventilation, and sedation needs in patients without acute respiratory distress syndrome: an individual patient data meta-analysis.** *Intensive Care Med* 2014, **40**(7):950-957.
49. Serpa Neto A, Nagtzaam L, Schultz MJ: **Ventilation with lower tidal volumes for critically ill patients without the acute respiratory distress syndrome: a systematic translational review and meta-analysis.** *Curr Opin Crit Care* 2014, **20**(1):25-32.
50. Serpa Neto A, Cardoso SO, Manetta JA, Pereira VG, Esposito DC, Pasqualucci Mde O, Damasceno MC, Schultz MJ: **Association between use of lung-protective ventilation with lower tidal volumes and clinical outcomes among patients without acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis.** *Jama* 2012, **308**(16):1651-1659.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

51. Futier E, Constantin JM, Paugam-Burtz C, Pascal J, Eurin M, Neuschwander A, Marret E, Beaussier M, Gutton C, Lefrant JY *et al*: **A trial of intraoperative low-tidal-volume ventilation in abdominal surgery.** *N Engl J Med* 2013, **369**(5):428-437.

## FIGURE LEGENDS

### Fig. 1. Lung injury main features according to the experimental condition.

Six representative light microphotographs of rabbit lungs in various conditions fixed at the same transpulmonary pressure (hematoxylin and eosin x400): (A) spontaneously breathing (SB) healthy rabbit (SB); (B) healthy rabbits submitted to a 32-hours mechanical ventilation (MV); (C) SB rabbits 8 hours after tracheal instillation of  $10^9$  CFU of *Staphylococcus aureus*; (D) MV rabbits 8 hours after tracheal instillation of  $10^9$  CFU of bacteria; (E) SB rabbits 24 hours after tracheal instillation of  $10^9$  CFU of *S. aureus*; (F) MV rabbits 24 hours after tracheal instillation of  $10^9$  CFU of *S. aureus*.

We observed interalveolar septa thickened by an interstitial cell infiltrate and several alveoli collapsed mainly in the MV groups (B, D, F).

### Fig. 2. Histologic score according to the experimental condition

Histologic score ranging from 0 to 3, based on the degree of PMN infiltration, haemorrhage, and oedema in the interstitial and alveolar spaces, following tracheal instillation of saline (controls) (n=5) or of  $10^9$  CFU of *S. aureus* in either spontaneously breathing (SB) rabbits or animals subjected to mild stretch mechanical ventilation (MV). After bacterial challenge animals were under MV for 8 hours (n = 5) and 24 hours (n=10). The histologic score was higher under MV; \*\* denotes  $p \leq 0.010$ .

Controls SB vs MV  $p=0.002$ ; Mann-Whitney U test, one-tailed

*S. aureus* pneumonia SB vs MV 8 hours  $p=0.007$ ; Mann-Whitney U test, one-tailed

*S. aureus* pneumonia SB vs MV 24 hours  $p=0.113$ ; Mann-Whitney U test, one-tailed

### Fig. 3. Pulmonary and systemic bacterial burden of *S. aureus*.

#### (3A) *S. aureus* lung concentrations 8 and 24 hours after bacteria instillation.

Pulmonary bacterial burden according to the experimental group in either spontaneously breathing (SB + *S. aureus*) or mechanically ventilated (MV + *S. aureus*) animals with *Staphylococcus aureus* pneumonia 8 hours after inoculation (n = 5 in each group) and 24 hours after inoculation (n = 10 in each group). The bacterial burden was higher in the MV group both after 8 hours ( $5.00 \pm 1.03$  vs.  $5.87 \pm 0.38$  CFU/g,  $p=0.028$ ) and 24 hours of MV ( $4.96 \pm 1.31$  vs.  $6.13 \pm 0.63$  CFU/g,  $p=0.002$ ).

#### (3B) *S. aureus* spleen concentrations 8 and 24 hours after bacteria instillation.

Spleen bacterial burden according to the experimental group in either spontaneously breathing (SB + *S. aureus*) or mechanically ventilated (MV + *S. aureus*) animals with *Staphylococcus aureus* pneumonia (n = 4 in each group). Interestingly, MV appears to promote early pulmonary-to-systemic translocation during *S. aureus* pneumonia, as indicated by the quantitative spleen cultures, as an indirect marker of bacteraemia, which were positive only in ventilated animals at 8H, even though there was no longer any difference at 24H ( $1.48 \pm 0.66$  vs.  $1.47 \pm 0.82$  CFU/g,  $p=0.44$ ).

Lung *S. aureus* concentrations SB vs MV 8 hours  $p=0.028$ ; Mann-Whitney U test, one-tailed

Lung *S. aureus* concentrations SB vs MV 24 hours  $p=0.0025$ ; Mann-Whitney U test, one-tailed

Spleen *S. aureus* concentrations SB vs MV 8 hours  $p=0.25$ ; Wilcoxon test, one-tailed

Spleen *S. aureus* concentrations SB vs MV 24 hours  $p=0.44$ ; Wilcoxon test, one-tailed

### Fig. 4. Lung bacterial clearance

Pulmonary bacterial clearance expressed as a percentage of the reduction of Log CFU in either spontaneously breathing (SB + *S. aureus*) or mechanically ventilated (MV + *S. aureus*) animals with *Staphylococcus aureus* pneumonia (n = 15 in each group).

### Fig. 5. Inflammatory cytokine gene expression in the lung

#### (5A) IL-8 mRNA expression in the lung

Inflammatory cytokine IL-8 gene expression in lung homogenates following tracheal instillation of saline (controls) or of  $10^9$  CFU of *S. aureus* (+*S. aureus*) in either spontaneously breathing (SB) rabbits or animals subjected to mild-stretch mechanical ventilation (MV) (n = 5 in each group). All values are reported as fold increase compared with SB rabbits. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. IL-8 gene expression was increased under MV in all groups, \*denotes  $p \leq 0.05$ .

Controls SB vs MV  $p=0.031$ , Wilcoxon test, one-tailed

*S.aureus* SB vs MV  $p=0.312$ , Wilcoxon test, one-tailed

#### **(5B) TNF- $\alpha$ mRNA expression in the lung**

Inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  gene expression in lung homogenates following tracheal instillation of saline (controls) or of  $10^9$  CFU of *S. aureus* (+*S. aureus*) in either spontaneously breathing (SB) rabbits or animals subjected to mild-stretch mechanical ventilation (MV) ( $n = 5$  in each group). All values are reported as fold increases compared with SB rabbits. Results are expressed as mean $\pm$ SD.

Controls SB vs MV  $p=0.062$ , Wilcoxon test, one-tailed

#### **Fig. 6. Inflammatory cytokines in the lung**

Inflammatory cytokines (IL-8 and TNF- $\alpha$ ) in lung homogenates and in BALF following tracheal instillation of saline (controls) and of  $10^9$  CFU of *S. aureus* (+SA 8H and +SA 24H) in either spontaneously breathing (SB) rabbits ( $n=5$ ) or animals subjected to mild-stretch mechanical ventilation (MV) for 8 hours ( $n=5$ ) or for 24 hours ( $n=10$ ).

IL-8 levels were increased in lung homogenates ( $135.5\pm 11.3$  vs.  $823.6\pm 544.1$ ,  $p=ns$ ) and in BALF ( $71.82\pm 21.80$  vs.  $189.22\pm 83.92$ ,  $p=0.010$ ) under MV in controls, but we did not find any significant difference between SB and MV groups after bacterial challenge.

Similarly, TNF- $\alpha$  levels were increased in lung homogenates ( $150.5\pm 24.3$  vs.  $533.1\pm 198.8$ ,  $p=0.001$ ) under MV in controls, but not after bacterial challenge.

\*\* Denotes  $p\leq 0.01$ . ND: concentration below the limits of detection of the assay.

#### **Fig. 7. Time course of mean serum inflammatory cytokine concentrations during experiment.**

Serum concentrations of IL-8 (Fig 7A) and TNF- $\alpha$  (Fig 7B) measured by enzyme-linked immune-sorbent assay at baseline, just before intra-tracheal instillation of  $10^9$  CFU of *S. aureus*, in the spontaneously breathing (SB+*S.aureus*) and the mechanically ventilated (MV+*S.aureus*) animals, and then 1, 2, 4, 8, 12, 18 and 24 h after instillation ( $n=15$ ). Significant changes over time in each group were assessed by repeated-measures analysis of variance followed by the *post hoc* Bonferroni multiple comparison test when significance was reached.

\*Denotes significantly different values as assessed by the post-analysis of variance comparisons between MV groups versus SB groups at the same time ( $p\leq 0.010$ ). ns: not significant.

#### **Fig 8. Inflammatory cytokines in whole blood stimulated *ex vivo* by either the TLR2 agonist Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, or *S. aureus***

Interleukin-8 and TNF- $\alpha$  levels in total blood stimulated *ex vivo* by Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (Fig 8A) or *S. aureus* (Fig 8B) in either spontaneously breathing (SB) rabbits or animals subjected to mild-stretch mechanical ventilation (MV) ( $n=10$  in the SB group,  $n = 5$  in the other groups), with or without the anti-TLR2 monoclonal antibody T2.5.

Interleukin-8 levels were not significantly greater in blood obtained from rabbits under MV than in controls ( $p=0.392$ ) but the difference reached statistical significance after stimulation by Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> ( $p=0.032$ ) and *S. aureus* as well ( $p=0.030$ ). Similarly, TNF- $\alpha$  levels were not significantly higher in blood taken from MV animals than in blood from SB animals ( $p=0.075$ ). In contrast, Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> stimulation led to the release of significantly larger amounts of TNF- $\alpha$  in the MV than in the SB group ( $p=0.030$ ), as did *S. aureus* stimulation ( $p=0.050$ ).

Although TLR2 blockade by T2.5 Mab did not abrogate the release of inflammatory mediators by the whole blood obtained from either SB or MV animals after Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> stimulation, TNF- $\alpha$  but not IL-8 release reached baseline values when Mab was added to media prior to *S. aureus* stimulation.

One-tailed Mann-Whitney U-test. \* Denotes  $p<0.05$  between SB and MV animals.

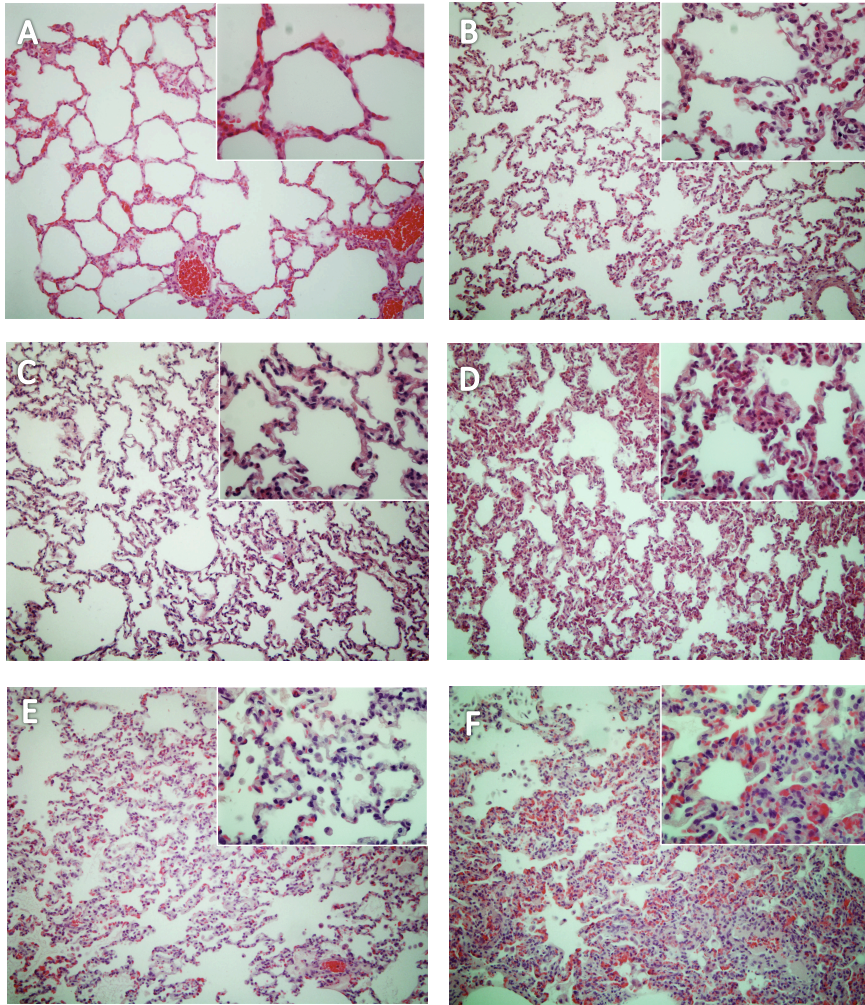


Figure 1



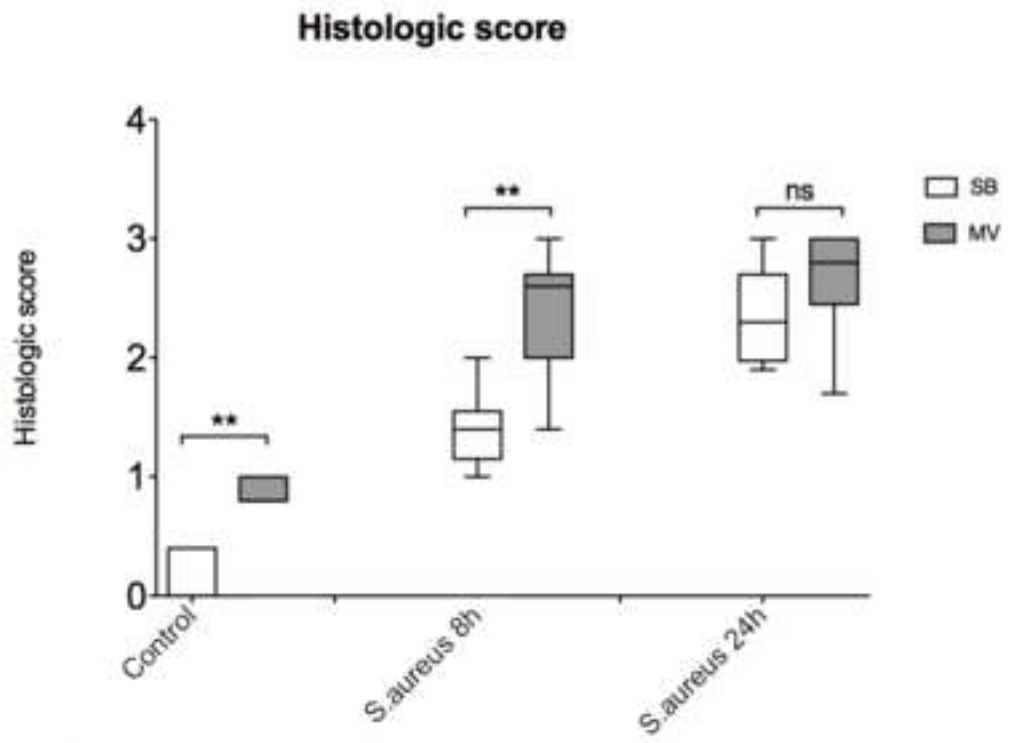


Figure 2.



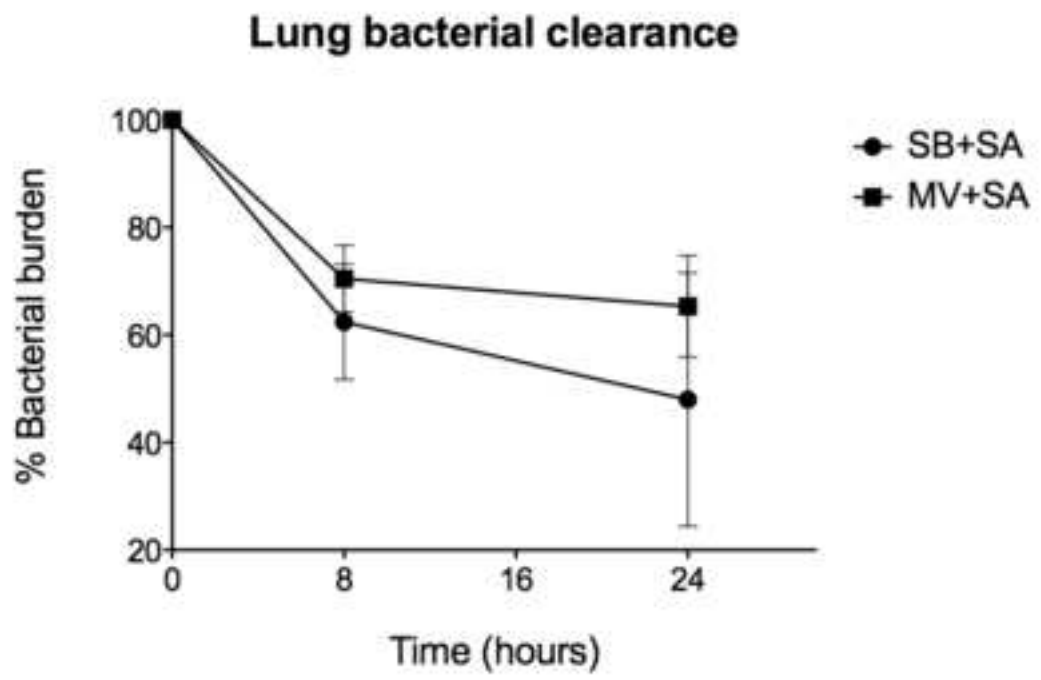


Figure 4.

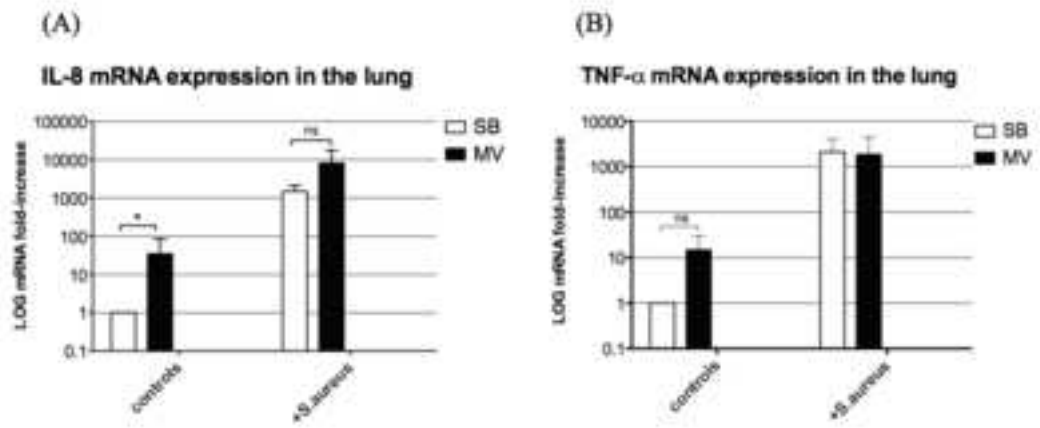
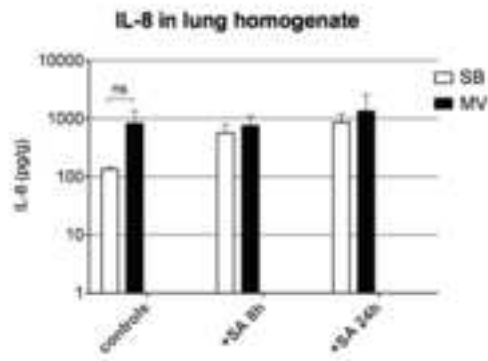
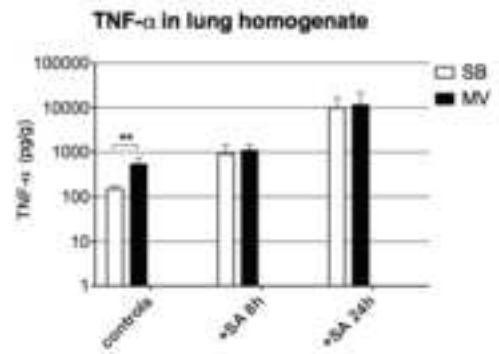


Figure 5.

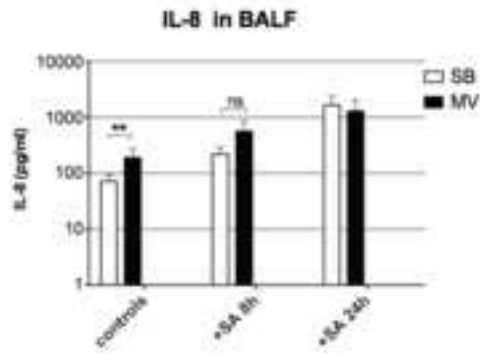
(A)



(B)



(C)



(D)

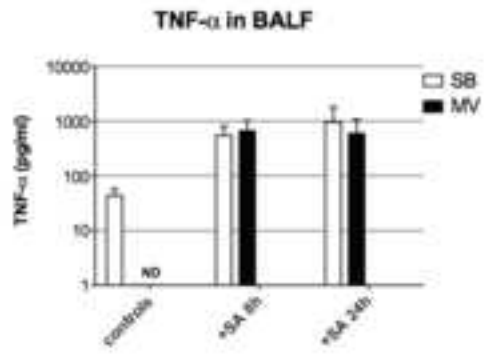


Figure 6.

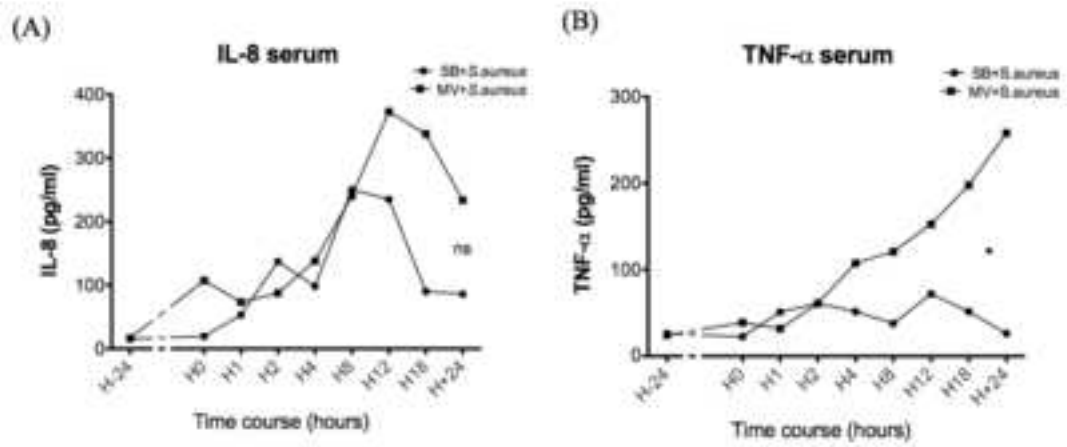
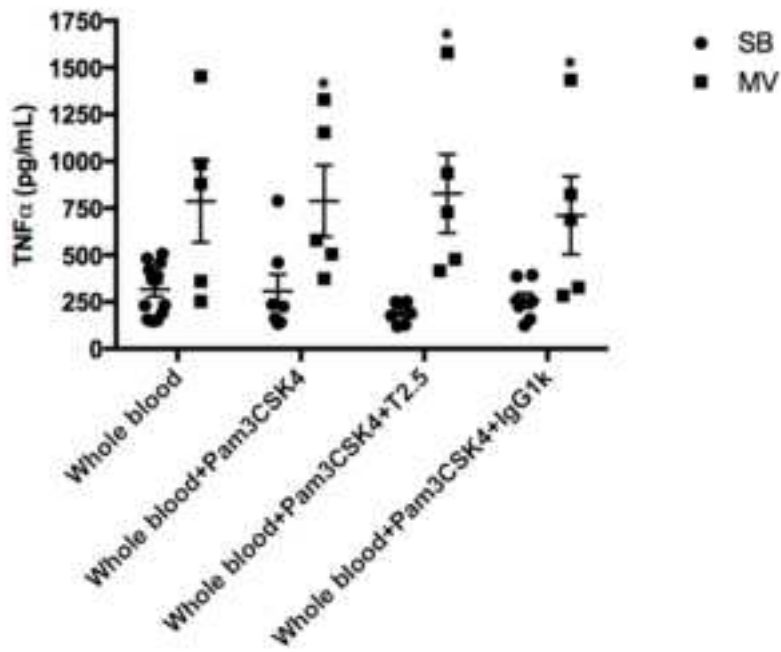
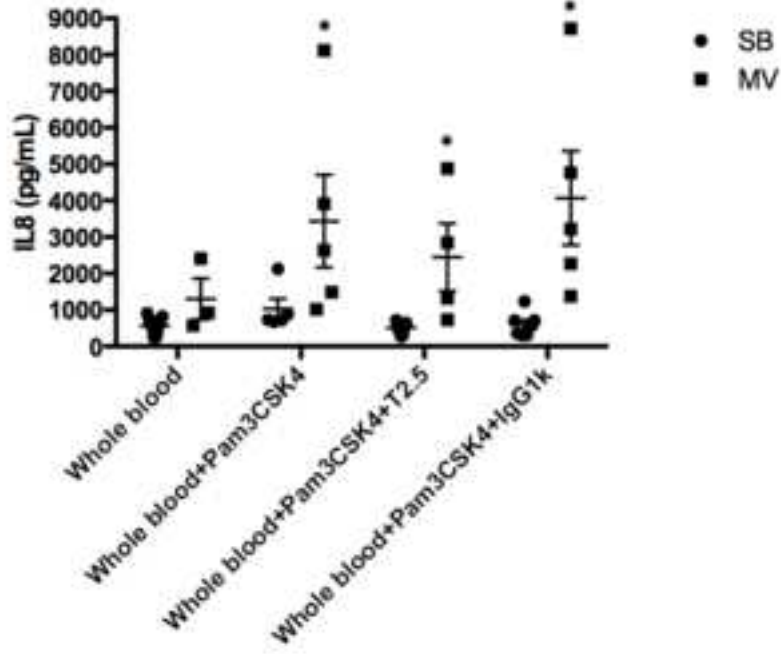
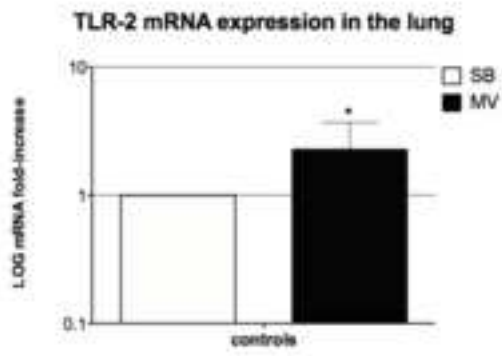


Figure 7.

(A)



(A)



(B)

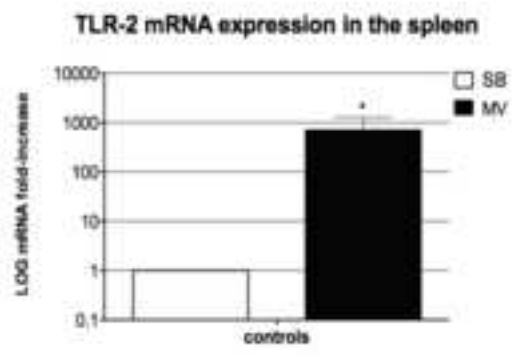


Figure 9.



## Conclusion

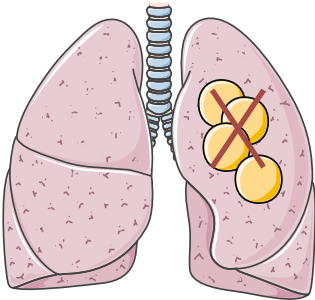
Le but de ce travail, en lien direct avec nos précédents résultats sur la surexpression de TLR2 dépendant de l'étirement, était d'investiguer en quoi la VM pouvait altérer la réponse immunitaire et inflammatoire à SARM dans un modèle de PAVM chez le lapin.

Les résultats mis à jour suite à ces travaux sont les suivants :

- ✓ Un étirement cyclique modéré par la VM diminuerait la clairance bactérienne et faciliterait la translocation systémique des bactéries durant la pneumonie.
- ✓ Une VM modérément agressive aggraverait les dommages sur le poumon incluant une infiltration des PNN, sans toutefois augmenter la libération locale des médiateurs inflammatoires dont l'IL-8.
- ✓ La VM exacerbe la réponse inflammatoire systémique. La surexpression de TLR2 ne peut pas être le seul mécanisme responsable.

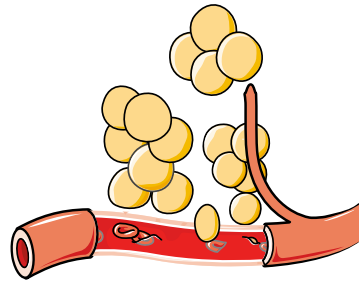
Etirement cyclique modéré par la ventilation mécanique

Diminue



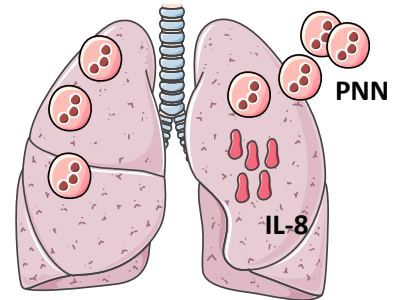
Clairance bactérienne pulmonaire

Facilite



Translocation systémique de SARM

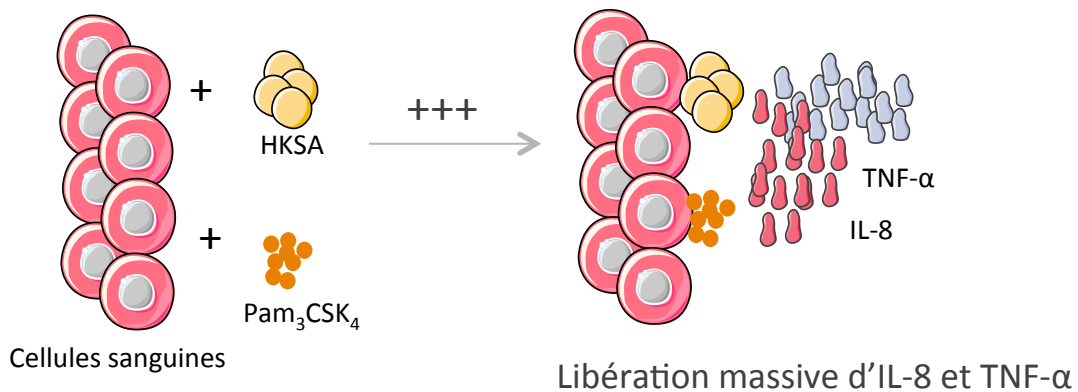
Aggrave les dommages pulmonaires



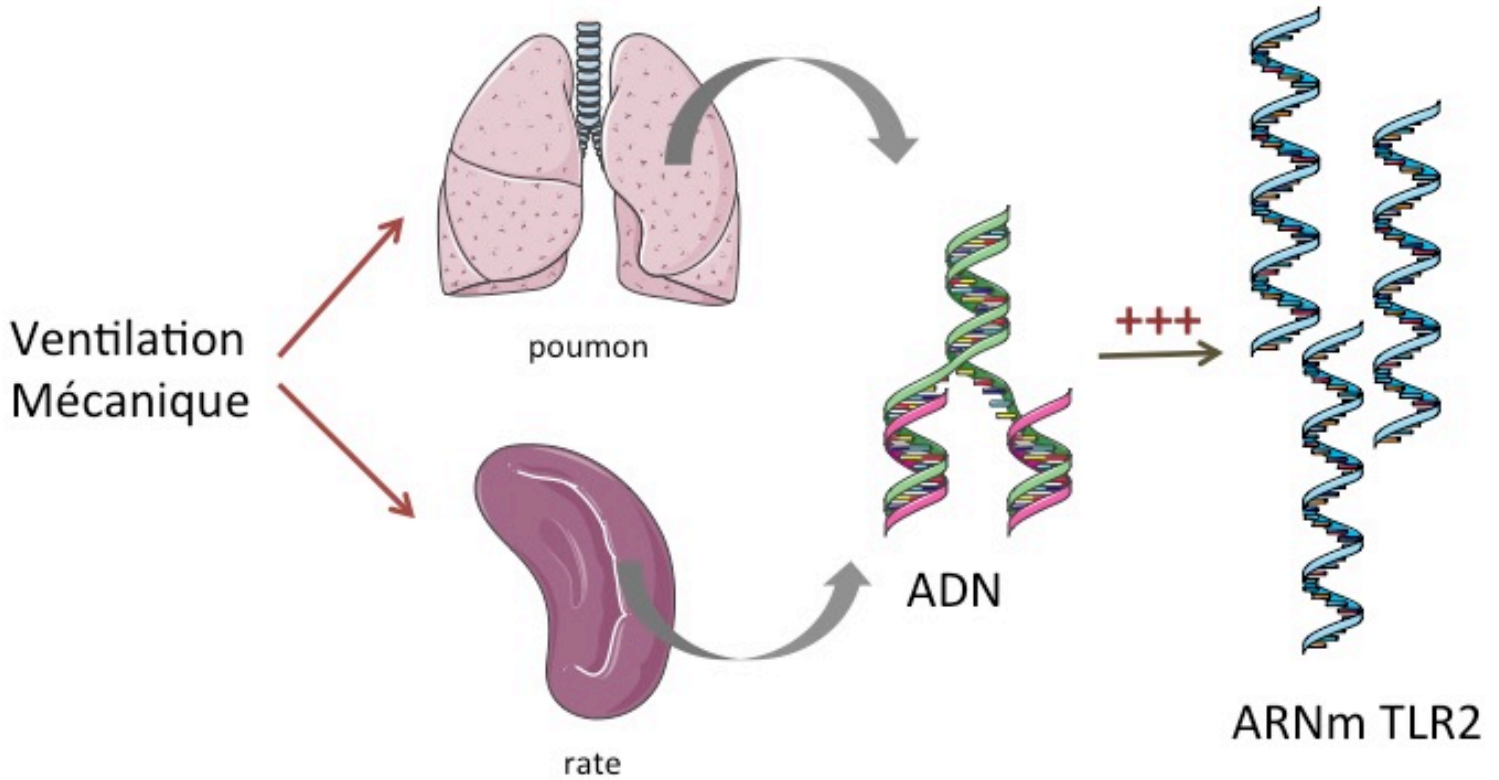
Augmentation infiltration PNN mais sans augmentation locale de l'IL-8

Stimulation *ex vivo* de sang de lapins ventilés par le HKSA ou le Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>

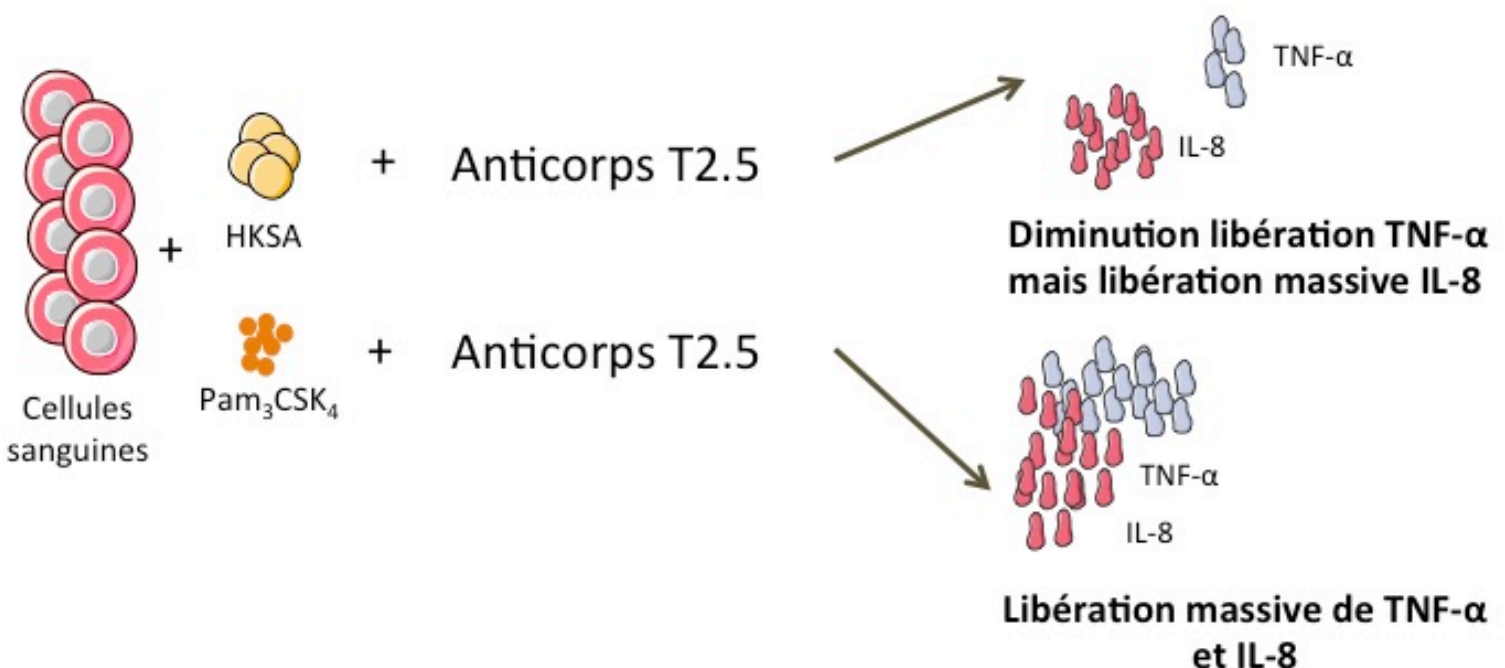
Exacerbe la réponse inflammatoire systémique



Expression *tlr2* augmentée par la ventilation mécanique dans le poumon et la rate



Blocage *ex vivo* de TLR2 dans le sang d'animaux ventilés mécaniquement



### III. Article 3

#### **« Impact of prior exposure to Atorvastatin on Linezolid efficacy in a rabbit model of ventilator-associated pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* »**

Ce projet s'inscrit dans la continuité du précédent travail. Il nous a permis d'évaluer quel pouvait être l'impact d'une exposition aux statines sur l'efficacité du linézolide dans un modèle de PAVM à SARM chez le lapin.

Les expériences ont été menées dans le même modèle animal que l'étude précédente portant sur l'impact de la ventilation sur le développement d'une pneumonie à *S. aureus*. Les lapins ont été intubés ventilés selon les mêmes paramètres de ventilation (VT= 12mL/Kg, PEEP= 0 cmH<sub>2</sub>O et FiO<sub>2</sub>= 50%). La pneumonie a été induite via l'instillation de SARM dans les voies aériennes des animaux en respiration spontanée ou sous ventilation mécanique, après qu'ils aient reçu une fois par jour pendant 3 jours, de l'atorvastatine ou un placebo. Ils ont ensuite été traités ou non par linézolide. Après 24 heures de pneumonie, nous avons évalué la charge bactérienne pulmonaire et systémique, les lésions pulmonaires et les niveaux d'inflammation pulmonaires. Les concentrations plasmatiques en cytokines inflammatoires IL-8 et TNF- $\alpha$  ont également été évaluées à différents temps.

Nos données suggèrent qu'une pré-exposition aux statines ne modifie pas la clairance bactérienne dans le poumon dans notre modèle (Figure 1A) mais en revanche elle faciliterait la translocation systémique des SARM chez les animaux ventilés malgré l'administration concomitante du linézolide dont l'efficacité n'est donc pas améliorée (Figure 1B). Des lésions plus importantes du tissu pulmonaire chez les animaux sous VM ayant reçu une prémedication aux statines sans antibiotique par la suite corroborent ces résultats (Figure 2A et 2B).

Une élévation des concentrations pulmonaires en médiateurs inflammatoires chez les animaux SB et VM atteste du développement de la pneumonie. L'antibiothérapie atténue les écarts de concentrations en TNF- $\alpha$  entre les animaux du groupe SB et VM alors que les concentrations en IL-8 atteignent des niveaux bien plus élevés chez les lapins VM en comparaison aux lapins SB (Figure 3). La pré-exposition aux statines, en dehors de toute antibiothérapie, suffit à elle seule à diminuer l'inflammation dans le poumon des animaux en terme de TNF- $\alpha$ . En revanche elle ne potentialise pas l'effet anti-inflammatoire du linezolide dans le poumon sauf pour l'IL-8 chez les animaux sous VM.

Les concentrations sériques en TNF- $\alpha$  sont significativement plus élevées chez les animaux ventilés avec une pneumonie non traitée en comparaison aux animaux SB, 8 heures ou 24 heures après l'administration des bactéries (Figure 4B). Statines et linezolide seuls ou en association n'ont aucun effet sur les concentrations sériques en TNF- $\alpha$  et IL-8 chez les animaux SB (Figure 4A) mais diminuent celles chez les lapins ventilés (Figure 4B). Le pré-traitement aux statines potentialise l'effet anti-inflammatoire du linezolide sur les concentrations en TNF- $\alpha$  (Figure 4B) mais pas sur celles en IL-8 (Figure 4A).

Les valeurs de concentrations en cytokines obtenues dans la rate corroborent les résultats précédents puisqu'elles montrent des niveaux significativement plus bas en IL-8 chez les animaux SB traités au linezolide (en comparaison aux témoins non traités) alors qu'aucune différence n'est observée pour le TNF- $\alpha$  (Figure 5). Dans le groupe des animaux ventilés, que le linezolide soit administré ou non, des niveaux similaires en IL-8 et TNF- $\alpha$  sont retrouvés. Les niveaux en IL-8 et TNF- $\alpha$  sont significativement plus bas dans la rate des lapins SB avec une pneumonie traitée par linezolide que chez ceux du groupe ventilé. Sans antibiothérapie associée, le pré-traitement aux statines diminue significativement les concentrations d'IL-8 dans la rate des animaux SB (en comparaison au groupe non traité) ce qui n'est pas le cas chez les animaux ventilés. En revanche, aucune différence significative n'est observée pour les niveaux en TNF- $\alpha$ . Chez les animaux VM, le traitement aux

statines (contrairement au placebo) avant l'administration du linézolide permet de diminuer l'inflammation systémique comme en témoignent les concentrations spléniques en IL-8 et TNF- $\alpha$ .

Nous avons ensuite conduit des travaux *ex vivo* visant à confirmer nos résultats *in vivo* concernant le possible effet anti-inflammatoire des statines sur le compartiment systémique dans le contexte d'une PAVM à SARM. Pour cela du sang total a été prélevé de lapins SB ou VM puis stimulé avec du SARM inactivé par la chaleur (HKSA). *Ex vivo*, le sang total des animaux VM sur-réagit au HKSA comme en attestent les concentrations mesurées en TNF- $\alpha$  et IL-8 (Figure 6). Les statines diminuent cet effet pro-inflammatoire de la ventilation mécanique lorsque l'on considère le TNF- $\alpha$  tandis que les concentrations IL-8 restent hautes avec ou sans pré-médication aux statines.

Pour évaluer quel pouvait être l'implication de TLR2 dans les variations de la réponse inflammatoire au pré-traitement aux statines, nous avons mesuré l'expression des transcrits *tlr2* dans le poumon et le compartiment systémique. Comme rapporté dans les travaux précédents de notre équipe, la VM augmente les niveaux de transcrits *tlr2* dans les tissus pulmonaire et splénique (Figure 7). Nous observons ici qu'une pré-exposition aux statines semble diminuer la transcription de *tlr2* dans le compartiment pulmonaire des animaux SB et VM. En revanche, au niveau de la rate, les taux de transcrits *tlr2* sont identiques chez les animaux ventilés que la thérapie aux statines soit mise en place ou non.

**Impact of Prior Exposure to Atorvastatin on Linezolid Efficacy in a Rabbit Model of Ventilator-Associated Pneumonia Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.**

L.-A. PAUCHARD<sup>1</sup>

M. BLOT<sup>1</sup>

R. BRUYERE<sup>1</sup>

S.-D. BARBAR<sup>1</sup>

D. CROISIER

P.-E. CHARLES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire “Lipides Nutrition Cancer”, U.M.R. 866, I.N.S.E.R.M., U.F.R. Sciences de Santé, Université de Bourgogne, DIJON, France

<sup>2</sup>Vivexia S.A.R.L.

Corresponding author:

Pr. Pierre-Emmanuel Charles

+33 3 80 29 31 27

Medical Intensive Care Unit.

Hôpital Bocage Central

Centre Hospitalier et Universitaire de Dijon

14, rue Gaffarel

21000 Dijon

France

Financial support: “Aspire” grant from Pfizer (50000 €) (Pfizer, New York, NY, U.S.A.)

Conflict of interest: none to declare from all authors

Key words: ventilator-associated pneumonia – *Staphylococcus aureus* – methicillino-resistance – linezolid - statin

## ABSTRACT

**Background:** Ventilator-associated pneumonia (VAP) frequently complicates mechanical ventilation (MV) and may involve methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Despite linezolid (LNZ) efficacy, failure rates remain high, maybe as a result of the pro-inflammatory impact of MV. Statins could be thus protective.

**Methods:** pneumonia was caused by MRSA airways challenge in spontaneously breathing (SB) or MV rabbits after atorvastatin were given once a day within the 3 previous days. LNZ was infused thereafter. Untreated infected animals were used as controls. Pulmonary and systemic bacterial burden, lung injury and inflammation were assessed after 24 hours. Blood concentrations of interleukin (IL)-8 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  were measured at different time-points.

**Results:** Pulmonary MRSA load was reduced by LNZ in all animals whereas lung injury was unchanged. LNZ failed to prevent MRSA systemic spillover in MV animals. Statin therapy alone did not alter lung bacterial clearance, but it promoted pulmonary-to-systemic MRSA translocation in MV animals treated by LNZ. Interleukin-8 lung release was augmented during MV, regardless of LNZ therapy, whereas antibiotics dampened TNF- $\alpha$  production. Statin had no effect on IL-8 lung concentrations but reduced TNF- $\alpha$  release as did LNZ. MV increased systemic inflammation during VAP. LNZ dampened cytokines elevation in blood, especially if combined with statin therapy.

**Conclusions:** statin exposure prior to pneumonia provides an anti-inflammatory effect within the lung and the systemic compartment of rabbits with MRSA VAP. Although LNZ enhances pulmonary bacterial clearance, dampening the host systemic inflammatory response with statin could impede defense against MRSA in this compartment.



## INTRODUCTION

Ventilator-associated pneumonia (VAP) is the most frequently encountered bacterial infection in the critically ill patients. Strikingly, among hospitalized patients, those subjected to mechanical ventilation (MV) are the most likely to develop hospital-acquired pneumonia (HAP), emphasizing the deleterious effect of MV regarding this point. In addition, the outcome of patients with VAP has frequently been reported as worse as in those with other forms of HAP<sup>1</sup>. Finally, according to most of the randomized controlled trials (RCTs), antibiotic treatment success rates in VAP are generally lower than those usually reported in patients with pneumonia apart from the context of MV. This is especially true for VAP caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), since clinical success rates did not exceed 57% despite early and appropriate antibiotic in a RCT comparing linezolid (LNZ) to vancomycin<sup>2,3</sup>. Altogether, these findings suggest that MV could be harmful in the setting of bacterial pneumonia.

Accordingly, experimental evidences suggest that MV could compromise the host ability to clear bacterial pathogens within the airway in addition to causing specific lung damages (i.e., ventilator-induced lung injury [VILI])<sup>4</sup>. Several mechanisms are probably implied, including deep alterations of the muco-ciliary clearance along the bronchial tree subsequent to the endotracheal tube insertion together with general anesthesia and prolonged decubitus<sup>5</sup>. In addition, our group and others have shown that MV it-self could modify the lung immunity efficacy against bacterial invaders and microbial products<sup>6-10</sup>. Actually, mechanical stress resulting from MV could shift the host 'innate immunity toward a pro-inflammatory state likely to promote its overreaction if pneumonia develop<sup>11-15</sup>. Such effect of MV could lead to increased lung injury as well as failure of keeping the pathogen in check, promoting thereby systemic translocation<sup>7,16</sup>. In addition, MV strategies that aim at reducing lung overdistension such as tidal volume reduction, positive end-expiratory pressure optimization and prone position could improve the host defense. These latter findings are in line with the results from large clinical studies conducted in patients with injured lungs submitted to prolong MV (i.e., patients with the acute respiratory distress syndrome [ARDS]) as well as those with previously healthy lung ventilated for a short period like in the operative room<sup>17,18</sup>.

Nonetheless, there is still a room for improvement since mortality rates remain high in the critically ill patients subjected to MV, especially if they develop VAP. Moreover, it is worth noting that in most of the published experimental studies, animals were not given antibiotic, thus precluding any translation into the clinical area.

Modulating the inflammatory host response has been suggested as a way to improve the outcome of the patients with pneumonia. Actually, it has been shown that there was a link between VAP severity, both pulmonary and systemic inflammatory response magnitude and outcome<sup>19-22</sup>. Statins are lipid-lowering agents that reduce the risk of cardiovascular events by inhibiting 3-hydroxy-3 methyl-glutaryl coenzyme A reductase<sup>23,24</sup>. Immunomodulatory properties have also been described<sup>25</sup>. Although controversial, a number of publications have raised the possibility that these drugs could exert protective anti-inflammatory effects in the context of sepsis, especially pneumonia<sup>26-31</sup>. Interestingly, some experimental studies have also demonstrated a lung-protective effect through VILI attenuation<sup>32,33</sup>. We have shown previously that in one single centre observational study that the outcome of VAP patients with prior exposure to statin was better than in those without<sup>34</sup>. However, a multiple centre RCT including patients with VAP compared atorvastatin to placebo in combination to antibiotic failed to demonstrate any benefit on survival<sup>35</sup>. Similar negative results were obtained in another recently RCT comparing statin to placebo in patients with ARDS<sup>36</sup>. It is worth noting that statin therapy was started after infection onset in those studies. Actually and interestingly, the results of another RCT testing statin in critically ill patients with sepsis showed an improved outcome in the patients provided they were already treated with statin prior to study inclusion, whereas no benefit was shown in naive patients<sup>37</sup>.

We hypothesized therefore that prior exposure to statin therapy could be protective for the host in a rabbit model of pneumonia caused by MRSA treated by LNZ through inflammatory response limitation and subsequent improvement of both lung injury and microbiological outcome. Our hypothesis was tested in both spontaneously breathing (SB) and mechanically ventilated (MV) animals in order to mimic two different relevant clinical scenarios (i.e., MRSA-HAP and VAP, respectively), given the expected between-groups differences regarding host-response and outcome.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Male New Zealand White rabbits ( $3.0 \pm 0.2$  kg) were bred in the University of Burgundy animal facility (Dijon, France). Animal use and handling were approved by the local veterinary committee and were performed according to the European laws for animal experimentation. These animals were free of virus antibodies and specific pathogens. They were placed in individual cages and had free access to water and were fed in accordance with current recommendations mentioned in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Institutes of Health No. 92–23, revised 1985. A central venous catheter was surgically inserted in the left jugular internal vein of every rabbit.

### **Bacterial inoculum**

The USA 300 PVL (negative) clinical strain of *Staphylococcus aureus* (kindly provided by G. Lina, Lyon, France) was used herein. Working stock cultures were kept frozen in a 15% glycerol-supplemented brain-heart infusion (Biomérieux Laboratories, Marcy-l'Etoile, France). They were changed monthly. Colonies isolated from infected rabbits' spleen cultures were used to preserve bacterial virulence. At 48 hours before experimentation began, several colonies were taken, cultures on MRSA2 agar plates (Biomérieux) and then incubated for 24 hours at 37°C. One colony was inoculated into 10 mL of brain-heart infusion and was incubated for 6 hours at 37°C before being cultured on MRSA2 agar plates for 18 hours at 37°C. Inocula concentration was estimated by optical densitometry, in reference to a standard curve, and systematically checked by a quantitative culture by plating successive ten-fold dilutions. A  $9.5 \text{ Log}_{10}$  colony-forming units per milliliter (CFU/mL) mean titer was used in this study since pneumonia obtained with lower values was too mild and transient.

### **Experimental design**

Five sets of experiments were conducted successively, including each time both SB (n=5) and MV (n=5) rabbits. Animals were randomized into SB or MV group within each set. Thus, the following experimental groups were established: control uninfected group (SB or MV), MRSA infected group (SB+MRSA or MV+MRSA), statin pretreatment MRSA infected group (SB+MRSA+Statin or MV+MRSA+Statin), LNZ-treated MRSA infected group (SB+MRSA+LNZ or MV+MRSA+LNZ) and the statin pretreatment LNZ-treated MRSA infected group (SB+MRSA+Statin+LNZ or MV+MRSA+Statin+LNZ).

### **Mechanical Ventilation**

Animals were orally intubated as previously described. Briefly, under general anesthesia provided by ketamine 3.3 mg/Kg (Panpharma, France) and xylazine 1 mg/Kg (Rompun®, Bayer, Germany) in intravenous injection, a cuff tube of 2.5 mm (Mallinckrodt™, Covidien®, U.S.A.) was orally introduced into the trachea under view control. The animal was put in supine position and connected to a volume-controlled respirator (Servo ventilator 900C, Siemens®, Germany) (12mL/Kg of tidal volume with zero end-expiratory pressure [ZEEP], a respiratory rate of 25 bpm and an inspired fraction of O<sub>2</sub> of 0.5). Rabbits were kept anesthetized and paralyzed throughout the experiment with continuous infusion of midazolam (0.06 mg/Kg/h) (Hypnovel®, Roche, Switzerland) and cisatracurium besilate (0.3 mg/Kg/h) (Nimbex®, GlaxoSmithKline, U.K). During the MV period, animals were positioned on a heating blanket to maintain body normothermia, and hydration with isotonic serum was provided intravenously to maintain a stable hemodynamic status in the context of MV, anesthesia and paralysis. Arterial blood gas was analyzed 15 minutes after the start of MV and 48 hours later.

### **Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia induction**

In the SB groups, rabbits were orally intubated as previously described. Freshly prepared MRSA inoculum (0.5 mL containing 9.5 Log<sub>10</sub>CFU/mL) was then gently flushed through a silicon catheter (Sigma Medical, Nanterre, France) introduced into the tracheal tube. The endobronchial catheter was then immediately removed after the inoculum instillation, and the animals were placed upright for 15s to facilitate distal alveolar migration by gravity. Then they were allowed to go back to their cage before being sacrificed 24 hours later.

In the MV groups, the tracheal tube was already introduced and animals were subjected to MV for a 24-hour period before being instilled intrabronchially with MRSA inoculum (0.5 mL containing 9.5 Log<sub>10</sub>CFU/mL) as described above. MV controls received 0,5mL of saline solution. The animals were then kept under MV during 24-hour period before being sacrificed.

### **Statin pre-treatment**

In the SB groups, rabbits were pre-treated with statin (20 mg/Kg) (Atorvastatin, Pfizer AG, Zürich) by intra-gastric administration, 72, 48 and 24 hours before infection with MRSA.

Rabbits were anesthetized intravenously with the same mixture of ketamine plus xylazine described above and a cuff tube of 3 mm was introduced orally into the esophagus. Then, the solution of statin was administered directly in the esophagus through a silicon catheter introduced into the cuff tube. Animals were then putting back in their cage. In the MV groups, rabbits were already under anesthesia and they were submitted to the same protocol of statin's intra-gastric administration.

### **Linezolid treatment**

Linezolid (Zyvoxid®, Pfizer, United States) was delivered over 1 day through 2 subcutaneous injections, 4 and 16 hours after bacterial challenge as previously described<sup>38</sup>. Animals were treated with 50 mg/Kg subcutaneously 2 times/day. Because of the poor solubility of LNZ, 125 mg of LNZ were re-suspended in 10 mL of 5%  $\alpha$ -cyclodextrin (Sigma-Aldrich, Le Pont de Claix, France) solution. As previously, in the SB groups, rabbits were anesthetized intravenously with the mixture of ketamine plus xylazine before administration of LNZ. Then they were putting back in their cage. In the MV groups, rabbits were already under anesthesia and they were submitted to the same protocol of LNZ's injection.

### **Material Harvesting**

Blood samples were collected from the venous catheter (24 hours before bacterial challenge, and then 0, 12 and 24 hours after the intrabronchial instillation) and centrifuged at 1,000 g for 15 minutes at 4°C; the supernatant was divided into 0.5 ml aliquots and stored at -80°C for cytokine concentration measurements.

At the end of the experiment, the animals were killed by an intravenous overdose of thiopental.

In both groups, the animals were exsanguinated by venous puncture. Autopsies were carried out so that the lungs and spleen were aseptically taken. Immediately after exsanguination, heart and lungs were carefully removed en block via midline sternotomy.

The lungs were harvested for ribonucleic acid (RNA) extraction. Additional samples were obtained for microscopic examination.

The remaining lung tissue was homogenized for the determination of cytokine concentrations and for bacterial culture.

The spleen was harvested for RNA extraction, and the remaining spleen tissue was homogenized for cytokine concentration measurements and bacterial culture.

### **Histological Analysis**

A tissue sample of 1 cm<sup>3</sup> that focused on a macroscopic lesion from the cranial and caudal lobes was fixed in formalin and embedded in paraffin. Five-micrometer sections were obtained and coloured with haematoxylin and eosin. Two pathologists blinded to the group assignment examined all slides. After viewing approximately five fields per sector under low and high power, each section was assigned a numerical histologic score ranging from 0 to 3 as previously described<sup>39</sup> according to the degree of PMNs infiltration, hemorrhage, and edema in the interstitial and alveolar spaces: 0 (normal), normal-appearing lung; 1 (mild), mild congestion, interstitial edema, and interstitial PMNs infiltrate with occasional red blood cells and neutrophils in the alveolar spaces; 2 (moderate), moderate congestion and interstitial edema with neutrophils partially filling the alveolar spaces but without consolidation; 3 (severe), marked congestion and interstitial edema, with neutrophilic infiltrate nearly filling the alveolar spaces, or with frank lung consolidation. Atelectasis per se was disregarded and not scored as abnormal. For each criterion, when disagreements occurred between the observers, the definite score was defined as the mean of each pathologist's score.

### **Microbiological Evaluation of Pneumonia**

Each pulmonary lobe was isolated from the whole lung, homogenized in sterile water, and used for serial ten-fold dilution cultures. For each lobe, the bacterial concentration was adjusted to its weight.

The mean bacterial pulmonary concentration was calculated according to each lobar concentration with lobar weight (e.g., mean concentration =  $\sum$  [lobar concentration x lobar weight] / lobar weights). The spleen of each rabbit was also removed, crushed, and cultured. An *S. aureus*-positive spleen culture was considered a marker of bacteraemia.

### **Cytokine Measurements**

TNF-alpha and IL-8 concentrations were measured in plasma, whole blood supernatants, and lung homogenates using rabbit specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Uscn Life Science Inc., Wuhan, China). The lower limits of the assays were 15.6 picograms/mL for both TNF-alpha and IL-8.

### **Quantitative Reverse Transcriptase (RT)-Polymerase Chain Reaction (PCR)**

RNA was extracted from lung samples using the RNA GenElute kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Quantitative PCR was performed using IQ Sybergreen Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Melting curves were performed to ensure the presence of a single amplicon. The following primers were used: rTlr2, forward 5'-TGT CTG TCA CCG AAC CGA ATC CAC-3' and reverse 5'-TCA GGT TTT TCA GCG TCA GCA GGG-3'<sup>40</sup>; and rGapdh, forward 5'-ATG TTT GTG ATG GGC GTG AAC C-3' and reverse 5'-CCC AGC ATC GAA GGT AGA GGA-3'.

The results are expressed as the fold induction using the  $\Delta C_t$  method<sup>41</sup> since the SB animals were always considered as the baseline condition.

### **Whole blood assay**

Fresh heparinated blood from SB, MV, SB+Statin and MV+Statin groups was obtained by venipuncture and diluted 1:2 with RPMI1640 medium purchased from Gibco<sup>TM</sup> (Life Technologies, Saint Aubin, France). Blood was plated at 120  $\mu$ L/well in a 96-well plate and incubated for 15 minutes at 37°C. Pills of statin were dissolved in RPMI 1640 medium (2 nmol/mL and 10 nmol/mL final volume), added to whole blood (60  $\mu$ L/well) and incubated for 23 hours at 37°C. Twenty-four hours later, either 60 $\mu$ L of Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (100 ng/mL final) or heat-killed *S. aureus* (...) were added and the blood was then incubated 24 hours at 37°C. These concentrations corresponded to the maximal response observed with these agonists in preliminary experiments (data not shown). Cell culture supernatants were finally removed and kept frozen at -80°C until IL-8 and TNF- $\alpha$  concentrations were determined.

### **Statistical analysis**

All data were expressed as the mean $\pm$ standard deviation.

Group size determination was based on previous experience<sup>15</sup>.

Continuous variables between the different study groups (i.e., SB vs. MV animals unless otherwise specified) were compared using the non-parametric Mann-Whitney U test or the Wilcoxon test if appropriate.

For temporally repeated data (i.e. for serum cytokine concentrations), changes over time were compared between groups using two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA). Differences between the times were identified using the Bonferroni multiple comparison test after repeated-measures analysis of variance when significance was reached.

All test were two-tailed. A *p* value lower than 0.05 was considered as statistically significant.

GraphPad Prism software was used (GraphPad Software, San Diego California, USA).

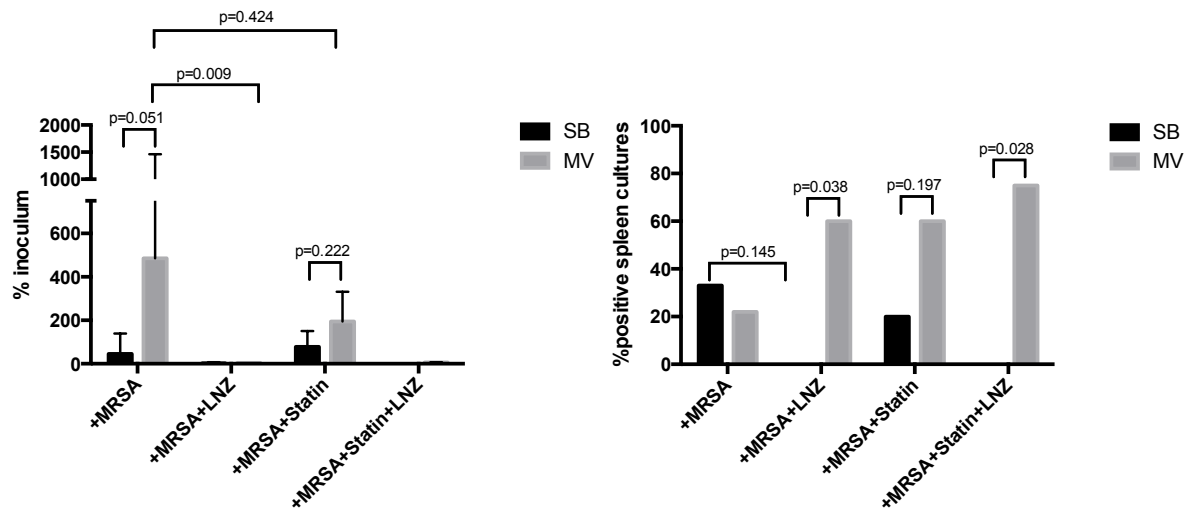


## RESULTS

### Statin exposure prior to pneumonia did not improve linezolid efficacy

As expected in untreated subjects, lung bacterial clearance was more efficient in SB animals as compared to MV ones (45.1[93.8] vs. 485.1[977.6]% of the inoculated bacteria recovered from the lung, respectively;  $p=0.051$ ) (Figure 1A). Pulmonary bacterial load was reduced by LNZ as compared to untreated animals in SB as well as in MV rabbits ( $p=0.073$  and  $p=0.009$ , respectively), blunting thereby any difference between those groups (4.6[6.2] vs. 2.5[4.2]% of the inoculated bacteria, respectively;  $p=0.543$ ). However, whereas no more bacteria were recovered from the spleen of the SB treated rabbits provided they received antibiotic (3/9[33.3%] vs. 0/5[0.0%] animals with positive spleen culture, respectively;  $p=0.145$ ), LNZ failed to prevent MRSA systemic spillover in MV animals (2/9[22.2%] vs. 3/5[60.0%] animals;  $p=0.167$ ) (Figure 1B). As a result, the rate of positive spleen cultures was significantly greater in MV infected rabbits treated by LNZ than in their SB counterparts (3/5[60.0%] vs. 0/5[0.0%] animals;  $p=0.038$ ). In addition, according to the histologic score measurement, lung injury was unchanged whenever antibiotic was administered and regardless of MV as well (Figures 2A & 2B).

We tested then to which extent statin exposure prior to airway challenge with MRSA could improve LNZ efficacy.



**Figure 1. Pulmonary and systemic bacterial burden of *S. aureus***

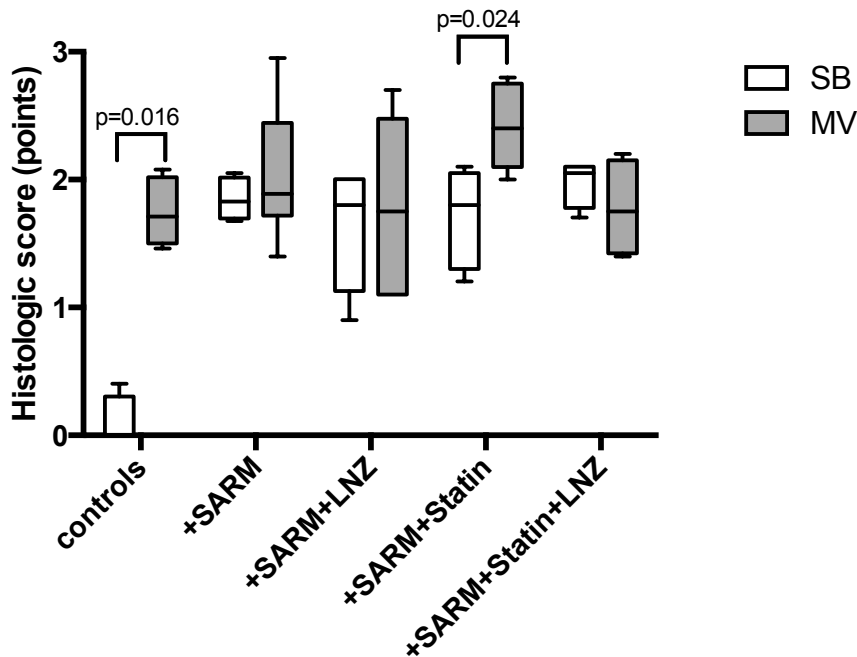
Pulmonary bacterial clearance expressed as a percentage (SD) of reduction of the initial *Staphylococcus aureus* inoculum 24 hours after bacterial challenge in either spontaneously breathing or mechanically ventilated animals. Pulmonary-to-systemic bacterial translocation expressed as the spleen positive cultures rate 24 hours after bacteria instillation according to the experimental group in either spontaneously breathing or mechanically ventilated animals with *Staphylococcus aureus* pneumonia.

Two-tailed Mann-Whitney U test or Fisher exact test was used for intergroup comparisons.

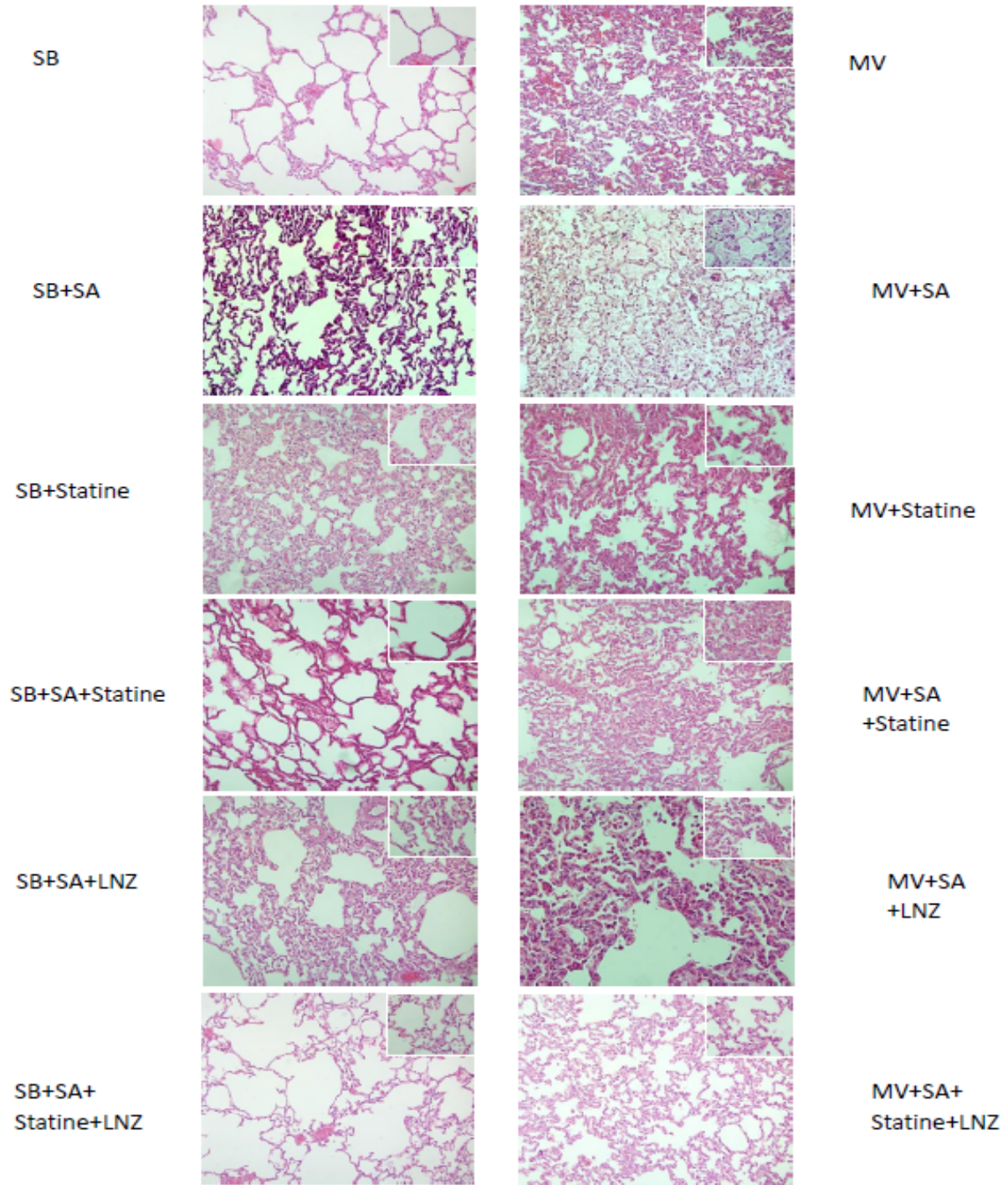
CFU: colony forming unit ; MRSA : methicilline-resistant S. aureus ; LNZ : linezolid ; SB : spontaneously breathing ; MV : mechanical ventilation ; SD : standard deviation.

Thus, statin therapy alone attenuated the difference of pulmonary bacterial clearance reported above between SB and MV rabbits (78.4[71.9] vs. 194.6[136.7]% of the inoculated bacteria, respectively;  $p=0.222$ ). However, atorvastatin exposure compared to the absence of pre-treatment did not significantly improve this endpoint within the SB groups (78.4[71.9] vs. 45.1[93.8]%, respectively;  $p=0.525$ ), nor it did within the MV ones (194.6[136.7] vs. 485.1[977.6]%;  $p=0.424$ ). Finally, no further improvement of the lung bacterial clearance was observed if atorvastatin was administered prior to LNZ, regardless of ventilation (i.e., SB or MV). In contrast, pulmonary-to-systemic MRSA translocation was less likely in SB animals as compared to the MV ones, especially in those, which received LNZ (0/4[0.0%] vs. 3/4[75.0%] animals with positive spleen culture, respectively;  $p=0.028$ ).

In addition, although atorvastatin exposure was likely to worsen lung injury in infected MV animals without antibiotic as compared to their SB counterparts (2.4[0.3] vs. 1.7[0.4] points, respectively;  $p=0.024$ ), no difference existed if they were given LNZ (Figures 2A & 2B).



(A)



(B)

**Figure 2. Lung injury main features according to the experimental condition**

Histologic score ranging from 0 to 3, based on the degree of polymorphonuclear infiltration, haemorrhage, and oedema in the interstitial and alveolar spaces, following tracheal instillation of saline (controls) or  $9 \log_{10}$ CFU of *Staphylococcus aureus* in either spontaneously breathing rabbits or animals subjected to mechanical ventilation with various treatment combinations. Mean values (SD) are shown (A) as well as representative light microphotographs of rabbit lungs in various conditions fixed at the same transpulmonary pressure (hematoxylin and eosin x400) (B).

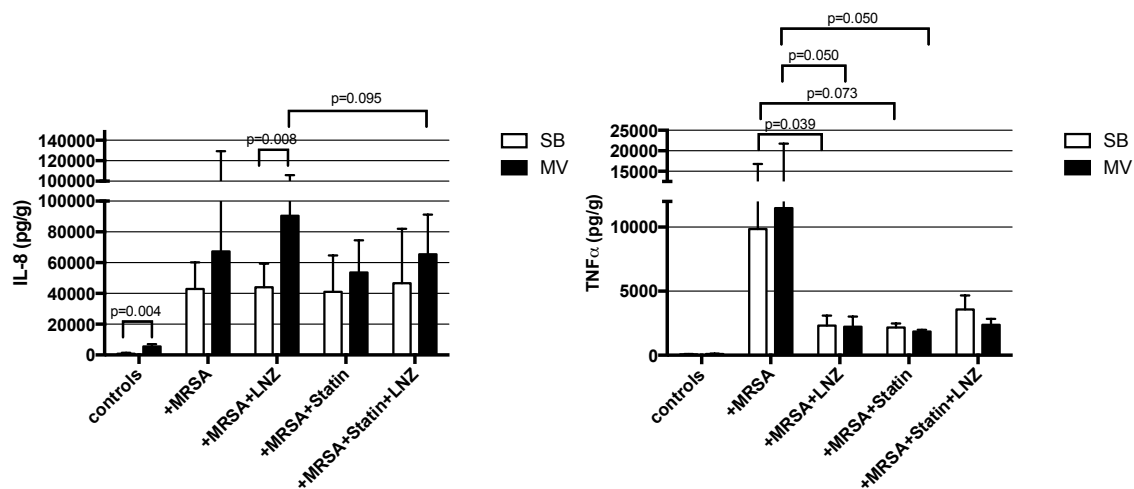
Two-tailed Mann-Whitney U test was used for all intergroup comparisons.

CFU: colony forming unit ; MRSA : methicilline-resistant *S. aureus* ; LNZ : linezolid ; SB : spontaneously breathing ; MV : mechanical ventilation ; SD : standard deviation.

Altogether, these data suggest that although prior exposure to atorvastatin did not alter lung bacterial clearance in our model, it was likely to promote pulmonary-to-systemic MRSA translocation in the MV animals despite subsequent LNZ administration, which efficacy was thus not improved. A higher degree of lung injury in the animals that received statin therapy in addition to MV could account of such finding.

### Statin exposure prior to pneumonia modify the pulmonary host response

In non-infected control animals, IL-8 lung release was augmented as a result of MV alone (868[547] vs. 5493[1579] pg/g of tissue, respectively;  $p=0.004$ ), while similar levels of TNF- $\alpha$  were measured (Figure 3). Pneumonia development was associated with significantly greater pulmonary concentrations of both cytokines as compared to healthy controls, whenever rabbits underwent MV or not. However, the same amounts of inflammatory mediators were recovered from either SB or MV infected animals.



**Figure 3. Inflammatory cytokines in the lung of rabbits in various experimental conditions**

Mean inflammatory cytokines (interleukin [IL]-8 and tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ ) concentrations (SD) in lung homogenates 24 hours after tracheal instillation of saline (controls)  $10^9$  CFU of *Staphylococcus aureus* in either spontaneously breathing rabbits or animals subjected to mechanical ventilation with various treatment combinations. Two-tailed Mann-Whitney U test was used for all intergroup comparisons.

CFU: colony forming unit ; MRSA : methicilline-resistant *S. aureus* ; LNZ : linezolid ; SB : spontaneously breathing ; MV : mechanical ventilation ; SD : standard deviation.

Linezolid treatment significantly reduced lung inflammation in the SB group as compared to untreated controls in terms of TNF- $\alpha$  concentrations (2315[782] vs. 10829[6457] pg/g of tissue, respectively;  $p=0.039$ ). Similarly, lower amounts of TNF- $\alpha$  were recovered from the lung of MV rabbits with pneumonia treated with LNZ (2226[789] vs. 11478[10251] pg/g;  $p=$

0.050). However, IL-8 (but not TNF- $\alpha$ ) concentrations remained significantly lower in SB animals than in MV ones (44055[15236] vs. 90424[15527] pg/g of tissue, respectively;  $p=0.008$ ).

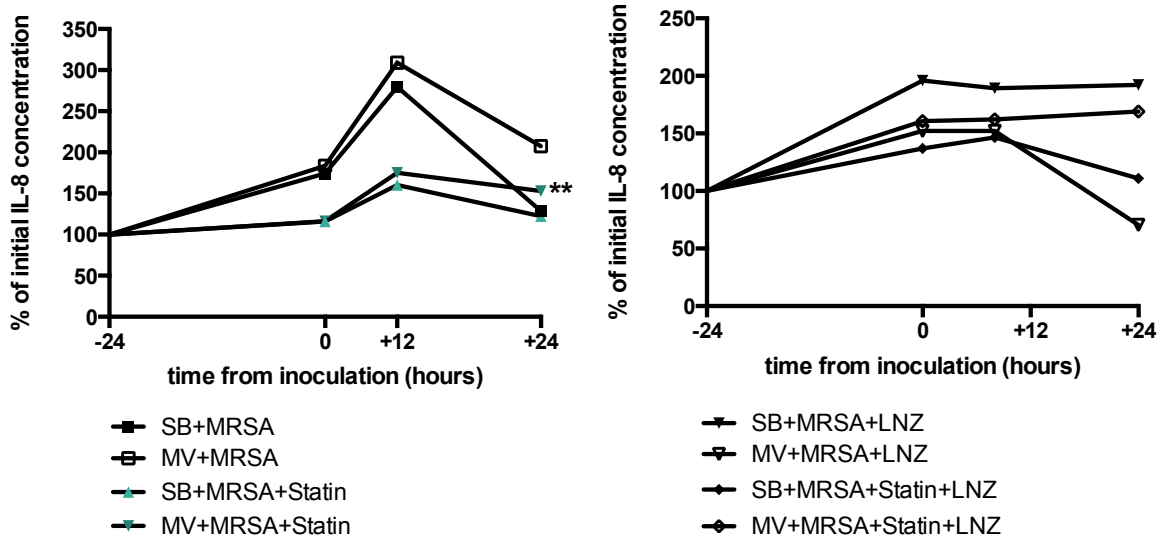
*Pneumonia development mounted a dramatic rising of inflammatory mediators within the lung of both SB and MV rabbits. Antibiotic blunted this local host response in terms of TNF- $\alpha$  release, but pulmonary concentrations of IL-8 reached higher levels in MV animals as compared to their SB counterparts.*

In the absence of antibiotic, prior exposure to statin therapy did not modify lung inflammation in infected animals according to IL-8 concentrations. In contrast, the release of TNF- $\alpha$  was reduced in both SB (2315[782] vs. 10829[6457] pg/g of tissue, respectively;  $p=0.073$ ), and MV rabbits (1855[133] vs. 11478[10251] pg/g of tissue, respectively;  $p=0.050$ ) as compared to unexposed ones. In rabbits treated with LNZ, previous statin therapy did not provide additional anti-inflammatory effect within the lung, although a trend toward lower IL-8 concentrations was measured in MV animals without statin exposure (65492[25733] vs. 90424[15527] pg/g of tissue, respectively;  $p=0.095$ ).

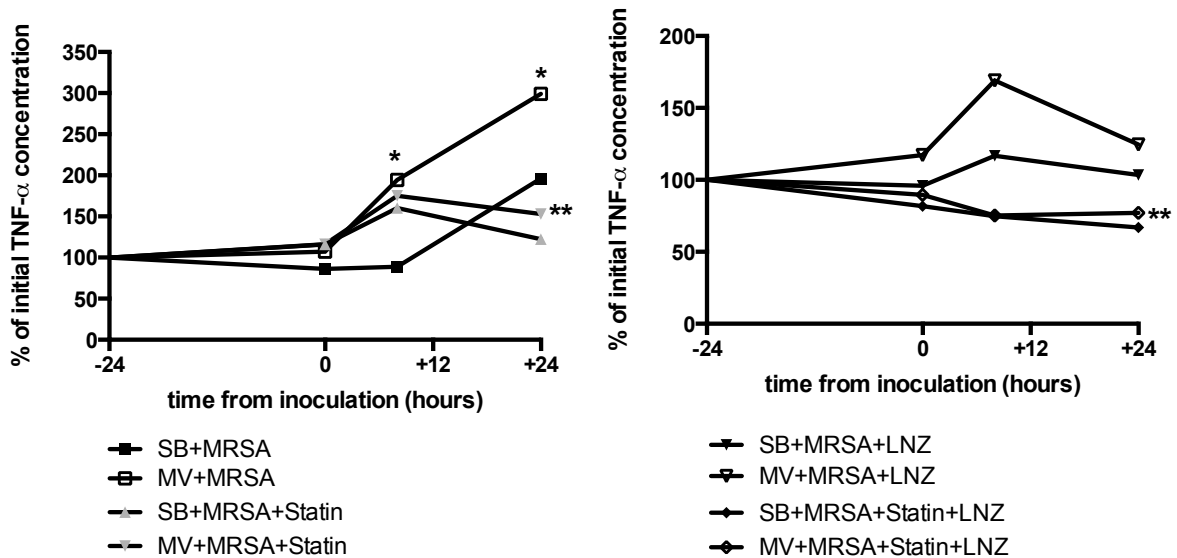
*Previous exposure to atorvastatin by itself was likely to decrease the lung inflammatory response in rabbits with untreated pneumonia but only in terms of TNF- $\alpha$  release. However, statin therapy failed to bring further anti-inflammatory effect to LNZ within the lung.*

### **Statin exposure prior to pneumonia modify the systemic host response**

Systemic inflammation during MRSA pneumonia in rabbits was evaluated through serum level measurements at different time-points in addition to spleen concentrations (Figures 4 & 5). Blood concentrations of TNF- $\alpha$  reached significantly higher levels in MV untreated animals with pneumonia than in their SB counterparts 8 hours (132[15] vs. 70[13] pg/mL, respectively;  $p=0.013$ ) and 24 hours (124[15] vs. 45[10] pg/mL;  $p=0.002$ ) after bacterial challenge. According to circulating cytokines concentrations time-course, no significant effect of either LNZ or statin, or both, was observed in SB rabbits. In contrast, either LNZ therapy or statin prior exposure were likely to dampen both IL-8 (ANOVA for repeated measures:  $p=0.225$  and  $p=0.004$ , respectively) and TNF- $\alpha$  ( $p=0.003$  and  $p=0.004$ , respectively) systemic release with time in MV animals. In addition, pre-treatment with atorvastatin enhanced the anti-inflammatory effect of LNZ alone according to TNF- $\alpha$  time-course ( $p=0.032$ ), but not if IL-8 concentrations variations were considered ( $p=0.442$ ), in those latter animals.



(A)



(B)

**Figure 4. Time course of mean serum inflammatory cytokine concentrations during experiment.**

Mean serum concentrations of interleukin (IL)-8 (A) and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (B) expressed as % of the mean baseline value measured by enzyme-linked immune-sorbent assay at baseline (100%; 24 hours before bacterial airway challenge), just before intra-tracheal instillation of  $10^9$  CFU of *S. aureus* (H0), in the spontaneously breathing and the mechanically ventilated animals, and then 8 (H8) and 24 hours (H24) after instillation.

Significant changes over time in each group were assessed by repeated-measures analysis of variance followed by the *post hoc* Bonferroni multiple comparison test when significance was reached, except otherwise stated.

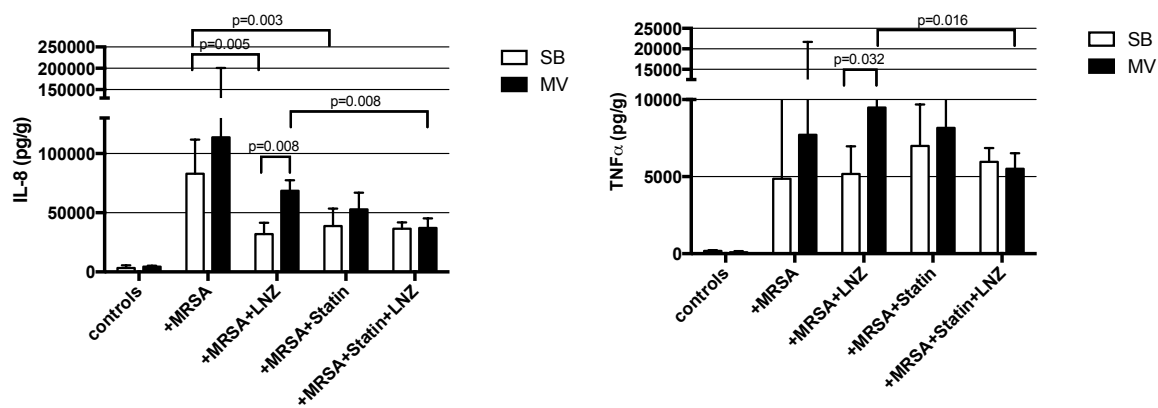
(A): \*\* denotes  $p < 0.05$  between MV rabbits with MRSA pneumonia pre-treated with atorvastatin or not pre-treated (*top*)

(B): \* denotes  $p < 0.05$  between SB and MV rabbits with MRSA pneumonia (Two-tailed Mann-Whitney U test)

\*\* denotes  $p < 0.05$  between MV rabbits with MRSA pneumonia treated with either LNZ or non antibiotic (*top*), and between those treated with either LNZ alone or LNZ plus pre-treatment with atorvastatin (*bottom*).

CFU: colony forming unit ; MRSA : methicilline-resistant *S. aureus* ; LNZ : linezolid ; SB : spontaneously breathing ; MV : mechanical ventilation

Cytokines spleen concentration measurement provides similar findings since we found that significantly lower amounts of IL-8 were released in the SB animals treated with LNZ as compared to those without antibiotic (32053[9527] vs. 82919[28864] pg/g of tissue, respectively;  $p=0.005$ ), although no difference was seen when TNF- $\alpha$  was considered (4867[7229] vs. 5177[1795] pg/g, respectively;  $p=0.180$ ) (Figure 5). In the MV group, whichever no antibiotic or LNZ was administrated, similar amounts of both IL-8 (113697[87189] vs. 68580[8884] pg/g, respectively;  $p=0.694$ ) and TNF- $\alpha$  (7713[14002] vs. 9486[2420];  $p=0.145$ ) were recovered. As a result, both IL-8 (32053[9527] vs. 68580[8884] pg/g, respectively;  $p=0.008$ ) and TNF- $\alpha$  (5177[1795] vs. 9486[2420] pg/g;  $p=0.032$ ) levels were found to be significantly lower in the spleen of SB animals with MRSA pneumonia treated by LNZ than in their MV counterparts.



**Figure 5. Inflammatory cytokines in the spleen of rabbits in various experimental conditions**

Mean inflammatory cytokines (interleukin [IL]-8 and tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ ) concentrations (SD) in lung homogenates 24 hours after tracheal instillation of saline (controls)  $10^9$  CFU of *Staphylococcus aureus* in either spontaneously breathing rabbits or animals subjected to mechanical ventilation with various treatment combinations. Two-tailed Mann-Whitney U test was used for all intergroup comparisons.

CFU: colony forming unit ; MRSA : methicilline-resistant *S. aureus* ; LNZ : linezolid ; SB : spontaneously breathing ; MV : mechanical ventilation ; SD : standard deviation.

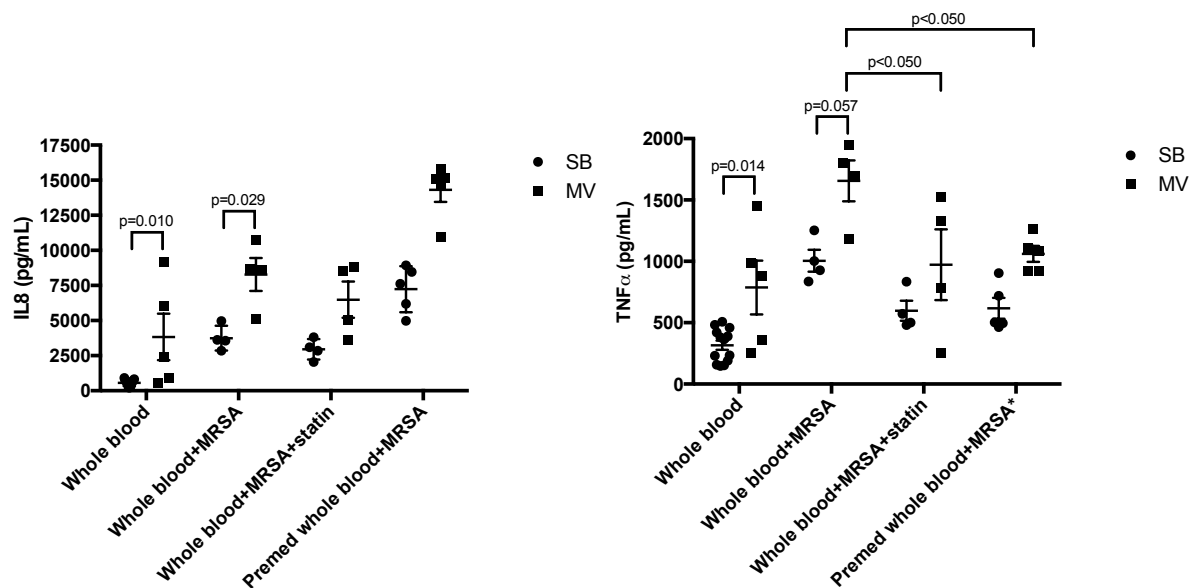
Prior exposure to statin therapy alone (i.e., without antibiotic) as compared to no pre-treatment was associated with lower spleen concentrations of IL-8 in SB rabbits (82919[28864] vs. 38726[14739] pg/g;  $p=0.003$ ), but not in MV ones (113697[87189] vs. 52780[14134] pg/g;  $p=0.171$ ). In contrast, no difference was seen regarding TNF- $\alpha$  levels. Finally, atorvastatin prior to LNZ as compared to no pre-treatment was likely to reduce systemic inflammation according to both IL-8 (37150[8094] vs. 68580[8884] pg/g, respectively;  $p=0.008$ ) and TNF- $\alpha$  (5509[1013] vs. 9486[2420] pg/g;  $p=0.016$ ) spleen concentrations in the only MV animals. As a result, similar amounts of both mediators were

retrieved in SB and MV rabbits with MRSA pneumonia treated by the combination of atorvastatin and LNZ.

*As a conclusion, the combination of LNZ and pre-treatment with atorvastatin was likely to dampen the excess of systemic inflammation measured in MV animals with MRSA pneumonia as compared to SB ones, whereas LNZ alone failed to.*

We conducted then *ex vivo* experiments attempting to confirm our findings regarding the possible anti-inflammatory effect of statin on the systemic compartment in the setting of MRSA pulmonary infection. Thus, whole blood was taken from either SB or MV rabbits and then stimulated with HKSA (Figure 6). Baseline inflammatory mediators (i.e., without any microbial stimulation) release by the MV blood was found to be significantly greater as compared to SB blood. This was true for both IL-8 (3833[3702] vs. 565[227] pg/mL, respectively; p=0.010) and TNF- $\alpha$  (1656[166] vs. 1005[89] pg/mL, respectively; p=0.014). As a result, after HKSA stimulation, both IL-8 (8279[2348] vs. 3747[881] pg/mL, respectively; p=0.029) and TNF- $\alpha$  (1656[333] vs. 1004[178] pg/mL; p=0.057) reached greater concentrations in the blood taken from MV rabbits than from the SB ones. If MV rabbits had been exposed to statin prior to blood drawing, as well as if atorvastatin was added to the blood sample prior to *ex vivo* stimulation, TNF- $\alpha$  levels were lower than untreated samples, reaching levels near to baseline values (i.e., without HKSA stimulation) (1656[333] vs. 972[575] pg/mL; p<0.050). As a result, the difference of inflammatory response to HKSA between SB and MV blood was attenuated (597[163] vs. 972[575] pg/mL, respectively; p=0.486). In contrast, if atorvastatin was added to the blood sample prior to *ex vivo* stimulation, IL-8 concentrations were not different from those measured in untreated samples. However, although the difference did not reach statistical significance, IL-8 concentrations were surprisingly found to be more elevated after HKSA stimulation if the whole blood had been obtained from rabbits that received atorvastatin as compared to those without pre-treatment.





**Figure 6. Inflammatory cytokines in whole blood stimulated *ex vivo* by *S. aureus* in various conditions**

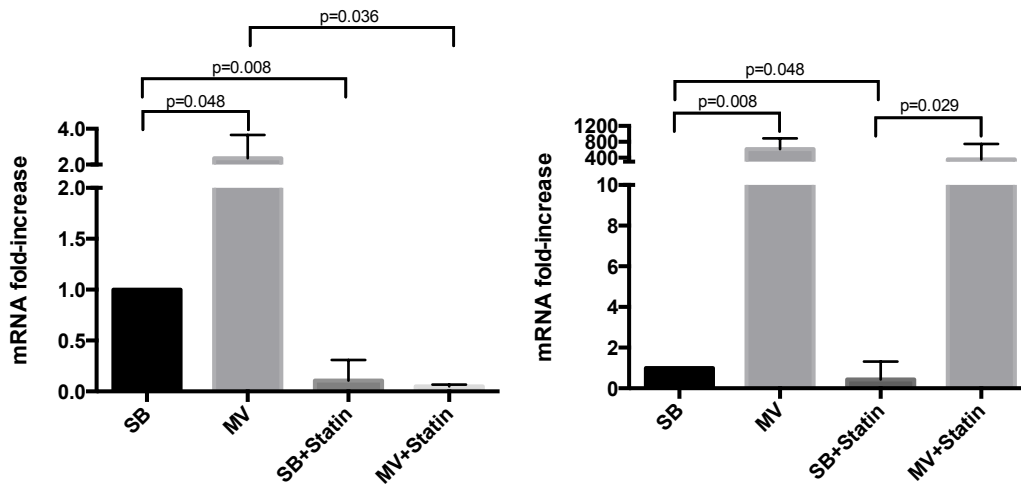
Interleukin (IL)-8 and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  mean levels (SD) in the supernatant of whole blood from either spontaneously breathing rabbits or animals subjected to mechanical ventilation. Atorvastatin was added to the medium (“statin”) or given to the rabbit prior to blood sampling (“Premed”). Two-tailed Mann-Whitney U test was used for all intergroup comparisons.

MRSA : methicilline-resistant *S. aureus* ; SB : spontaneously breathing ; MV : mechanical ventilation ; SD : standard deviation.

*Ex vivo*, whole blood taken from MV rabbits overreacted to HKSA regarding both IL-8 and TNF- $\alpha$  production. Statin only in terms of TNF- $\alpha$  release blunted this pro-inflammatory effect of MV while paradoxically supernatant IL-8 concentrations looked even greater with than without exposure to atorvastatin.

### **Atorvastatin exposure decreases pulmonary but not systemic expression of TLR2 in ventilated rabbits**

In an attempt to evaluate TLR2 involvement in inflammatory response variations related to atorvastatin pre-treatment, gene expression measurements were conducted within the lung and the systemic compartment. As previously reported, TLR2 gene expression was up-regulated in both tissue in MV animals. Interestingly, statin exposure was associated with significantly lower *tlr2* expression within the lung compartment of both SB and MV animals. In contrast, *tlr2* gene transcripts were found in similar amounts in MV regardless of statin therapy effect.



**Figure 7. Toll-like receptor 2 gene expression**

TLR2 gene expression was measured in both lung (*right*) and spleen (*left*) homogenates in either spontaneously breathing rabbits (SB) or animals subjected to mechanical ventilation (MV) with or without atorvastatin pre-treatment ( $n = 5$  in each group). All values are reported as fold increases compared with SB rabbits. Results are expressed as mean $\pm$ standard deviation.

Kolmogorov-Smirnov test was used for all intergroup comparisons.

*Altogether, our findings suggest that in the setting of MRSA pneumonia, atorvastatin exposure prior to bacterial challenge had anti-inflammatory effects mainly within the systemic compartment. As a result, despite the potential benefits of such effects that remain to be investigated, lowering blood inflammation could account at least in part of the increased risk of pulmonary to systemic translocation of *S. aureus* in our model, despite the administration of early and appropriate antibiotic.*

## DISCUSSION

We show herein in a rabbit model of pneumonia caused by MRSA that LNZ was efficient in keeping in check bacterial growth within the lung of both SB and MV animals whereas as expected MV was likely to compromise bacterial clearance in the absence of antibiotic. However, pulmonary-to-systemic translocation of *S. aureus* was not prevented by LNZ in MV animals, as it was in SB ones. Linezolid treatment was likely to dampen the lung inflammatory response in both SB and MV animals but IL-8 release remained greater in the latter despite antibiotic. Similarly, in the blood compartment, since we showed an excessive release of inflammatory mediators subsequent to MV in the context of MRSA pneumonia, the overall effect of LNZ was to blunt circulating inflammation, but to a lesser extent in the MV rabbits than in the SB ones. As a first conclusion, our model showed that MRSA pneumonia was probably more severe in the setting of MV despite prompt and effective antibiotic administration, since bacteremia was more likely together with uncontrolled inflammation. The potential interest of adjunctive statin therapy was then addressed.

Thus, exposure to atorvastatin prior to bacterial airway challenge main effect was to promote in MV animals lung bacteria spillover into the blood flow, despite LNZ administration, maybe as a result of lung injury worsening. However, statin therapy had anti-inflammatory effects in both compartments (i.e., pulmonary and blood), which could theoretically improve the outcome of the host, but may have hampered its ability to control systemic diffusion of *S. aureus* in our model, since LNZ antimicrobial efficacy relies mainly on growth inhibition.

Our findings are in line with the clinical practice since as usually reported, bacterial pneumonia is more severe in patients submitted to MV than in those without. Underlying host condition may be different but a deleterious effect of MV itself is suggested by numbers of clinical and experimental studies. Thus, MV could be harmful through lung overdistension (volutrauma) and repeated opening-closing cycles of alveoli (atelectotrauma), leading in turn to additional lung injury (i.e., VILI), together with pulmonary and systemic inflammation<sup>42</sup>. This has been demonstrated in patients with ARDS but could be also clinically relevant in those without, especially if a second insult such as bacterial challenge is applied to their lungs<sup>17,18</sup>. Findings from experimental studies suggest that MV strategies that aimed at limiting both volutrauma and atelectotrauma were likely to improve bacterial clearance, to limit pulmonary-to-systemic translocation as well as to reduce inflammation<sup>8,9,43</sup>. We show herein that, despite a “mild-stretch” strategy, MV delayed the lung bacterial clearance and promote

extra-pulmonary diffusion of bacteria, as previously shown with a gram-negative pneumonia model <sup>7</sup>. Interestingly, in the present study, these features were not associated with an obvious increase of lung injury, despite using a score likely to properly evaluate lung damage related to VILI <sup>39</sup>. However, an excessive inflammatory response was shown within both compartments, suggesting that the so-called biotrauma resulting from MV could account at least in part for such differences between SB and MV animals. The relevance of these findings needed however to be confirmed in the setting of antibiotic-treated pneumonia, in an attempt to get closer to the clinical area.

Accordingly, we chose to administrate LNZ to the rabbits given its proven efficacy in patients with MRSA-pneumonia including VAP, as well as in infected animals <sup>3</sup>. Although LNZ therapy was associated with microbiologic success in SB subjects, we should admit that its efficacy was limited to the lung compartment in the MV ones. Interestingly, we did similar observations in our previously model of *Streptococcus pneumoniae* pneumonia treated with moxifloxacin <sup>44</sup>. No significant histological finding was likely to account for such a difference of bacteria extra-pulmonary diffusion. However, we cannot exclude the existence of unseen breaches within the alveolo-capillar membrane resulting from VILI.

Interleukin-8 pulmonary release was lowered by LNZ in both SB and MV rabbits, along with pulmonary bacterial load. It remains unclear to which extent LNZ anti-inflammatory properties *per se* have contributed to such a decrease of IL-8 lung concentrations. Actually, experimental studies have shown that LNZ as compared to vancomycin (i.e., the standard therapy against MRSA) was likely to reduce pulmonary inflammation in spontaneously breathing mice with MRSA pneumonia, especially in terms of MIP-2 concentrations, the rodent equivalent of IL-8, limiting in turn PMNs recruitment and lung damages <sup>45</sup>. However, conflicting results have been published since others did not find any difference using a similar experimental design <sup>46</sup>. In addition, although the anti-inflammatory effect of LNZ measured in our study was significant, it might be too weak since higher levels of IL-8 were still achieved in MV rabbits as compared to the SB ones. Thus, given the chemo-attractant properties of this mediator, larger numbers of PMNs might have been recruited within the lung of MV rabbits despite LNZ therapy, leading in turn to more severe tissue injury that we failed to detect by optic microscopy. The systemic diffusion of MRSA could have been thus facilitated. Altogether, these data suggest that LNZ efficacy may be hampered in the setting of MV. Indeed, we then attempted to further dampen lung inflammation by statin therapy given the drug *in vitro* potency <sup>47,48</sup>.

Actually, exposure to atorvastatin prior to bacterial infection onset had *per se* anti-inflammatory effects in the infected lung of both SB and MV animals according to TNF- $\alpha$  concentrations since IL-8 reached similar levels. Those findings are in line with one recently published *in vitro* study showing that human alveolar macrophages incubated with simvastatin released lower amounts of inflammatory mediators including both IL-8 and TNF- $\alpha$  in response to lipoteichoic acid stimulation, a TLR2 agonist, in the presence of simvastatin<sup>48</sup>. Interestingly, it has also been previously shown that in healthy volunteers, statin pretreatment was likely to decrease lung inflammation following lipopolysaccharide inhalation<sup>49</sup>. However, it is worth noting that in our model, statin therapy worsened lung injury in MV infected animals if they did not receive LNZ thereafter, despite significantly lower pulmonary concentrations of TNF- $\alpha$ . This points out the need for efficient antimicrobial therapy in combination with any anti-inflammatory strategy, as previously illustrated in a mouse model of *S. pneumoniae* pneumonia<sup>50</sup>. Accordingly, IL-10 treatment worsened lung injury whereas a significant improvement was obtained if it was given in combination with antibiotic as compared with antibiotic alone. In addition, as reported in mice submitted to adverse MV, Siempos *et al* showed that atorvastatin pretreatment was likely to reduce lung injury in one isolated-perfused rabbit healthy lung model but only in the high-stretch group (i.e., 20 mL/kg) whereas no effect was reported in the lungs submitted to “mild-stretch” MV (i.e., 10 mL/kg), that is the settings we used in the present study<sup>32,33</sup>. Unfortunately, lung inflammation was not assessed in this latter study. In addition, although sparse, clinical data did not support any beneficial effect of statin therapy on lung injury so far<sup>36,51</sup>. Finally, although speculative, we can hypothesize that the anti-inflammatory effect of atorvastatin in ventilated rabbits without antibiotic compromised the host anti-bacterial defense, promoting thereby tissue injury instead of protecting the host against VILI. Antibiotic appropriateness (i.e., prompt and active against the involved pathogen) could be thus the prerequisite for any beneficial adjunctive effect of statin therapy in patients with VAP.

Beside lung damage, systemic inflammation magnitude and persistence are considered as key determinants of the outcome in the setting of lung injury including VAP and sepsis<sup>52</sup>. We show herein that atorvastatin pretreatment was likely to blunt the host inflammatory response within the blood compartment, especially in terms of TNF- $\alpha$  release. Such an effect has already been reported in some animal models of sepsis such as the cecal ligation puncture. Actually, some authors showed that atorvastatin was likely to reduce circulating levels of both IL-6 and TNF- $\alpha$  along with survival improvement<sup>53</sup>.

However, this effect may be deleterious in MV rabbits with pneumonia according to microbiologic data since the rate of positive spleen cultures was greater than in their SB counterparts despite LNZ administration, thus illustrating the host failure to control the growth of *S. aureus* within the blood compartment.

Altogether, these findings suggest that the systemic anti-inflammatory effects of statin therapy in our animal model of MRSA VAP treated by LNZ could be harmful to some extent. Actually, bacteremia has been shown to be an independent predictor of death in VAP patients, especially those with pneumonia caused by MRSA<sup>54</sup>. However, since our infection model is not lethal, we could not assess the impact on the survival of such an effect. In addition, Yoshizawa *et al.* showed elegantly in a mice model of pneumonia that LNZ might have immuno-modulatory properties likely to dampen MRSA virulence factors including pro-inflammatory signals expression<sup>55</sup>. Thus, the systemic inflammatory response to *S. aureus* was significantly attenuated when bacteria were pre-incubated with sub-inhibitory LNZ concentrations prior to injection to mice, maybe through *S. aureus* toxins expression inhibition as suggested elsewhere<sup>56</sup>. In addition, some clinical data support this assumption since the inflammatory signs related to *S. aureus* bacteremia (e.g., fever) could resolve despite persistent proven bacteremia in patients treated with LNZ<sup>55</sup>. Accordingly, we could speculate that the overall effect of the combination of atorvastatin and LNZ could protect the host against one protracted systemic inflammatory response, although delaying *S. aureus* clearance from the blood compartment. Further experimental studies are however mandatory before drawing any definitive conclusions.

Statins exert various effects on the inflammatory response, but the underlying mechanisms remain unclear. Basically, these drugs are mainly considered as anti-inflammatory agents<sup>25</sup>. Data from *in vitro* studies suggest that statins could interfere with the TLR pathway, modulating thereby the response to microbial products such as endotoxin or gram positive bacteria cell wall compounds. However, depending on the experimental model, the net effect of statin exposure could be pro- or anti-inflammatory<sup>47,57-59</sup>. In addition, various underlying mechanisms have been described so far. For instance, statins could behave as anti-inflammatory drugs through Akt-phosphorylation leading thereby to the down-regulation of this MyD88-alternate signaling pathway downstream to TLR, or directly through TLR down-regulation<sup>59-61</sup>. This could account for the lower responsiveness to endotoxin of monocytes obtained from patients under statin therapy as compared with untreated controls, provided a high dose of simvastatin was given<sup>61</sup>. Accordingly, statin effects on inflammation probably depend on several factors such as the tested molecule, the cell type and its environment, as

well as both dose and duration of exposure prior to stimulation. Herein we show that despite one negative effect of atorvastatin intake prior to pneumonia regarding IL-8 systemic release in MV rabbits, *ex vivo* experiments showed that the whole blood taken from pretreated MV rabbits overreacted to HKSA stimulation in terms of IL-8 production. These findings illustrate to which extent statin impact on the inflammatory response is equivocal, as well as the need for animal experimental models together with clinical studies before drawing firm conclusions.

In addition, we found that TLR2 gene expression variations may play a role in our model regarding statin impact on the host inflammatory response. Actually, *tlr2* down regulation within the pulmonary compartment could account for the anti-inflammatory effect of atorvastatin exposure prior to *S. aureus* pneumonia in MV rabbits. Interestingly, this is in line with previous findings from our group and others showing that *tlr2* up-regulation within the lung of animals submitted to MV was likely to account for overreaction to its agonist including *S. aureus* cell wall compounds<sup>15,62</sup>. In contrast, other mechanisms probably account for the host response modulation within the blood, making the assumption that spleen was a surrogate for peripheral blood mononuclear cells<sup>63</sup>.

Although cumulative experimental findings support the potential use of statins as a way to modulate the excessive immune response in the setting of sepsis including VAP, clinical evidence are still lacking. Although our group showed that statin exposure prior to VAP was an independent predictor of ICU survival, this study was observational from a single center<sup>34</sup>. Makris *et al* conducted a small RCT in their ICU comparing pravastatin to placebo. They showed that although statins failed to prevent VAP, the overall mortality was reduced in the subset of the most severe patients receiving statin compared with placebo<sup>64</sup>. Nonetheless, the only large multicenter RCT published so far showed that atorvastatin in combination to antibiotic had no effect on the outcome of patients with suspected VAP<sup>35</sup>. However, one cannot exclude that statins are actually be beneficial to the host if given prior to infection onset, as we did in our model and as suggested by one RCT's subgroup analysis<sup>37</sup>. Several explanations could be proposed: (i) more than one single drug administration is required before reaching blood and pulmonary critical concentrations; (ii) VAP clinical suspicion is probably delayed from actual pneumonia onset (i.e., airway challenge with bacteria triggering the immune response); (iii) immunomodulation has to occur very early during sepsis course in order to prevent any overwhelming pro-inflammatory response.

Several limitations of our study should be mentioned. First, the MV without PEEP we used could be considered as non-clinically relevant, since it is likely to promote cyclic opening and closing of lung units. However, it has recently been reported that such settings were still used, especially in the operating room<sup>65</sup>. In addition, it is known that lung injury is heterogeneous in ARDS patients. As a result, poorly aerated areas of the lung usually coexist with overstretched ones, even if “low- $V_T$ ” (i.e., 6 mL per ideal body weight) is applied, as shown in human studies<sup>66</sup>. Although cautiously, one could assume that such parts of the lung may react as described in the present study if bacterial challenge with *S. aureus* occurred in patients subjected to MV. Third, TLR2 assessment was limited to gene expression. We cannot therefore draw any strong conclusions regarding this point since the corresponding protein was not measured directly. Fourth, since we used small sized samples, our study may be underpowered and our findings should be taken cautiously.

**As a conclusion, atorvastatin exposure prior to pneumonia provides an anti-inflammatory effect within the lung and the systemic compartment of rabbits with MRSA pneumonia treated by LNZ. This effect is probably more relevant and of potential interest in the VAP setting, and may be mediated at least in part by TLR2 down-regulation. Whether such an impact is beneficial for the host remains unclear. Actually, although LNZ enhances pulmonary bacterial clearance, dampening the host systemic inflammatory response with statin could impede defense against MRSA in this compartment, leading thereby to protracted bacteremia. Our findings highlight the need for developing models of pneumonia in ventilated animals.**



## REFERENCES

1. Valles J, Martin-Loeches I, Torres A, Diaz E, Seijas I, Lopez MJ, Garro P, Castillo C, Garnacho-Montero J, Martin Mdel M, de la Torre MV, Olaechea P, Cilloniz C, Almirall J, Garcia F, Jimenez R, Seoane E, Soriano C, Mesalles E, Posada P: Epidemiology, antibiotic therapy and clinical outcomes of healthcare-associated pneumonia in critically ill patients: a Spanish cohort study. *Intensive care medicine* 2014; 40: 572-81
2. Rubinstein E, Kollef MH, Nathwani D: Pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2008; 46 Suppl 5: S378-85
3. Wunderink RG, Niederman MS, Kollef MH, Shorr AF, Kunkel MJ, Baruch A, McGee WT, Reisman A, Chastre J: Linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a randomized, controlled study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012; 54: 621-9
4. Dreyfuss D, Saumon G: Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 294-323
5. Safdar N, Crnich CJ, Maki DG: The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. *Respiratory care* 2005; 50: 725-39; discussion 739-41
6. Nahum A, Hoyt J, Schmitz L, Moody J, Shapiro R, Marini JJ: Effect of mechanical ventilation strategy on dissemination of intratracheally instilled *Escherichia coli* in dogs. *Crit Care Med* 1997; 25: 1733-43
7. Charles PE, Piroth L, Desbiolles N, Lequeu C, Martin L, Portier H, Chavanet P: New model of ventilator-associated pneumonia in immunocompetent rabbits. *Critical care medicine* 2002; 30: 2278-83
8. Charles PE, Martin L, Etienne M, Croisier D, Piroth L, Lequeu C, Pugin J, Portier H, Chavanet P: Influence of positive end-expiratory pressure (PEEP) on histopathological and bacteriological aspects of pneumonia during low tidal volume mechanical ventilation. *Intensive care medicine* 2004; 30: 2263-70
9. Schortgen F, Bouadma L, Joly-Guillou ML, Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G: Infectious and inflammatory dissemination are affected by ventilation strategy in rats with unilateral pneumonia. *Intensive care medicine* 2004; 30: 693-701
10. Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, O'Mahony DS, Glenn RW, Martin TR, Liles WC: Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2006; 86: 790-9
11. Pugin J, Dunn I, Jolliet P, Tassaux D, Magnenat JL, Nicod LP, Chevrolet JC: Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *Am J Physiol* 1998; 275: L1040-50
12. Bregeon F, Roch A, Delpierre S, Ghigo E, Autillo-Touati A, Kajikawa O, Martin TR, Pugin J, Portugal H, Auffray JP, Jammes Y: Conventional mechanical ventilation of healthy lungs induced pro-inflammatory cytokine gene transcription. *Respir Physiol Neurobiol* 2002; 132: 191-203
13. Altemeier WA, Matute-Bello G, Frevert CW, Kawata Y, Kajikawa O, Martin TR, Glenn RW: Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: L533-42
14. Moriyama K, Ishizaka A, Nakamura M, Kubo H, Kotani T, Yamamoto S, Ogawa EN, Kajikawa O, Frevert CW, Kotake Y, Morisaki H, Koh H, Tasaka S, Martin TR, Takeda J: Enhancement of the endotoxin recognition pathway by ventilation with a large tidal volume in rabbits. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2004; 286: L1114-21
15. Charles PE, Tissieres P, Barbar SD, Croisier D, Dufour J, Dunn-Siegrist I, Chavanet P, Pugin J: Mild-stretch mechanical ventilation up-regulates toll-like receptor 2 and sensitizes the lung to bacterial lipopeptide. *Critical care* 2011; 15: R181
16. Murphy DB, Cregg N, Tremblay L, Engelberts D, Laffey JG, Slutsky AS, Romaschin A, Kavanagh BP: Adverse ventilatory strategy causes pulmonary-to-systemic translocation of endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 27-33
17. 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: 1301-8
18. Futier E, Constantin JM, Paugam-Burtz C, Pascal J, Eurin M, Neuschwander A, Marret E, Beaussier M, Gutton C, Lefrant JY, Allaouchiche B, Verzilli D, Leone M, De Jong A, Bazin JE, Pereira B, Jaber S: A trial of intraoperative low-tidal-volume ventilation in abdominal surgery. *The New England journal of medicine* 2013; 369: 428-37

19. Bonten MJ, Froom AH, Gaillard CA, Greve JW, de Leeuw PW, Drent M, Stobberingh EE, Buurman WA: The systemic inflammatory response in the development of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1105-13
20. Parsons PE, Matthay MA, Ware LB, Eisner MD: Elevated plasma levels of soluble TNF receptors are associated with morbidity and mortality in patients with acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L426-31
21. Bauer TT, Monton C, Torres A, Cabello H, Fillela X, Maldonado A, Nicolas JM, Zavala E: Comparison of systemic cytokine levels in patients with acute respiratory distress syndrome, severe pneumonia, and controls. *Thorax* 2000; 55: 46-52
22. Hellyer TP, Morris AC, McAuley DF, Walsh TS, Anderson NH, Singh S, Dark P, Roy AI, Baudouin SV, Wright SE, Perkins GD, Kefala K, Jeffels M, McMullan R, O'Kane CM, Spencer C, Laha S, Robin N, Gossain S, Gould K, Ruchaud-Sparagano MH, Scott J, Browne EM, MacFarlane JG, Wiscombe S, Widdrington JD, Dimmick I, Laurenson IF, Nauwelaers F, Simpson AJ: Diagnostic accuracy of pulmonary host inflammatory mediators in the exclusion of ventilator-acquired pneumonia. *Thorax* 2015; 70: 41-7
23. Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S, Stern T: Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2001; 285: 1711-8
24. McMurray JJ, Kjekshus J, Gullestad L, Dunselman P, Hjalmarsen A, Wedel H, Lindberg M, Waagstein F, Grande P, Hradec J, Kamensky G, Korewicki J, Kuusi T, Mach F, Ranjith N, Wikstrand J: Effects of statin therapy according to plasma high-sensitivity C-reactive protein concentration in the Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure (CORONA): a retrospective analysis. *Circulation* 2009; 120: 2188-96
25. Terblanche M, Almog Y, Rosenson RS, Smith TS, Hackam DG: Statins and sepsis: multiple modifications at multiple levels. *The Lancet Infectious Diseases* 2007; 7: 358-368
26. Yende S, Milbrandt EB, Kellum JA, Kong L, Delude RL, Weissfeld LA, Angus DC: Understanding the potential role of statins in pneumonia and sepsis. *Critical care medicine* 2011; 39: 1871-8
27. Majumdar SR, McAlister FA, Eurich DT, Padwal RS, Marrie TJ: Statins and outcomes in patients admitted to hospital with community acquired pneumonia: population based prospective cohort study. *BMJ* 2006; 333: 999
28. Leung S, Pokharel R, Gong MN: Statins and outcomes in patients with bloodstream infection: a propensity-matched analysis. *Critical care medicine* 2012; 40: 1064-71
29. Mortensen EM, Restrepo MI, Anzueto A, Pugh J: The effect of prior statin use on 30-day mortality for patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Respiratory research* 2005; 6: 82
30. Chalmers JD, Singanayagam A, Murray MP, Hill AT: Prior statin use is associated with improved outcomes in community-acquired pneumonia. *The American journal of medicine* 2008; 121: 1002-1007 e1
31. Ma Y, Wen X, Peng J, Lu Y, Guo Z, Lu J: Systematic review and meta-analysis on the association between outpatient statins use and infectious disease-related mortality. *PloS one* 2012; 7: e51548
32. Siempos II, Maniatis NA, Kopterides P, Magkou C, Glynos C, Roussos C, Armaganidis A: Pretreatment with atorvastatin attenuates lung injury caused by high-stretch mechanical ventilation in an isolated rabbit lung model. *Critical care medicine* 2010; 38: 1321-8
33. Muller HC, Hellwig K, Rosseau S, Tschernig T, Schmiedl A, Gutbier B, Schmeck B, Hippenstiel S, Peters H, Morawietz L, Suttrop N, Witzenzrath M: Simvastatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Critical care* 2010; 14: R143
34. Bruyere R, Vigneron C, Prin S, Pechinot A, Quenot JP, Aho S, Papazian L, Charles PE: Impact of prior statin therapy on the outcome of patients with suspected ventilator-associated pneumonia: an observational study. *Critical care* 2014; 18: R83
35. Papazian L, Roch A, Charles PE, Penot-Ragon C, Perrin G, Roulier P, Goutorbe P, Lefrant JY, Wiramus S, Jung B, Perbet S, Hernu R, Nau A, Baldesi O, Allardet-Servent J, Baumstarck K, Jouve E, Moussa M, Hraiech S, Guervilly C, Forel JM: Effect of statin therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia: a randomized clinical trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2013; 310: 1692-700
36. McAuley DF, Laffey JG, O'Kane CM, Perkins GD, Mullan B, Trinder TJ, Johnston P, Hopkins PA, Johnston AJ, McDowell C, McNally C: Simvastatin in the acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine* 2014; 371: 1695-703
37. Kruger P, Bailey M, Bellomo R, Cooper DJ, Harward M, Higgins A, Howe B, Jones D, Joyce C, Kostner K, McNeil J, Nichol A, Roberts MS, Syres G, Venkatesh B: A Multicenter Randomized Trial of

Atorvastatin Therapy in Intensive Care Patients with Severe Sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2013; 187: 743-750

38. Diep BA, Afasizheva A, Le HN, Kajikawa O, Matute-Bello G, Tkaczyk C, Sellman B, Badiou C, Lina G, Chambers HF: Effects of Linezolid on Suppressing In Vivo Production of Staphylococcal Toxins and Improving Survival Outcomes in a Rabbit Model of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Necrotizing Pneumonia. *Journal of Infectious Diseases* 2013; 208: 75-82

39. Broccard A, Shapiro RS, Schmitz LL, Adams AB, Nahum A, Marini JJ: Prone positioning attenuates and redistributes ventilator-induced lung injury in dogs. *Crit Care Med* 2000; 28: 295-303

40. Kajikawa O, Frevert CW, Lin SM, Goodman RB, Mongovin SM, Wong V, Ballman K, Daubeuf B, Elson G, Martin TR: Gene expression of Toll-like receptor-2, Toll-like receptor-4, and MD2 is differentially regulated in rabbits with Escherichia coli pneumonia. *Gene* 2005; 344: 193-202

41. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC(T)</sup> Method. *Methods* 2001; 25: 402-8

42. Slutsky AS, Ranieri VM: Ventilator-induced lung injury. *The New England journal of medicine* 2013; 369: 2126-36

43. Ladoire S, Pauchard LA, Barbar SD, Tissieres P, Croisier-Bertin D, Charles PE: Impact of the Prone Position in an Animal Model of Unilateral Bacterial Pneumonia Undergoing Mechanical Ventilation. *Anesthesiology* 2013

44. Charles PE, Etienne M, Croisier D, Piroth L, Lequeu C, Pugin J, Portier H, Chavanet P: The impact of mechanical ventilation on the moxifloxacin treatment of experimental pneumonia caused by Streptococcus pneumoniae. *Critical care medicine* 2005; 33: 1029-35

45. Jacqueline C, Roquilly A, Desessard C, Boutoille D, Broquet A, Le Mabecque V, Amador G, Potel G, Caillon J, Asehnoune K: Efficacy of ceftolozane in a murine model of Pseudomonas aeruginosa acute pneumonia: in vivo antimicrobial activity and impact on host inflammatory response. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2013; 68: 177-83

46. Akinnusi ME, Hattemer A, Gao W, El-Solh AA: Does linezolid modulate lung innate immunity in a murine model of methicillin-resistant Staphylococcus aureus pneumonia? *Critical care medicine* 2011; 39: 1944-52

47. Niessner A, Steiner S, Speidl WS, Pleiner J, Seidinger D, Maurer G, Goronzy JJ, Weyand CM, Kopp CW, Huber K, Wolzt M, Wojta J: Simvastatin suppresses endotoxin-induced upregulation of toll-like receptors 4 and 2 in vivo. *Atherosclerosis* 2006; 189: 408-13

48. Wu BQ, Luo JM, Wang YH, Shi YF, Liu H, Ba JH, Zhang TT: Inhibitory effects of simvastatin on staphylococcus aureus lipoteichoic acid-induced inflammation in human alveolar macrophages. *Clinical and experimental medicine* 2014; 14: 151-60

49. Shyamsundar M, McKeown ST, O'Kane CM, Craig TR, Brown V, Thickett DR, Matthay MA, Taggart CC, Backman JT, Elborn JS, McAuley DF: Simvastatin decreases lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in healthy volunteers. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009; 179: 1107-14

50. Bergeron Y, Ouellet N, Deslauriers AM, Simard M, Olivier M, Bergeron MG: Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun* 1998; 66: 912-22

51. Kor DJ, Iscimen R, Yilmaz M, Brown MJ, Brown DR, Gajic O: Statin administration did not influence the progression of lung injury or associated organ failures in a cohort of patients with acute lung injury. *Intensive care medicine* 2009; 35: 1039-46

52. van der Poll T, Opal SM: Host-pathogen interactions in sepsis. *The Lancet. Infectious diseases* 2008; 8: 32-43

53. Calisto KL, Carvalho Bde M, Ropelle ER, Mittestainer FC, Camacho AC, Guadagnini D, Carvalheira JB, Saad MJ: Atorvastatin improves survival in septic rats: effect on tissue inflammatory pathway and on insulin signaling. *PloS one* 2010; 5: e14232

54. Magret M, Lisboa T, Martin-Loeches I, Manes R, Nauwynck M, Wrigge H, Cardellino S, Diaz E, Koulenti D, Rello J: Bacteremia is an independent risk factor for mortality in nosocomial pneumonia: a prospective and observational multicenter study. *Critical care* 2011; 15: R62

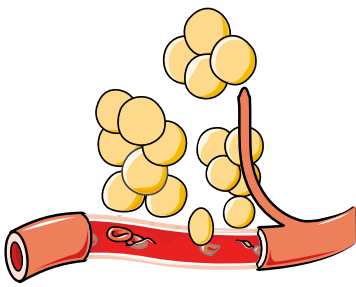
55. Yoshizawa S, Tateda K, Saga T, Ishii Y, Yamaguchi K: Virulence-suppressing effects of linezolid on methicillin-resistant Staphylococcus aureus: possible contribution to early defervescence. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; 56: 1744-8

56. Stevens DL, Ma Y, Salmi DB, McIndoo E, Wallace RJ, Bryant AE: Impact of antibiotics on expression of virulence-associated exotoxin genes in methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *The Journal of infectious diseases* 2007; 195: 202-11

57. Matsumoto M, Einhaus D, Gold ES, Aderem A: Simvastatin augments lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses in macrophages by differential regulation of the c-Fos and c-Jun transcription factors. *Journal of immunology* 2004; 172: 7377-84
58. Lindholm MW, Nilsson J: Simvastatin stimulates macrophage interleukin-1beta secretion through an isoprenylation-dependent mechanism. *Vascular pharmacology* 2007; 46: 91-6
59. Wang Y, Zhang MX, Meng X, Liu FQ, Yu GS, Zhang C, Sun T, Wang XP, Li L, Wang YY, Ding SF, Yang JM, Zhang Y: Atorvastatin suppresses LPS-induced rapid upregulation of Toll-like receptor 4 and its signaling pathway in endothelial cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 2011; 300: H1743-52
60. Patel TR, Corbett SA: Simvastatin suppresses LPS-induced Akt phosphorylation in the human monocyte cell line THP-1. *The Journal of surgical research* 2004; 116: 116-20
61. Moutzouri E, Tellis CC, Rousouli K, Liberopoulos EN, Milionis HJ, Elisaf MS, Tselepis AD: Effect of simvastatin or its combination with ezetimibe on Toll-like receptor expression and lipopolysaccharide - induced cytokine production in monocytes of hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 2012; 225: 381-7
62. Vaneker M, Joosten LA, Heunks LM, Snijdelaar DG, Halbertsma FJ, van Egmond J, Netea MG, van der Hoeven JG, Scheffer GJ: Low-tidal-volume mechanical ventilation induces a toll-like receptor 4-dependent inflammatory response in healthy mice. *Anesthesiology* 2008; 109: 465-72
63. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD, 2nd, Kreisel D, Krupnick AS, Srivastava A, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS: Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2011; 306: 2594-605
64. Makris D, Manoulakas E, Komnos A, Papakrivou E, Tzovaras N, Hovas A, Zintzaras E, Zakynthinos E: Effect of pravastatin on the frequency of ventilator-associated pneumonia and on intensive care unit mortality: open-label, randomized study. *Critical care medicine* 2011; 39: 2440-6
65. Hess DR, Kondili D, Burns E, Bittner EA, Schmidt UH: A 5-year observational study of lung-protective ventilation in the operating room: a single-center experience. *Journal of critical care* 2013; 28: 533 e9-15
66. Terragni PP, Rosboch G, Tealdi A, Corno E, Menaldo E, Davini O, Gandini G, Herrmann P, Mascia L, Quintel M, Slutsky AS, Gattinoni L, Ranieri VM: Tidal hyperinflation during low tidal volume ventilation in acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2007; 175: 160-6

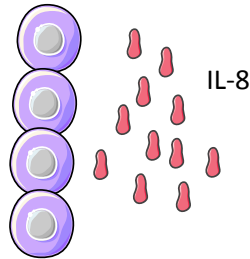
Pré-traitement aux statines suivi d'une antibiothérapie au linezolide chez animaux ventilés infectés au SARM

Favorise



Translocation systémique de SARM

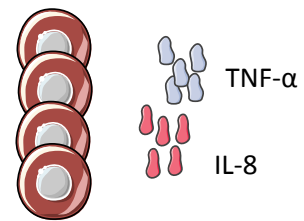
Potentiale effet du LNZ dans le poumon



Cellules pulmonaires

Diminution de la libération IL-8

Potentiale effet du LNZ en systémique

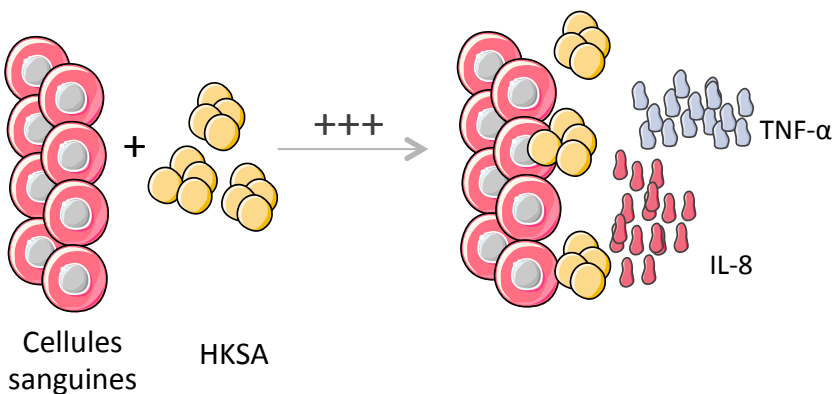


Cellules spléniques

Diminution inflammation dans la rate

Traitement aux statines sur sang de lapins ventilés stimulé *ex vivo* par le HKSA

Hyper réaction du sang à la stimulation par HKSA

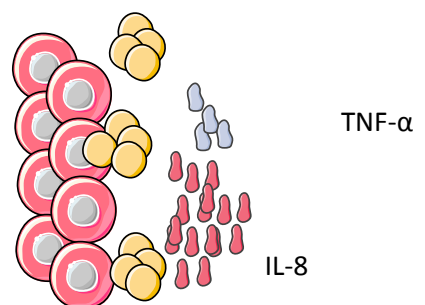


Cellules sanguines

HKSA

Libération massive d'IL-8 et TNF-α

Statine diminue effet pro-inflammatoire de la VM



TNF-α

IL-8

Diminution libération TNF-α

## Conclusion.

Ces travaux de recherche nous ont permis de montrer que :

- ✓ dans un contexte de PAVM à SARM, l'exposition aux statines avant l'infection au SARM a des effets anti-inflammatoires principalement sur le compartiment systémique,
- ✓ cet effet anti-inflammatoire des statines dans le sang pourrait augmenter le risque de translocation des SARM du poumon au sang et ceci malgré l'administration précoce d'une antibiothérapie adaptée.

## IV. Article 4

### « Mitochondrial alarmins are tissue mediators of ventilator-induced lung injury and ARDS »

Durant ma thèse j'ai pu collaborer avec une équipe de renommée internationale sur un projet initié à Genève par le Professeur Pugin. Ce travail a abouti à un article qui est actuellement soumis pour publication.

Une part importante du VILI est due à une inflammation dans les voies respiratoires basses, médiée par des cytokines et chemokines pro-inflammatoires, et des neutrophiles sanguins recrutés au niveau du poumon (Kawano, Mori et al. 1987, Pugin, Verghese et al. 1999). Il a été démontré dans des expériences *in vitro* (Pugin, Dunn et al. 1998, DUNN and PUGIN 1999) ainsi que dans des études chez l'animal (Bregeon, Roch et al. 2002, Vaneker, Halbertsma et al. 2007) que l'étirement cyclique *per se* induit la libération de médiateurs pro-inflammatoires comme MCP-1 ou l'IL-8.

Il a été montré que la VM et l'étirement cyclique des cellules pulmonaires induisent la rupture des membranes plasmiques des cellules dont le contenu intracellulaire se déverse alors dans l'espace extra-cellulaire (Vlahakis and Hubmayr 2000, Stroetz, Vlahakis et al. 2001). Des études récentes révèlent que les cellules lésées libèrent des alarmines dont certaines ont pour origine la mitochondrie (McDonald, Pittman et al. 2010, Zhang, Raoof et al. 2010). Ces alarmines dites mitochondriales pourraient jouer un rôle dans le développement du VILI (Kuipers, van der Poll et al. 2011, Wu, Yan et al. 2013).

Dans ce travail, l'hypothèse a été faite que les alarmines mitochondriales pourraient être libérées par les cellules des voies respiratoires en réponse au stress induit par la ventilation mécanique. Elles pourraient représenter le lien entre le stimulus mécanique subit par les cellules étirées et la libération locale voire systémique de cytokines inflammatoires.

Les résultats obtenus *in vitro* à partir des cellules alvéolaires humaines de type II soumises à un étirement cyclique, montrent qu'elles libèrent de l'IL-8 et des alarmines mitochondriales sous l'effet des contraintes mécaniques. En effet de grandes quantités d'ADN mitochondrial (cytochrome B, cytochrome C oxidase III et NADH DNA I) ont été retrouvées dans les surnageants des cellules étirées en comparaison aux cellules témoins maintenues dans des conditions statiques (Figure 1 et Figure S1). L'ATP extracellulaire a également été retrouvée en concentration élevée dans le surnageant des cellules A549 étirées pendant 24 heures (Figure 2 Panneau A). L'IL-1 $\beta$  a été mesurée à des taux élevés dans les surnageants de monocytes étirés dérivant de macrophages ainsi que dans des lysats de cellules, en comparaison avec des cellules maintenues en condition statique (Figure 2 Panneau B).

Le surnageant des cellules A549 étirées induit la chemoattraction des neutrophiles humains après 6, 24 et 48 heures (Figure 3 Panneau A). Ce chemotaxis a été bloqué par l'ajout d'un anticorps bloquant le récepteur au fMLP tandis qu'un anticorps bloquant le récepteur à l'IL-8 reste sans effet (Figure 3 Panneau B). A la lumière de ces résultats il semblerait que le fMLP mitochondrial soit libéré par les cellules A549 pendant l'étirement et que cette alarmine soit le principal facteur chemoattractant malgré la présence concomittante de l'IL-8 (Figure 1 Panneau A).

Dans le modèle de lapin, la VM induit des lésions pulmonaires importantes ainsi qu'un recrutement significatif des neutrophiles en comparaison aux animaux laissés en respiration spontanée (Figure S2 et Figure S3 Panneau A et B). Comparés aux animaux SB, les animaux ventilés de manière agressive présentent des concentrations en cytokines pro-inflammatoires (IL-8, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) augmentées dans le tissu pulmonaire et les LBA (Figure S4). Les LBA des animaux ventilés 4 et 8 heures présentent de plus grandes concentrations en ADN mitochondrial que les témoins en respiration spontanée (Figure 4 et Figure S5 Panneau A et B). Nous avons retrouvé significativement plus d'ATP dans les LBA des animaux soumis à la VM pendant 8 heures (Figure 5 Panneau A). L'activité chemotactique du LBA vis-à-vis des neutrophiles mesurée *in vitro* est plus importante lorsqu'il est issu des animaux ventilés pendant 8 heures (Figure 5 Panneau



B). Ces résultats obtenus grâce au modèle animal confirment ceux retrouvés *in vitro* puisqu'ils suggèrent que les alarmines sont libérées dans les voies respiratoires basses des lapins soumis à la VM en plus grandes quantités que lors d'une ventilation spontanée.

L'ADN mitochondrial (Figure 6 Panneau A) est significativement plus élevé dans les LBA des patients aux jours 1 et 7 après le début du SDRA, en particulier chez ceux avec une importante inflammation alvéolaire. Les LBA de patients souffrant de SDRA stimulent l'expression cellulaire de TLR9, le récepteur de l'ADN mitochondrial et bactérien (Figure S6 Panneau B). Son activité est inhibée par l'antagoniste du TLR9, l'ODN TTAGGG.



## Mitochondrial alarmins are tissue mediators of ventilator-induced lung injury and ARDS

Journal:	<i>American Journal of Respiratory And Critical Care Medicine</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	OC - Original Contribution
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Dunn-Siegrist, Irène; University Hospitals of Geneva, Intensive Care Pauchard, Laure-Anne; University Hospital of Dijon, Intensive Care Charles, Pierre-Emmanuel; University Hospital of Dijon, Intensive Care Pugin, Jerome; University Hospitals of Geneva, Intensive Care
Subject Category:	3.33 Airway Inflammation < CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, 5.01 Chemokines: Immune Effects < CHEMOKINES AND MEDIATORS, 4.01 ALI/ARDS: Biological Mechanisms < CRITICAL CARE, 4.08 Mechanical Ventilation: Physiology & Pathophysiology < CRITICAL CARE, 7.10 Inflammation:Lung Injury < IMMUNOLOGY AND INFLAMMATION
Keywords:	Alarmins, DAMPs, VILI, ARDS, chemokines

# Mitochondrial alarmins are tissue mediators of ventilator-induced lung injury and ARDS

Irène Dunn-Siegrist<sup>1\*</sup>, Laure-Anne Pauchard<sup>2,3\*</sup>, Pierre-Emmanuel Charles<sup>2,3</sup>,  
and Jérôme Pugin<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Intensive Care Laboratory, University Hospitals of Geneva & Faculty of Medicine, University  
Hospital of Geneva, Switzerland

<sup>2</sup>Service de Réanimation Médicale, Hôpital Bocage Central, University Hospital of Dijon,  
France

<sup>3</sup>U.M.R. 1347 (pôle M.E.R.S.), I.N.R.A., Dijon, France

\*Contributed equally to this work

\*\*Corresponding author. Mailing address: Intensive Care Division, University Hospitals of  
Geneva, CH-1211 Geneva 14, Switzerland. Phone: +41 22 372 92 36, FAX: +41 22 372 74 55,  
e-mail: [jerome.pugin@unige.ch](mailto:jerome.pugin@unige.ch)

## Contribution of the authors:

Conception and design: PEC and JP

Performed experiments: IDS and ALP

Analysis and interpretation: IDS, ALP, PEC, and JP

Drafting of the manuscript: PEC and JP

Running title: Mitochondrial alarmins during VILI and ARDS

Word count: 3,316

Financial support: This study was supported by a grant from the Swiss National Foundation  
for Scientific Research (#310030-141143 to JP).

At-a-glance commentary: Mitochondrial alarmins are released by lung cells submitted to cyclic stretch, and are found in BAL fluids from rabbits during ventilator-induced lung injury (VILI) and ARDS patients with high alveolar inflammation. These alarmins are likely to represent the proximal endogenous mediators of lung injury and inflammation during VILI and ARDS.

For Review Only

## Abstract

Rationale: Endogenous tissue mediators inducing lung inflammation in the context of ventilator-induced lung injury (VILI) and ARDS are ill-defined.

Objectives: To test whether mitochondrial alarmins are released during VILI, and can generate lung inflammation.

Methods: Release of mitochondrial DNA, adenosine triphosphate (ATP), and formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) peptide-dependent neutrophil chemotaxis were measured in conditioned supernatants from human alveolar type II-like (A549) epithelial cells submitted to cyclic stretch *in vitro*. Similar measurements were performed in bronchoalveolar lavage fluids from rabbits submitted to an injurious ventilatory regimen, and from patients with ARDS.

Measurements and main results: Mitochondrial DNA was released by A549 cell during cell stretching, and was found elevated in BAL fluids from rabbits during VILI, and from ARDS patients. Autocrine activation of A549 cells during cyclic stretch could be inhibited by TLR9 blockade. ATP concentrations were increased in conditioned supernatants from A549 cells, and in rabbit BAL fluids during VILI. Neutrophil chemotaxis induced by A549 cells conditioned supernatants was essentially dependent on fMLP rather than IL-8. A synergy between cyclic stretch-induced alarmins and LPS was found in monocyte-derived macrophages in the production of IL-1 $\beta$ .

Conclusions: Mitochondrial alarmins are released during cyclic stretch of human epithelial cells, as well as in BAL fluids from rabbits ventilated with an injurious ventilatory regimen, and in BAL fluids from ARDS patients, particularly in those with high alveolar inflammation. These alarmins stimulate lung cells to produce bioactive IL-1 $\beta$ , and are likely to represent the proximal endogenous mediators of VILI and ARDS, released by injured pulmonary cells.

Number of words in the abstract: 249

Keywords: Alarmins, DAMPs, mitochondrial DNA, ATP, chemokines, VILI, ARDS

## Introduction

Mechanical ventilation has been lifesaving in many patients with respiratory failure since its introduction several decades ago. It has also been associated with lung damage due to cyclic stretch imposed by positive pressure mechanical ventilation, particularly when the lung is injured or infected. This phenomenon is nowadays known as ventilator-induced lung injury (VILI) (1, 2). It is also now widely accepted that ventilatory strategies aimed at decreasing airway overstretching are associated with better outcome in patients with and without acute respiratory distress syndrome (ARDS) (3, 4).

An important part of VILI is due to lower airway inflammation mediated by pro-inflammatory cytokines, chemokines, and blood neutrophils recruited to the airways (5-7). In *in vitro* experiments with isolated lung cells (8, 9) and in animal studies with intact lungs (10-12), it could be demonstrated that cyclic stretch *per se* induced pro-inflammatory mediators such as MCP-1 and IL-8, prototypical chemokines for myeloid cells. Whereas it could be shown that the IL-8 gene was *de novo* transcribed upon cyclic stretch (13), it remained unclear whether this was a direct transcriptional effect of the mechanical strain or a secondary effect of endogenous mediator(s) released by lung cells injured by cyclic stretch.

It has been shown that mechanical ventilation and cyclic stretch of lung cells induced cell membrane breaks with spill over of intracellular cell content (14, 15). Recent evidence suggests that injured cells release alarmins (also called damage-associated molecular patterns, DAMPs) originating from mitochondria (16, 17), and that these alarmins may play a role in mediating VILI (18-21). The release by injured cells of mitochondrial alarmins, such as mitochondrial DNA, fMLP, and adenosine triphosphate (ATP) by injured cells produces a local and sometimes systemic inflammatory response. This response is mainly dependent on the local production of IL-1 $\beta$  via the assembly of the NALP3 inflammasome and the recruitment of neutrophils to injured tissues (16, 17, 22). Since IL-1 $\beta$  is a prominent and bioactive pro-inflammatory cytokine in the lower airways from patients with ARDS (6, 7, 23), we hypothesized that mitochondrial alarmins may be released by airway cells submitted to cyclic stretch due to mechanical ventilation, and represent the missing link between cell stretch and downstream inflammatory cytokines.

## Methods

### In vitro cell stretching

The human alveolar type II-like A549 cells (ATCC, Manassas, VA) were cultured onto silastic membranes (Bioflex® plates, Dunn Labortechnik, Asbach, Germany), and submitted to cyclic stretch using the FX-3000 Flexercell® system (Flexcell International, Hillsborough, NC, USA), as previously described (13, 24). In some experiments, we substituted A459 cells for primary human monocyte-derived macrophages (8). In other experiments, macrophages submitted to cyclic stretch were co-incubated with 100 ng/mL of E.coli K12 LPS (UltraPure® LPS, Invivogen). ATP (Roche) was used at 100 µM concentration, and the TLR9 antagonist ODN TTAGGG (Invivogen) was used at 1 µM concentration. Detailed methods are described in the online data supplement.

### Measurement of alarmins in conditioned supernatants

**Mitochondrial DNA.** Quantitative PCR was used to measure levels of mitochondrial DNA in cell-free supernatants using specific PCR primers for cytochrome B, cytochrome C oxidase III, and NADH I mitochondrial DNA, as previously described (17). In some experiments, 2 µM of the TLR9 antagonist ODN TTAGGG (Invivogen, San Diego, CA, USA) was added to the A549 cell cultures just before starting cell stretch. IL-8 secreted in conditioned supernatants was measured as a marker of cell activation. In other experiments, supernatants from stretched cells were added to HEK293 Blue® cells expressing TLR9 (Invivogen) which respond to TLR9 agonists such as bacterial and mitochondrial DNA by secreting embryonic alkaline phosphatase (25, 26). Cell activation was measured using an alkaline phosphatase substrate present in the colorimetric HEK-Blue™ detection system (Caya-Invivogen Europe, Toulouse, France), quantified using an ELISA reader at 630 nm, and expressed as optical densities. In other experiments, human BAL samples were also incubated with these cells. More detailed methods are described in the online data supplement.

**ATP.** Extracellular ATP released by A549 cells was quantified in conditioned supernatants using the ATP bioluminescence assay kit CLS II with a detection range of  $10^{-11}$  -  $10^{-6}$  M (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). For optimal measurements with this method, pH of

the samples was set at pH 7.7 using Tris buffer. A standard curve was performed with purified ATP.

**Chemotactic factors.** Chemotaxis of human neutrophils induced by supernatants from stretched A549 cells was measured using a modified Boyden chamber as previously described (27). For each experiments, serial dilutions of prototypical chemotactic factors, such as human IL-8 (a gift from C. Power, MerckSerono, Geneva, Switzerland) and the bacterial/mitochondrial formylated peptide N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP, Sigma, St. Louis, MO) served to control a maximal rate of neutrophil chemotaxis. In some experiments, neutrophils were pre-incubated 30 min prior to start the chemotaxis assay with an anti-FPR1 MAb (blocking the human surface receptor for fMLP, R&D, Minneapolis, MN, USA) or an anti-CXCR1 (blocking the anti-human IL-8 receptor A, Abcam). More detailed methods are described in the online data supplement.

**IL-8 and IL-1 $\beta$ .** Conditioned supernatants collected after A549 cell stretching were centrifuged at 1,200 rpm for 5 min at 4°C to remove cell debris. IL-8 levels were measured in supernatants using a sandwich ELISA using a pair of MAbs as previously described (24). IL-1 $\beta$  levels were measured in conditioned supernatants and in cell lysates from monocyte-derived macrophages (cell lysed using a Triton-X-based cell lysis buffer) using a sandwich ELISA (Perbio Science Switzerland SA). This antibody pair does not differentiate pro-IL-1 $\beta$  from mature IL-1 $\beta$ . In one experiment, monocyte-derived macrophages were also cultured with the TLR9 agonist (ODN TTAGGG, Invivogen), ATP, or both. The secretion of IL-1 $\beta$  in conditioned supernatants from monocyte-derived macrophages was also assessed using a Western blot technique as described by Wu et al. (21).

### **Mechanical ventilation in rabbits**

**Experimental protocol.** Rabbits were intubated, ventilated, and sacrificed as previously described (24). Bronchoalveolar lavage (BAL) followed by surgical lungs removal was performed at the end of the experiment as described (24, 28). Measurement of inflammatory mediators in BAL fluids and in lung tissues, as well as the assessment of a histological lung injury score was done as described elsewhere (24, 28). More detailed methods can be found in the online data supplement, including the quantitative



measurement of mitochondrial DNA in BAL fluids. Methods for the quantification of chemotactic attraction of human neutrophils by rabbit BAL fluids are also described in the online data supplement.

### **Patients with ARDS.**

BAL fluid was obtained through fiberoptic bronchoscopy in intubated and mechanically ventilated patients at day 1 and day 7 after the onset of ARDS (Harborview Medical Center, Seattle, WA, USA) (29) after having obtained an informed consent from the patient or the next-of-kin. BAL fluid was also obtained in 3 healthy volunteers, centrifuged and kept frozen at -80°C (29). Total DNA was extracted from cell-free human BAL fluids and quantitative PCR was done measuring levels of the mitochondrial cytochromes B and C oxidase III DNA, as described above for supernatants from stretched cells. BAL samples were defined as “highly inflammatory” if they contained > 80% neutrophils and > 2 mg/mL proteins. Others were defined as “low inflammatory”.

### **Statistical analysis**

Data are presented as median (Inter-Quartile Range, IQR) except otherwise stated. The Mann Whitney U test was used to compare continuous variables between 2 groups for non-normally distributed variables. The Kruskal-Wallis test was used in non-parametrically distributed variables among > 2 groups. A  $p \leq 0.05$  was considered statistically significant. Data were analyzed with the GraphPad Prism® software (30).

## **Results**

**Human type II-like alveolar cells submitted in vitro to cyclic stretch released IL-8 and mitochondrial alarmins.** Mitochondrial DNA (cytochrome B, cytochrome C oxidase III, and NADH I DNA) was found in large quantities in supernatant from stretched cells in a time-dependent manner as compared with cells kept in static conditions (Fig. 1, panel A: IL-8, and panel B: cytochrome C oxidase III DNA; Fig. S1, panel A: cytochrome B, and panel B: NADH I

DNA). Interestingly, the release of mitochondrial DNA seemed important for cell activation and IL-8 release upon stretch since the TLR9 antagonist ODN TTAGG added at the beginning of cell stretching blocked IL-8 production (Fig. 1C). Supernatants from stretched cells activated HEK293 Blue™ cells expressing TLR9, and this could be inhibited by the same ODN TTAGG TLR9 antagonist, showing the prominent, “autocrine” and “paracrine” role of released of mitochondrial DNA in lung cell activation by cell stretch (mean optical densities  $\pm$  SD of alkaline phosphatase activity secreted by HEK293 Blue™ cells expressing TLR9, stimulated by supernatants from stretched A549 cells vs. cells kept in static conditions:  $0.337 \pm 0.069$  vs.  $0.296 \pm 0.062$ ,  $n = 10$  from 5 different experiments,  $p < 0.001$ ). Extracellular ATP was also found to be elevated in supernatants from A549 cells stretched for 24 hrs. as compared with cells kept in static conditions (Fig. 2, panel A). IL-1 $\beta$  was found elevated both in supernatants from stretched monocyte-derived macrophages, as well as in cell lysates, compared with cells kept in static conditions (Fig. 2, panel B). IL-1 $\beta$  was found in supernatants from stretched cells both by ELISA and Western blot (Figure S2), and a synergistic effect was found between cell stretching and LPS treatment of macrophages. A similar synergy was also observed in monocyte-derived macrophages treated by a mixture of TLR9 agonist and ATP (Figure S2). Supernatants from stretched A549 cells induced chemotaxis of human neutrophils after 6, 24, and 48 hrs (Fig. 3, panel A). Chemotaxis was blocked by an anti-fMLP receptor MAb but not by an anti-IL-8 receptor MAb (Fig. 3, panel B). These results strongly suggest that mitochondrial fMLP was released by A549 cells during stretch, and that this alarmin was the main chemotactic factor, despite the concomitant presence of IL-8 in those supernatants (Fig. 1, panel A).

#### **Lung inflammation and alarmins in rabbits submitted to adverse mechanical ventilation.**

In the rabbit model, the mechanical ventilation (MV) regimen induced significant lung injury and neutrophil recruitment as compared with control spontaneously breathing (SB) animals (histology and neutrophil recruitment, Fig. S3, panels A and B; histologic lung injury score Fig. S2,  $p = 0.03$ , panel C). Compared to SB animals, rabbits ventilated with injurious MV had increased pro-inflammatory cytokines in lung tissue and in BAL fluids (IL-8, TNF- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ ; Fig. S4). Cytokines levels were not found to be statistically different in serum from the two groups (data not shown). Mitochondrial DNA was found in larger quantities in BAL fluids from animals submitted to 4 and 8 hrs. of adverse MV as compared with SB animals

(cytochrome C oxidase III DNA,  $p = 0.011$ , Fig. 4; cytochrome B and NADH I DNA, Fig. S5, panels A and B,  $p = 0.015$ , and  $p = 0.017$ , respectively). Significantly higher ATP was found in BAL fluids from rabbits subjected to adverse MV for 8 hrs. ( $p = 0.016$ , Fig. 5, panel A). BAL fluids from MV animals induced *in vitro* chemotaxis of human neutrophils particularly in those originating from animals ventilated for 8 hrs. ( $p = 0.023$ , Fig. 5, panel B). Taken together, these results suggest that mitochondrial alarmins are released in the lower airways of rabbits submitted to an injurious MV, similarly to what was observed in human lung cells submitted *in vitro* to cyclic stretch.

### **Mitochondrial DNA in bronchoalveolar lavage fluids from ARDS patients.**

Mitochondrial DNA (cytochrome C oxidase III, Fig. 6; cytochrome B, Fig. S6, panel A) was significantly elevated in BALF from patients at Day 1 and 7 after the onset of ARDS, particularly in those with highest alveolar inflammation, defined as a neutrophil count of  $> 80\%$  and protein levels  $> 2$  mg/mL. Mitochondrial DNA was found to be low in BAL fluids from 3 healthy volunteers (Fig. S6, panel A). BAL fluids from ARDS patients, particularly those with a high inflammatory pattern stimulated cells expressing TLR9, the receptor for mitochondrial (and bacterial) DNA. BAL fluids from ARDS patients at Day 1 with a high inflammatory profile stimulated HEK293 cells expressing TLR9 (Fig S6, panel B), and this activity was inhibited by the TLR9 antagonist ODN TTAGGG ( $p = 0.03$ , data not shown).

### **Discussion**

Herein, we show that mitochondrial DNA, ATP and fMLP are released from human type II-like A459 cells submitted to cyclic stretch. Similarly, the same proinflammatory alarmins are found in the airways of rabbits submitted to an injurious ventilatory regimen, and mitochondrial DNA concentrations were found to be markedly elevated in BAL fluids from patients with ARDS. In addition, these alarmins were shown to be bioactive and potent pro-inflammatory mediators. Mitochondrial DNA released by stretched cells induced IL-8 in lung cells *via* its receptor TLR9, and virtually all the neutrophil chemotactic activity found in supernatants from stretched cells and rabbit BAL fluids were attributable to the mitochondrial fMLP chemokine.

Lung inflammation is a hallmark of acute lung injury and ARDS (7, 31). Whereas it was first believed that inflammation originated from the primary lung insult (pneumonia, sepsis, aspiration, trauma, etc.), it has now become evident that mechanical ventilation could directly induce airway inflammation, and synergized with the primary lung injury. Supporting this, ARDS patients receiving lung protective ventilator strategy have lower levels of alveolar and systemic inflammation, in particular less alveolar neutrophils, and lower levels of the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  (32).

IL-1 $\beta$  has been shown to play a major role as a local pro-inflammatory mediator in the context of ARDS and VILI, and is secreted by alveolar macrophages and by alveolar epithelial cells (6, 7, 31, 33). IL-1 $\beta$  can be secreted in response to various stimuli, including bacterial molecules such as Gram-negative lipopolysaccharide (LPS). The production of bioactive IL-1 $\beta$  is tightly regulated and follows a multistep pathway. It requires both the upregulation of the pro-IL-1 $\beta$  gene expression, and the posttranslational cleavage of pro-IL-1 $\beta$  into mature IL-1 $\beta$ . This latter step is dependent on the activation of the “inflammatory” caspase-1, part of the NALP3 inflammasome complex (34). It was recently recognized that endogenous danger signals (alarmins) originating from injured/necrotic cells could trigger the production of IL-1 $\beta$ , and be responsible for “aseptic” inflammation. Mitochondrial DNA, when released from injured cells, upregulates the IL-1 $\beta$  gene through its interaction with its receptor, TLR9. Extracellular ATP, which is also released by injured/necrotic cells, induces the assembly of the NALP3 inflammasome and caspase-1 activation through its interaction with the P2X<sub>7</sub> receptor, resulting in the cleavage of pro-IL-1 $\beta$  into bioactive IL-1 $\beta$  (16, 17). Our results confirm that cyclic stretch of human monocyte-derived macrophages induced the production and the release of IL-1 $\beta$ , and that cyclic stretch synergized with co-treatment of macrophages with LPS. Interestingly, in unstretched macrophages, IL-1 $\beta$  was secreted only when incubated with both the TLR9 agonist (inducing pro-IL-1 $\beta$ ) and ATP (assembling the NALP3 inflammasome and activating caspase-1), essential steps to produce mature, bioactive IL-1 $\beta$ . We therefore postulate that cyclic stretch induces the release by lung cells of mitochondrial DNA (TLR9 agonist), and ATP, and that this leads to the production of IL-1 $\beta$  by macrophages, and play an important local pro-inflammatory signal in the lung submitted to (injurious) mechanical ventilation.

In the present paper, we also show that cyclic stretch of type II-like alveolar A549 cells induces the release of both mitochondrial DNA and ATP, and that blockade of the mitochondrial DNA receptor TLR9 by the TLR9 antagonist ODN TTAGGG abrogated the stretch-induced IL-8 secretion by these cells. This strongly suggests autocrine and paracrine cell activation by cytoplasmic alarmins. The extracellular release of cytoplasmic content during cyclic stretch is most likely due to cell plasma membrane breaks induced by cyclic cell elongations, as previously described (14, 15). We postulate that endogenous alarmins released into the airways during mechanical ventilation could be responsible for the local production of IL-1 $\beta$  (and IL-8), and therefore participate in the alveolar inflammation observed during VILI and ARDS.

In our study, important levels of mitochondrial DNA and TLR9 agonistic activity was also found in BAL fluids from ARDS patients, as soon as Day 1 after intubation. The origin of this mitochondrial DNA can be related to lung tissue injury as well as from necrotic alveolar neutrophils. Recently, Zhang et al. confirmed that mitochondrial DNA injected intravenously to rats induced lung inflammation and increased permeability of the alveolar capillary barrier (17), and that mitochondrial DNA upregulated TLR9 in lung tissue (35). Interestingly, mitochondrial DNA is more potent as a TLR9 agonist when it is oxidized (36). The production of reactive oxygen species by different alveolar cells is thought to be an important pathogenic and pro-inflammatory mechanism during ARDS, due to inflammation and hyperoxic environment (37). Aside from protein and lipid oxidation, oxidation of mitochondrial DNA could well represent an important proinflammatory mediator of acute lung injury.

We also report that adverse mechanical ventilation in rabbits induced the elevation in the airways of both mitochondrial DNA and ATP, and that ARDS patients had markedly elevated mitochondrial DNA in BAL fluid. Altogether, these data support a model of alarmin release into the airway by lung cells injured by cyclic stretch, participating in the alveolar inflammation observed during VILI and ARDS. Recent work supports the role of NALP3 inflammasome in the pathogenesis of VILI. NALP3 inflammasome gene expression was upregulated in ventilated patients, and also in ventilated mice receiving high tidal volumes, with increased caspase-1 activation, and increased uric acid levels, a NALP3 agonist (38). Finally, NALP3-deficient mice showed less signs of VILI, and IL-1 receptor antagonist partially

protected mice against VILI, supporting previously published data (23, 38). ATP released into the airways during VILI (30) may also be an agonist for NALP3. Interestingly, Wu et al. recently reported that mechanical ventilation in mice and *in vitro* alveolar macrophage cyclic stretch induced the assembly of NALP3 and activated caspase-1, leading to the production and secretion of bioactive IL-1 $\beta$  (21). Caspase-1 activation was dependent on the generation of reactive oxygen species by mitochondria, but the possible implication of extracellular ATP as a trigger for inflammasome activation was not tested.

Polymorphonuclear neutrophil recruitment to the lung and neutrophil-dependent tissue damage have been proposed as key pathogenic factors in VILI and ARDS (5, 39). It was long thought that the main neutrophil chemotactic and activation factor was the CXC chemokine IL-8. It was however recently shown in a murine model of “aseptic” thermal hepatic injury that mitochondrial fMLP released by injured cells was the essential chemotactic factor bringing neutrophils to the necrotic lesion, overriding the effect of CXC chemokines (16). The formylated peptide fMLP is indeed found in both bacterial and mitochondrial walls, attracts and activates neutrophils mainly via the fMLP receptor-1 (FPR1). In our experiments, the neutrophil chemotactic activity present in supernatants from stretched lung cells could almost be completely inhibited by an anti-FPR1 antibody and to a very small extent by an anti-IL-8 receptor antibody. This indicated that the major chemotactic factor released by cells injured by cyclic stretch was mitochondrial fMLP.

In conclusion, our data support a model of VILI with an aseptic local inflammation due to proinflammatory endogenous alarmins released from lung cells injured by airway overstretching, mainly of mitochondrial origin. These alarmins act in concert, one attracting neutrophils (fMLP), one stimulating alveolar cells in an autocrine and paracrine manner to produce pro-inflammatory cytokines (mitochondrial DNA), and one inducing the assembly of the inflammasome (ATP), the activation of caspase-1, and the cleavage of pro-IL-1 $\beta$  into mature and bioactive IL-1 $\beta$ . These lung alarmins may represent the missing molecular links between the mechanical stress imposed to lung cells and the observed airway inflammation in critically ill patients submitted to mechanical ventilation. This model also fits with the “danger theory” in which inflammatory and immune cells will respond to mediators of cell injury, rather than to innocuous non-self molecules (40, 41). It remains to be demonstrated if alarmins released locally by airway stretch act synergistically with other types of lung

injury or infection to generate lung inflammation, as suggested by animal studies (11, 24, 42). It also remains to be tested whether a pharmacologic modulation of alarmin pathways will prevent VILI, and decrease lung inflammation and impairment of pulmonary functions in patients with acute lung injury and ARDS.

**Acknowledgements:**

The authors thank Thomas R. Martin (University of Washington, Seattle, WA) for the gift of BAL samples from ARDS patients and healthy volunteers.

For Review Only

## References

1. Pugin J. Is the ventilator responsible for lung and systemic inflammation? *Intensive care medicine* 2002;28:817-819.
2. 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. *The Journal of clinical investigation* 1997;99:944-952.
3. 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. *The New England journal of medicine* 2000;342:1301-1308.
4. Serpa Neto A, Cardoso SO, Manetta JA, Pereira VG, Esposito DC, Pasqualucci Mde O, Damasceno MC, Schultz MJ. Association between use of lung-protective ventilation with lower tidal volumes and clinical outcomes among patients without acute respiratory distress syndrome: A meta-analysis. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2012;308:1651-1659.
5. Kawano T, Mori S, Cybulsky M, Burger R, Ballin A, Cutz E, Bryan AC. Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *Journal of applied physiology* 1987;62:27-33.
6. Pugin J, Ricou B, Steinberg KP, Suter PM, Martin TR. Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ards, a prominent role for interleukin-1. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996;153:1850-1856.
7. Pugin J, Verghese G, Widmer MC, Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine* 1999;27:304-312.
8. Dunn I, Pugin J. Mechanical ventilation of various human lung cells in vitro: Identification of the macrophage as the main producer of inflammatory mediators. *Chest* 1999;116:95S-97S.
9. Pugin J, Dunn I, Jolliet P, Tassaux D, Magnenat JL, Nicod LP, Chevrolet JC. Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *The American journal of physiology* 1998;275:L1040-1050.
10. Bregeon F, Roch A, Delpierre S, Ghigo E, Autillo-Touati A, Kajikawa O, Martin TR, Pugin J, Portugal H, Auffray JP, Jammes Y. Conventional mechanical ventilation of healthy



lungs induced pro-inflammatory cytokine gene transcription. *Respiratory physiology & neurobiology* 2002;132:191-203.

11. Charles PE, Martin L, Etienne M, Croisier D, Piroth L, Lequeu C, Pugin J, Portier H, Chavanet P. Influence of positive end-expiratory pressure (peep) on histopathological and bacteriological aspects of pneumonia during low tidal volume mechanical ventilation. *Intensive care medicine* 2004;30:2263-2270.
12. Vaneker M, Halbertsma FJ, van Egmond J, Netea MG, Dijkman HB, Snijdelaar DG, Joosten LA, van der Hoeven JG, Scheffer GJ. Mechanical ventilation in healthy mice induces reversible pulmonary and systemic cytokine elevation with preserved alveolar integrity: An in vivo model using clinical relevant ventilation settings. *Anesthesiology* 2007;107:419-426.
13. Oudin S, Pugin J. Role of map kinase activation in interleukin-8 production by human beas-2b bronchial epithelial cells submitted to cyclic stretch. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2002;27:107-114.
14. Stroetz RW, Vlahakis NE, Walters BJ, Schroeder MA, Hubmayr RD. Validation of a new live cell strain system: Characterization of plasma membrane stress failure. *Journal of applied physiology* 2001;90:2361-2370.
15. Vlahakis NE, Hubmayr RD. Invited review: Plasma membrane stress failure in alveolar epithelial cells. *Journal of applied physiology* 2000;89:2490-2496;discussion 2497.
16. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA, Kubes P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science* 2010;330:362-366.
17. Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010;464:104-107.
18. Kuipers MT, van der Poll T, Schultz MJ, Wieland CW. Bench-to-bedside review: Damage-associated molecular patterns in the onset of ventilator-induced lung injury. *Critical care* 2011;15:235.
19. Matsuyama H, Amaya F, Hashimoto S, Ueno H, Beppu S, Mizuta M, Shime N, Ishizaka A, Hashimoto S. Acute lung inflammation and ventilator-induced lung injury caused by atp via the p2y receptors: An experimental study. *Respiratory research* 2008;9:79.
20. Pugin J. How tissue injury alarms the immune system and causes a systemic inflammatory response syndrome. *Annals of intensive care* 2012;2:27.

21. Wu J, Yan Z, Schwartz DE, Yu J, Malik AB, Hu G. Activation of nlrp3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury. *Journal of immunology* 2013;190:3590-3599.
22. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proil-beta. *Molecular cell* 2002;10:417-426.
23. Frank JA, Pittet JF, Wray C, Matthay MA. Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by il-1 receptor blockade. *Thorax* 2008;63:147-153.
24. Charles PE, Tissieres P, Barbar SD, Croisier D, Dufour J, Dunn-Siegrist I, Chavanet P, Pugin J. Mild-stretch mechanical ventilation upregulates toll-like receptor 2 and sensitizes the lung to bacterial lipopeptide. *Critical care* 2011;15:R181.
25. Mortaz E, Adcock IM, Ito K, Kraneveld AD, Nijkamp FP, Folkerts G. Cigarette smoke induces cxcl8 production by human neutrophils via activation of tlr9 receptor. *The European respiratory journal* 2010;36:1143-1154.
26. Panigrahi S, Ma Y, Hong L, Gao D, West XZ, Salomon RG, Byzova TV, Podrez EA. Engagement of platelet toll-like receptor 9 by novel endogenous ligands promotes platelet hyperreactivity and thrombosis. *Circulation research* 2013;112:103-112.
27. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissieres P, Pugin J. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. *Critical care medicine* 2013;41:820-832.
28. Broccard A, Shapiro RS, Schmitz LL, Adams AB, Nahum A, Marini JJ. Prone positioning attenuates and redistributes ventilator-induced lung injury in dogs. *Critical care medicine* 2000;28:295-303.
29. Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, Ruzinski JT, Radella F, 2nd, Park DR, Pugin J, Skerrett SJ, Hudson LD, Martin TR. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001;164:1896-1903.
30. Rich PB, Douillet CD, Mahler SA, Husain SA, Boucher RC. Adenosine triphosphate is released during injurious mechanical ventilation and contributes to lung edema. *The Journal of trauma* 2003;55:290-297.
31. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *The New England journal of medicine* 2000;342:1334-1349.

32. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: A randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1999;282:54-61.
33. Narimanbekov IO, Rozycki HJ. Effect of il-1 blockade on inflammatory manifestations of acute ventilator-induced lung injury in a rabbit model. *Experimental lung research* 1995;21:239-254.
34. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: An integrated view. *Immunological reviews* 2011;243:136-151.
35. Zhang JZ, Liu Z, Liu J, Ren JX, Sun TS. Mitochondrial DNA induces inflammation and increases tlr9/nf-kappab expression in lung tissue. *International journal of molecular medicine* 2014;33:817-824.
36. Hajizadeh S, DeGroot J, TeKoppele JM, Tarkowski A, Collins LV. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* 2003;5:R234-240.
37. Sarma JV, Ward PA. Oxidants and redox signaling in acute lung injury. *Comprehensive Physiology* 2011;1:1365-1381.
38. Kuipers MT, Aslami H, Janczy JR, van der Sluijs KF, Vlaar AP, Wolthuis EK, Choi G, Roelofs JJ, Flavell RA, Sutterwala FS, Bresser P, Leemans JC, van der Poll T, Schultz MJ, Wieland CW. Ventilator-induced lung injury is mediated by the nlrp3 inflammasome. *Anesthesiology* 2012;116:1104-1115.
39. Abraham E. Neutrophils and acute lung injury. *Critical care medicine* 2003;31:S195-199.
40. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* 1994;12:991-1045.
41. Matzinger P. Friendly and dangerous signals: Is the tissue in control? *Nature immunology* 2007;8:11-13.
42. Brégeon F, Delpierre S, Chetaille B, Kajikawa O, Martin TR, Autillo-Touati A, Jammes Y, Pugin J. Mechanical ventilation affects lung function and cytokine production in an experimental model of endotoxemia. *Anesthesiology* 2005;102:331-339.

## Figure legends

### Figure 1.

Panel A. IL-8 secretion in conditioned supernatants from human alveolar type II-like epithelial A459 cells submitted to cell stretching for 3, 19, and 27 hours or kept in static conditions. One representative experiment out of 3 experiments with similar results.

Panel B. Mitochondrial DNA (cytochrome C) release in conditioned supernatants from human alveolar type II-like epithelial A459 cells submitted to cell stretching for 3, 19, and 27 hours or kept in static conditions. One representative experiment out of 3 experiments with similar results.

Panel C. Inhibition of IL-8 secretion in conditioned supernatants from human alveolar type II-like epithelial A459 cells submitted to cell stretching for 24 hours by the TLR9 antagonist ODN TTAGGG. One representative experiment out of 3 experiments with similar results.

### Figure 2.

Panel A. Extracellular ATP measured in conditioned supernatants from human alveolar type II-like epithelial A459 cells submitted to cell stretching for 24 hours, and from cells kept in static conditions. One representative experiment out of 4 experiments with similar results.

Panel B. IL-1 $\beta$  measured in conditioned supernatants from human primary monocyte-derived macrophages submitted to cell stretching for 19 hours (filled bars) and in macrophages cell lysates (open bars), and in macrophages kept in static conditions. One representative experiment out of 3 experiments with similar results.

### Figure 3.

Panel A. Conditioned supernatants from A549 cells submitted to cell stretching for 6, 24, and 48 hours stimulated human primary neutrophil chemotaxis in a 96-well Boyden chamber (results expressed as % neutrophils migrating across the filter to the lower chamber). One representative experiment out of 3 experiments with similar results.

Panel B. Neutrophil chemotaxis induced by conditioned supernatants from A549 cells submitted to cell stretching (6, 24, and 48 hours) is blocked by an antibody to the fMLP receptor-1, but not to an anti-IL-8 receptor antibody. Neutrophils were pre-treated with

blocking antibodies to the fMLP receptor (anti-FPR1), to the IL-8 receptor (anti-CXCR1), or both.

**Figure 4.**

Mitochondrial DNA (cytochrome C) measured by quantitative PCR in bronchoalveolar lavage (5) fluid from rabbits submitted to mechanical ventilation (MV) for 4 and 8 hours and in spontaneously breathing (SB) animals.

**Figure 5.**

Panel A. Extracellular ATP measured in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from rabbits submitted to mechanical ventilation (MV) for 4 and 8 hours and in spontaneously breathing (SB animals).

Panel B. Chemotactic activity of BAL fluid from rabbits submitted to mechanical ventilation (MV) for 4 and 8 hours and in spontaneously breathing (SB) animals. Human primary neutrophil chemotaxis was measured in a 96-well Boyden chamber (results expressed as % neutrophils migrating across the filter to the lower chamber where BAL fluids were put).

Panel C. Chemotactic activity of BAL fluid from ARDS patients at Day 1 and Day 7 after mechanical ventilation (open circles, low inflammatory BAL fluids; closed circles, high inflammatory BAL fluids), and of BAL fluid from healthy volunteers (empty squares). Human primary neutrophil chemotaxis was measured in a 96-well Boyden chamber (results expressed as % neutrophils migrating across the filter to the lower chamber where BAL fluids were put).

**Figure 6.**

Mitochondrial DNA (cytochrome C) measured in bronchoalveolar lavage (BAL) fluids by quantitative PCR from ARDS patients on Day 1 and Day 7 after intubation (high inflammatory BAL fluids, closed circles; low inflammatory BAL fluids, opened circles), and in BAL fluids from healthy human volunteers (opened squares).

Figure 1.

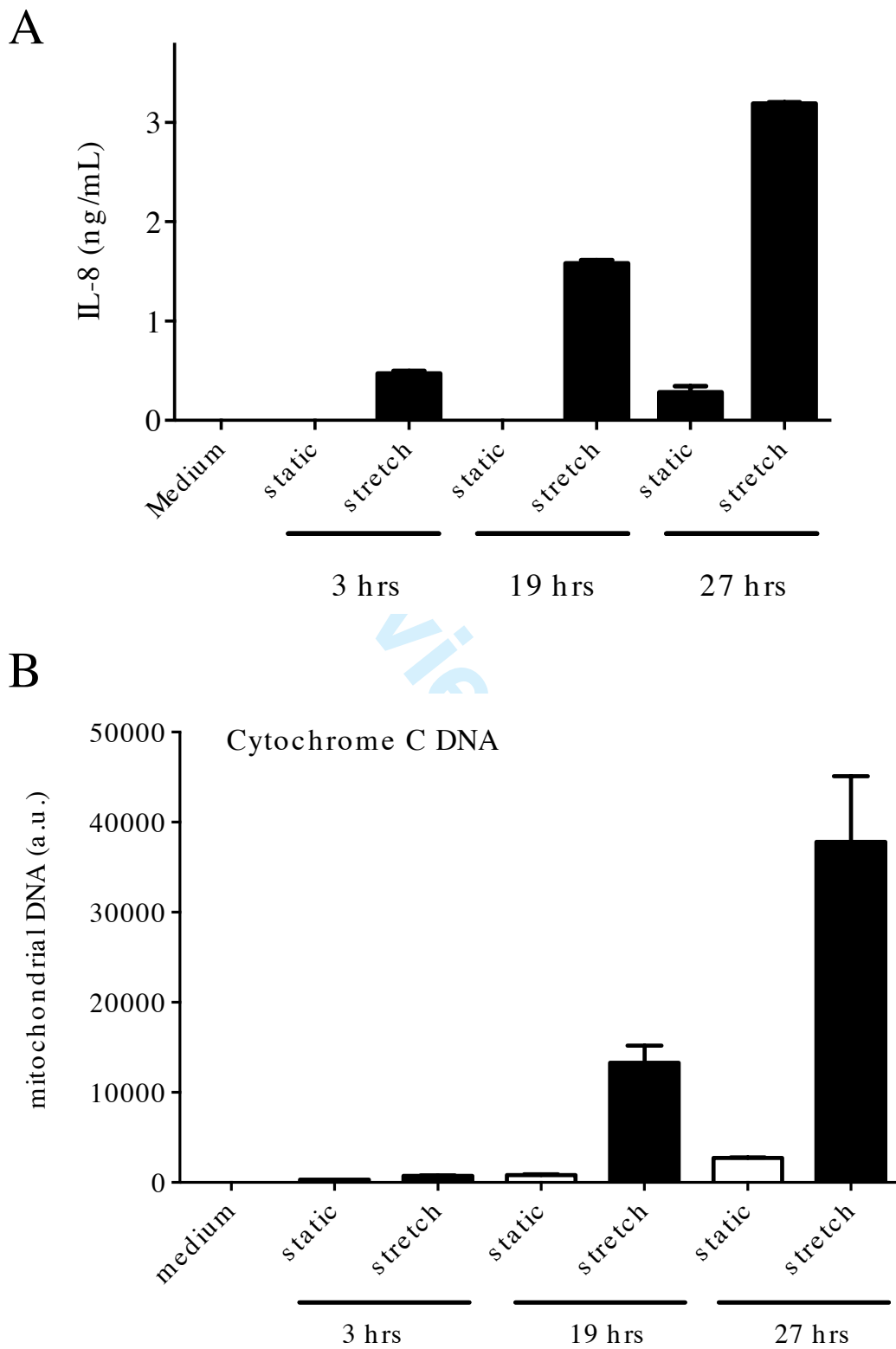
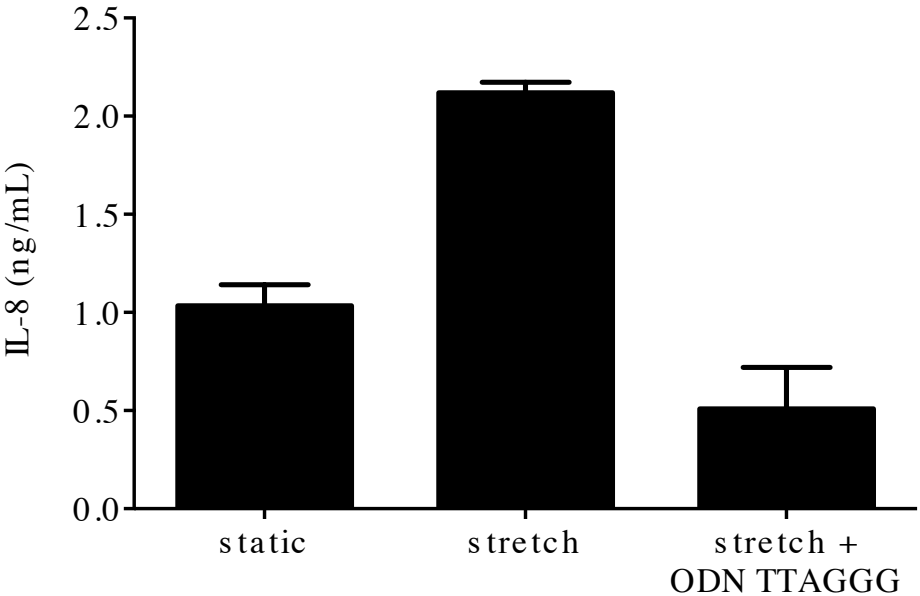


Figure 1.

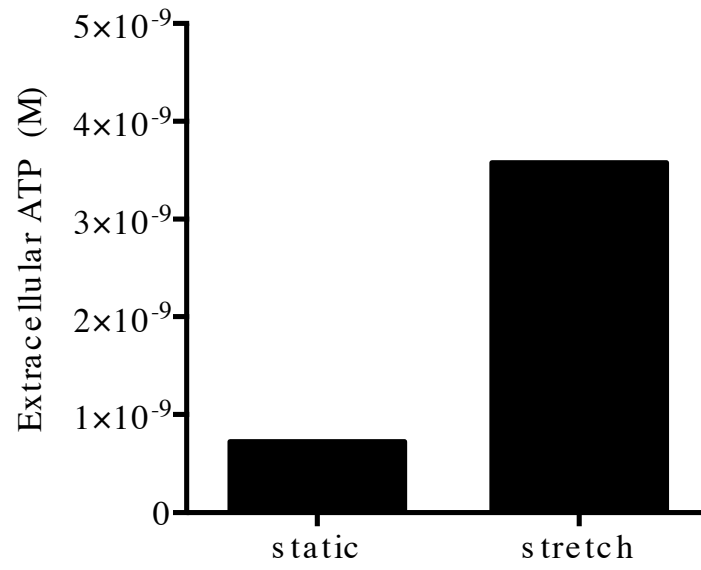
C



www.Only

Figure 2.

A



B

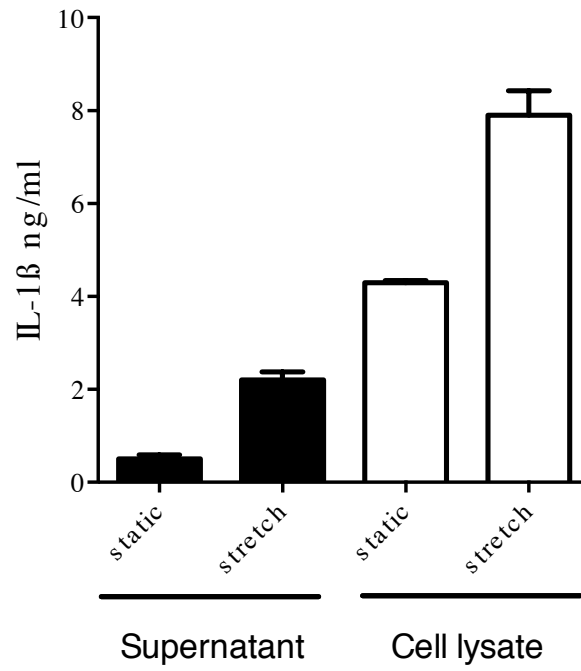
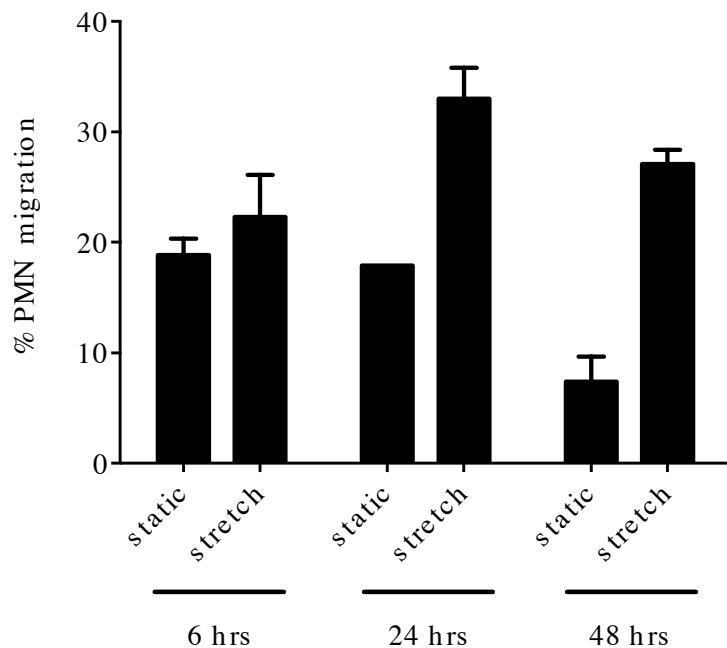




Figure 3.

A



B

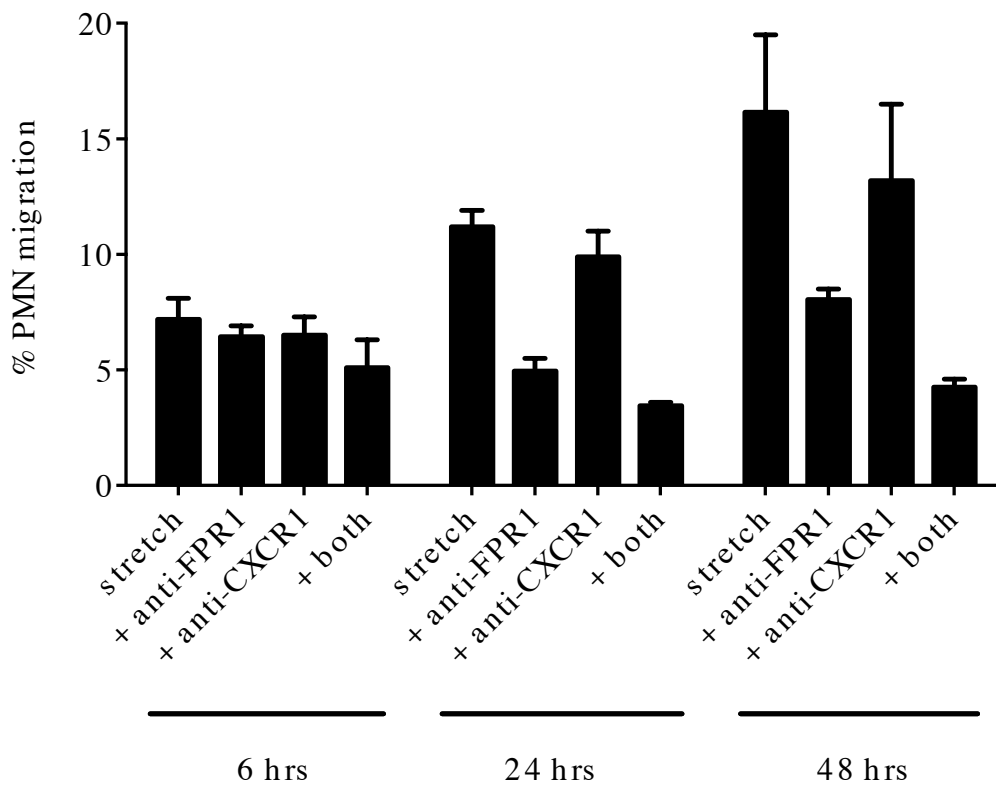


Figure 4.

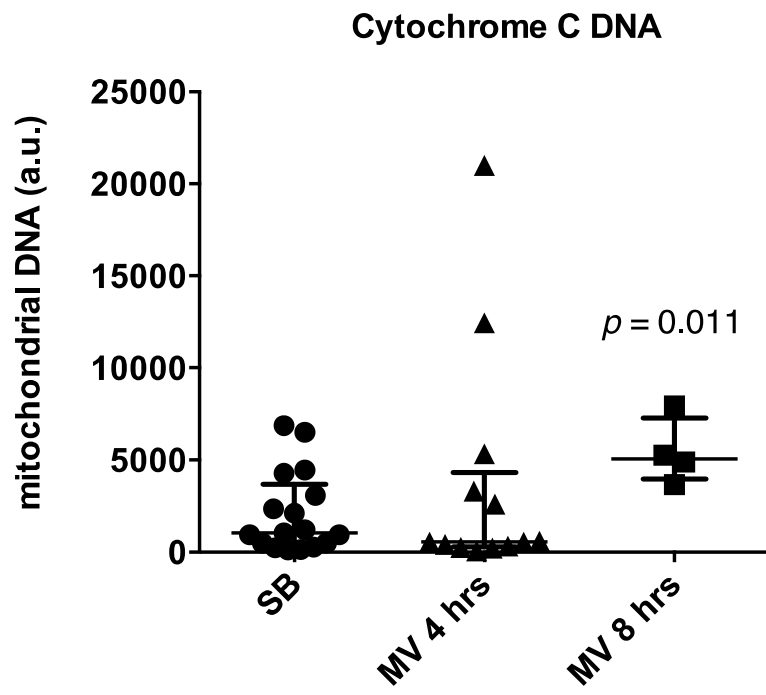
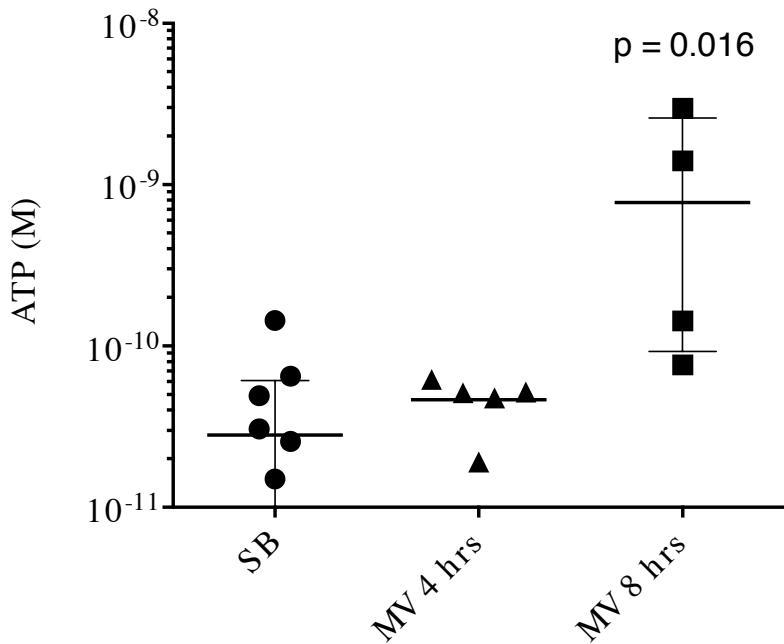


Figure 5.

A



B

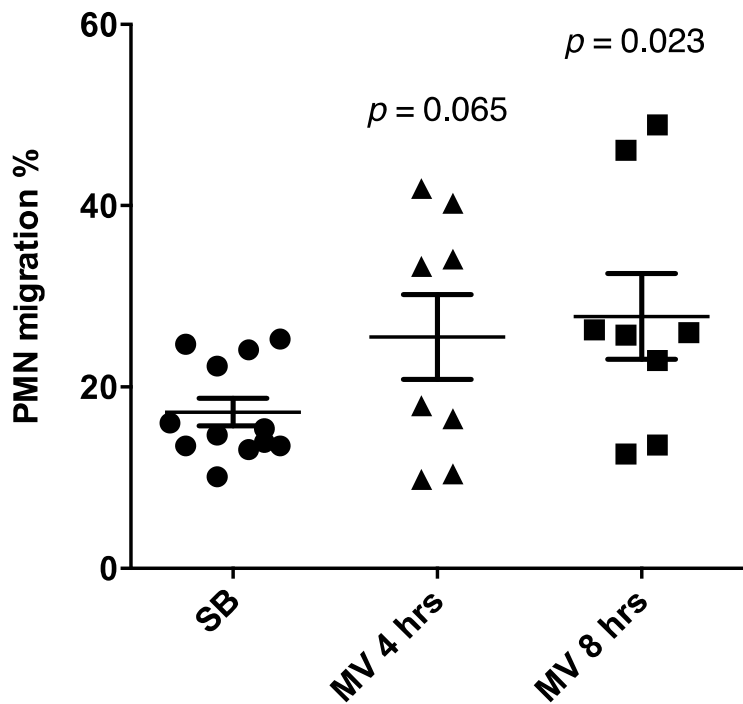
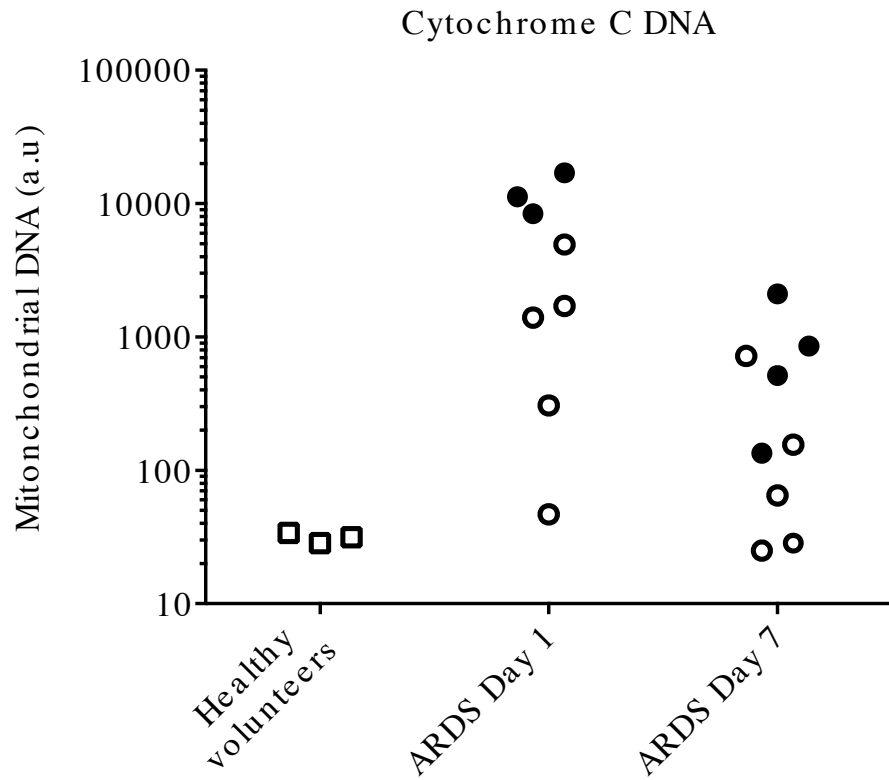


Figure 6.



VMC

## Online data supplement

### Material and Methods

#### Cell stretching

A549 cells were cultured in Bioflex plates up to 80% confluence in DMEM/F12 Glutamax<sup>®</sup> medium (Invitrogen, Basel, Switzerland) containing 10% fetal bovine serum (Gibco, Basel, Switzerland) and antibiotics. Cells were then submitted to cyclic stretch at a stretching rate of 20 cycles/minute with a square signal, a 1:1 stretch:relaxation ratio, and a 20% maximal equibiaxial elongation for 24 to 48 hrs., in a 37°C incubator with 5% CO<sub>2</sub>. Supernatants from stretched cells and from cells grown in the same conditions in Bioflex<sup>®</sup> plates without cell stretching were sampled at different times, and used for the quantification of alarmins, as well as for other functional tests.

#### Measurement of alarmins in conditioned supernatants

**Mitochondrial DNA.** DNA was isolated using the DNA purification kit from blood or body fluids (Qiagen, Valencia, CA, USA), with a final volume of 200 µl of DNA resuspended in elution buffer. Quantitative PCR using the IQ<sup>™</sup> Sybr Green technique (BioRad, Hercules, CA, USA) was performed with one-tenth and one-hundredth dilutions of the final product, compared to a standard curve of human mitochondrial DNA to quantify the amount of mitochondrial DNA amplified, and expressed as arbitrary units. Melting curves were performed to ascertain the amplification of a single amplicon. Human mitochondrial DNA was isolated from A459 cells using the mitochondrial isolation kit for cultured cells from ThermoScientific (Rockford, IL, USA).

**Chemotactic factors.** Human neutrophils from healthy volunteers were isolated using a Ficoll-Paque<sup>™</sup> (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) gradient and seeded into the upper well. Supernatants from cells stretched for various times were put into the lower well. Results were expressed as % of neutrophils from the upper well having migrated acrossed the filter to the lower well after 90 min. Neutrophils in the lower well were detected with the DraQ5<sup>™</sup> dye (Biostatus) marking neutrophil DNA, counted using the

Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System (Life Technologies, Switzerland), and a known concentration of neutrophils as standard.

### **Mechanical ventilation in rabbits**

**Animals.** Male New Zealand white rabbits (body weight, 2.7 - 3.0 kg) were obtained from the "élevage scientifique des Dombes" (Romans, France). They were placed in individual cages, had free access to water, and were fed in accordance with current recommendations described in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Institutes of Health No. 92-23, revised version of 1985. The Dijon Faculty of Medicine Ethical Committee approved the experimental protocol. A central venous catheter was surgically inserted into every rabbit the day before MV.

**Experimental protocol.** Rabbits were put in supine position, and connected to a volume-controlled respirator (20 mL/kg of tidal volume with zero end-expiratory pressure [ZEEP], a respiratory rate of 30 bpm and an inspired fraction of O<sub>2</sub> of 0.5, Figure 1). Rabbits were kept anesthetized and paralyzed throughout the experiment using a continuous infusion of 1 mg/kg/hr of ketamine and 0.3 mg/kg/hr of pancuronium bromide. Rabbits were sacrificed after 4 hrs. (n = 5) or 8 hrs. (n = 5) of mechanical ventilation (MV). Intubated, but spontaneously breathing (SB) rabbits were used as controls (n = 8). At the end of the experiments, animals were exsanguinated by venous puncture, and autopsied aseptically to harvest the lungs. Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed in the lower pulmonary lobe using an appropriate catheter with 5 mL of sterile 0.9% NaCl. The collected BAL fluid was divided into aliquots, and stored at -80°C until analyses were performed. The remaining tissue was homogenized in sterile water. Lung homogenates were then frozen, and stored at -80°C until tissue concentrations of cytokines were measured.

**Lung mediators and lung injury score.** Tissue IL-8, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  protein levels were quantified using rabbit specific ELISA kits following the manufacturer's instructions (Euromedex, Strasbourg, France). Blood samples were obtained before intubation, 4 and 8 hrs. after intubation. Plasma levels of IL-8, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were measured using the same ELISA kits. For ultrastructural examination, approximately 1 cm<sup>3</sup> of tissue was fixed in formalin and embedded in paraffin. Four- $\mu$ m sections were obtained and stained with

hematoxylin-eosin. A pulmonary pathologist blinded to the treatment group examined ten fields of each section and an injury score was calculated as previously described (28). Briefly, lung injury assessment was based on the degree of neutrophil infiltration, haemorrhage and edema. Lung injury was considered absent [0], mild [1], moderate [2] or severe [3]. Another lung sample was harvested for RNA extraction using the GenElute kit (Sigma, Dorset, UK) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was obtained by reverse transcription using random primers, RNAsin treatment, and ImProm II reverse transcriptase (Promega, Madison, WI). Quantitative PCR was performed using the IQ5 thermocycler (Biorad, Hercules, CA) and the IQ<sup>TM</sup> Syber Green Supermix (Biorad) and rabbit-specific primers, designed using the Primer3 software (version 0.4.0), and the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) sequence database. Melting curves were performed to ascertain the specificity of the amplification. The following primers were used: rGapdh forward: 5'-ATG TTT GTG ATG GGC GTG AAC C-3', reverse: 5'-CCC AGC ATC GAA GGT AGA GGA-3'; rIl-8 forward: 5'-AAC CTT CCT GCT GCT TCT GA-3', reverse: 5'-TCT GCA CCC ACT TTT TCC TTG-3'. The results were expressed as expression levels normalized to a reference gene (rGapdh).

**Mitochondrial alarmins in rabbit BAL fluids.** Quantitative PCR was used to measure levels of mitochondrial DNA in BAL fluid (cytochrome B, cytochrome C oxidase III, and NADH I). BAL fluid DNA was isolated using the DNA purification kit from blood or body fluids (Qiagen) using 200 µl of sample. Rabbit primer sequences were synthesized by Microsynth (Balgach, Switzerland) and had no significant homology with sequences from rabbit genomic DNA (Blast<sup>®</sup> site, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). The following primers were used: rabbit cytochrome B, forward 5'-CCA TCC TTG TTC TAG CCT TCA and reverse 5'-AAT GGT GAT GAA CGG GTG TT; rabbit cytochrome C oxidase III, forward 5'-GAA GGC AAT CGC AAA AAC AT and reverse 5'-ACG TGA AGA CCG TGA AAT CC); NADH I, forward 5' GCC CCA ACC CTA GCT CTA AC and reverse 5'-GCT CGG AGA GCA CCA AAT AG. Quantitative PCR was used to measure levels of mitochondrial DNA in BAL fluid using the IQ<sup>TM</sup> Sybr Green technique (Biorad), and quantified using a standard curve of rabbit mitochondrial DNA. Rabbit mitochondrial DNA was isolated from rabbit peripheral blood mononuclear cells obtained from fresh rabbit heparinized blood and a Ficoll-Paque<sup>TM</sup> gradient, using the mitochondrial isolation kit for cultured cells from ThermoScientific. The DNA concentration was measured by spectrometry (Nanodrop ND-1000) and resuspended at the stock concentration of 1 µg/ml. Levels of rabbit BAL fluid ATP was measured using the same technology as for human samples.

**Chemotactic activity of rabbit BAL fluid** was also measured according to the protocol described above for supernatants from human stretched cells, using human neutrophils. Of note, rabbit IL-8 was shown to be chemoattractant for human neutrophils, as shown by a classical chemotactic curve of rabbit IL-8 and human neutrophils in the modified Boyden chamber (results not shown).

### Figure legends

#### Figure S1.

Mitochondrial DNA (cytochrome B, Panel A; NADH I, Panel B) release in conditioned supernatants from human alveolar type II-like epithelial A459 cells submitted to cell stretching for 3, 19, and 27 hours or kept in static conditions. One representative experiment out of 3 experiments with similar results.

#### Figure S2.

Secretion of IL-1 $\beta$  in conditioned supernatants from monocyte-derived macrophages during cell stretching (20 hrs cell stretching). One representative experiment out of 3 experiments with similar results.

Panel A. Measurement of IL-1 $\beta$  by western blot in conditioned supernatants from monocyte-derived macrophages after cell stretching (stretch), LPS treatment (LPS), or both (stretch + LPS). Ctr, unstretched control cells; recIL-1 $\beta$ , recombinant IL-1 $\beta$  migrating at 17kD.

Panel B. Measurement of IL-1 $\beta$  by ELISA in conditioned supernatants from monocyte-derived macrophages after cell stretching (stretch), LPS treatment (LPS), or both (stretch + LPS), left graph. Right graph, IL-1 $\beta$  concentrations in conditioned supernatants from monocyte-derived macrophages incubated with TLR-9 DNA CpG agonist (ODN), adenosine triphosphate (ATP), or both (ODN + ATP).

#### Figure S3.



Increased neutrophil recruitment in lungs from ventilated rabbits. Representative lung histology (hematoxylin-eosin stain) in rabbits submitted to mechanical ventilation (MV) for 4 hours (Panel B), and in spontaneously breathing (SB) animals (Panel A).

Panel C. Increased histologic lung injury score in rabbits submitted to mechanical ventilation (MV) compared to spontaneously breathing (SB) animals.

**Figure S4.**

Lung production (lung tissue mRNAs and proteins) and secretion into the alveolar space (bronchoalveolar lavage [BAL] fluid) of the IL-8 chemokine (panels A, B, and C) and the pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , panels D, E, and F; and IL-1 $\beta$ , panels G, and H) by rabbits submitted to mechanical ventilation (MV) and by spontaneously breathing animals (SB).

**Figure S5.**

Mitochondrial DNA (cytochrome B, panel A; NADH, panel B) measured by quantitative PCR in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from rabbits submitted to mechanical ventilation (MV) for 4 and 8 hours and in spontaneously breathing (SB) animals.

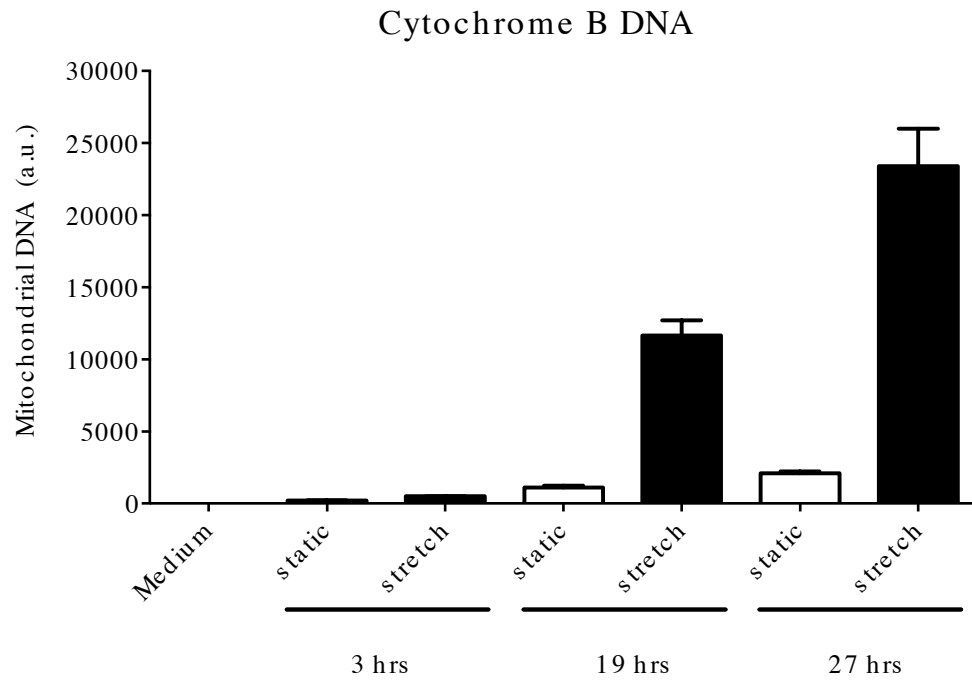
**Figure S6.**

Panel A. Mitochondrial DNA (cytochrome B) measured in bronchoalveolar lavage (BAL) fluids by quantitative PCR from ARDS patients on Day 1 and Day 7 after intubation (high inflammatory BAL fluids, closed circles; low inflammatory BAL fluids, opened circles), and in BAL fluids from healthy human volunteers (opened squares).

Panel B. TLR9 agonistic activity in bronchoalveolar lavage (BAL) fluids from ARDS patients with high inflammatory activity (HI, filled squares) and low inflammatory activity (LI, filled triangles) on Day 1 after intubation. BAL fluids were cultured with HEK293 cells expressing TLR9, and cell activation by mitochondrial (or bacterial DNA) present in BAL fluids was measured by the release in conditioned supernatants of embryonic alkaline phosphatase (OD 630 nm).

Figure S1.

A



B

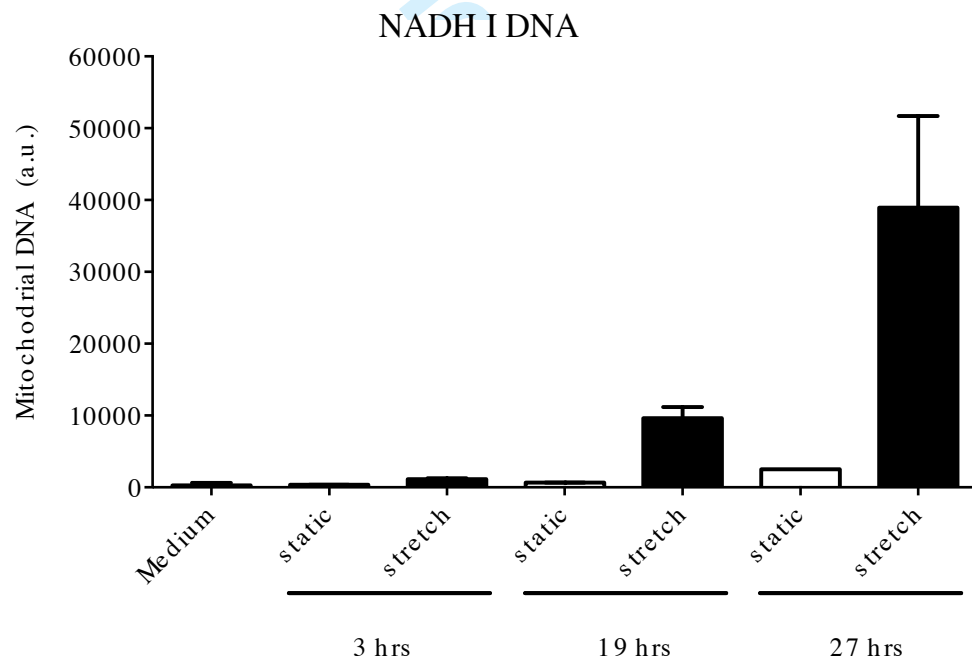


Figure S2.

**A**



**B**

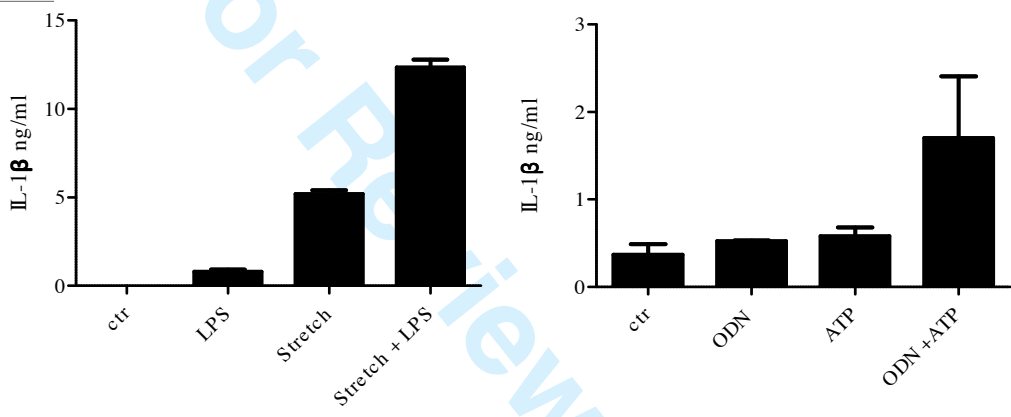


Figure S3.

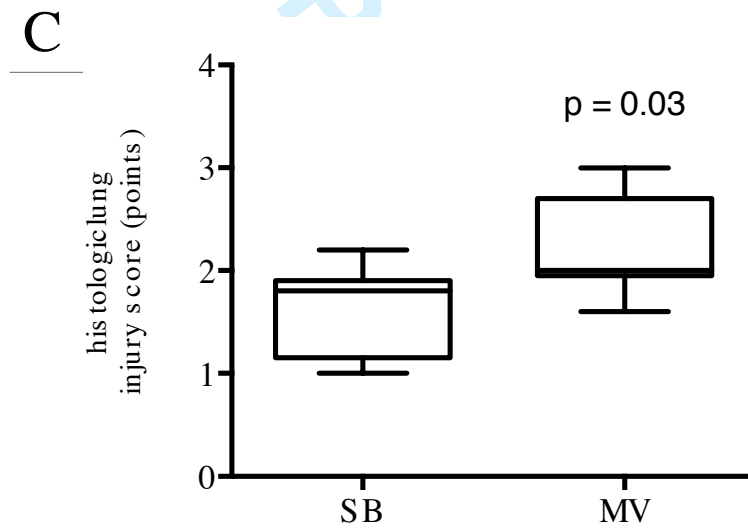
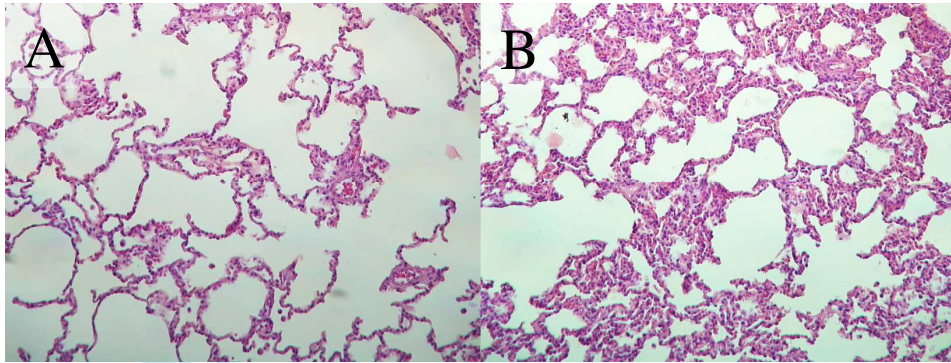


Figure S4.

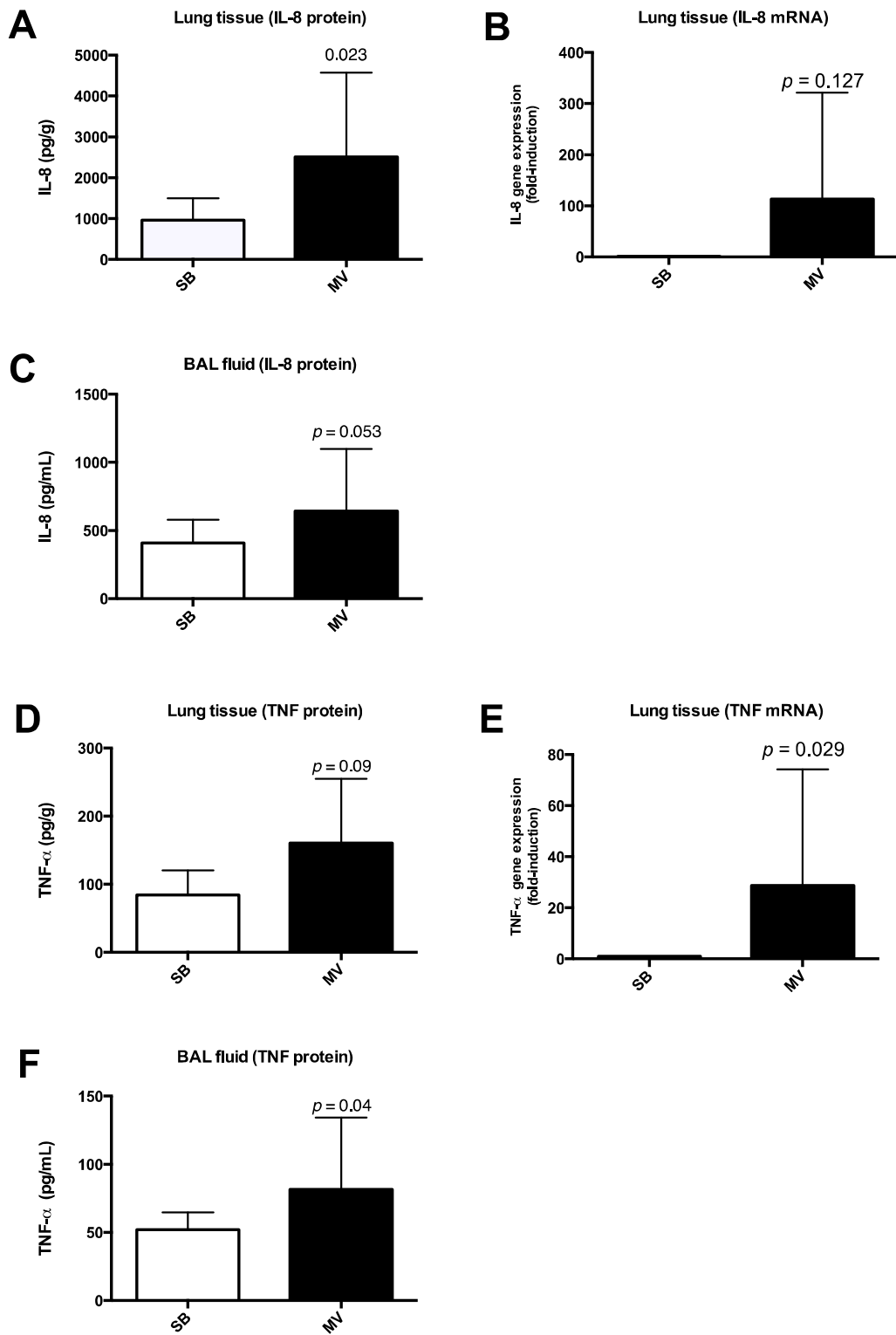
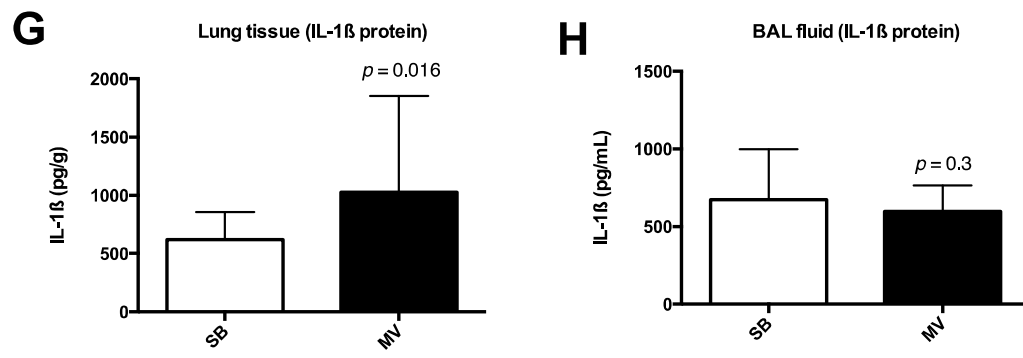


Figure S3.



For Review Only

Figure S5.

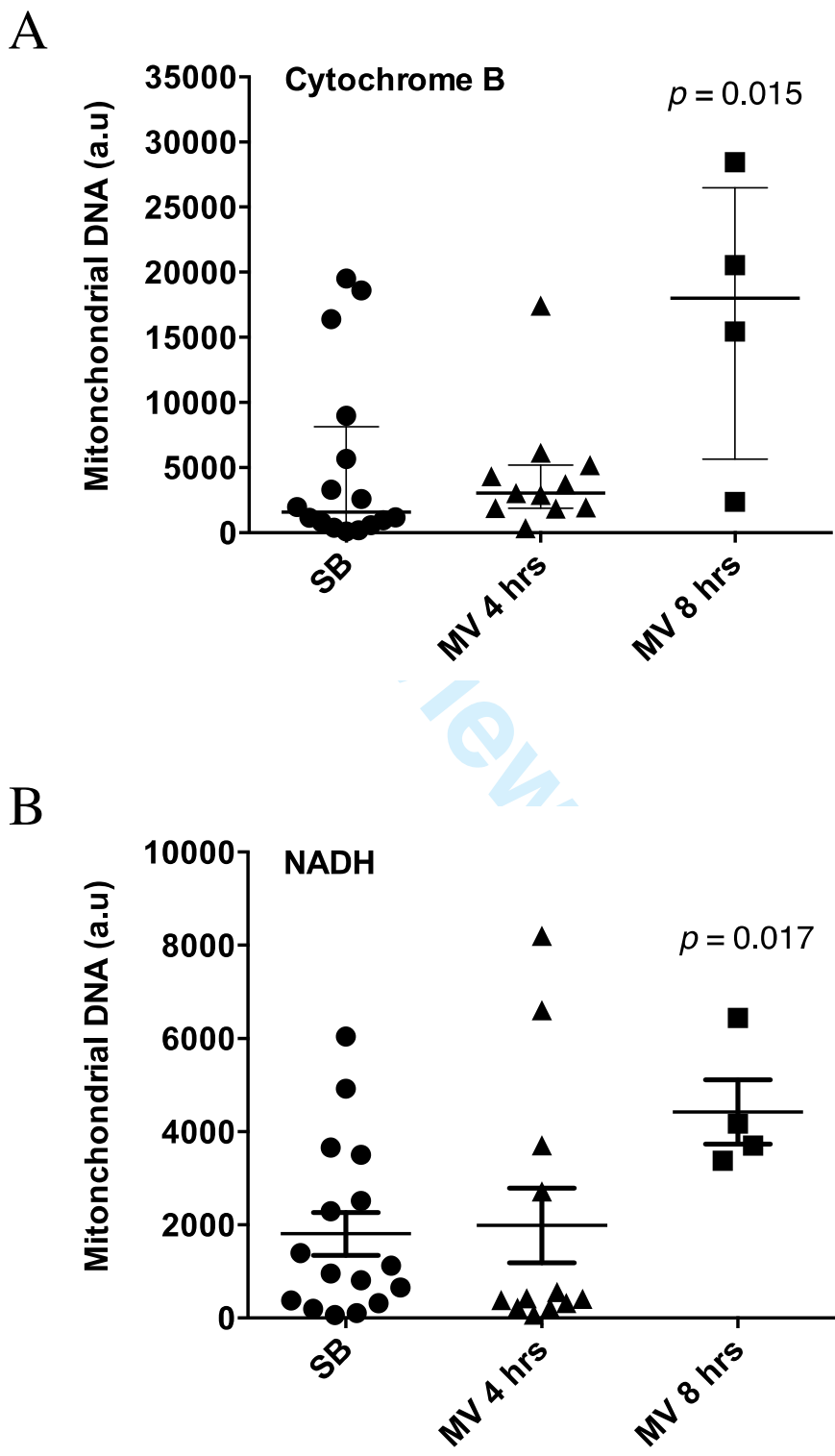
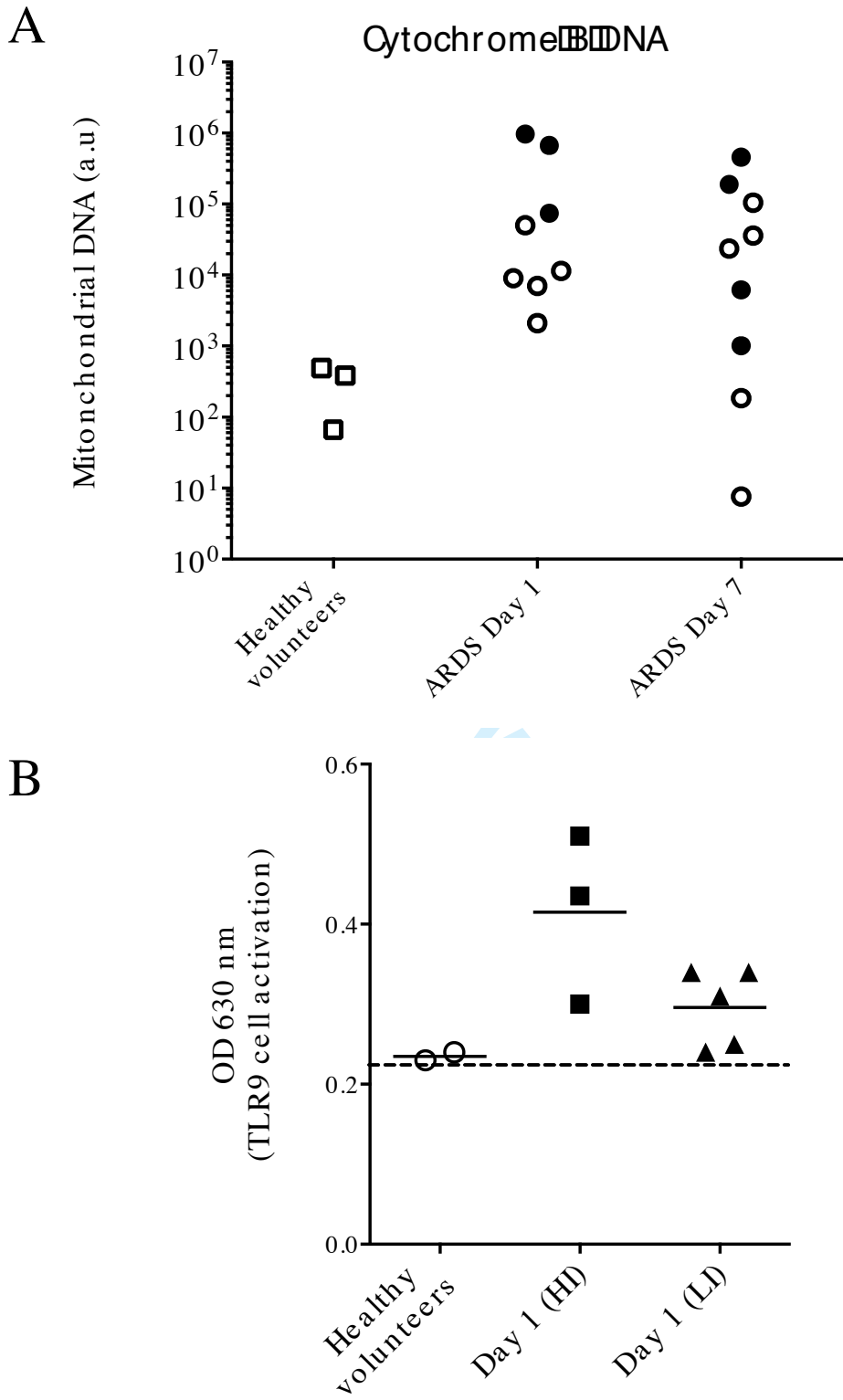


Figure S6.

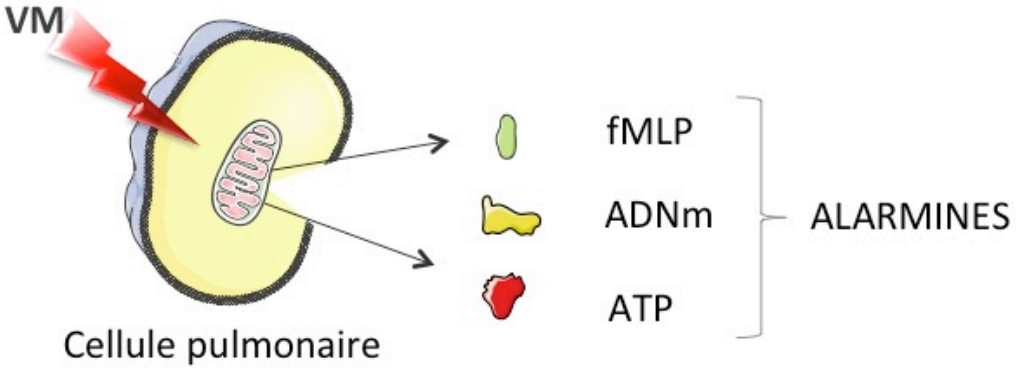




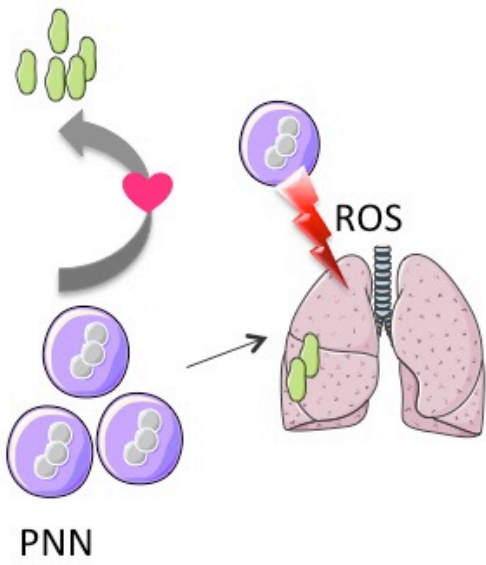
## Conclusion

Ces résultats ont montré que :

- ✓ l'ADN mitochondrial, l'ATP et le fMLP sont libérés par les cellules alvéolaires humaines de type II (cellules A549) soumises à un étirement cyclique;
- ✓ les mêmes alarmines pro-inflammatoires sont retrouvées dans les voies respiratoires des lapins soumis à une ventilation mécanique agressive;
- ✓ l'ADN mitochondrial est retrouvé fortement augmenté dans les LBA de patients souffrant de SDRA;
- ✓ ces alarmines apparaissent comme étant bioactives et de puissants médiateurs pro-inflammatoires;
- ✓ l'ADN mitochondrial libéré par les cellules étirées induit la production d'IL-8 dans les cellules pulmonaires via leurs récepteurs TLR9;
- ✓ l'activité chémoattractante des neutrophiles retrouvée dans les surnageants des cellules étirées ainsi que dans les LBA de lapins semble être également attribuable au fMLP mitochondrial.

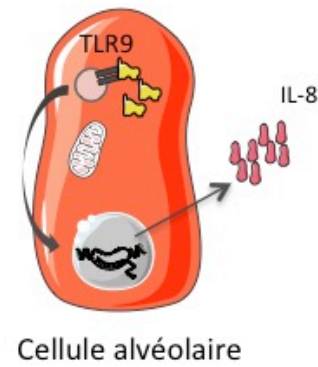


Action fMLP

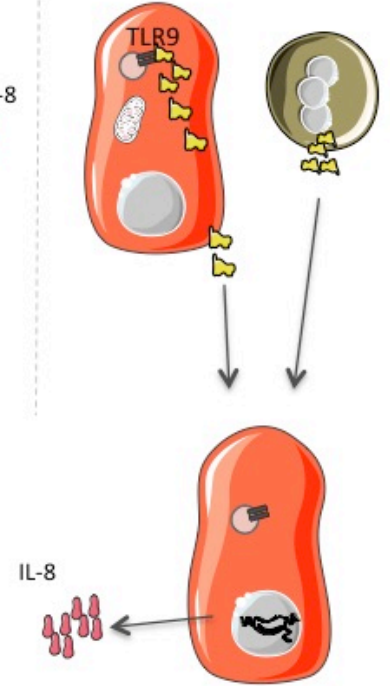


Action ADN mitochondrial

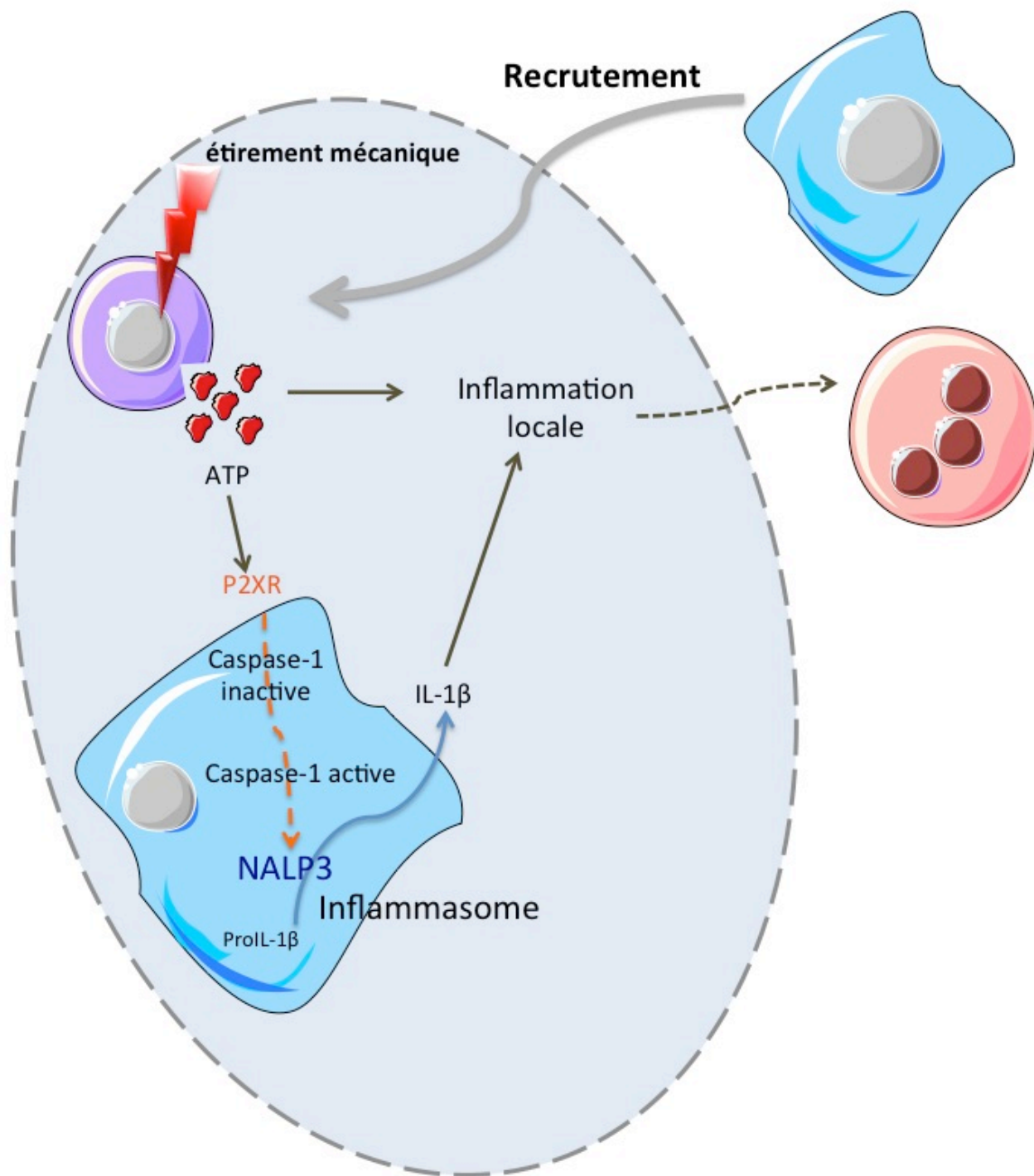
Stimulation autocrine



Stimulation paracrine



## Action de l'ATP



Stress mécanique sur cellule pulmonaire  $\xrightarrow[\text{ATP}]{\text{fMLP / ADNm}}$  Inflammation pulmonaire

# DISCUSSION

## Discussion

---

La ventilation mécanique est la technique de suppléance la plus utilisée en réanimation. Elle est nécessaire à la prise en charge de l'insuffisance respiratoire aiguë. Malheureusement, les contraintes mécaniques auxquelles est exposé le poumon pendant la ventilation, génèrent des lésions tissulaires, le VILI, exacerbent la réponse inflammatoire (Chiumello, Pristine et al. 1999) et modifient la réactivité aux agressions par différents pathogènes (Dreyfuss and Saumon 1998). La ventilation en décubitus ventral a été décrite comme améliorant les échanges de gaz et la mécanique ventilatoire chez les patients atteints de SDRA en particulier lorsqu'un seul lobe est touché (Galiatsou, Kostanti et al. 2006) Toutefois, il a également été prouvé que dans des modèles de lésions pulmonaires diffuses, le décubitus ventral pouvait améliorer le recrutement alvéolaire et diminuer ainsi les lésions caractéristiques du VILI (Broccard, Shapiro et al. 2000, Richard, Bregeon et al. 2008).

La ventilation mécanique est également l'un des principaux facteurs de risque d'acquisition d'une infection liée aux soins. En effet, les pneumopathies bactériennes acquises sous ventilation mécanique font partie des infections nosocomiales les plus fréquentes et graves chez les patients de réanimation, malgré les progrès en terme de prévention et de traitement. Elles résultent de la colonisation oropharyngée par des bactéries suivie de leur migration dans les poumons par le biais de micro-inhalations (Dreyfuss and Ricard 2005). Le succès de l'antibiothérapie est bien moindre dans les PAVM en comparaison aux pneumonies sans assistance par ventilation mécanique. Cette caractéristique est particulièrement vraie dans les cas de PAVM à *Staphylococcus aureus* résistant à la methicilline, pour lesquelles le taux de succès de l'antibiothérapie n'excède pas 57% (Wunderink, Niederman et al. 2012)

L'efficacité et la promptitude de la réponse immunitaire innée pulmonaire et systémique de l'hôte au cours des PAVM déterminent le contrôle de l'infection (Martin

and Frevert 2005). La reconnaissance précoce des pathogènes par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires est une étape cruciale dans le déterminisme de la réponse inflammatoire. Lors des PAVM à SARM, l'efficacité de la réponse immune à l'encontre du pathogène semble reposer en partie sur le TLR2 (Takeuchi, Hoshino et al. 2000). Des études expérimentales montrent que selon les modèles, TLR2 peut être protecteur ou délétère pour l'hôte au cours d'une infection à Gram-positif. Dans ce contexte, il apparaît que le niveau d'expression de TLR2 est déterminant quant au devenir de la réponse inflammatoire et qu'une régulation fine est requise.

La modulation de la réponse inflammatoire de l'hôte serait potentiellement un moyen d'améliorer le devenir des patients souffrants de pneumonies. Dans la littérature, les statines sont citées, car, en plus de leurs capacités à diminuer les risques cardiovasculaires, elles possèderaient également des propriétés immunomodulatrices (Terblanche, Almog et al. 2007). Certains travaux tendent à prouver un effet anti-inflammatoire et protecteur des statines sur le poumon notamment dans le VILI expérimental (Siempos, Maniatis et al. 2010) ou au cours des pneumonies chez l'Homme (Majumdar, McAlister et al. 2006, Yende, Milbrandt et al. 2011). Cependant d'autres études soutiennent l'hypothèse inverse et ne soulignent aucun bienfait des statines sur le devenir de patients atteints de PAVM (Papazian, Roch et al. 2013) ou de SDRA (McAuley, Laffey et al. 2014).

La ventilation mécanique est également décrite comme destructrice de la membrane cellulaire des cellules de part le stress mécanique qu'elle impose à ces cellules. La membrane rompue, le contenu intracellulaire se retrouve en dehors de la cellule (Vlahakis and Hubmayr 2000, Stroetz, Vlahakis et al. 2001). De récentes études suggèrent que les cellules lésées libèrent des alarmines provenant de la mitochondrie (ADN mitochondrial, fMLP, et adénosine triphosphate) (McDonald, Pittman et al. 2010, Zhang, Raouf et al. 2010). Ces alarmines pourraient jouer un rôle dans le développement du VILI (Matsuyama, Amaya et al. 2008, Kuipers, van der Poll et al. 2011) en générant une réponse inflammatoire locale et parfois même systémique. Cette réponse est principalement dépendante de la production locale d'IL-1 $\beta$  via

l'assemblage de l'inflamasome NALP3, et du recrutement de neutrophiles sur le tissu lésé (Martinon, Burns et al. 2002, McDonald, Pittman et al. 2010, Zhang, Raouf et al. 2010).

Notre travail de recherche a consisté :

- à explorer certains des nombreux mécanismes moléculaires impliqués dans la formation du VILI et des PAVM, et notamment le rôle des récepteurs *Toll*, acteurs majeurs de l'immunité innée, mais aussi celui de certaines molécules de danger ou alarmines;

- à tenter de moduler l'inflammation tant sur le plan pulmonaire que systémique afin de protéger l'hôte au cours des agressions pulmonaires avec un intérêt particulier pour le modèle PAVM, en tentant de limiter la distension pulmonaire par le DV, ou en limitant les effets pro-inflammatoires de ces contraintes mécaniques anormales imposées au poumon par des moyens pharmacologiques (immunomodulation).

## **I. Impact du décubitus ventral dans un modèle animal de pneumonie bactérienne unilatérale acquise sous ventilation mécanique**

La ventilation mécanique a un impact délétère sur le poumon en induisant de nombreuses lésions et en empêchant le bon fonctionnement des échanges gazeux. Le passage en ventilation en DV permet de limiter les lésions induites par une pneumonie unilatérale acquise sous ventilation mécanique à *E. aerogenes* et ce indépendamment de la stratégie de ventilation mécanique utilisée (protectrice ou agressive). La ventilation en DV diminue également les concentrations bactériennes à la fois dans les poumons et dans la rate des animaux. La position DV limiterait également la libération d'IL-8 et donc le recrutement de PNNs dans le poumon. Ces résultats de notre étude

soulignent que la ventilation en DV augmente la clairance bactérienne pulmonaire, limite la translocation bactérienne du poumon au compartiment systémique et la réponse inflammatoire de l'hôte. Il semblerait également que la position DV, dans notre modèle, protège le poumon contro-latéral non infecté de la VM. L'association de paramètres ventilatoires protecteurs et d'une ventilation mécanique en décubitus ventral, pourrait améliorer le devenir des malades souffrant de PAVM.

Cependant certaines études viennent s'opposer à cette hypothèse. D'autres modèles animaux de pneumonie associée à la VM similaires au nôtre ont montré que la VM pouvait induire en réalité une hyper distension des voies aériennes non seulement dans le poumon infecté mais également dans le poumon « sain » (Goldstein, Bughalo et al. 2001, Sartorius, Lu et al. 2007). Cet effet délétère de la VM a été attribué à la perte d'aération à l'intérieur de la zone pulmonaire infectée, qui ne peut pas être facilement recrutée par pression positive, à cause d'une baisse de la compliance pulmonaire dépendante de l'importance de la réponse inflammatoire locale (Brackenbury, McCaig et al. 2004). L'effet habituellement protecteur de la PEEP à des niveaux de pression modérés peut ainsi devenir dangereux si l'on augmente les niveaux de pression car on génère alors une hyperdistension pulmonaire du poumon non infecté (Croisier, Etienne et al. 2004).

Le DV a été principalement proposé comme un moyen efficace d'améliorer les échanges gazeux chez les patients atteints des formes les plus sévères d'ALI (Gattinoni, Pelosi et al. 1991). Plus récemment il a été démontré que le DV permet une meilleure répartition de l'inflation du poumon le long de l'axe cranio-caudale grâce à l'amélioration du recrutement alvéolaire et de la compliance du système respiratoire (Pelosi, Bottino et al. 2003, Galiatsou, Kostanti et al. 2006). Certains auteurs ont montré que les patients chez lesquels le passage en DV améliorait la compliance du système respiratoire présentaient plus fréquemment une atteinte pulmonaire lobaire, y compris des pneumonies (Galiatsou, Kostanti et al. 2006). De manière plus récente, certaines études cliniques montrent que le DV peut soit prévenir l'apparition de PAVM, soit améliorer le devenir de PAVM pré-existantes (Guerin, Gaillard et al. 2004, Sud, Friedrich et al. 2010).



Tous ces résultats suggèrent que le DV peut être intéressant dans le cadre de lésions pulmonaires unilatérales incluant les pneumonies bactériennes. Nos résultats apportent de nouvelles données susceptibles d'améliorer notre compréhension des effets bénéfiques du DV, car elles établissent un lien entre ses effets connus sur la mécanique respiratoire, et une possible amélioration de la réponse immune de l'hôte contre les infections bactériennes. Malheureusement nous ne sommes pas en mesure au terme de ces expérimentations de déterminer la nature précise des mécanismes sous-jacents, et notamment le rôle exact des modifications de l'immunité innée de l'hôte. D'autres études seront nécessaires pour investiguer notamment la voie des TLRs, celle-ci pouvant être modifiée par l'étirement mécanique inhabituel auquel sont exposés les poumons soumis à la VM comme suggéré par les précédents travaux du groupe et d'autres (Oudin and Pugin 2002, Charles, Tissières et al. 2005, Vaneker, Joosten et al. 2008, Barbar, Charles et al. 2011, Charles, Tissières et al. 2011). Pour le moment on ne peut qu'émettre l'hypothèse selon laquelle le DV atténue la distension du poumon, ce qui entraîne à son tour une réduction de la libération d'IL-8, protégeant ainsi l'hôte contre les effets nuisibles d'une réponse inflammatoire accrue, et notamment le recrutement d'un trop grand nombre de PNNs activés.

Nos résultats soulignent également l'effet protecteur du DV, sur le poumon non-infecté en y diminuant la formation de lésions liées à la ventilation. Nous avons retrouvé une diminution de la  $PCO_2$  secondaire à l'augmentation du volume courant identique quelle que soit la position du corps, ce qui indique que le DV n'augmente pas nécessairement le volume télé-expiratoire, tel que rapporté précédemment chez les patients en SDRA (Gattinoni, Pelosi et al. 1991, Pelosi, Tubiolo et al. 1998). De façon attendue, la distribution de l'aération était différente en DD et en DV. Dans le groupe en DD, nous avons observé une réduction importante de l'aération des lobes inférieurs, alors que les espaces alvéolaires des lobes supérieurs étaient élargis, avec apparition de lésions bulleuses. En outre, la présence des membranes hyalines, un des signes histologiques typiques du VILI, a été retrouvée exclusivement chez les animaux en DD. Des résultats similaires ont été obtenus avec des réglages de ventilation protectrice, même si les

lésions tissulaires étaient moins sévères, témoignant de l'intérêt potentiel du DV même lorsqu'une ventilation conventionnelle est appliquée et en l'absence de critères de SDRA. Il est à noter en effet que la pneumonie du modèle était unilatérale, avec un retentissement modéré sur l'oxygénation artérielle.

Il est intéressant de remarquer que l'expression du gène *il-8* était nettement plus importante dans les poumons non infectés des lapins en DD par rapport à ceux des lapins en DV, indépendamment de la stratégie de ventilation. Ceci pourrait être considéré comme un marqueur du bio-trauma subit par le poumon ventilé, peut-être en rapport avec une distension alvéolaire plus importante dans le groupe DD (Oudin and Pugin 2002). De façon surprenante, il n'y avait pas de différence entre les animaux en DD et ceux en DV exposés à une ventilation agressive en ce qui concerne la formation d'œdème pulmonaire d'hyperperméabilité mesurée par le rapport poids humide/ poids sec au niveau des poumons non infectés. Nous pouvons alors seulement émettre l'hypothèse qu'il existait bien une différence entre les groupes, avec une distribution différente de l'œdème entre les lobes supérieurs et inférieurs, qui n'a pas pu être mise en évidence par notre méthode de mesure évaluant le poumon dans sa globalité. Cependant, comme attendu, la ventilation protectrice avec réduction du volume courant et utilisation d'une PEEP, a permis de réduire le rapport poids humide/ poids sec, et là encore le passage en DV a permis d'obtenir une amélioration supplémentaire. Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que le DV améliore la distribution du volume courant, réduisant ainsi l'hyper-distension des espaces alvéolaires et donc le risque de développement du VILI, comme déjà démontré dans des modèles animaux de lésion pulmonaire diffuse (Broccard, Shapiro et al. 2000, Valenza, Guglielmi et al. 2005, Nakos, Batistatou et al. 2006).

Notre étude comporte plusieurs limitations. En premier lieu, il faut être très prudent avant d'extrapoler nos résultats à l'Homme, car il est bien connu que les petits animaux sont plus susceptibles de développer un VILI que les plus grands. De plus, les réglages de ventilation mécanique utilisés dans le groupe ventilation agressive sont très différents de la pratique clinique et des recommandations actuelles. La modalité d'induction de la

pneumonie ainsi que la courte durée de la ventilation mécanique sont spécifiques de notre modèle, et d'autres études expérimentales sont nécessaires avant de pouvoir généraliser ces résultats. On pourrait également nous opposer que la croissance bactérienne était mieux contrôlée en DV tout simplement grâce à un meilleur drainage des sécrétions bronchiques et donc indépendante des modifications de l'étirement du poumon (Panigada, Berra et al. 2003); cependant le drainage expliquerait difficilement l'aggravation des lésions du poumon controlatéral. Nous devons également préciser que l'évaluation hémodynamique n'a pas été effectuée de façon systématique; en conséquence, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la réduction dans la translocation pulmonaire-systémique soit secondaire à une baisse du débit cardiaque dans le groupe DV. Cependant, plusieurs études cliniques et expérimentales n'ont trouvé aucune différence sur ce point (Blanch, Mancebo et al. 1997, Jolliet, Bulpa et al. 1998, Pelosi, Bottino et al. 2003, Nakos, Batistatou et al. 2006). Et pour terminer, nous devons reconnaître que l'absence de calcul des effectifs *a priori* et la petite taille de nos groupes expérimentaux rendent l'interprétation de statistiques de notre étude difficile par manque de puissance.

## **II. Impact d'une ventilation mécanique modérément agressive sur le développement d'une pneumonie à *Staphylococcus aureus***

Nos données montrent que la capacité du poumon à lutter contre la croissance de *S.aureus* est réduite par la VM, surtout à la 8<sup>ème</sup> heure d'évolution de l'infection. Dhanireddy *et al.* n'ont pas réussi à démontrer de manière significative l'impact de l'étirement du poumon sur la clairance de *S. aureus* chez des souris avec pneumonie soumise à 12 heures de VM (Dhanireddy, Altemeier et al. 2006). Notre modèle est plus pertinent d'un point de vue clinique puisque grâce à une VM préalable de 24 heures,

non réalisable chez des rongeurs, nous nous rapprochons du scénario clinique de la PAVM. De plus les TLRs des lapins sont décrits comme étant plus proches des TLRs humains que ne peuvent l'être ceux des rongeurs (Kajikawa, Frevert et al. 2005). Enfin, des données cliniques montrent que les PAVM à SARM sont plus souvent associées à une bactériémie que lorsque d'autres pathogènes sont impliqués (Luna, Videla et al. 1999, Magret, Lisboa et al. 2011). Cette observation souligne la pertinence de notre modèle dans la mesure où la bactériémie est fréquente chez nos animaux.

*S. aureus* cause significativement plus de lésions chez les animaux soumis à la VM que chez les animaux SB. Cependant, même si cette différence est évidente dans les premières heures de la pneumonie, la sévérité des lésions sur le poumon est sensiblement la même dans les deux groupes à la 24<sup>ème</sup> heure, suggérant que l'étirement du poumon a accéléré l'expansion des lésions et surtout l'infiltration par les PNNs. Ce phénomène a déjà été décrit dans d'autres modèles animaux de VILI, qui montrent que plus les paramètres ventilatoires sont défavorables plus les caractéristiques du VILI deviennent évidentes tôt (Valenza, Guglielmi et al. 2003).

### **III. Impact d'une pré-exposition à l'Atorvastatine sur l'efficacité du Linézolide dans un modèle de pneumonie acquise sous ventilation mécanique à *Staphylococcus aureus* résistant à la methicilline chez le lapin.**

Notre modèle montre donc en premier lieu que la pneumonie à SARM est plus sévère dans le contexte d'une ventilation mécanique et ceci malgré la mise en place rapide d'une antibiothérapie efficace. La question était alors de savoir si une thérapie par les statines pouvait potentialiser l'effet de l'antibiothérapie et parvenir à contrôler la bactériémie et l'inflammation excessive, caractéristiques des PAVM bactériennes. Il

s'est avéré que la thérapie préalable par les statines suivi d'une antibiothérapie par le linézolide n'a pas permis, chez les animaux ventilés, d'empêcher la translocation systémique des bactéries, certainement en raison du trop grand nombre et de la sévérité des lésions du tissu pulmonaire. Cependant les statines ont permis de limiter l'inflammation dans les compartiments pulmonaire et systémique, ce qui aurait pu améliorer le devenir de l'hôte. Mais, il est également envisageable dans notre modèle, que cet effet anti-inflammatoire des statines limite l'efficacité des défenses de l'hôte, favorisant le non contrôle de la croissance bactérienne, ce d'autant que l'efficacité du LNZ repose essentiellement sur l'inhibition de la croissance bactérienne, sans effet bactéricide propre de la molécule.

Nos résultats sont en lien direct avec la pratique clinique puisqu'il est souvent rapporté que les pneumonies bactériennes sont plus sévères chez les patients soumis à la VM que chez ceux qui respirent spontanément. De nombreuses études cliniques et expérimentales suggèrent que la VM a de nombreux effets délétères. La VM génère notamment des volotraumatismes et de l'atélectasie, en imposant des cycles répétitifs d'ouverture/fermeture des alvéoles, conduisant alors au développement du VILI (Slutsky and Ranieri 2013). Les résultats d'études expérimentales suggèrent que des stratégies ventilatoires visant à limiter le volotrauma et l'atelectrauma pourrait améliorer la clairance bactérienne et limiter ainsi la translocation du poumon au compartiment systémique mais également réduire l'inflammation (Charles, Martin et al. 2004, Ladoire, Pauchard et al. 2013).

Notre étude montre que la VM même peu agressive, diminue la clairance bactérienne et favorise la translocation extra-pulmonaire des bactéries comme nous l'avons déjà montré dans un modèle de pneumonie à Gram-négatif (Charles, Piroth et al. 2002). En revanche dans notre modèle, ces caractéristiques ne sont pas associées à une augmentation des lésions sur le poumon malgré l'utilisation d'un score spécifique adapté à l'évaluation du VILI (Broccard, Shapiro et al. 2000). Cependant une inflammation excessive est mesurée dans les deux compartiments (pulmonaire et

systémique), résultant probablement du biotraumatisme imposé par la VM et expliquant alors les différences observées entre les SB et les VM. Pour plus de pertinence il fallait confirmer ces résultats en mettant en place cette fois un traitement antibiotique de la PAVM.

Nous avons choisi le linezolide compte tenu de son efficacité chez les patients souffrant de pneumonie à SARM incluant les PAVM (Wunderink, Niederman et al. 2012). L'efficacité de cet antibiotique s'est révélée réelle chez les animaux SB mais le résultat était plus mitigé chez les animaux ventilés chez lesquels son efficacité s'est limitée au compartiment pulmonaire. Il est possible que des brèches invisibles sur la membrane alvéolo-capillaire permettent la translocation bactérienne extra-pulmonaire, même si nos données histologiques ne traduisaient pas cette réalité.

Des études expérimentales ont montré que le LNZ comparé à la vancomycine est capable de réduire l'inflammation pulmonaire chez des souris en respiration spontanée souffrant de PAVM à SARM, et en particulier les concentrations en MIP-2, l'équivalent murin de l'IL-8, limitant ainsi le recrutement des PNN et donc les dommages associés sur le poumon (Jacqueline, Roquilly et al. 2013). Dans notre modèle la libération de l'IL-8 est diminuée par le LNZ chez les SB et le VM. Cependant certains résultats issus d'autres études s'opposent à nos données (Akinnusi, Hattemer et al. 2011). Nos résultats sont à prendre avec précaution car, malgré un effet anti-inflammatoire significatif du LNZ dans notre modèle entre les animaux SB et VM, les concentrations en IL-8 restent très élevées dans le groupe VM. Ces fortes concentrations en IL-8 retrouvées chez les animaux ventilés pourraient expliquer d'hypothétiques lésions pulmonaires non visibles en microscopie optique. En effet, l'IL-8 libérée en quantité massive, attirerait par chemoattraction au site de l'inflammation les neutrophiles qui participeraient alors à la destruction du tissu pulmonaire. La diffusion systémique des SARM serait alors facilitée, et ceci en dépit d'une antibiothérapie.

Le sang de lapins ventilés a montré *ex vivo*, une sur-réaction en réponse à la stimulation par HKSA. Les productions d'IL-8 et TNF- $\alpha$  ont augmenté. Le prétraitement aux statines a uniquement permis de diminuer l'effet pro-inflammatoire de la VM en termes de TNF-

$\alpha$  tandis que les concentrations en IL-8 restent hautes que le sang ait été traité ou non. Une étude *in vitro* récente corrobore nos résultats. Elle montre que des macrophages alvéolaires incubés avec de la simvastatine libèrent de faibles quantités de médiateurs inflammatoires incluant l'IL-8 et le TNF- $\alpha$ , en réponse à une stimulation par l'acide lipoteichoïque, un agoniste de TLR2 (Wu, Luo et al. 2014). De plus, il faut noter que dans notre modèle, la thérapie par les statines aggraverait les lésions induites sur le poumon des animaux infectés ventilés et ceci même si les concentrations en TNF- $\alpha$  sont diminuées. Ceci met en évidence le besoin d'une antibiothérapie efficace en combinaison avec n'importe quelle stratégie anti-inflammatoire, comme déjà illustré dans les travaux de l'équipe de Bergeron, dans un modèle murin de pneumonie à *S. pneumoniae* (Bergeron, Ouellet et al. 1998). De plus, les recherches de Siempos vont dans notre sens, puisqu'il montre dans un modèle de poumon de lapin isolé-perfusé que les statines en pré-traitement sont capables de limiter les lésions pulmonaires. Cependant, cet effet protecteur des statines n'est retrouvé que dans le groupe des animaux soumis à une ventilation mécanique agressive c'est-à-dire induisant un étirement important des cellules pulmonaires. Cette étude n'a en revanche retrouvé aucun effet des statines lorsque l'étirement est induit par une VM identique à celle que nous utilisons (Siempos, Maniatis et al. 2010). Nous pouvons supposer que l'effet anti-inflammatoire de l'atorvastatine chez les lapins ventilés sans antibiothérapie compromet les défenses antibactériennes, favorisant alors les lésions sur le tissu pulmonaire infecté, au lieu de le protéger contre le VILI. Un antibiotique approprié pourrait donc être nécessaire pour qu'un effet bénéfique d'une thérapie par les statines soit obtenu chez les patients.

Cependant, l'effet anti-inflammatoire systémique des statines dans notre modèle de PAVM à SARM traitée par LNZ pourrait être délétère comme le montrent nos résultats microbiologiques sur les cultures de rates positives retrouvées en plus grande proportion chez les animaux ventilés. En effet la bactériémie est considérée comme un facteur prédictif indépendant du risque de décès chez les patients souffrant de PAVM, et notamment à SARM (Magret, Lisboa et al. 2011).

Les statines exercent des effets variés sur la réponse inflammatoire, mais les mécanismes par lesquels elles agissent restent flous. Des données issues de travaux *in vitro*, suggèrent que les statines interfèrent avec la voie des TLRs, modulant ainsi la réponse aux produits bactériens. Cependant, en fonction du modèle expérimental, l'effet des statines peut être pro-ou anti-inflammatoire (Matsumoto, Einhaus et al. 2004, Niessner, Steiner et al. 2006). De plus, divers mécanismes ont déjà été décrits. Par exemple, les statines pourraient se comporter comme un agent anti-inflammatoire via la phosphorylation de Akt, conduisant alors à la régulation négative de la voie MyD88 alternative en aval de TLR ou directement en régulant négativement les TLR (Patel and Corbett 2004, Wang, Zhang et al. 2011). Dans notre étude *ex vivo*, le pré-traitement du sang total de lapins ventilés sur-réagit à une stimulation par HKSA pour ce qui est de la production de l'IL-8. Ces résultats illustrent combien l'impact des statines sur la réponse inflammatoire est équivoque, ce qui pourrait expliquer pourquoi elles peuvent être bénéfiques, neutres voire délétères selon le modèle utilisé ou la situation clinique.

Nous avons trouvé que l'atorvastatine induisait des variations d'expression du transcrit *tlr2* dans notre modèle, ce qui était susceptible d'expliquer l'impact de ce traitement sur la réponse inflammatoire de l'hôte. En effet, la régulation négative de *tlr2* dans le compartiment pulmonaire pourrait expliquer l'effet anti-inflammatoire d'une exposition aux statines avant l'installation de la pneumonie à SARM. Ces données sont cohérentes avec de précédents résultats obtenus par notre équipe et d'autres montrant que la régulation positive de *tlr2* dans les poumons des animaux soumis à la VM pourrait expliquer sa sur-réaction à des agonistes dont les composants de la paroi cellulaire de *S.aureus* (Vaneker, Joosten et al. 2008, Charles, Tissieres et al. 2011). Les statines seraient donc potentiellement protectrices au cours des PAVM, leur effet anti-inflammatoire s'exerçant via la régulation négative de TLR2, s'opposant ainsi à l'effet de l'étirement cyclique des voies aériennes sur l'expression de ce récepteur. Elles sont en outre d'administration plus simple et moins coûteuse qu'un anticorps monoclonal anti-TLR2. Néanmoins, leur effet dans notre modèle mériterait d'être généralisé à d'autres modèles. Il faut en effet insister sur le fait que le seul essai clinique randomisé contrôlé



disponible s'est révélé négatif (Papazian, Roch et al. 2013). On peut néanmoins imaginer qu'une exposition préalable aux statines est nécessaire, d'où l'éventuel intérêt préventif d'un traitement qui pourrait être instauré dès que la ventilation se prolonge au-delà de 48 heures (Bruyere, Pauchard et al. 2013).

De nombreuses limites dans notre étude doivent être mentionnées. Tout d'abord, la VM sans PEEP que nous utilisons peut être considérée comme cliniquement non pertinente, puisque ceci induit la répétition cyclique d'ouverture/fermeture des alvéoles. Des études cliniques montrent que dans le SDRA, des zones pauvrement aérées du poumon coexistent avec des zones fortement étirées même si un volume courant faible est appliqué (Terragni, Rosboch et al. 2007). Nous pouvons prudemment supposer que ces parties du poumon puissent réagir comme décrit dans la présente étude si le patient sous VM entre en contact avec *S.aureus*. Il faut noter également que notre évaluation de l'expression de TLR2 se limite à celle de son transcrit. Nous ne pouvons donc tirer aucune conclusion ferme puisque nous ne disposons pas des données concernant l'expression de la protéine correspondante. Enfin, en raison de nos petits effectifs dans chaque groupe, et de la petite taille de nos échantillons, notre étude manque de puissance et nos résultats doivent donc être pris avec beaucoup de précaution.

#### **IV. Les alarmines mitochondriales sont des médiateurs tissulaires du VILI et du SDRA.**

Le VILI et le SDRA sont caractérisés par une importante inflammation pulmonaire (Pugin, Verghese et al. 1999, Ware and Matthay 2000). Il est maintenant clairement établi que la ventilation mécanique peut induire une inflammation dans les voies respiratoires en synergie avec un processus lésionnel pré-existant, infectieux par

exemple. Les patients souffrant de SDRA et recevant une VM protectrice, présentent des niveaux d'inflammation pulmonaire et systémique plus faible avec en particulier moins de neutrophiles alvéolaires et des niveaux plus bas en cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ), que lorsque la VM est « agressive » (VT élevé et niveau de PEEP insuffisant) (Ranieri, Suter et al. 1999).

L'IL-1 $\beta$  peut être sécrétée en réponse à divers stimuli, incluant le LPS, par les macrophages et les cellules épithéliales alvéolaires (Pugin, Ricou et al. 1996, Pugin, Verghese et al. 1999, Ware and Matthay 2000). La production d'IL-1 $\beta$  bioactive requiert :

- l'activation de l'expression du gène codant pour la pro-IL-1 $\beta$ ,
- le clivage post-translationnel de la pro-IL-1 $\beta$  en IL-1 $\beta$  mature, étape dépendante de l'activation de la caspase-1 qui fait partie de l'inflammasome NALP3 (Gross, Thomas et al. 2011).

Il a récemment été démontré que les alarmines libérées par les cellules lésées ou nécrotiques pouvaient déclencher la production d'IL-1 $\beta$  et être responsables d'une inflammation dite aseptique. Nos résultats confirment que l'étirement cyclique des monocytes humains dérivés de macrophages induisait la production et la libération d'IL-1 $\beta$ , et qu'il avait une action synergique avec un co-traitement au LPS. Dans les macrophages non étirés, l'IL-1 $\beta$  n'est sécrétée que lorsqu'ils sont incubés avec à la fois un agoniste de TLR9 et l'ATP, deux étapes essentielles à la production d'une IL-1 $\beta$  mature. Nous pouvons donc supposer que l'étirement cyclique induit la libération par les cellules pulmonaires d'ADN mitochondrial (agoniste de TLR9) et d'ATP, ce qui conduit alors à la production d'IL-1 $\beta$  par les macrophages, et joue un rôle important de signal pro-inflammatoire local dans le poumon soumis à la VM.

Le blocage du TLR9 par l'ODN TTAGGG, qui abolit la production d'IL-8 par les cellules étirées, suggère une activation paracrine et autocrine des cellules par les alarmines cytoplasmiques. Il semblerait donc que les alarmines endogènes libérées dans les voies respiratoires pendant la VM puissent être responsables de la production locale d'IL-1 $\beta$

et d'IL-8, et participeraient alors à l'inflammation alvéolaire observée pendant le VILI et le SDRA.

Il apparaît également qu'une VM agressive induise une libération d'ADN mitochondriaux et de l'ATP dans les voies aériennes des lapins mais également de l'ADN mitochondrial dans les LBA des patients atteints de SDRA. Toutes ces données sont en faveur d'un modèle de libération d'alarmines dans les voies aériennes par les cellules pulmonaires lésées par l'étirement mécanique, participant à l'inflammation alvéolaires dans le VILI et le SDRA. Des travaux récents traitent du rôle de l'inflammasome NALP3 dans la pathogénèse du VILI. Les gènes de l'inflammasome NALP3 sont sur-exprimés chez les patients ventilés mais également chez des souris ventilées à haut volume courant, avec une augmentation de l'activation de la caspase-1, et une augmentation des niveaux d'acide urique, un agoniste de NALP3 (Kuipers, Aslami et al. 2012). De plus, des études montrent que des souris déficientes pour NALP3 présentent moins de signes de VILI lorsqu'elles sont ventilées de façon agressive, et qu'un antagoniste du récepteur à l'IL-1 protégerait partiellement les souris du VILI, corroborant alors des données précédemment publiées (Frank, Pittet et al. 2008, Kuipers, Aslami et al. 2012). L'ATP libérée dans les voies respiratoires pendant le VILI (Rich, Douillet et al. 2003) peut aussi être un agoniste de NALP3. Wu et al. ont récemment rapporté que la VM chez des souris et l'étirement cyclique *in vitro* de macrophages alvéolaires, induisaient l'assemblage de NALP3 et activaient la caspase-1, conduisant alors à la production et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  bioactive (Wu, Yan et al. 2013). L'activation de la caspase-1 est dépendante de la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) par les mitochondries, mais le possible rôle de l'ATP extracellulaire comme déclencheur de l'activation de l'inflammasome n'a pas encore été testé.

Le recrutement des PNNs au poumon et les dommages tissulaires induits par les neutrophiles ont été proposés comme des facteurs clés de la pathogénèse du VILI et du SDRA (Kawano, Mori et al. 1987, Abraham 2003). Il a longtemps été admis que le principal chemoattractant des neutrophiles était l'IL-8. Mais récemment il a été montré dans un modèle murin de lésion thermique hépatique aseptique, que le fMLP

mitochondrial sécrété par les cellules lésées, était le facteur chemoattractant essentiel attirant les neutrophiles au site de lésion nécrotique, plus encore que que les chemokines CXC (comme IL-8) (McDonald, Pittman et al. 2010). Dans les expériences décrites dans cet article, l'activité chemoattractante sur les neutrophiles présente dans les surnageants des cellules pulmonaires étirées pourrait être totalement inhibée par un anticorps anti-FPR1 (récepteur du fMLP) et dans une moindre mesure, par un anticorps anti-récepteur à l'IL-8. Ceci indique que le facteur chemoattractant principal sécrété par les cellules lésées par le stress mécanique est le fMLP mitochondrial et non l'IL-8, ce qui remet quelque peu en cause les données établies jusqu'à présent et ouvre des perspectives diagnostiques et thérapeutiques intéressantes.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

## Conclusion et perspectives

---

Malgré les nombreux progrès réalisés dans le domaine de la ventilation mécanique, les mécanismes moléculaires par lesquels l'étirement cyclique, en interaction ou non avec des produits bactériens, génère une augmentation de l'inflammation pulmonaire et systémique ne sont pas complètement clairs.

L'étirement mécanique induit l'expression d'une variété de facteurs et active donc diverses voies de signalisation intracellulaire, constituant chacune une piste d'étude pour la compréhension des mécanismes sous-jacents. En effet, l'élucidation des événements moléculaires engagés dans la signalisation cellulaire permettrait d'approfondir nos connaissances conceptuelles dans ce domaine et procurerait des informations exploitables en recherche translationnelle pour générer des applications cliniques à visée préventive ou thérapeutique.

Ces résultats suggèrent que la position en décubitus ventral, dans un modèle de PAVM unilatéral, pourrait non seulement améliorer la mécanique pulmonaire et l'oxygénation du sang, mais améliorerait également les défenses antibactériennes et diminuerait l'inflammation tout en protégeant le poumon contro-latéral. Une autre étude, dans un modèle animal de PAVM à SARM, montre qu'un étirement modéré par la VM empêcherait la bonne clairance bactérienne des poumons, accélérerait les lésions tissulaires et favoriserait la réponse inflammatoire systémique. La sur-expression de TLR2 à la fois dans le compartiment pulmonaire et systémique pourrait jouer un rôle mais d'autres facteurs pouvant aggraver cette inflammation doivent être envisagés. Dans un contexte de pneumoie à SARM chez le lapin, nos résultats montrent qu'une pré-exposition aux statines avant le développement de la pneumonie génère un effet anti-inflammatoire dans le poumon et le compartiment systémique des lapins traités au linézolide. Cet effet est plus pertinent et d'un intérêt majeur dans le contexte d'une

PAVM, et semble être en partie médié par la régulation négative de l'expression du gène *tlr2*. Il n'est toujours pas très clair si cet impact est bénéfique pour l'hôte. Même si le linézolide améliore la clairance bactérienne pulmonaire, la diminution de la réponse inflammatoire systémique de l'hôte par les statines pourrait empêcher de lutter contre les SARM dans ce compartiment, conduisant alors au développement d'une bactériémie.

Il pourrait être intéressant d'examiner si les modifications dans la réponse inflammatoire et la clairance bactérienne observées avec le décubitus ventral sont associées à des modifications de l'expression des TLRs, notamment TLR4 dans notre modèle de pneumonie à bacille à Gram-négatif, et si dans notre modèle il existe une différence entre le poumon lésé et le poumon controlatéral. Il pourrait également être intéressant de reproduire ces expériences en faisant varier le germe. Il pourrait également être intéressant dans ce modèle d'évaluer la production d'alarmines et de déterminer si celle-ci varie selon la position de ventilation (DV ou DD). De par leur pouvoir anti-inflammatoire sur le poumon et le compartiment systémique, les statines pourraient être intéressantes à tester dans ce modèle de pneumonie en association avec un traitement antibiotique adapté. En effet il existe peut-être une synergie d'action entre ces statines et le DV qui permettrait, en plus de l'antibiothérapie, de diminuer l'inflammation sans entraver la clairance bactérienne pulmonaire.

L'impact des alarmines mitochondriales dans la genèse de l'inflammation stérile a été démontré. Il serait intéressant de tester, dans notre modèle d'infection bactérienne et de ventilation mécanique, si ce modèle est transposable. En effet, il existe de forts liens de parenté entre les mitochondries et les bactéries, possédant toutes deux l'ADN CpG reconnu par TLR9. Il existerait peut-être alors un lien étroit entre les mitochondries et l'inflammasome au cours du sepsis. Il serait alors judicieux d'évaluer dans quelle mesure la VM est capable d'induire la libération d'alarmines mitochondriales dans les poumons de lapins infectés traités ou non par antibiotiques. Des expériences comparant des lapins sains et infectés pourraient permettre de rendre compte d'une éventuelle synergie entre VM et infection dans la libération des ces alarmines.

Enfin, dans nos différents modèles *in vivo*, il serait intéressant de tester l'effet de traitement anti-alarmines, comme la ciclosporine A, afin de tenter de réduire l'effet néfaste des alarmines mitochondriales. Ceci permettrait alors de moduler la réponse immunitaire, mais sous couvert d'une antibiothérapie efficace.



# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## Bibliographie

---

### A

- Abraham, E. (2003). "Neutrophils and acute lung injury." *Crit Care Med* **31**(4 Suppl): S195-199.
- Agostini, L., F. Martinon, K. Burns, M. F. McDermott, P. N. Hawkins and J. Tschopp (2004). "NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder." *Immunity* **20**(3): 319-325.
- Akinnusi, M. E., A. Hattemer, W. Gao and A. A. El-Solh (2011). "Does linezolid modulate lung innate immunity in a murine model of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia?" *Critical care medicine* **39**(8): 1944-1952.
- Akira, S. (2003). "Mammalian Toll-like receptors." *Curr Opin Immunol* **15**(1): 5-11.
- Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." *Nat Rev Immunol* **4**(7): 499-511.
- Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* **124**(4): 783-801.
- American Thoracic, S. and A. Infectious Diseases Society of (2005). "Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia." *Am J Respir Crit Care Med* **171**(4): 388-416.
- Annane, D., B. Clair, B. Mathieu, C. Boucly, O. Lesieur, L. Donetti, M. Gatey, J. C. Raphael and P. Gajdos (1996). "Immunoglobulin A levels in bronchial samples during mechanical ventilation and onset of nosocomial pneumonia in critically ill patients." *Am J Respir Crit Care Med* **153**(5): 1585-1590.
- Antonelli, M., G. Conti, M. Rocco, M. Bui, R. A. De Blasi, G. Vivino, A. Gasparetto and G. U. Meduri (1998). "A comparison of noninvasive positive-pressure ventilation and conventional mechanical ventilation in patients with acute respiratory failure." *N Engl J Med* **339**(7): 429-435.
- Arbibe, L., J. P. Mira, N. Teusch, L. Kline, M. Guha, N. Mackman, P. J. Godowski, R. J. Ulevitch and U. G. Knaus (2000). "Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway." *Nat Immunol* **1**(6): 533-540.
- Arendrup, M. C., E. Chryssanthou, P. Gaustad, M. Koskela, P. Sandven and V. Fernandez (2007). "Diagnostics of fungal infections in the Nordic countries: we still need to improve!" *Scandinavian journal of infectious diseases* **39**(4): 337-343.
- Ashbaugh, D. G., D. B. Bigelow, T. L. Petty and B. E. Levine (1967). "Acute respiratory distress in adults." *Lancet* **2**(7511): 319-323.
- Atherton, S. T. and D. J. White (1978). "Stomach as source of bacteria colonising respiratory tract during artificial ventilation." *Lancet* **2**(8097): 968-969.

## B

Barbar, S. D., P. E. Charles, P. Tissieres, D. Croisier-Bertin, J. Dufour, P. Chavanet and J. Pugin (2011). Mechanical ventilaton up regulates Toll-like receptor 2 and activation of the lung by bacterial lipopeptide. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. E. S. o. C. M. a. I. Diseases. Milan.

Baughman, R. P., R. I. Sternberg, W. Hull, J. A. Buchsbaum and J. Whitsett (1993). "Decreased surfactant protein A in patients with bacterial pneumonia." *Am Rev Respir Dis* **147**(3): 653-657.

Bergeron, Y., N. Ouellet, A. M. Deslauriers, M. Simard, M. Olivier and M. G. Bergeron (1998). "Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice." *Infect Immun* **66**(3): 912-922.

Bernard, G. R., A. Artigas, K. L. Brigham, J. Carlet, K. Falke, L. Hudson, M. Lamy, J. R. Legall, A. Morris and R. Spragg (1994). "The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination." *Am J Respir Crit Care Med* **149**(3 Pt 1): 818-824.

Beutler, B., Z. Jiang, P. Georgel, K. Crozat, B. Croker, S. Rutschmann, X. Du and K. Hoebe (2006). "Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large." *Annu Rev Immunol* **24**: 353-389.

Beutler, B. A. (2009). "TLRs and innate immunity." *Blood* **113**(7): 1399-1407.

Bianchi, M. E. (2007). "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." *J Leukoc Biol* **81**(1): 1-5.

Bilek, A. M., K. C. Dee and D. P. Gaver, 3rd (2003). "Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening." *J Appl Physiol* (1985) **94**(2): 770-783.

Blanch, L., J. Mancebo, M. Perez, M. Martinez, A. Mas, A. J. Betbese, D. Joseph, J. Ballus, U. Lucangelo and E. Bak (1997). "Short-term effects of prone position in critically ill patients with acute respiratory distress syndrome." *Intensive care medicine* **23**(10): 1033-1039.

Blanch, L., J. Mancebo, M. Perez, M. Martinez, A. Mas, A. J. Betbese, D. Joseph, J. Ballus, U. Lucangelo and E. Bak (1997). "Short-term effects of prone position in critically ill patients with acute respiratory distress syndrome." *Intensive Care Med* **23**(10): 1033-1039.

Bonten, M. J., C. A. Gaillard, P. W. de Leeuw and E. E. Stobberingh (1997). "Role of colonization of the upper intestinal tract in the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia." *Clin Infect Dis* **24**(3): 309-319.

Bonten, M. J., C. A. Gaillard, F. H. van Tiel, H. G. Smeets, S. van der Geest and E. E. Stobberingh (1994). "The stomach is not a source for colonization of the upper respiratory tract and pneumonia in ICU patients." *Chest* **105**(3): 878-884.

Brackenburg, A. M., L. A. McCaig, L. J. Yao, R. A. Veldhuizen and J. F. Lewis (2004). "Host response to intratracheally instilled bacteria in ventilated and nonventilated rats." *Crit Care Med* **32**(12): 2502-2507.

Bregeon, F., A. Roch, S. Delpierre, E. Ghigo, A. Autillo-Touati, O. Kajikawa, T. R. Martin, J. Pugin, H. Portugal, J. P. Auffray and Y. Jammes (2002). "Conventional mechanical ventilation of healthy lungs induced pro-inflammatory cytokine gene transcription." *Respir Physiol Neurobiol* **132**(2): 191-203.

Brennan, M. T., F. Bahrani-Mougeot, P. C. Fox, T. P. Kennedy, S. Hopkins, R. C. Boucher and P. B. Lockhart (2004). "The role of oral microbial colonization in ventilator-associated pneumonia." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **98**(6): 665-672.

Broccard, A., R. S. Shapiro, L. L. Schmitz, A. B. Adams, A. Nahum and J. J. Marini (2000). "Prone positioning attenuates and redistributes ventilator-induced lung injury in dogs." *Crit Care Med* **28**(2): 295-303.

Bruyere, R., L. A. Pauchard, S. D. Barbar, F. Dalle and P. E. Charles (2013). Impact de la ventilation mécanique sur la réponse inflammatoire pulmonaire et systémique de l'hôte médiée par TLR2 dans un modèle animal de PAVM à SARM. Société de Réanimation de Langue Française. Paris.

## C

Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." *Science* **296**(5573): 1655-1657.

Carty, M., R. Goodbody, M. Schroder, J. Stack, P. N. Moynagh and A. G. Bowie (2006). "The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling." *Nat Immunol* **7**(10): 1074-1081.

Celis, R., A. Torres, J. M. Gatell, M. Almela, R. Rodriguez-Roisin and A. Agusti-Vidal (1988). "Nosocomial pneumonia. A multivariate analysis of risk and prognosis." *Chest* **93**(2): 318-324.

Charles, P. E., L. Martin, M. Etienne, D. Croisier, L. Piroth, C. Lequeu, J. Pugin, H. Portier and P. Chavanet (2004). "Influence of positive end-expiratory pressure (PEEP) on histopathological and bacteriological aspects of pneumonia during low tidal volume mechanical ventilation." *Intensive care medicine* **30**(12): 2263-2270.

Charles, P. E., L. Piroth, N. Desbiolles, C. Lequeu, L. Martin, H. Portier and P. Chavanet (2002). "New model of ventilator-associated pneumonia in immunocompetent rabbits." *Crit Care Med* **30**(10): 2278-2283.

Charles, P. E., L. Piroth, N. Desbiolles, C. Lequeu, L. Martin, H. Portier and P. Chavanet (2002). "New model of ventilator-associated pneumonia in immunocompetent rabbits." *Critical care medicine* **30**(10): 2278-2283.

Charles, P. E., P. Tissières, S. D. Barbar, D. Croisier, J. Dufour, I. Dunn-Siegrist, P. Chavanet and J. Pugin (2011). "Mild-stretch mechanical ventilation up-regulates toll-like receptor 2 and sensitizes the lung to bacterial lipopeptide." *Critical care* **15**(4): R181.

Charles, P. E., P. Tissières, S. D. Barbar, D. Croisier, J. Dufour, I. Dunn-Siegrist, P. Chavanet and J. Pugin (2011). "Mild-stretch mechanical ventilation upregulates toll-like receptor 2 and sensitizes the lung to bacterial lipopeptide." *Crit Care* **15**(4): R181.

Charles, P. E., P. Tissières, J. Dufour and J. Pugin (2005). "Cyclic stretch modulates TLR2 expression and responsiveness to its agonist in lung epithelial cells." *Intensive Care Med* **31**(S1): S128.

Chastre, J. and J. Y. Fagon (2002). "Ventilator-associated pneumonia." *Am J Respir Crit Care Med* **165**(7): 867-903.

Chevret, S., M. Hemmer, J. Carlet and M. Langer (1993). "Incidence and risk factors of pneumonia acquired in intensive care units. Results from a multicenter prospective study on 996 patients. European Cooperative Group on Nosocomial Pneumonia." *Intensive Care Med* **19**(5): 256-264.

Chiumello, D., E. Carlesso, P. Cadringer, P. Caironi, F. Valenza, F. Polli, F. Tallarini, P. Cozzi, M. Cressoni, A. Colombo, J. J. Marini and L. Gattinoni (2008). "Lung stress and strain during mechanical ventilation for acute respiratory distress syndrome." *Am J Respir Crit Care Med* **178**(4): 346-355.

Chiumello, D., G. Pristine and A. S. Slutsky (1999). "Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome." *Am J Respir Crit Care Med* **160**(1): 109-116.

Christcrain, M. (2004). "Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial." *The Lancet* **363**(9409): 600-607.

Craven, D. E. (2000). "Epidemiology of ventilator-associated pneumonia." *Chest* **117**(4 Suppl 2): 186S-187S.

Craven, D. E., L. M. Kunches, V. Kilinsky, D. A. Lichtenberg, B. J. Make and W. R. McCabe (1986). "Risk factors for pneumonia and fatality in patients receiving continuous mechanical ventilation." *Am Rev Respir Dis* **133**(5): 792-796.

Craven, D. E. and K. A. Steger (1996). "Nosocomial pneumonia in mechanically ventilated adult patients: epidemiology and prevention in 1996." *Semin Respir Infect* **11**(1): 32-53.

Croisier, D., M. Etienne, E. Bergoin, P. E. Charles, C. Lequeu, L. Piroth, H. Portier and P. Chavanet (2004). "Mutant selection window in levofloxacin and moxifloxacin treatments of experimental pneumococcal pneumonia in a rabbit model of human therapy." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(5): 1699-1707.

Cruz, C. M., A. Rinna, H. J. Forman, A. L. Ventura, P. M. Persechini and D. M. Ojcius (2007). "ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages." *J Biol Chem* **282**(5): 2871-2879.

Curtin, J. F., N. Liu, M. Candolfi, W. Xiong, H. Assi, K. Yagiz, M. R. Edwards, K. S. Michelsen, K. M. Kroeger, C. Liu, A. K. Muhammad, M. C. Clark, M. Ardit, B. Comin-Anduix, A. Ribas, P. R. Lowenstein and M. G. Castro (2009). "HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression." *PLoS Med* **6**(1): e10.

## D

Denk, S., M. Perl and M. Huber-Lang "Damage- and pathogen-associated molecular patterns and alarmins: keys to sepsis?" *Eur Surg Res* **48**(4): 171-179.

Dhanireddy, S., W. A. Altemeier, G. Matute-Bello, D. S. O'Mahony, R. W. Glenny, T. R. Martin and W. C. Liles (2006). "Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia." *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **86**(8): 790-799.

Donati, S. Y. and L. Papazian (2008). "Role of open-lung biopsy in acute respiratory distress syndrome." *Curr Opin Crit Care* **14**(1):75-9.

Donowitz, L. G., M. C. Page, B. L. Mileur and S. H. Guenther (1986). "Alteration of normal gastric flora in critical care patients receiving antacid and cimetidine therapy." *Infect Control* **7**(1): 23-26.

Dore, P., R. Robert, G. Grollier, J. Rouffineau, H. Lanquetot, J. M. Charriere and J. L. Fauchere (1996). "Incidence of anaerobes in ventilator-associated pneumonia with use of a protected specimen brush." *Am J Respir Crit Care Med* **153**(4 Pt 1): 1292-1298.

Dostert, C., V. Petrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B. T. Mossman and J. Tschopp (2008). "Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica." *Science* **320**(5876): 674-677.

Drage, M. G., N. D. Pecora, A. G. Hise, M. Febbraio, R. L. Silverstein, D. T. Golenbock, W. H. Boom and C. V. Harding (2009). "TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*." *Cell Immunol* **258**(1): 29-37.

Dreyfuss, D., L. Martin-Lefevre and G. Saumon (1999). "Hyperinflation-induced lung injury during alveolar flooding in rats: effect of perfluorocarbon instillation." *Am J Respir Crit Care Med* **159**(6): 1752-1757.

Dreyfuss, D. and J. D. Ricard (2005). "Acute lung injury and bacterial infection." *Clin Chest Med* **26**(1): 105-112.

Dreyfuss, D. and G. Saumon (1993). "Role of tidal volume, FRC, and end-inspiratory volume in the development of pulmonary edema following mechanical ventilation." *Am Rev Respir Dis* **148**(5): 1194-1203.

Dreyfuss, D. and G. Saumon (1998). "Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies." *Am J Respir Crit Care Med* **157**(1): 294-323.

Dreyfuss, D., P. Soler, G. Basset and G. Saumon (1988). "High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure." *Am Rev Respir Dis* **137**(5): 1159-1164.

du Moulin, G. C., D. G. Paterson, J. Hedley-Whyte and A. Lisbon (1982). "Aspiration of gastric bacteria in antacid-treated patients: a frequent cause of postoperative colonisation of the airway." *Lancet* **1**(8266): 242-245.

Dulay, A. T., C. S. Buhimschi, G. Zhao, E. A. Oliver, A. Mbele, S. Jing and I. A. Buhimschi (2009). "Soluble TLR2 is present in human amniotic fluid and modulates the intraamniotic inflammatory response to infection." *J Immunol* **182**(11): 7244-7253.

DUNN, I. and J. PUGIN (1999). "Mechanical ventilation of various human lung cells in vitro: identification of the macrophage as the main producer of inflammatory mediators." *Chest* **116**: 95S-97S.

## **E**

Egan, E. A. (1980). "Response of alveolar epithelial solute permeability to changes in lung inflation." *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **49**(6): 1032-1036.

Egan, E. A. (1982). "Lung inflation, lung solute permeability, and alveolar edema." *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **53**(1): 121-125.

el-Ebiary, M., A. Torres, N. Fabregas, J. P. de la Bellacasa, J. Gonzalez, J. Ramirez, D. del Bano, C. Hernandez and M. T. Jimenez de Anta (1997). "Significance of the isolation of *Candida* species from respiratory samples in critically ill, non-neutropenic patients. An immediate postmortem histologic study." *Am J Respir Crit Care Med* **156**(2 Pt 1): 583-590.

Engstrom, C. G. (1954). "Treatment of severe cases of respiratory paralysis by the Engstrom universal respirator." *Br Med J* **2**(4889): 666-669.

## **F**

Fagon, J. Y., J. Chastre, Y. Domart, J. L. Trouillet, J. Pierre, C. Darne and C. Gibert (1989). "Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques." *Am Rev Respir Dis* **139**(4): 877-884.

Fagon, J. Y., J. Chastre, A. J. Hance, P. Montravers, A. Novara and C. Gibert (1993). "Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay." *Am J Med* **94**(3): 281-288.

Fanelli, V. and V. M. Ranieri (2015). "Mechanisms and clinical consequences of acute lung injury." *Ann Am Thorac Soc* **12 Suppl 1**: S3-8.

Ferwerda, G., F. Meyer-Wentrup, B. J. Kullberg, M. G. Netea and G. J. Adema (2008). "Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages." *Cell Microbiol* **10**(10): 2058-2066.

Flo, T. H., O. Halaas, S. Torp, L. Ryan, E. Lien, B. Dybdahl, A. Sundan and T. Espevik (2001). "Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells." *J Leukoc Biol* **69**(3): 474-481.

Force, A. D. T., V. M. Ranieri, G. D. Rubenfeld, B. T. Thompson, N. D. Ferguson, E. Caldwell, E. Fan, L. Camporota and A. S. Slutsky (2012). "Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition." *JAMA* **307**(23): 2526-2533.

Frank, J. A., J. A. Gutierrez, K. D. Jones, L. Allen, L. Dobbs and M. A. Matthay (2002). "Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-injured rat lungs." *Am J Respir Crit Care Med* **165**(2): 242-249.

Frank, J. A. and M. A. Matthay (2003). "Science review: mechanisms of ventilator-induced injury." *Crit Care* **7**(3): 233-241.

Frank, J. A., J. F. Pittet, C. Wray and M. A. Matthay (2008). "Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade." *Thorax* **63**(2): 147-153.

Fraser, I. P., H. Koziel and R. A. Ezekowitz (1998). "The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity." *Semin Immunol* **10**(5): 363-372.

Funderburg, N., M. M. Lederman, Z. Feng, M. G. Drage, J. Jadowsky, C. V. Harding, A. Weinberg and S. F. Sieg (2007). "Human  $\alpha$ -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(47): 18631-18635.

## **G**

Galiatsou, E., E. Kostanti, E. Svarna, A. Kitsakos, V. Koulouras, S. C. Efremidis and G. Nakos (2006). "Prone position augments recruitment and prevents alveolar overinflation in acute lung injury." *American journal of respiratory and critical care medicine* **174**(2): 187-197.



Galiatsou, E., E. Kostanti, E. Svarna, A. Kitsakos, V. Koulouras, S. C. Efremidis and G. Nakos (2006). "Prone position augments recruitment and prevents alveolar overinflation in acute lung injury." *Am J Respir Crit Care Med* **174**(2): 187-197.

Garrouste-Orgeas, M., S. Chevret, G. Arlet, O. Marie, M. Rouveau, N. Popoff and B. Schlemmer (1997). "Oropharyngeal or gastric colonization and nosocomial pneumonia in adult intensive care unit patients. A prospective study based on genomic DNA analysis." *Am J Respir Crit Care Med* **156**(5): 1647-1655.

Gattinoni, L. (2011). "Counterpoint: Is low tidal volume mechanical ventilation preferred for all patients on ventilation? No." *Chest* **140**(1): 11-13; discussion 14-15.

Gattinoni, L., P. Pelosi, G. Vitale, A. Pesenti, L. D'Andrea and D. Mascheroni (1991). "Body position changes redistribute lung computed-tomographic density in patients with acute respiratory failure." *Anesthesiology* **74**(1): 15-23.

Goldstein, I., M. T. Bughalo, C. H. Marquette, G. Lenaour, Q. Lu, J. J. Rouby and I. C. U. S. G. Experimental (2001). "Mechanical ventilation-induced air-space enlargement during experimental pneumonia in piglets." *Am J Respir Crit Care Med* **163**(4): 958-964.

Greenfield, L. J., P. A. Ebert and D. W. Benson (1964). "Effect of Positive Pressure Ventilation on Surface Tension Properties of Lung Extracts." *Anesthesiology* **25**: 312-316.

Gross, O., C. J. Thomas, G. Guarda and J. Tschopp (2011). "The inflammasome: an integrated view." *Immunol Rev* **243**(1): 136-151.

Guerin, C., S. Gaillard, S. Lemasson, L. Ayzac, R. Girard, P. Beuret, B. Palmier, Q. V. Le, M. Sirodot, S. Rosselli, V. Cadiergue, J. M. Sainty, P. Barbe, E. Combourieu, D. Debatty, J. Rouffineau, E. Ezingard, O. Millet, D. Guelon, L. Rodriguez, O. Martin, A. Renault, J. P. Sibille and M. Kaidomar (2004). "Effects of systematic prone positioning in hypoxemic acute respiratory failure: a randomized controlled trial." *Jama* **292**(19): 2379-2387.

## H

Halle, A., V. Hornung, G. C. Petzold, C. R. Stewart, B. G. Monks, T. Reinheckel, K. A. Fitzgerald, E. Latz, K. J. Moore and D. T. Golenbock (2008). "The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta." *Nat Immunol* **9**(8): 857-865.

Hillman, K. M., T. Riordan, S. M. O'Farrell and S. Tabaqchali (1982). "Colonization of the gastric contents in critically ill patients." *Crit Care Med* **10**(7): 444-447.

Hillman, N. H., T. J. Moss, S. G. Kallapur, C. Bachurski, J. J. Pillow, G. R. Polglase, I. Nitsos, B. W. Kramer and A. H. Jobe (2007). "Brief, large tidal volume ventilation initiates lung injury and a systemic response in fetal sheep." *American journal of respiratory and critical care medicine* **176**(6): 575-581.

Hoebe, K., X. Du, P. Georgel, E. Janssen, K. Tabeta, S. O. Kim, J. Goode, P. Lin, N. Mann, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, J. Han and B. Beutler (2003). "Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling." *Nature* **424**(6950): 743-748.

Hoebe, K., X. Du, J. Goode, N. Mann and B. Beutler (2003). "Lps2: a new locus required for responses to lipopolysaccharide, revealed by germline mutagenesis and phenotypic screening." *J Endotoxin Res* **9**(4): 250-255.

Hoebe, K., P. Georgel, S. Rutschmann, X. Du, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, L. Shamel, T. Hartung, U. Zahringer and B. Beutler (2005). "CD36 is a sensor of diacylglycerides." *Nature* **433**(7025): 523-527.

Hogg, J. C. (1987). "Neutrophil kinetics and lung injury." *Physiol Rev* **67**(4): 1249-1295.

Horan, T. C., D. H. Culver, R. P. Gaynes, W. R. Jarvis, J. R. Edwards and C. R. Reid (1993). "Nosocomial infections in surgical patients in the United States, January 1986-June 1992. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System." *Infect Control Hosp Epidemiol* **14**(2): 73-80.

## I

Ibsen, B. (1954). "The anaesthetist's viewpoint on the treatment of respiratory complications in poliomyelitis during the epidemic in Copenhagen, 1952." *Proc R Soc Med* **47**(1): 72-74.

Imai, Y., T. Kawano, S. Iwamoto, S. Nakagawa, M. Takata and K. Miyasaka (1999). "Intratracheal anti-tumor necrosis factor-alpha antibody attenuates ventilator-induced lung injury in rabbits." *J Appl Physiol* (1985) **87**(2): 510-515.

Imai, Y., S. Nakagawa, Y. Ito, T. Kawano, A. S. Slutsky and K. Miyasaka (2001). "Comparison of lung protection strategies using conventional and high-frequency oscillatory ventilation." *J Appl Physiol* (1985) **91**(4): 1836-1844.

Imai, Y., J. Parodo, O. Kajikawa, M. de Perrot, S. Fischer, V. Edwards, E. Cutz, M. Liu, S. Keshavjee, T. R. Martin, J. C. Marshall, V. M. Ranieri and A. S. Slutsky (2003). "Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome." *Jama* **289**(16): 2104-2112.

Imanaka, H., M. Shimaoka, N. Matsuura, M. Nishimura, N. Ohta and H. Kiyono (2001). "Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF-beta 1 mRNA upregulation in rat lungs." *Anesth Analg* **92**(2): 428-436.

Imler, J. L. and J. A. Hoffmann (2003). "Toll signaling: the TIReless quest for specificity." *Nat Immunol* **4**(2): 105-106.

Ip, W. K., K. Takahashi, R. A. Ezekowitz and L. M. Stuart (2009). "Mannose-binding lectin and innate immunity." *Immunol Rev* **230**(1): 9-21.

Ip, W. K., K. Takahashi, K. J. Moore, L. M. Stuart and R. A. Ezekowitz (2008). "Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome." *J Exp Med* **205**(1): 169-181.

## J

Jacqueline, C., A. Roquilly, C. Desessard, D. Boutoille, A. Broquet, V. Le Mabecque, G. Amador, G. Potel, J. Caillon and K. Asehnoune (2013). "Efficacy of ceftolozane in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia: in vivo antimicrobial activity and impact on host inflammatory response." *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **68**(1): 177-183.

Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**: 1-13.

Janssens, S. and R. Beyaert (2002). "A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling." *Trends Biochem Sci* **27**(9): 474-482.

Jimenez-Dalmaroni, M. J., N. Xiao, A. L. Corper, P. Verdino, G. D. Ainge, D. S. Larsen, G. F. Painter, P. M. Rudd, R. A. Dwek, K. Hoebe, B. Beutler and I. A. Wilson (2009). "Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a co-receptor for TLR2." *PLoS One* **4**(10): e7411.

Jin, M. S., S. E. Kim, J. Y. Heo, M. E. Lee, H. M. Kim, S. G. Paik, H. Lee and J. O. Lee (2007). "Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide." *Cell* **130**(6): 1071-1082.

Johanson, W. G., Jr., J. H. Higuchi, T. R. Chaudhuri and D. E. Woods (1980). "Bacterial adherence to epithelial cells in bacillary colonization of the respiratory tract." *Am Rev Respir Dis* **121**(1): 55-63.

Jolliet, P., P. Bulpa and J. C. Chevrolat (1998). "Effects of the prone position on gas exchange and hemodynamics in severe acute respiratory distress syndrome." *Critical care medicine* **26**(12): 1977-1985.

## K

Kahlenberg, J. M. and G. R. Dubyak (2004). "Mechanisms of caspase-1 activation by P2X7 receptor-mediated K<sup>+</sup> release." *Am J Physiol Cell Physiol* **286**(5): C1100-1108.

Kajikawa, O., C. W. Frevert, S. M. Lin, R. B. Goodman, S. M. Mongovin, V. Wong, K. Ballman, B. Daubeuf, G. Elson and T. R. Martin (2005). "Gene expression of Toll-like receptor-2, Toll-like receptor-4, and MD2 is differentially regulated in rabbits with *Escherichia coli* pneumonia." *Gene* **344**: 193-202.

Kawai, T., O. Adachi, T. Ogawa, K. Takeda and S. Akira (1999). "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." *Immunity* **11**(1): 115-122.

Kawano, T., S. Mori, M. Cybulsky, R. Burger, A. Ballin, E. Cutz and A. C. Bryan (1987). "Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung." *J Appl Physiol* **62**(1): 27-33.

Kirby, B. D., K. M. Snyder, R. D. Meyer and S. M. Finegold (1980). "Legionnaires' disease: report of sixty-five nosocomially acquired cases of review of the literature." *Medicine (Baltimore)* **59**(3): 188-205.

Kollef, M. H. (1999). "The prevention of ventilator-associated pneumonia." *N Engl J Med* **340**(8): 627-634.

Konigshoff, M., J. Schwarz and O. Eickelberg (2011). "Human lung stem cells: oh, the places you'll go!" *EMBO Mol Med* **3**(10): 575-577.

Kopp, E. B. and R. Medzhitov (1999). "The Toll-receptor family and control of innate immunity." *Curr Opin Immunol* **11**(1): 13-18.

Kuchnicka, K. and D. Maciejewski (2013). "Ventilator-associated lung injury." *Anaesthesiol Intensive Ther* **45**(3): 164-170.

Kuipers, M. T., H. Aslami, J. R. Janczy, K. F. van der Sluijs, A. P. Vlaar, E. K. Wolthuis, G. Choi, J. J. Roelofs, R. A. Flavell, F. S. Sutterwala, P. Bresser, J. C. Leemans, T. van der Poll, M. J. Schultz and C. W. Wieland (2012). "Ventilator-induced lung injury is mediated by the NLRP3 inflammasome." *Anesthesiology* **116**(5): 1104-1115.

Kuipers, M. T., T. van der Poll, M. J. Schultz and C. W. Wieland (2011). "Bench-to-bedside review: Damage-associated molecular patterns in the onset of ventilator-induced lung injury." *Crit Care* **15**(6): 235.

Kuipers, M. T., T. van der Poll, M. J. Schultz and C. W. Wieland (2011). "Bench-to-bedside review: Damage-associated molecular patterns in the onset of ventilator-induced lung injury." *Critical care* **15**(6): 235.

Kurdowska, A., E. J. Miller, J. M. Noble, R. P. Baughman, M. A. Matthay, W. G. Brelsford and A. B. Cohen (1996). "Anti-IL-8 autoantibodies in alveolar fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome." *J Immunol* **157**(6): 2699-2706.

## **L**

Ladoire, S., L. A. Pauchard, S. D. Barbar, P. Tissieres, D. Croisier-Bertin and P. E. Charles (2013). "Impact of the Prone Position in an Animal Model of Unilateral Bacterial Pneumonia Undergoing Mechanical Ventilation." *Anesthesiology*.

Larson, E. L. (1981). "Persistent carriage of gram-negative bacteria on hands." *Am J Infect Control* **9**(4): 112-119.

Lassen, H. C. (1953). "A preliminary report on the 1952 epidemic of poliomyelitis in Copenhagen with special reference to the treatment of acute respiratory insufficiency." *Lancet* **1**(6749): 37-41.

Lecuona, E., F. Saldias, A. Comellas, K. Ridge, C. Guerrero and J. I. Sznajder (1999). "Ventilator-associated lung injury decreases lung ability to clear edema and downregulates alveolar epithelial cell Na,K-adenosine triphosphatase function." *Chest* **116**(1 Suppl): 29S-30S.

Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* **86**(6): 973-983.

Lopez Sastre, J. B., D. Perez Solis, V. Roques Serradilla, B. Fernandez Colomer, G. D. Coto Cotallo, X. Krauel Vidal, E. Narbona Lopez, M. Garcia del Rio, M. Sanchez Luna, A. Belaustegui Cueto, M. Moro Serrano, A. Urbon Artero, E. Alvaro Iglesias, A. Cotero Lavin, E. Martinez Vilalta and B. Jimenez Cobos (2006). "Procalcitonin is not sufficiently reliable to be the sole marker of neonatal sepsis of nosocomial origin." *BMC Pediatr* **6**: 16.

Lopez-Medrano, F., R. San Juan, M. Lizasoain, M. Catalan, J. M. Ferrari, F. Chaves, C. Lumbreras, J. C. Montejo, A. Herreros de Tejada and J. M. Aguado (2013). "A non-compulsory stewardship programme for the management of antifungals in a university-affiliated hospital." *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **19**(1): 56-61.

Luna, C. M., A. Videla, J. Mattera, C. Vay, A. Famiglietti, P. Vujacich and M. S. Niederman (1999). "Blood cultures have limited value in predicting severity of illness and as a diagnostic tool in ventilator-associated pneumonia." *Chest* **116**(4): 1075-1084.

## **M**

Magret, M., T. Lisboa, I. Martin-Loeches, R. Manez, M. Nauwynck, H. Wrigge, S. Cardellino, E. Diaz, D. Koulenti and J. Rello (2011). "Bacteremia is an independent risk factor for mortality in nosocomial pneumonia: a prospective and observational multicenter study." *Critical care* **15**(1): R62.

Majumdar, S. R., F. A. McAlister, D. T. Eurich, R. S. Padwal and T. J. Marrie (2006). "Statins and outcomes in patients admitted to hospital with community acquired pneumonia: population based prospective cohort study." *BMJ* **333**(7576): 999.

Maki, D. G. (1978). "Control of colonization and transmission of pathogenic bacteria in the hospital." *Ann Intern Med* **89**(5 Pt 2 Suppl): 777-780.

Martin, T. R. and C. W. Frevert (2005). "Innate immunity in the lungs." *Proc Am Thorac Soc* **2**(5): 403-411.

Martinon, F., K. Burns and J. Tschopp (2002). "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." *Mol Cell* **10**(2): 417-426.

Matsumoto, M., D. Einhaus, E. S. Gold and A. Aderem (2004). "Simvastatin augments lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses in macrophages by differential regulation of the c-Fos and c-Jun transcription factors." *Journal of immunology* **172**(12): 7377-7384.

Matsushima, N., T. Tanaka, P. Enkhbayar, T. Mikami, M. Taga, K. Yamada and Y. Kuroki (2007). "Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors." *BMC Genomics* **8**: 124.

Matsuyama, H., F. Amaya, S. Hashimoto, H. Ueno, S. Beppu, M. Mizuta, N. Shime, A. Ishizaka and S. Hashimoto (2008). "Acute lung inflammation and ventilator-induced lung injury caused by ATP via the P2Y receptors: an experimental study." *Respir Res* **9**: 79.

McAuley, D. F., J. G. Laffey, C. M. O'Kane, G. D. Perkins, B. Mullan, T. J. Trinder, P. Johnston, P. A. Hopkins, A. J. Johnston, C. McDowell and C. McNally (2014). "Simvastatin in the acute respiratory distress syndrome." *The New England journal of medicine* **371**(18): 1695-1703.

McDonald, B., K. Pittman, G. B. Menezes, S. A. Hirota, I. Slaba, C. C. Waterhouse, P. L. Beck, D. A. Muruve and P. Kubes (2010). "Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation." *Science* **330**(6002): 362-366.

Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immune recognition: mechanisms and pathways." *Immunol Rev* **173**: 89-97.

Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1997). "Innate immunity: impact on the adaptive immune response." *Curr Opin Immunol* **9**(1): 4-9.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway, Jr. (1997). "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* **388**(6640): 394-397.

Miller, E. J., A. B. Cohen and M. A. Matthay (1996). "Increased interleukin-8 concentrations in the pulmonary edema fluid of patients with acute respiratory distress syndrome from sepsis." *Crit Care Med* **24**(9): 1448-1454.

## **N**

Nakata, T., M. Yasuda, M. Fujita, H. Kataoka, K. Kiura, H. Sano and K. Shibata (2006). "CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex." *Cell Microbiol* **8**(12): 1899-1909.

Nakos, G., A. Batistatou, E. Galiatsou, E. Konstanti, V. Koulouras, P. Kanavaros, A. Doulis, A. Kitsakos, A. Karachaliou, M. E. Lekka and M. Bai (2006). "Lung and 'end organ' injury due to

mechanical ventilation in animals: comparison between the prone and supine positions." *Critical care* **10**(1): R38.

Narimanbekov, I. O. and H. J. Rozycki (1995). "Effect of IL-1 blockade on inflammatory manifestations of acute ventilator-induced lung injury in a rabbit model." *Exp Lung Res* **21**(2): 239-254.

Nash, G., J. A. Bowen and P. C. Langlinais (1971). "'Respirator lung': a misnomer." *Arch Pathol* **91**(3): 234-240.

Neel, B. G., H. Gu and L. Pao (2003). "The 'Shp'ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling." *Trends Biochem Sci* **28**(6): 284-293.

Network, T. A. R. D. S. (2000). "Ventilation with lower tidal volume as compared with traditional tidal volume for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome." *New Eng J Med* **342**: 1301-1308.

Niessner, A., S. Steiner, W. S. Speidl, J. Pleiner, D. Seidinger, G. Maurer, J. J. Goronzy, C. M. Weyand, C. W. Kopp, K. Huber, M. Wolzt and J. Wojta (2006). "Simvastatin suppresses endotoxin-induced upregulation of toll-like receptors 4 and 2 in vivo." *Atherosclerosis* **189**(2): 408-413.

## O

Otto, C. M., K. Markstaller, O. Kajikawa, J. Karmrodt, R. S. Syring, B. Pfeiffer, V. P. Good, C. W. Frevert and J. E. Baumgardner (2008). "Spatial and temporal heterogeneity of ventilator-associated lung injury after surfactant depletion." *J Appl Physiol* (1985) **104**(5): 1485-1494.

Oudin, S. and J. Pugin (2002). "Role of MAP kinase activation in interleukin-8 production by human BEAS-2B bronchial epithelial cells submitted to cyclic stretch." *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**(1): 107-114.

## P

Panigada, M., L. Berra, G. Greco, M. Stylianou and T. Kolobow (2003). "Bacterial colonization of the respiratory tract following tracheal intubation-effect of gravity: an experimental study." *Crit Care Med* **31**(3): 729-737.

Papazian, L., A. Fraisse, L. Garbe, C. Zandotti, P. Thomas, P. Saux, G. Pierrin and F. Gouin (1996). "Cytomegalovirus. An unexpected cause of ventilator-associated pneumonia." *Anesthesiology* **84**(2): 280-287.

Papazian, L., A. Roch, P. E. Charles, C. Penot-Ragon, G. Perrin, P. Roulier, P. Goutorbe, J. Y. Lefrant, S. Wiramus, B. Jung, S. Perbet, R. Hernu, A. Nau, O. Baldesi, J. Allardet-Servent, K. Baumstarck, E. Jouve, M. Moussa, S. Hraiech, C. Guervilly and J. M. Forel (2013). "Effect of statin therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia: a randomized clinical trial." *JAMA : the journal of the American Medical Association* **310**(16): 1692-1700.

Patel, T. R. and S. A. Corbett (2004). "Simvastatin suppresses LPS-induced Akt phosphorylation in the human monocyte cell line THP-1." *The Journal of surgical research* **116**(1): 116-120.

Pavone, L., S. Albert, J. DiRocco, L. Gatto and G. Nieman (2007). "Alveolar instability caused by mechanical ventilation initially damages the nondependent normal lung." *Crit Care* **11**(5): R104.

Pelosi, P., N. Bottino, D. Chiumello, P. Caironi, M. Panigada, C. Gamberoni, G. Colombo, L. M. Bigatello and L. Gattinoni (2003). "Sigh in supine and prone position during acute respiratory distress syndrome." *American journal of respiratory and critical care medicine* **167**(4): 521-527.

Pelosi, P., D. Tubiolo, D. Mascheroni, P. Vicardi, S. Crotti, F. Valenza and L. Gattinoni (1998). "Effects of the prone position on respiratory mechanics and gas exchange during acute lung injury." *American journal of respiratory and critical care medicine* **157**(2): 387-393.

Petersson, J. and R. W. Glenny (2014). "Gas exchange and ventilation-perfusion relationships in the lung." *Eur Respir J* **44**(4): 1023-1041.

Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." *Science* **282**(5396): 2085-2088.

Pugin, J., I. Dunn, P. Jolliet, D. Tassaux, J. L. Magnenat, L. P. Nicod and J. C. Chevrolet (1998). "Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro." *Am J Physiol* **275**(6 Pt 1): L1040-1050.

Pugin, J., I. Dunn-Siegrist, J. Dufour, P. Tissieres, P. E. Charles and R. Comte (2008). "Cyclic stretch of human lung cells induces an acidification and promotes bacterial growth." *Am J Respir Cell Mol Biol* **38**(3): 362-370.

Pugin, J., B. Ricou, K. P. Steinberg, P. M. Suter and T. R. Martin (1996). "Proinflammatory activity in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ARDS, a prominent role for interleukin-1." *Am J Respir Crit Care Med* **153**(6 Pt 1): 1850-1856.

Pugin, J., G. Verghese, M. C. Widmer and M. A. Matthay (1999). "The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome." *Crit Care Med* **27**(2): 304-312.

## Q

Qureshi, S. T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros and D. Malo (1999). "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)." *J Exp Med* **189**(4): 615-625.



## R

Raby, A. C., E. Le Bouder, C. Colmont, J. Davies, P. Richards, B. Coles, C. H. George, S. A. Jones, P. Brennan, N. Topley and M. O. Labeta (2009). "Soluble TLR2 reduces inflammation without compromising bacterial clearance by disrupting TLR2 triggering." *J Immunol* **183**(1): 506-517.

Ranieri, V. M., P. M. Suter, C. Tortorella, R. De Tullio, J. M. Dayer, A. Brienza, F. Bruno and A. S. Slutsky (1999). "Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial." *Jama* **282**(1): 54-61.

Rello, J., V. Ausina, M. Ricart, J. Castella and G. Prats (1993). "Impact of previous antimicrobial therapy on the etiology and outcome of ventilator-associated pneumonia." *Chest* **104**(4): 1230-1235.

Rello, J., M. Gallego, D. Mariscal, R. Sonora and J. Valles (1997). "The value of routine microbial investigation in ventilator-associated pneumonia." *Am J Respir Crit Care Med* **156**(1): 196-200.

Rello, J., M. Rue, P. Jubert, G. Muses, R. Sonora, J. Valles and M. S. Niederman (1997). "Survival in patients with nosocomial pneumonia: impact of the severity of illness and the etiologic agent." *Crit Care Med* **25**(11): 1862-1867.

Rich, P. B., C. D. Douillet, S. A. Mahler, S. A. Husain and R. C. Boucher (2003). "Adenosine triphosphate is released during injurious mechanical ventilation and contributes to lung edema." *J Trauma* **55**(2): 290-297.

Richard, J. C., F. Bregeon, N. Costes, D. L. Bars, C. Tourvieille, F. Lavenne, M. Janier, G. Bourdin, G. Gimenez and C. Guerin (2008). "Effects of prone position and positive end-expiratory pressure on lung perfusion and ventilation." *Crit Care Med* **36**(8): 2373-2380.

Rock, F. L., G. Hardiman, J. C. Timans, R. A. Kastelein and J. F. Bazan (1998). "A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(2): 588-593.

Rouby, J. J., E. Martin De Lassale, P. Poete, M. H. Nicolas, L. Bodin, V. Jarlier, Y. Le Charpentier, J. Grosset and P. Viars (1992). "Nosocomial bronchopneumonia in the critically ill. Histologic and bacteriologic aspects." *Am Rev Respir Dis* **146**(4): 1059-1066.

## S

Sartorius, A., Q. Lu, S. Vieira, M. Tonnellier, G. Lenaour, I. Goldstein and J. J. Rouby (2007). "Mechanical ventilation and lung infection in the genesis of air-space enlargement." *Crit Care* **11**(1): R14.

Scheibner, K. A., M. A. Lutz, S. Boodoo, M. J. Fenton, J. D. Powell and M. R. Horton (2006). "Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2." *J Immunol* **177**(2): 1272-1281.

Schenk, M., J. T. Belisle and R. L. Modlin (2009). "TLR2 looks at lipoproteins." *Immunity* **31**(6): 847-849.

Schlingmann, B., S. A. Molina and M. Koval (2015). "Claudins: Gatekeepers of lung epithelial function." *Semin Cell Dev Biol.*

Schwandner, R., R. Dziarski, H. Wesche, M. Rothe and C. J. Kirschning (1999). "Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2." *J Biol Chem* **274**(25): 17406-17409.

Shimada, K., T. R. Crother, J. Karlin, S. Chen, N. Chiba, V. K. Ramanujan, L. Vergnes, D. M. Ojcius and M. Arditi (2011). "Caspase-1 dependent IL-1beta secretion is critical for host defense in a mouse model of *Chlamydia pneumoniae* lung infection." *PLoS One* **6**(6): e21477.

Sidibe, A. and B. A. Imhof (2014). "VE-cadherin phosphorylation decides: vascular permeability or diapedesis." *Nat Immunol* **15**(3): 215-217.

Siempos, II, N. A. Maniatis, P. Kopterides, C. Magkou, C. Glynos, C. Roussos and A. Armaganidis (2010). "Pretreatment with atorvastatin attenuates lung injury caused by high-stretch mechanical ventilation in an isolated rabbit lung model." *Critical care medicine* **38**(5): 1321-1328.

Sladen, A., M. B. Laver and H. Pontoppidan (1968). "Pulmonary complications and water retention in prolonged mechanical ventilation." *N Engl J Med* **279**(9): 448-453.

Slutsky, A. S. (2005). "Ventilator-induced lung injury: from barotrauma to biotrauma." *Respir Care* **50**(5): 646-659.

Slutsky, A. S. and V. M. Ranieri (2013). "Ventilator-induced lung injury." *The New England journal of medicine* **369**(22): 2126-2136.

Slutsky, A. S. and L. N. Tremblay (1998). "Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor?" *Am J Respir Crit Care Med* **157**(6 Pt 1): 1721-1725.

Spencer, R. C. (1996). "Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **15**(4): 281-285.

Stahl, P. D. and R. A. Ezekowitz (1998). "The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense." *Curr Opin Immunol* **10**(1): 50-55.

Stroetz, R. W., N. E. Vlahakis, B. J. Walters, M. A. Schroeder and R. D. Hubmayr (2001). "Validation of a new live cell strain system: characterization of plasma membrane stress failure." *J Appl Physiol* (1985) **90**(6): 2361-2370.

Stuart, L. M., J. Deng, J. M. Silver, K. Takahashi, A. A. Tseng, E. J. Hennessy, R. A. Ezekowitz and K. J. Moore (2005). "Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain." *J Cell Biol* **170**(3): 477-485.

Sud, S., J. O. Friedrich, P. Taccone, F. Polli, N. K. Adhikari, R. Latini, A. Pesenti, C. Guerin, J. Mancebo, M. A. Curley, R. Fernandez, M. C. Chan, P. Beuret, G. Voggenreiter, M. Sud, G. Tognoni and L. Gattinoni (2010). "Prone ventilation reduces mortality in patients with acute respiratory failure and severe hypoxemia: systematic review and meta-analysis." *Intensive care medicine* **36**(4): 585-599.

Suzuki, N., S. Suzuki and W. C. Yeh (2002). "IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity." *Trends Immunol* **23**(10): 503-506.

## T

Takahashi, K., T. Kawai, H. Kumar, S. Sato, S. Yonehara and S. Akira (2006). "Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA." *J Immunol* **176**(8): 4520-4524.

Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." *Cell* **140**(6): 805-820.

Takeuchi, O., K. Hoshino and S. Akira (2000). "Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection." *J Immunol* **165**(10): 5392-5396.

Tenoever, B. R., S. L. Ng, M. A. Chua, S. M. McWhirter, A. Garcia-Sastre and T. Maniatis (2007). "Multiple functions of the IKK-related kinase IKKepsilon in interferon-mediated antiviral immunity." *Science* **315**(5816): 1274-1278.

Terblanche, M., Y. Almog, R. S. Rosenson, T. S. Smith and D. G. Hackam (2007). "Statins and sepsis: multiple modifications at multiple levels." *The Lancet Infectious Diseases* **7**(5): 358-368.

Terragni, P. P., G. Rosboch, A. Tealdi, E. Corno, E. Menaldo, O. Davini, G. Gandini, P. Herrmann, L. Mascia, M. Quintel, A. S. Slutsky, L. Gattinoni and V. M. Ranieri (2007). "Tidal hyperinflation during low tidal volume ventilation in acute respiratory distress syndrome." *American journal of respiratory and critical care medicine* **175**(2): 160-166.

Todd, T. R., A. Franklin, P. Mankinen-Irvin, G. Gurman and R. T. Irvin (1989). "Augmented bacterial adherence to tracheal epithelial cells is associated with gram-negative pneumonia in an intensive care unit population." *Am Rev Respir Dis* **140**(6): 1585-1589.

Torres, A., R. Aznar, J. M. Gatell, P. Jimenez, J. Gonzalez, A. Ferrer, R. Celis and R. Rodriguez-Roisin (1990). "Incidence, risk, and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients." *Am Rev Respir Dis* **142**(3): 523-528.

Torres, A., M. el-Ebiary, J. Gonzalez, M. Ferrer, J. Puig de la Bellacasa, A. Gene, A. Martos and R. Rodriguez-Roisin (1993). "Gastric and pharyngeal flora in nosocomial pneumonia acquired during mechanical ventilation." *Am Rev Respir Dis* **148**(2): 352-357.

Tremblay, L., F. Valenza, S. P. Ribeiro, J. Li and A. S. Slutsky (1997). "Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model." *J Clin Invest* **99**(5): 944-952.

Tremblay, L. N., D. Miatto, Q. Hamid, A. Govindarajan and A. S. Slutsky (2002). "Injurious ventilation induces widespread pulmonary epithelial expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-6 messenger RNA." *Crit Care Med* **30**(8): 1693-1700.

Tremblay, L. N. and A. S. Slutsky (2006). "Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside." *Intensive Care Med* **32**(1): 24-33.

Troutman, T. D., J. F. Bazan and C. Pasare (2012). "Toll-like receptors, signaling adapters and regulation of the pro-inflammatory response by PI3K." *Cell Cycle* **11**(19): 3559-3567.

Tschumperlin, D. J., J. Oswari and A. S. Margulies (2000). "Deformation-induced injury of alveolar epithelial cells. Effect of frequency, duration, and amplitude." *Am J Respir Crit Care Med* **162**(2 Pt 1): 357-362.

## V

Valenza, F., M. Guglielmi, M. Irace, G. A. Porro, S. Sibilla and L. Gattinoni (2003). "Positive end-expiratory pressure delays the progression of lung injury during ventilator strategies involving high airway pressure and lung overdistention." *Crit Care Med* **31**(7): 1993-1998.

Valenza, F., M. Guglielmi, M. Maffioletti, C. Tedesco, P. Maccagni, T. Fossali, G. Aletti, G. A. Porro, M. Irace, E. Carlesso, N. Carboni, M. Lazzerini and L. Gattinoni (2005). "Prone position delays the progression of ventilator-induced lung injury in rats: does lung strain distribution play a role?" *Critical care medicine* **33**(2): 361-367.

Vance, R. E., R. R. Isberg and D. A. Portnoy (2009). "Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and nonpathogenic microbes by the innate immune system." *Cell Host Microbe* **6**(1): 10-21.

Vaneker, M., F. J. Halbertsma, J. van Egmond, M. G. Netea, H. B. Dijkman, D. G. Snijdelaar, L. A. Joosten, J. G. van der Hoeven and G. J. Scheffer (2007). "Mechanical ventilation in healthy mice induces reversible pulmonary and systemic cytokine elevation with preserved alveolar integrity: an in vivo model using clinical relevant ventilation settings." *Anesthesiology* **107**(3): 419-426.

Vaneker, M., L. A. Joosten, L. M. Heunks, D. G. Snijdelaar, F. J. Halbertsma, J. van Egmond, M. G. Netea, J. G. van der Hoeven and G. J. Scheffer (2008). "Low-tidal-volume mechanical ventilation induces a toll-like receptor 4-dependent inflammatory response in healthy mice." *Anesthesiology* **109**(3): 465-472.

Villar, J. (2006). "Low vs high positive end-expiratory pressure in the ventilatory management of acute lung injury." *Minerva Anestesiologica* **72**(6): 357-362.

Villar, J., N. Cabrera, M. Casula, C. Flores, F. Valladares, M. Muros, L. Blanch, A. S. Slutsky and R. Kacmarek (2010). "Mechanical ventilation modulates Toll-like receptor signaling pathway in a sepsis-induced lung injury model." *Intensive Care Med* **in press**.

Vlahakis, N. E. and R. D. Hubmayr (2000). "Invited review: plasma membrane stress failure in alveolar epithelial cells." *J Appl Physiol* (1985) **89**(6): 2490-2496;discussion 2497.

Vlahakis, N. E., M. A. Schroeder, R. E. Pagano and R. D. Hubmayr (2001). "Deformation-induced lipid trafficking in alveolar epithelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**(5): L938-946.

## **W**

Wang, Y., M. X. Zhang, X. Meng, F. Q. Liu, G. S. Yu, C. Zhang, T. Sun, X. P. Wang, L. Li, Y. Y. Wang, S. F. Ding, J. M. Yang and Y. Zhang (2011). "Atorvastatin suppresses LPS-induced rapid upregulation of Toll-like receptor 4 and its signaling pathway in endothelial cells." *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **300**(5): H1743-1752.

Ware, L. B. and M. A. Matthay (2000). "The acute respiratory distress syndrome." *N Engl J Med* **342**(18): 1334-1349.

Ware, L. B. and M. A. Matthay (2001). "Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome." *Am J Respir Crit Care Med* **163**(6): 1376-1383.

Webb, H. H. and D. F. Tierney (1974). "Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure." *Am Rev Respir Dis* **110**(5): 556-565.

Weibel, E. R. (2015). "On the tricks alveolar epithelial cells play to make a good lung." *Am J Respir Crit Care Med* **191**(5): 504-513.

Wessel, F., M. Winderlich, M. Holm, M. Frye, R. Rivera-Galdos, M. Vockel, R. Linnepe, U. Ipe, A. Stadtmann, A. Zarbock, A. F. Nottebaum and D. Vestweber (2014). "Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin." *Nat Immunol* **15**(3): 223-230.

Whitehead, T. C., H. Zhang, B. Mullen and A. S. Slutsky (2004). "Effect of mechanical ventilation on cytokine response to intratracheal lipopolysaccharide." *Anesthesiology* **101**(1): 52-58.

Wilkinson, K. D. (2003). "Signal transduction: aspirin, ubiquitin and cancer." *Nature* **424**(6950): 738-739.

Williams, M. J., A. Rodriguez, D. A. Kimbrell and E. D. Eldon (1997). "The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense." *EMBO J* **16**(20): 6120-6130.

Wu, B. Q., J. M. Luo, Y. H. Wang, Y. F. Shi, H. Liu, J. H. Ba and T. T. Zhang (2014). "Inhibitory effects of simvastatin on staphylococcus aureus lipoteichoic acid-induced inflammation in human alveolar macrophages." *Clinical and experimental medicine* **14**(2): 151-160.

Wu, J., Z. Yan, D. E. Schwartz, J. Yu, A. B. Malik and G. Hu (2013). "Activation of NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury." *J Immunol* **190**(7): 3590-3599.

Wunderink, R. G., M. S. Niederman, M. H. Kollef, A. F. Shorr, M. J. Kunkel, A. Baruch, W. T. McGee, A. Reisman and J. Chastre (2012). "Linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a randomized, controlled study." *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **54**(5): 621-629.

Wunderink, R. G., M. S. Niederman, M. H. Kollef, A. F. Shorr, M. J. Kunkel, A. Baruch, W. T. McGee, A. Reisman and J. Chastre (2012). "Linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial pneumonia: a randomized, controlled study." *Clin Infect Dis* **54**(5): 621-629.

Wyszogrodski, I., K. Kyei-Aboagye, H. W. Taeusch, Jr. and M. E. Avery (1975). "Surfactant inactivation by hyperventilation: conservation by end-expiratory pressure." *J Appl Physiol* **38**(3): 461-466.

## Y

Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho, H. Sanjo, O. Takeuchi, M. Sugiyama, M. Okabe, K. Takeda and S. Akira (2003). "Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway." *Science* **301**(5633): 640-643.

Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, H. Sanjo, S. Uematsu, T. Kaisho, K. Hoshino, O. Takeuchi, M. Kobayashi, T. Fujita, K. Takeda and S. Akira (2002). "Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4." *Nature* **420**(6913): 324-329.

Yamamoto, M., S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda and S. Akira (2003). "TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway." *Nat Immunol* **4**(11): 1144-1150.

Yende, S., E. B. Milbrandt, J. A. Kellum, L. Kong, R. L. Delude, L. A. Weissfeld and D. C. Angus (2011). "Understanding the potential role of statins in pneumonia and sepsis." *Critical care medicine* **39**(8): 1871-1878.

Yoshimura, A., E. Lien, R. R. Ingalls, E. Tuomanen, R. Dziarski and D. Golenbock (1999). "Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2." *J Immunol* **163**(1): 1-5.

## **Z**

Zahringer, U., B. Lindner, S. Inamura, H. Heine and C. Alexander (2008). "TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity." *Immunobiology* **213**(3-4): 205-224.

Zhang, Q., M. Raoof, Y. Chen, Y. Sumi, T. Sursal, W. Junger, K. Brohi, K. Itagaki and C. J. Hauser (2010). "Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury." *Nature* **464**(7285): 104-107.

Merci ma Nanou d'avoir relu tout mon manuscrit, de m'avoir presque tenu la main pour les impressions du manuscrit, merci de tous tes mots réconfortants, apaisants et de me faire tant rire.

Ma Dreynousse tu es tout le temps loiiiiiiiiin mais rien ne change. Tu restes une amie fidèle. Nos soirées me manquent. Tu as choisi de rester encore plus au Nord que Dijon, Bruxelles, maintenant Lille...c'est toujours l'occasion de se faire de supers we et j'espère que l'on pourra bientôt se voir. Merci de m'avoir toujours motivée et d'avoir toujours été là dans ma vie. Je te souhaite le meilleur dans la tienne.

Ma Deb, la globe-trotteuse je te dois un paquet de merci....merci de m'avoir toujours poussée un peu aux fesses pour que j'avance, merci de m'avoir initiée à l'avion que je déteste toujours autant, merci de me faire partager tous tes beaux moments de voyages et merci de toujours être mon SOS médecin dès que j'ai un petit truc qui va pas. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec Guillaume.

Ma Flo, on se suit depuis le lycée. Tu as toujours été présente dans ma vie malgré la petite distance géographique qui nous éloignait! Merci pour tous nos fous rires depuis toutes ses années, j'ai toujours l'impression d'avoir 18 ans avec toi! On est une sacrée équipe de Sipoue et nos aventures vont continuer avec les deux minis Sipou(e)s qui pointeront bientôt le bout de leur nez. Je vous souhaite une vie pleine d'amour avec Guillaume.

Maëva, tu es celle je pense qui me comprends le plus quant à mon amour des animaux...je pense que toi et moi nous avons le même amour inconditionnel pour toutes ces petites bêtes et surtout pour nos deux chats, les frères siamois loucheurs. Tu es la seule qui comme moi a essayé de promener son chat en laisse et la seule qui comprend pourquoi j'arrête de regarder un film où on fait mourir les animaux. Merci de m'avoir toujours soutenue dans cette aventure et d'être mon amie également pour tout le reste. Ta joie de vivre et ta fraîcheur sont contagieuses, je me sens toujours heureuse quand on se voit. Quand on sera vieille on ouvrira ensemble chez "Lau et Mama", refuge pour tous les animaux perdus. Je vous souhaite beaucoup de bonheur avec Denis, que j'adooouooooore. Merci à toi aussi mon petit Denis, d'avoir toujours eu de la considération pour ce que je faisais et de m'avoir toujours encouragée. Tu es un garçon en or et je suis plus qu'heureuse de te compter parmi mes amis. Lov u mes deux asticots.



Coch ou coconneau, merci d'être mon ami depuis ces loooongues années. Grâce à toi j'ai vu il y a longtemps pour la première fois un chat obèse, Réglisse, je me suis beaucoup moquée et maintenant c'est moi qui dois vivre au quotidien avec un chat sumo à la maison. Merci d'être resté le même depuis toutes ces années et de me faire toujours autant rire avec tes calembours, de répondre au bout de 3 semaines aux sms et de toujours me diagnostiquer un cancer au cerveau à chaque fois que je te demande un avis médical :) Je te souhaite plein de bonheur avec Sandra et une belle vie avec votre enfant chat Kétamine que j'ai hâte de rencontrer.

Pierre, mon petit Pierre, tu es la personne à la fois la plus sage et la plus folle par moment que je connaisse. Tu me fais tellement rire depuis toutes ses années. Merci d'être autant à l'écoute et toujours de bons conseils. Merci d'avoir toi aussi toujours cru en moi. Tu as ce quelque chose d'indéscriptible qui fait qu'on t'aime. Lyon ce n'est pas le bout du monde mais suffisamment loin pour qu'on ne puisse pas se voir autant qu'on le voudrait. Je te souhaite une belle carrière en chirurgie, tu te donnes tellement et moi je suis certaine depuis le début que tu feras de grandes choses. Tu es discret, tu te remets toujours (parfois trop peut être) en question mais c'est aussi ta grande qualité et c'est ce qui fera que tu seras, je pense toujours meilleur. J'espère pouvoir être à tes côtés autant que tu as été aux miens. Tu as trouvé ton alter ego en Adeline, c'est une fille géniale, pétillante et c'est toujours du pur bonheur de partager des moments avec vous. Je vous souhaite le meilleur dans vos carrières et votre vie à deux.

Sandoche....que te dire...déjà PARDON pour ce surnom dont je t'ai affublé...et que tout le monde utilise maintenant...C'est presque devenu ton vrai prénom en fait!!!! Je n'aurais pas assez de pages ni assez de mots pour te dire combien je te remercie pour ton soutien que ce soit dans le boulot de thèse ou dans ma vie perso. Tu es LA GRANDE DECOUVERTE de ma thèse, tu es devenue très vite en fait une amie chère à mon coeur. On a partagé de très grands moments de rire (avec la Goyette aussi) au labo (bon en plus du travail bien sûr...). Merci d'être venue me tenir compagnie pendant mes quelques nuits de surveillance au labo...on y a battu de beaux records de sauts en vélo avec notre tremplin! Merci de m'avoir redonné le sourire quand je déprimais sur ma vie en me faisant une banane flambée et finalement en flambant tes cheveux et tes sourcils. Tu fais même partie de mon vocabulaire, je vais te proposer pour les nouvelles expressions de l'année. ***Se faire une Sandoche***: "expression signifiant que l'on se brise un doigt en rebouchant son stylo ou en

*faisant ses lacets, qu'on se coupe le bras de manière démesurée avec une simple tranche de pain de mie..."* Bref, il faut t'éviter de toucher même ce qui est autorisé à un enfant de 6 mois. Tu es une amie en or et pour tout ça MERCI.

Merci également à Corinne, Christian et Florence. Merci de m'avoir si bien accueillie dans vos vies et de me soutenir dans la réalisation de cette thèse. Merci également de nous accompagner Nicolas et moi dans notre vie au quotidien. Je ne pouvais rêver mieux comme belle famille. Christian, ça fait du bien de pouvoir parler de science avec vous, je ne me sens pas extraterrestre et merci pour vos précieux conseils.

Je remercie également ma famille, mes tantes Joss et Béatrice, mes oncles Norbert, Gilles et Pascal pour leur soutien tout au long de mes études. Merci Béatrice et Pascal pour tous les supers moments de décompression et de fêtes vers vous à Toulouse ou à Roses. C'est toujours un grand bonheur de tous vous voir.

Merci ma Caro, même à l'autre bout du monde tu m'envoies plein de bonnes ondes positives et d'amour qui me donnent le moral.

Karine, Xav, Paul et Théo vous êtes mon bol d'air Dijonnais. Merci pour tous ces bons moments passés avec vous, c'est toujours du pur bonheur d'être avec vous et de voir les zouzous grandir! Merci ma Karine d'être ma grande soeur, de m'écouter et me conseiller, de m'avoir inculqué de vrais bons goûts en matière de mode et merci à toi et Xavier de me faire partager depuis longtemps vos moments en famille, chez vous, cela participe depuis longtemps à mon équilibre. Tu es un exemple pour moi Karine de super woman: super maman et super working-girl.

Pépé....c'est bon cette fois tu peux être rassuré je passe ma thèse. Je l'ai enfin terminée!!! Merci à toi et Eliane pour votre soutien et votre amour depuis que je suis enfant. J'espère vous combler de bonheur comme vous le faites pour moi. On fera la chouille pour fêter ça!!

Maman, Papa, vous dire merci est évident mais ne sera jamais suffisant. Votre foi indéfectible en moi quoi que je fasse m'a toujours portée et poussée à aller plus loin. Vous avez mis en moi beaucoup de persévérance et d'endurance qui me permettent aujourd'hui d'arriver là où je voulais aller, même si le chemin a été parfois chaotique. Votre amour inconditionnel et votre soutien ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui et j'espère simplement que vous êtes fiers de moi, c'est le seul moyen que j'ai de vous remercier de tout ce que vous faites pour moi.

A mon "petit" frère, Mimi ou Marmouzet, qui même TRES LOIN a toujours su me motiver et être là pour moi. Tu es un exemple. J'admire ton courage d'être parti si loin vivre ton rêve et l'acharnement que tu mets dans ton travail pour continuer de vivre ce rêve. Je serai toujours là pour toi moi aussi. Je te souhaite d'être encore plus heureux. Continue de croire en toi, le reste suivra et profite de la Big Apple!!!!

Enfin, un dernier mot pour toi Nicolas. Depuis que l'on est ensemble on forme une sorte de ménage à trois: toi, moi et ma thèse. Je sais la part prépondérante qu'elle a occupée dans ma vie et donc dans la tienne, en tout cas depuis deux ans. Moi je la vis avec un affect tout particulier puisque je la vis de l'intérieur et toi tu vois les choses de bien plus haut. Aussi c'est vrai, parfois, on a du mal à s'entendre sur ce point. Pourtant, même si tu le fais à ta manière, un peu brutale et maladroite par moment, tu es derrière moi depuis tout ce temps. Tu sais me remettre les pieds sur terre, me faire arrêter de me plaindre et me faire avancer mieux que quiconque. Tu as été un soutien hors pair pour moi dans cette aventure. Tu es l'homme que je rêvais de rencontrer. Je te remercie de m'avoir supportée dans mes plus mauvais jours, de m'apporter tant de réconfort et d'amour et de me pousser toujours plus haut. Tu m'apportes une telle joie dans mon quotidien. Je n'ai jamais connu autant de bonheur que depuis que je partage ma vie avec toi. Maintenant c'est bon, YOUPIIIII, on quitte la vie à trois avec ma thèse...pour la reprendre autrement, mais toujours à trois, dans quelques mois! Je suis si heureuse de vivre ça avec toi. Tu es l'amour de ma vie et je t'aime de tout mon coeur.