

Université de Montréal

Syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)
Étude de mécanismes impliqués dans la phase exsudative

par

Cécile Chupin

Département de Médecine

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté Médecine
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en Sciences Biomédicales

Août 2012

© Cécile Chupin, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)
Étude de mécanismes impliqués dans la phase exsudative

Présentée par :
Cécile Chupin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Philippe Juvet, président-rapporteur
Dr Yves Berthiaume, directeur de recherche
Dr André Dagenais, co-directeur
Dr Alain Rivard, membre du jury
Dr François Lamontagne, examinateur externe
Dr Denis DeBlois, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) se développe suite à une atteinte pulmonaire lésionnelle, induisant un œdème et une inflammation excessive, généralement suivis d'une réparation atypique menant à la fibrose. Malgré de significants progrès dans les traitements, la mortalité reste élevée : ~ 40 %.

Mon hypothèse de travail est que l'atténuation de l'œdème ou de la réponse inflammatoire pourrait freiner le développement ou la sévérité de la phase exsudative.

Nous avons évalué cette hypothèse à l'aide d'un modèle de phase exsudative du SDRA, i.e. instillation intra-trachéale de bléomycine, chez les souris.

- ❖ La modulation des fluides alvéolaires est étudiée avec des souris transgénique (Tg) pour le canal ENaC, qui sont sensibles à la formation d'un œdème. Cependant, ces souris Tg ne sont pas plus sensibles au développement de la phase exsudative en condition lésionnelle (bléomycine). Nous avons déterminé par une étude électrophysiologique des cellules épithéliales alvéolaires de type II (AT II) que ce n'est pas lié à une inhibition par la bléomycine de la fonction du canal ENaC.
- ❖ Le traitement de la réponse inflammatoire associée au SDRA par des glucocorticoïdes est une thérapie potentielle mais controversée. Les glucocorticoïdes dans notre modèle murin ne réduisent pas la sévérité des lésions. Nous avons pu déterminer lors d'expériences *in vitro* que ce serait dû à une réduction de la capacité de réparation des AT II.

En résumé :

- ❖ La modulation du canal ENaC ne modifie pas le développement de la phase exsudative, suggérant que la régulation de l'œdème n'est pas suffisante pour modifier l'évolution du SDRA.
- ❖ La modulation de l'inflammation par les glucocorticoïdes est inefficace, possiblement à cause d'une altération de la réparation.

Mon étude suggère que le traitement de la phase exsudative du SDRA est complexe. En effet, la régulation de l'œdème ou de l'inflammation de façon isolée ne peut pas modifier l'évolution du SDRA. L'hétérogénéité des sources du SDRA et la redondance des mécanismes cellulaires impliqués dans l'évolution des lésions pulmonaires suggèrent que le traitement nécessitera une approche visant plusieurs cibles mécanistiques afin d'en accélérer la résolution.

Mots-clés : SDRA, bléomycine, souris transgéniques, ENaC, œdème, inflammation, glucocorticoïdes, cellules alvéolaires de type II (AT II), réparation

Abstract

Although much has been learned about the mechanisms leading to acute respiratory distress syndrome (ARDS), mortality remains high: ~ 40%. This syndrome is associated with lung injury where alveolar edema and excessive inflammatory response can progress to abnormal epithelial repair and fibrosis.

The hypothesis of the work presented in this thesis is that attenuation of edema or of the inflammatory response in the initial stage of the acute lung injury would decrease the severity of injury.

I evaluated this hypothesis in an ARDS acute phase, modeled by an intratracheal instillation of bleomycin in mice, using two distinct experimental strategies.

- ❖ The importance of edema clearance was studied in a transgenic (Tg) ENaC mouse, a mouse known to be sensitive to the formation of edema. However, our results show that these Tg mice were not more susceptible to the development of the ARDS acute phase induced by bleomycin. Furthermore, we have been able to show that bleomycin itself did not interfere with the ENaC channel function of alveolar epithelial cells type II (AT II).
- ❖ The treatment of the inflammatory response associated with ARDS by glucocorticoid therapy is subject to controversy. In our mouse model, glucocorticoids decrease the level of cytokine in the alveolar milieu but did not decrease the severity of lung injury. Using *in vitro* experiments, we show that this lack of response could be secondary to the impact of the treatment on the epithelial repair capacity of AT II.

In summary:

- ❖ The ENaC channel expression did not have an impact on the development of the exudative phase, suggesting that the regulation of edema is not sufficient to alter the course of ARDS.
- ❖ The modulation of inflammation by glucocorticoids was ineffective, possibly because of impaired repair of the epithelium.

These results suggest that the control of edema or inflammation separately does not modify the evolution of lung injury. The heterogeneity of the ARDS origins and the redundancy of cellular mechanisms involved in lung injury will require therapy aimed at multiple pathophysiological targets to permit the resolution of lung injury.

Keywords : ARDS, bleomycin, transgenic mice, ENaC, edema, inflammation, glucocorticoids, epithelial alveolar type II cells (AT II), epithelial repair

Table des matières

Liste des tableaux	p viii
Liste des figures	p ix
Liste des abréviations	p xii
Remerciements	p xvi
Introduction	p 1
A) SDRA	p 3
1 Définition	p 3
2 Historique	p 3
3 Statistiques épidémiologiques	p 4
4 La pathophysiologie	p 5
B) Description de l'appareil respiratoire	p 10
1 Structure générale	p 10
1.1 Les voies respiratoires extra-pulmonaires	p 11
1.2 Les voies respiratoires intra-pulmonaires	p 12
1.3 Le parenchyme respiratoire	p 13
2 L'épithélium dans l'appareil respiratoire	p 15
2.1 L'épithélium du parenchyme respiratoire	p 16
C) Les rôles fonctionnels de l'appareil respiratoire : cibles thérapeutiques potentielles et des traitements du SDRA	p 19
1 Généralités	p 19
2 L'homéostasie liquidienne	p 20
2.1 Les canaux chlores	p 22
2.1 Les canaux potassiques	p 22
2.3 Les canaux sodiques	p 23
3 L'intégrité physique de l'épithélium respiratoire	p 31
3.1 La matrice extracellulaire	p 32

3.2 Cellules progénitrices et cellules souches	p 33
3.3 Les facteurs moléculaires	p 35
3.3.1 Les facteurs de croissance	p 35
3.3.2 Les cytokines	p 37
4 La protection immunitaire dans l'épithélium respiratoire	p 39
4.1 Les cellules participant à l'immunité	p 41
4.1.1 Les neutrophiles	p 42
4.1.1.1 Attraction et rétention des neutrophiles sur le site de lésion	p 42
4.1.1.2 Traversée de l'endothélium	p 43
4.1.1.3 Traversée de l'épithélium	p 44
4.2 Quelques molécules inflammatoires	p 47
4.2.1 Les ROS	p 47
4.2.2 Des cytokines	p 48
4.2.3 Des chémokines et facteurs de croissance	p 51
D. Hypothèses et objectifs	p 54
Méthodologie	p 57
A. In vivo	p 58
1 Le modèle animal	p 58
2 Les traitements oxydants	p 59
2.1 La bléomycine	p 59
2.2 Le <i>thiourea</i>	p 62
3 Le traitement anti-inflammatoire aux glucocorticoïdes	p 63
3.1 Le dexaméthasone	p 64
3.2 Le méthylprednisolone	p 66
4 Procédures générales suivant les traitements aux animaux	p 67
4.1 Euthanasie et nécropsie	p 67
4.2 Wet to Dry ou Mesure poids mouillé/poids sec	p 67

4.3 Mesure du poids	p 67
4.4 Histologie	p 68
4.5 Lavage broncho-alvéolaire : BAL	p 68
4.7 AlphaLISA pour le TNF α	p 68
B. In vitro	p 69
1 Le modèle cellulaire	p 69
1.1 La chirurgie	p 69
1.2 Isolation des cellules AT II	p 70
2 Les traitements oxydants	p 70
2.1 La bléomycine	p 70
3 Le traitement anti-inflammatoire aux glucocorticoïdes	p 71
3.1 Le dexaméthasone	p 71
4 Procédures générales des travaux cellulaires	p 72
4.1 Mesure de courants ioniques et résistance (Ussing)	p 72
4.2 Mesure de la réparation des plaies	p 73
4.3 Mesures de l'apoptose	p 73
4.4 Mesure de l'adhésion	p 74
4.5 Mesure de la prolifération	p 75
C. Statistiques	p 76
Résultats	p 77
A. Importance du canal ENaC dans la résolution de l'œdème d'un modèle de phase aiguë du SDRA à la bléomycine	p 78
1 Réponse à la bléomycine <i>in vitro</i>	p 78
1.1 Le modèle cellulaire	p 78
1.2 Le courant du canal ENaC	p 78
2 Réponse à la bléomycine <i>in vivo</i>	p 81
2.1 Le modèle murin transgénique	p 81
2.2 Le modèle <i>thiourea</i>	p 83

2.3 La survie	p 84
2.4 La variation de poids	p 85
2.5 L'œdème	p 86
2.6 Les lésions tissulaires	p 87
2.7 L'inflammation	p 89
B. Impact du traitement aux glucocorticoïdes dans le modèle de phase aiguë du SDRA à la bléomycine	p 92
1 Réponse aux glucocorticoïdes <i>in vivo</i>	p 93
1.1 La survie	p 93
1.2 La variation de poids	p 94
1.3 L'œdème	p 95
1.4 Les lésions tissulaires	p 98
1.5 L'inflammation	p 100
2 Réponse au dexaméthasone <i>in vitro</i>	p 103
2.1 Les processus modulant la réparation épithéliale	p 103
2.1.1 La fermeture des plaies	p 104
2.1.2 L'apoptose	p 107
2.1.3 L'adhésion	p 109
2.1.4 La prolifération	p 110
Discussion	p 111
A) Évaluation de l'importance du canal ENaC lors de la phase aiguë du SDRA	p 112
1 Rationnelle	p 112
2 Interprétation et discussion de nos résultats	p 113
3 Conclusion	p 117
B) Impact du traitement aux glucocorticoïdes sur la phase aiguë du SDRA	p 118
1 Rationnelle	p 118
2 Interprétation et discussion de nos résultats	p 122

3 Conclusion	p 132
C) Conclusion générale sur le traitement de la phase aiguë du SDRA	p 132
Annexe 1	p xvii
Annexe 2	p xviii
Annexe 3	p xx
Annexe 4	p xxii
Annexe 5	p xxiii
Annexe 6	p xxiv

Liste des tableaux

Tableau 1 : Historique des définitions du SDRA	p 4
Tableau 2 : Médiateurs de l'inflammation dans le SDRA	p 41
Tableau 3 : Tableau de croisements des souris ENaC +/- Tg+	p 81

Liste des figures

Figure 1 : Le système respiratoire avec les voies respiratoires extra-pulmonaires, intra-pulmonaires et le parenchyme respiratoire	p 11
Figure 2 : L'acinus pulmonaire	p 13
Figure 3 : La zone alvéolo-capillaire	p 14
Figure 4 : Les épithéliums de l'appareil respiratoire	p 16
Figure 5 : L'épithélium alvéolaire	p 17
Figure 6 : Le surfactant et l'hypophase	p 18
Figure 7 : Schéma du canal ENaC avec les sous-unités α ou δ , et β et γ	p 25
Figure 8 : Les canaux et transporteurs au niveau des cellules AT I et II	p 28
Figure 9 : Séquence des événements permettant la réparation épithéliale	p 32
Figure 10 : Les différentes phases du processus de réparation des cellules alvéolaires	p 34
Figure 11 : Théorie de la cellule en migration	p 35
Figure 12 : Les étapes de l'extravasation des neutrophiles	p 44
Figure 13 : Migration des neutrophiles à travers l'épithélium	p 45
Figure 14 : Molécule bléomycine	p 59
Figure 15 : Bléomycine et ADN	p 60
Figure 16 : Molécule thiourea	p 61
Figure 17 : Molécule dexaméthasone	p 63
Figure 18 : Molécule méthylprednisolone	p 65
Figure 19 A : Exemple de courant sodium transépithélial en condition contrôle et bléomycine	p 78
Figure 19 B : Exemple de courant sodium apical en condition contrôle et bléomycine	p 78
Figure 20 : Effet de la bléomycine sur les courants apical et transépithélial des AT II	p 79

Figure 21 : Effet de la thiourée sur le développement de l'œdème chez les souris WT et Tg	P 82
Figure 22 : Effet de la bléomycine sur la mortalité des souris WT et Tg	p 83
Figure 23 : Effet de la bléomycine sur la variation de poids chez les souris WT et Tg	P 84
Figure 24 : Effet de la bléomycine sur le développement de l'œdème chez les souris WT et Tg	p 85
Figure 25 A : Histologie des souris WT et Tg	p 86
Figure 25 B : Effet de la bléomycine sur la sévérité des lésions chez les souris WT et Tg	P 87
Figure 26 A : Effet de la bléomycine sur la concentration protéique du BAL chez les souris WT et Tg	p 88
Figure 26 B : Effet de la bléomycine sur la concentration en TNF α du BAL chez les souris WT et Tg	p 89
Figure 26 C : Effet de la bléomycine sur l'infiltration leucocytaire chez les souris WT et Tg	p 90
Figure 27 : Effet du dexaméthasone sur la survie du modèle bléomycine murin	p 92
Figure 28 : Effet du dexaméthasone sur la variation de poids du modèle bléomycine murin	p 93
Figure 29 A : Effet du dexaméthasone sur l'œdème du modèle bléomycine murin	p 94
Figure 29 B : Effet du méthylprednisolone sur l'œdème du modèle bléomycine murin	p 95
Figure 29 C : Effet du dexaméthasone ou méthylprednisolone sur l'œdème du modèle bléomycine murin	p 96
Figure 30 A : Histologie des souris WT	p 97
Figure 30 B : Effet du dexaméthasone sur la sévérité des lésions du modèle bléomycine murin	p 98
Figure 31 A : Effet du dexaméthasone sur la concentration protéique du BAL du modèle bléomycine	p 99

Figure 31 B : Effet du dexaméthasone sur la concentration en TNF α du BAL du modèle bléomycine	p 100
Figure 31 C : Effet du dexaméthasone sur l'infiltration leucocytaire du modèle bléomycine	p 101
Figure 32 A : Modèle de fermeture de plaies sur une monocouche de AT II, en condition contrôle, aux temps 30min, 24h et 48h	p 103
Figure 32 B : Fermeture de plaies en condition contrôle sur les AT II	p 103
Figure 33 A : Effet de la bléomycine sur la fermeture de plaies, sur des AT II	p 104
Figure 33 B : Effet de doses croissantes de bléomycine sur la réparation des plaies mécaniques sur des AT II	p 104
Figure 34 : Effets de la bléomycine et du dexaméthasone sur la réparation des plaies mécaniques sur des AT II	p 105
Figure 35 : Effets de la bléomycine et du dexaméthasone sur l'apoptose des AT II	p 106
Figure 36 A : Effet de la bléomycine sur l'apoptose des AT II	p 107
Figure 36 B : Effets de la bléomycine et du z-Vad-FMK sur l'apoptose des AT II	p 107
Figure 36 C : Effet de l'inhibiteur général des caspases sur les plaies en présence de bléomycine	p 107
Figure 37 : Effet du dexaméthasone sur l'adhésion des AT II	p 108
Figure 38 : Effets de la bléomycine et du dexaméthasone sur la prolifération des AT II	p 109
Figure 39 : Rôle des médiateurs inflammatoires dans la pathophysiologie du SDRA	p 133

Liste des abréviations

SDRA	syndrome de détresse respiratoire aiguë	p 2
MODS	syndrome de dysfonction multi-viscérale	p 3
PaO ₂	pression partielle en oxygène dans le sang artériel	p 3
FiO ₂	fraction d'oxygène dans les gaz inspirés	p 3
PaO ₂ / FiO ₂	ratio of arterial oxygen tension to inspired oxygen concentration	p 3
ALI	acute lung injury	p 4
ICU	unite des soins intensifs	p 5
RNS	reative nitrogen species	p 6
LPS	lipopolysaccharide	p 6
NOS-2	inducible nitric oxide synthase	p 6
ROS	reactive oxygen species	p 6
AT I / II	cellules alvéolaires de type I/II	p 6
O ₂	dioxygène	p 15
CO ₂	dioxyde de carbone	p 15
DPPC	dipalmitoyl phosphatidylcholine	p 18
SP- A, B, C	surfactant protein A, B, C	p 18
Na ⁺	ion sodium	p 21
Cl ⁻	ion chlore	p 21
ATP	adénosine triphosphate	p 21
K _{ATP}	canal potassique ATP-dépendant	p 21
K ⁺	ion potassium	p 21
ENaC	epithelium sodium channel	p 22
HCO ₃	bicarbonate	p 22
KCl	chlorure de potassium	p 22
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator	p 22
AMPc	adénosine monophosphate cyclique	p 22

NaKATPase	pompe sodium-potassium adenosinetriphosphatase	p 22
KvLQT1	canaux potassium voltage-dépendant	p 23
Kv1.7	canaux potassium voltage-dépendant	p 23
Kir2.1	canal K ⁺ rectifiant entrant	p 23
HKATPase	pompe hydrogène-potassium adenosinetriphosphatase	p 23
H ⁺	proton	p 23
CNG1	cyclic nucleotide gated channel	p 24
KO	knock-out	p 24
NaCh	sodium channel	p 24
NH ₂ -	extrémité amine d'une protéine	p 25
-COOH	extrémité carboxylique d'une protéine	p 25
NSC	canal non-sélectif aux cations	p 25
ACTH	adreno-cortico-trophic hormone hypophysaire	p 26
HSC	canal hautement sélectif au sodium	p 26
GRE	glucocorticoid response element	p 27
HAPE	œdème pulmonaire de haute altitude	p 28
i.e.	id est est une expression latine et signifie « c'est-à-dire »	p 28
ARNm	acide ribonucléique messenger	p 28
EGF	epithelial growth factor	p 28
MEC	matrice extracellulaire	p 30
CCSP	protéine de secretion des cellules de Clara	p 32
TGF- α	transforming growth factor alpha	p 34
REGF	récepteur à l'EGF	p 34
IL	interleukine	p 35
FGF	fibroblast growth factor	p 35
KGF	keratinocyte growth factor	p 35
TNF α	tumor necrosis factor alpha	p 35
PDGF-BB	platelet-derived growth factor-BB	p 35
HGF	hepatocyte growth factor	p 35

u-PA	plasminogen activator	p 35
IPF	idiopathic pulmonary fibrosis	p 36
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1	p 36
IGF-1	insulin-like growth factor-1	p 36
b-FGF	basic-fibroblast growth factor	p 36
BAL	lavage broncho-alvéolaire	p 36
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase	p 36
EMT	transition épithélio-mésenchymateuse	p 37
MMP	métalloprotéinases de la matrice	p 45
H ₂ O ₂	péroxyde d'hydrogène	p 46
Po	probabilité d'ouverture	p 46
LIS	lung injury score	p 47
GSH/GSSG ratio	ratio du glutathion GSH (forme réduite) sur GSSG (forme oxydée)	p 47
RAGE	receptor of advanced glycation end products	p 48
IFN γ	interferon gamma	p 48
RTNF	récepteur au TNF α	p 48
MIP	macrophage inflammatory protein	p 50
VEGF	vascular endothelial growth factor	p 51
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	p 52
MPOC	maladie pulmonaire obstructive chronique	p 55
WT	Wild Type	p 55
NMRI	Naval Medical Research Institute	p 57
Tg	transgénique	p 57
CMV	cytomegalovirus	p 57
HMGB1	high-mobility group protein B1	p 58
ADN	acide désoxyribonucléique	p 59
i.t.	instillation intra-trachéale	p 60
FMO	flavin-containing monooxygenases	p 61

i.p.	injection intra-péritonéale	p 61
GRE	glucocorticoid-responsive element	p 62
NFκB	nuclear factor-kappaB	p 62
IRIC	institut de recherche en immunologie et en cancérologie	p 67
HE	hémalun - éosine	p 67
SGGS	sodium glucose gentamycine sepra	p 68
DNase	désoxyribonucléase	p 69
SVF	sérum de veau fœtal	p 69
FBS	foetal bovine serum	p 69
DMNQ	2,3-dimethoxy-1,4-naphtoquinone	p 71
TCA	trichloroacetic acid	p 74
IRIC	Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie	p 86
O ₂ ⁻	radical oxydant de l'oxygène	p 114
KC	équivalent murin de l'IL-8	p 115
Prx	peroxiredoxin	p 115
MCP	monocyte chimoattractant protein	p 115
NCI H441	human lung epithelial cell lines	p 129
HPMEC	primary human pulmonary microvascular endothelial cells	p 129
16HBE14o-	transformed epithelial cell line derived from normal human bronchial	p 129

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier mes parents. Mes parents qui m'ont suivie dans chacun de mes choix. Mes parents qui m'ont supportée moralement et monétairement.

Je remercie chaque personne qui a croisée mon chemin, et n'en ferai pas la liste. Chacun de vous m'a permis d'être qui je suis et *in fine* de soutenir cette thèse de doctorat.

Cette thèse de doctorat est aussi la vôtre. Je vous la dédie.

C'est un aboutissement et un commencement.

INTRODUCTION

Le SDRA (syndrome de détresse respiratoire aiguë) regroupe de multiples phénomènes pathologiques (œdème, lésions endothéliales et épithéliales,

inflammation, fibrose) touchant l'appareil respiratoire et entraînant une insuffisance respiratoire aiguë.

La définition, l'historique, l'épidémiologie et la pathophysiologie du SDRA seront d'abord décrites, avec une attention particulière sur la première phase du syndrome que nous avons étudiée. Afin de mieux connaître l'organe dans lequel il se produit, un survol général avec un appui prononcé sur la zone alvéolaire, qui est fortement touchée par le syndrome, sera fait.

Ensuite, les liens entre les différentes fonctions de l'appareil pulmonaire qui sont des cibles thérapeutiques (i.e. l'homéostasie liquidienne, le maintien de l'intégrité physique et la protection immunitaire) et les traitements actuels, seront exposés.

Finalement, les hypothèses de travail et la démarche expérimentale seront développées.

A) Le SDRA

1 Définition

L'origine du syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) peut être d'ordre pulmonaire-directe (pneumonie, aspiration gastrique) ou extrapulmonaire-indirecte (sepsis, trauma sévère, multiples transfusions). Le SDRA est une forme très sévère de défaillance pulmonaire aiguë, se caractérisant par la survenue rapide d'une détresse respiratoire. Cette détresse est d'abord liée au bris de la membrane alvéolo-capillaire, qui induit œdème et inflammation – ou renforce l'inflammation déjà présente. Lorsque celle-ci se prolonge, elle entretient les dommages à la membrane alvéolo-capillaire, empêchant sa restauration. Lorsque l'inflammation devient systémique, elle entraîne le MODS (*multiple organ dysfunction syndrome*). La mortalité est généralement due au développement d'un sepsis ou du MODS, plutôt qu'à la détresse respiratoire (Tsushima K, *et al.*, 2009). La détresse respiratoire se perpétue car l'architecture pulmonaire subit un remodelage qui n'est pas seulement structural, mais aussi fonctionnel (Morales MM, *et al.*, 2011). Les patients survivants peuvent souffrir de dysfonctionnements persistants un an après leur congé de l'hôpital, tant au niveau respiratoire (diminution de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone) que musculaire (perte de masse et fatigue) (Herridge MS, *et al.*, 2003).

2 Historique

Bien que connu depuis très longtemps, sous des dénominations différentes, le SDRA fut décrit pour la première fois par D.G. Ashbaugh (Ashbaugh DG, *et al.*, 1967). En 1988, 4 points permettant la reconnaissance de cette pathologie pour les cliniciens ont été ainsi définis : -1- la pression positive de fin d'expiration, -2- la sévérité de l'hypoxémie (*ratio of arterial oxygen tension to inspired oxygen concentration* $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$), -3- le degré de compliance du poumon et -4- le degré d'infiltration lors de radiographies thoraciques (Murray JF, *et al.*, 1988). Une conférence-consensus américano-européenne a précisé en 1994 les critères définissant ce syndrome (définition, classification, incidence de la pathologie) : -1- l'hypoxémie (rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ mm Hg), -2- la présence d'infiltrats floconeux bilatéraux à la radiographie du thorax, -3- un facteur de risque pour le

développement du SDRA et -4- l'absence d'une insuffisance cardiaque ou une pression capillaire bloquée inférieure à 18cm H₂O [Tableau 1].

TABLE 1. DEFINITIONS OF THE ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME.*

REFERENCE	YEAR	DEFINITION OR CRITERIA	ADVANTAGES	DISADVANTAGES
Petty and Ashbaugh ³	1971	Severe dyspnea, tachypnea Cyanosis refractory to oxygen therapy Decreased pulmonary compliance Diffuse alveolar infiltrates on chest radiography Atelectasis, vascular congestion, hemorrhage, pulmonary edema, and hyaline membranes at autopsy	First description Summarizes clinical features well	Lacks specific criteria to identify patients systematically
Murray et al. ⁴	1988	Preexisting direct or indirect lung injury Mild-to-moderate or severe lung injury Nonpulmonary organ dysfunction	Includes 4-point lung-injury scoring system Specifies clinical cause of lung injury Includes consideration of the presence or absence of systemic disease	Lung-injury score not predictive of outcome Lacks specific criteria to exclude a diagnosis of cardiogenic pulmonary edema
Bernard et al. ⁵	1994	Acute onset Bilateral infiltrates on chest radiography Pulmonary-artery wedge pressure \leq 18 mm Hg or the absence of clinical evidence of left atrial hypertension Acute lung injury considered to be present if PaO ₂ :FiO ₂ is \leq 300 Acute respiratory distress syndrome considered to be present if PaO ₂ :FiO ₂ is \leq 200	Simple, easy to use, especially in clinical trials Recognizes the spectrum of the clinical disorder	Does not specify cause Does not consider the presence or absence of multi-organ dysfunction Radiographic findings not specific

*PaO₂ denotes partial pressure of arterial oxygen, and FiO₂ fraction of inspired oxygen.

Tableau 1 : Historique des définitions du SDRA (Ware LB, *et al.*, 2000)

3 Statistiques épidémiologiques

La mortalité des patients atteints de SDRA décline depuis les dernières décennies. Dans les années 1980, le taux de mortalité était de 64–70% (Milberg JA, *et al.*, 1995, Villar J, *et al.*, 1989). Cependant, il faut tenir compte du fait que la définition consensus de l'ALI (acute lung injury)/SDRA n'a été développée qu'en 1994. Les études les plus récentes indiquent des taux de mortalité allant de 29% à 42 % (Erickson SE, *et al.*, 2009, Zamboni M, *et al.*, 2008). Cette réduction de la mortalité a été obtenue grâce à une méthode de ventilation mécanique sécuritaire et quelques améliorations dans les soins. Les variations dans l'incidence du SDRA peuvent être expliquées par les différences de prise en charge selon

les pays et les tranches d'âge. Ainsi, aux États-Unis, une étude assez récente montre une incidence de 78.9 pour 100,000 personnes par an, associé à un taux de mortalité proche de 40% (Rubenfeld GD, *et al.*, 2005). Selon le type de conception de l'étude, la méthodologie, la définition et la population, les résultats diffèrent. Ainsi, aux Pays-Bas, l'incidence est de 20.9 pour 100,000 (Wind J, *et al.*, 2007), tandis qu'en Australie et Nouvelle-Zélande elle est de 28 pour 100,000 (Bersten AD, *et al.*, 2002). De plus, l'incidence varie avec l'âge, ainsi dans l'étude états-unienne le taux est de 15 pour 100,000 pour les patients âgés de 15 à 19 ans, tandis que pour la tranche d'âge 75-84, le taux est de 306 pour 100,000 (Rubenfeld GD, *et al.*, 2005). Une incidence plus élevée se trouve dans les unités de soins intensifs (ICU) : 6,3% au Brésil (Oliveira RH, *et al.*, 2006), de 2% en Chine (Lu Y, *et al.*, 2004), de 8,1% en Écosse (Hughes M, *et al.*, 2003), de 7,7 % en Argentine (Estenssoro E, *et al.*, 2002). Le taux de mortalité varie de 10,3% en ICU pour la Chine (Lu Y, *et al.*, 2004), à 53,1% en unité des soins intensifs (ICU) pour l'Écosse (Hughes M, *et al.*, 2003) ou encore 49,4% en ICU pour une étude pan-européenne (Brun-Buisson C, *et al.*, 2004).

4 La pathophysiologie

Le SDRA peut être décrit en 3 stades qui se chevauchent dans le temps (Berthiaume Y, *et al.*, 1999, Schwarz MA, 2001, Ware LB, *et al.*, 2000).

Tout d'abord, il y a la phase aiguë ou exsudative. La détérioration des tissus conduit au développement d'un œdème riche en protéines, pouvant emplir les alvéoles pulmonaires (Schwarz MA, 2001), accompagné d'un infiltrat neutrophilique. Il existe une controverse quant à l'ordre d'apparition : d'abord un infiltrat de neutrophiles dans les alvéoles et l'interstitium, puis la génération de lésions tissulaires (Fowler AA, *et al.*, 1987), ou l'inverse (Pugin J, *et al.*, 1999, Weinacker AB, *et al.*, 2001). Sachant que le passage des neutrophiles par eux-mêmes n'endommage pas la paroi alvéolo-capillaire (Ley K, *et al.*, 2007, Zemans RL, *et al.*, 2009), leur grand nombre et/ou leur état activé peut être une source additionnelle de dommages. Cependant, leur attraction sur un site nécessite qu'il y

ait eut préalablement lésion ou infection. Il y a donc probablement mise en place d'une boucle rétro-positive inflammatoire. Il a d'autre part été établi que cet infiltrat neutrophilique diffus est hémorragique. De plus, la toxicité des métabolites de l'oxygène et de l'azote relâchés par les neutrophiles actifs, les macrophages et d'autres cellules est l'un des mécanismes participant aux lésions pulmonaires. Notamment, il a été montré que les RNS (Reactive Nitrogen Species) jouent un rôle dans l'inflammation. Lors de lésions induites par l'injection de LPS (lipopolysaccharides) (Kristof AS, *et al.*, 1998), l'infection par le virus influenza (Karupiah G, *et al.*, 1998) ou l'expérience d'hémorragie/ressuscitation (Szabo C, *et al.*, 1999), les souris NOS-2 (Inducible Nitric Oxide Synthase) -/- sont moins touchées que leurs consœurs WT. Aussi, la présence d'une hyperoxie qui induit la formation de ROS (Reactive Oxygen Species), conduit à la dégénérescence des cellules alvéolaires de type I (AT I) et les cellules épithéliales alvéolaires de type II (AT II) montrent une altération profonde des mitochondries (gonflement hyperplasie desquamation de la structure, l'appauvrissement en surfactant ; (Bin-Jaliah I, *et al.*, 2009)).

Il est à noter que les dommages tissulaires peuvent être exacerbés par la ventilation mécanique et l'exposition prolongée à des hauts taux d'oxygène. Les hauts taux d'oxygène et l'atélectasie augmentée lors de l'altération des AT II conduisent à une diminution de la synthèse et du renouvellement du surfactant pulmonaire (Baker CS, *et al.*, 1999, Crim C, *et al.*, 1995, Gregory TJ, *et al.*, 1991). Les neutrophiles, par la synthèse d'élastase (Baker CS, *et al.*, 1999), induisent le clivage et donc l'inactivation de protéines du surfactant. Les radicaux oxydants – dont l'équilibre avec les anti-oxydants a été détruit (Lenz AG, *et al.*, 1999) - ont le même effet (Seeger W, *et al.*, 1993b). Des éléments du surfactant peuvent être incorporés à la structure des membranes hyalines (Seeger W, *et al.*, 1993a). De plus, des dépôts de molécules de fibrinogène provenant de l'exsudat, forment un réseau de fibrine le long des parois alvéolaires endommagées (Idell S, *et al.*, 1987). La fibrine, les éléments du surfactants, les débris cellulaires et les globules rouges participent à la formation de membranes hyalines remplissant les espaces aériens et bloquant les échanges

gazeux. Ces différents éléments mènent à l'endommagement de la barrière alvéolo-capillaire, induisant une diminution de la régulation des flux ioniques et aqueux, et des échanges gazeux. Ce stade dure environ 6 jours.

Chez certains patients, le SDRA se résout à ce stade, ne laissant pas de trace fonctionnelle du syndrome (Ware LB, *et al.*, 2001). Dans ce cas, les AT II migrent à la surface des membranes hyalines, permettant la reconstitution du tissu interstitiel, suivi du renouvellement de l'épithélium respiratoire (Geiser T, 2003).

Si le SDRA ne se résout pas, il se développe une phase dite subaiguë ou proliférative. Les dommages alvéolaires s'accroissent et consistent en une hyperplasie, une métaplasie des pneumocytes II, une prolifération des myofibroblastes, des fibroblastes dans les septas interalvéolaires et les espaces alvéolaires, et des cellules endothéliales (Schwarz MA, 2001). Cette phase dure de 4 à 10 jours et peut commencer dès le 3^{ème} jour.

Une phase chronique ou fibrosante, constituée par l'accumulation d'éléments de la matrice extracellulaire et de fibroblastes, se met en place. Une fibrose des zones interalvéolaires, alvéolo-capillaires, des alvéoles et des conduits alvéolaires (Tomashefski JF, Jr., 1990) se développe. Ce mécanisme forme une barrière physique aux infiltrats plasmatiques de tous ordres, au niveau des parties collapsées, atelectatiques ou trop endommagées. Malheureusement, ce tissu est non-fonctionnel : incapable d'échanges gazeux. Cette période peut débuter dès les 36 premières heures et se poursuit pendant 3 à 4 semaines.

L'organe ici touché par le SDRA est le poumon. Une description générale, suivie de ses rôles fonctionnels d'où l'on déduit des cibles thérapeutiques pour le SDRA et des traitements correspondants seront exposés ci-après. Enfin, les hypothèses de travail quant aux approches thérapeutiques et la démarche expérimentale seront émises.

Citation

J'avais besoin d'un poumon, m'a dit l'arbre: alors ma sève est devenue feuille, afin d'y pouvoir respirer. Puis quand j'eus respiré, ma feuille est tombée, et je n'en suis pas mort. Mon fruit contient toute ma pensée sur la vie.

Les Nourritures terrestres (1897)

André Gide

Devinette

J'ai la tête en bas. Elle ressemble à une éponge. Aussi grande qu'un demi-terrain de tennis, ma tête abrite 300 millions d'unités. Enfin, je suis un super héros qui lutte contre les envahisseurs.

Qui suis-je?

Réponse

L'appareil respiratoire

B) Description de l'appareil respiratoire

1 Structure générale

La structure de l'appareil respiratoire ressemble à un arbre : les racines en l'air, le bouquet de feuilles vers le bas. Il sera développé en trois parties : voies respiratoires extra-pulmonaires, puis voies respiratoires intra-pulmonaires et enfin parenchyme respiratoire. Ces deux derniers sont contenus dans les poumons [Fig. 1].

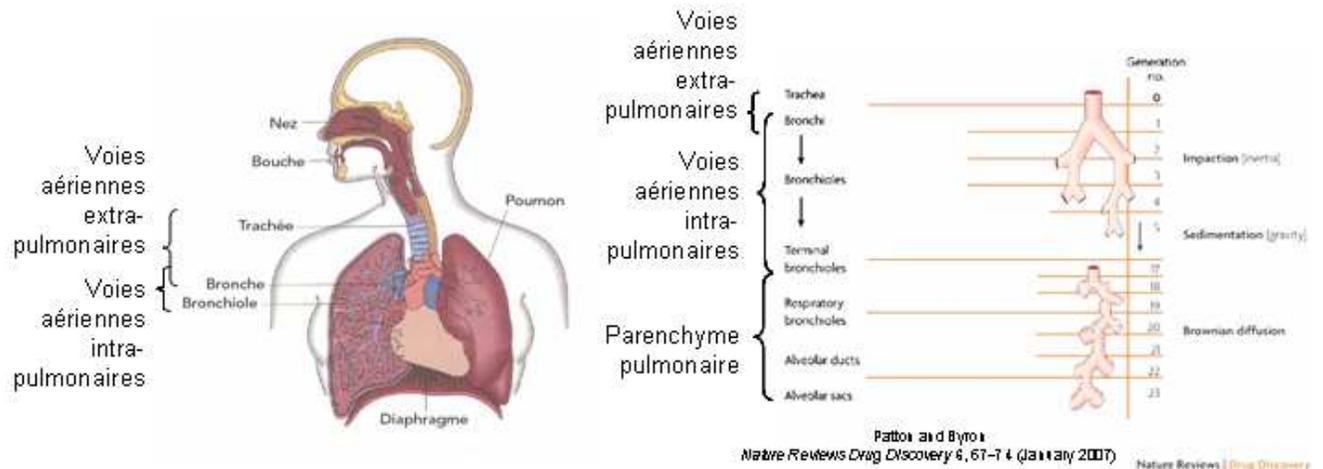


Fig. 1 : Le système respiratoire avec les voies respiratoires extra-pulmonaires, intra-pulmonaires et le parenchyme respiratoire

L'air pénètre dans les poumons par les voies aériennes supérieures, qui par divisions successives vont former les voies respiratoires intra-pulmonaires. L'air commence à être échangé au niveau des bronchioles respiratoires jusqu'aux 300 millions d'alvéoles, formant ainsi le parenchyme respiratoire qui assure l'hématose [Fig. 2]. Cette voie royale d'entrée pour l'air l'est aussi pour les pathogènes (pneumonie) ainsi que l'eau (noyade) ou l'acide gastrique (reflux gastrique). Ces entrants altèrent les différentes fonctions pulmonaires; des mécanismes de défenses (voir § C.4) et de réparation (voir § C.3) sont alors mis en place.

1.1 Les voies respiratoires extra-pulmonaires

Dans notre arbre à l'envers l'air pénètre par les racines soit le nez et la bouche. L'air (21% oxygène, 78% diazote, 1% autre) entre par les fosses nasales. Il est immédiatement purifié par les vibrisses qui arrêtent les gros éléments, tandis que le mucus prend en charge les

éléments de 1µm et plus. Le mucus recouvre la surface de l'épithélium pseudostratifié. Il permet aussi l'humidification de l'air qui va être réchauffé grâce à la circulation capillaire. L'air est ensuite dirigé vers le pharynx qui est divisé en deux parties par le voile du palais. La partie supérieure, ou nasopharynx, est recouverte d'un épithélium pseudostratifié. L'air poursuit son chemin dans le larynx. Situé en avant de l'œsophage, lui et la trachée sont tapissés par un épithélium pseudostratifié, sauf au niveau des cordes vocales. L'air entre alors dans la trachée qui se divise en deux branches, les bronches souches. L'air est ensuite dirigé vers les voies aériennes inférieures et le parenchyme respiratoire, qui composent la suite de l'organe pulmonaire.

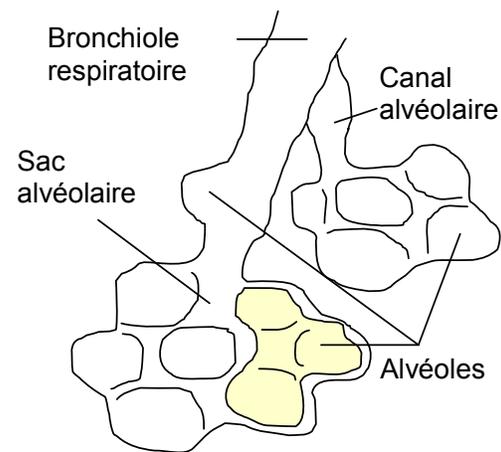
1.2 Les voies respiratoires intra-pulmonaires

L'arbre bronchique est une dénomination courante pour les voies respiratoires intra-pulmonaires. Ainsi la trachée se divise en deux bronches souches, qui pénètrent dans chaque poumon au niveau du hile. Puis chaque bronche souche donne naissance à 16 générations de ramifications, de diamètre décroissant, jusqu'aux bronchioles (Phalen RF, *et al.*, 1983). Les bronches lobaires se rendent dans chaque lobe du poumon, puis elles se ramifient en bronches tertiaires qui donnent naissance à des bronches de moins en moins grosses jusqu'aux bronches sus-lobulaires. Lors de sa pénétration dans le lobule, la bronche sus-lobulaire devient la bronchiole intra-lobulaire. Les bronchioles terminales sont les derniers "rameaux" [Fig. 1]. Tout au long de ce trajet l'air continue d'être purifié et humidifié par le mucus produit par l'épithélium pseudostratifié.

1.3 Le parenchyme respiratoire

L'arbre bronchique se prolonge par le parenchyme respiratoire. Comme chaque feuille d'un rameau, l'acinus pulmonaire est l'unité morpho-fonctionnelle du parenchyme respiratoire [Fig. 2]. Le pétiole de la feuille est ici une bronchiole respiratoire qui se divise en canaux alvéolaires, où chaque canal alvéolaire comporte 2 ou 3 sacs alvéolaires qui recèlent de multiples alvéoles.

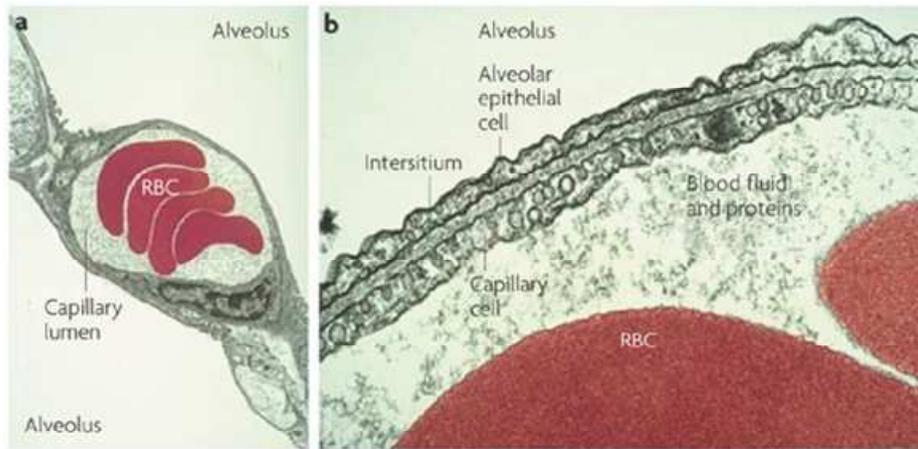
Fig. 2 : L'acinus pulmonaire



Les bronchioles respiratoires possèdent le même épithélium cubique que les bronchioles terminales, elles sont impliquées dans la conduction de l'air et sa purification, mais aussi dans les échanges gazeux de par la présence d'alvéoles s'ouvrant dans leur paroi.

Comme cela a été signalé plus haut, le poumon humain comprend environ 300 millions d'alvéoles. Elles totalisent une surface d'environ 150 m^2 (un demi terrain de tennis) dont 60 à 80 m^2 effectuent véritablement les échanges gazeux (Maina JN, *et al.*, 2005). Ces 60-80 m^2 forment la zone alvéolo-capillaire [Fig. 3]. Elle serait constituée, en allant de l'espace aérien vers le sang successivement du surfactant et de l'hypophase sécrétés notamment par les cellules épithéliales alvéolaires de type II, de l'épithélium alvéolaire composé des

cellules épithéliales alvéolaires de type I et II (AT I et II), de l'interstitium, et enfin des cellules endothéliales.



Nature Reviews | Drug Discovery

Patton and Byron *Nature Reviews Drug Discovery* 6, 67–74 (January 2007)

Fig. 3 : La zone alvéolo-capillaire

On constate donc ici la finesse de la zone alvéolo-capillaire et donc sa sensibilité à toute lésion pouvant y survenir. On pense alors à sa fonction barrière qui la sépare du plasma ainsi qu'à sa fonction de régulation des flux ioniques et liquidiens trans-épithéliaux; altérées un œdème se développe. Il vient ensuite à l'esprit que des mécanismes de réparation vont se mettre en place pour pouvoir reconstruire cette membrane, suite aux lésions. Ces mêmes lésions induisent, en présence ou non d'infection, l'activation du système immunitaire et donc une inflammation qui module la réparation et régule, si besoin est, l'infection.

L'épithélium a fonction de réguler les transports ioniques et aqueux, doit se régénérer et est un interlocuteur majeur du système immunitaire tout au long des voies aériennes. L'accent sera mis sur l'épithélium alvéolaire, dont les fonctions seront ensuite détaillées.

2 L'épithélium dans l'appareil respiratoire

Un survol rapide de l'épithélium des voies aériennes extra- et intra-pulmonaires est ici présenté. L'épithélium des fosses nasales jusqu'au bronches est pseudo-stratifié. Il est caractérisé par plusieurs types cellulaires : les cellules ciliées (assainissement), les cellules caliciformes (mucus), les cellules basales (progénitrices), les cellules à bordure en brosse (régénération de l'épithélium), les cellules endocrines (chémo-récepteurs pour la teneur en O₂ et CO₂ de l'air). Au fur et à mesure des ramifications, l'épithélium des bronches s'amincit et s'appauvrit en cellules caliciformes. Au stade bronchiole, l'épithélium est dit cylindrique simple, il est dépourvu de cellules caliciformes, les cellules ciliées sont plus minces et peu nombreuses, tandis que les cellules de Clara apparaissent. Les cellules de Clara participent aussi -1- au transport ionique, -2- à la régénération de l'épithélium bronchiolaire (Bishop AE, 2004, Otto WR, 2002), -3- à la génération d'éléments pour le mucus et l'hypophase (Stripp BR, *et al.*, 2002), et -4- au rôle immuno-modulateur (Dierynck I, *et al.*, 1996, Hung CH, *et al.*, 2004, Johansson S, *et al.*, 2007, Reynolds SD, *et al.*, 2007)). L'épithélium respiratoire devient cubique au niveau des bronchioles terminales. Il ne compte plus que de rares cellules ciliées éparpillées entre les cellules de Clara [Fig. 4].

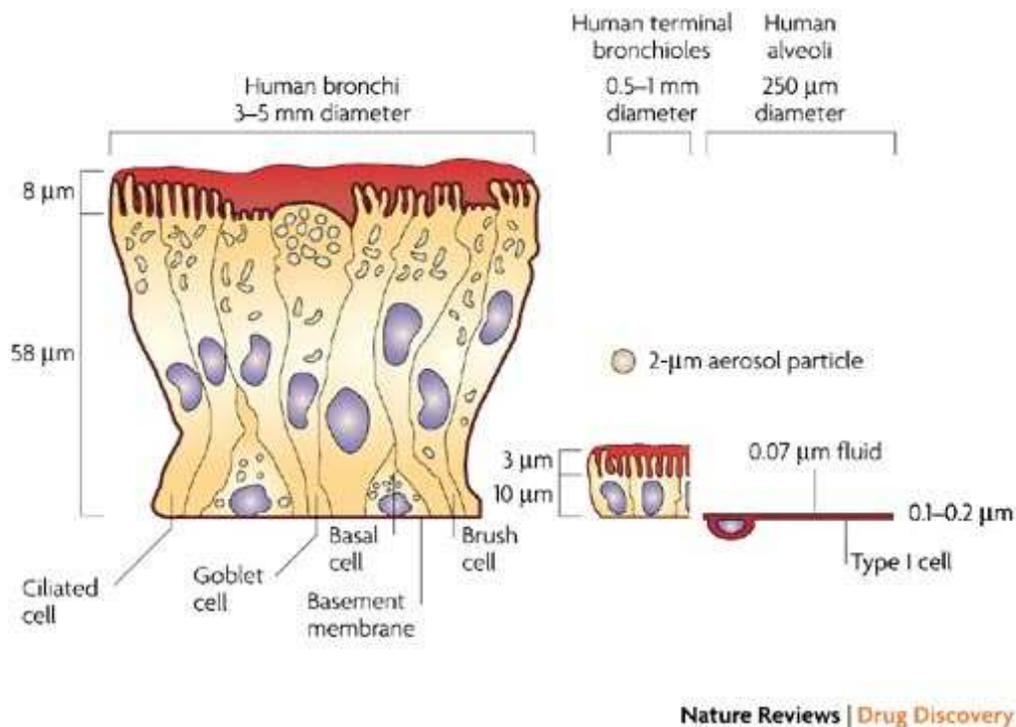


Fig. 4 : Les épithéliums de l'appareil respiratoire

La structure et les fonctions de l'épithélium alvéolaires sont explicitées plus largement ci-après.

2.1 L'épithélium du parenchyme respiratoire

Le revêtement épithélial [Fig. 5] des alvéoles pulmonaires est une couche unicellulaire posée sur une lame basale continue, fusionnée avec la lame basale de l'endothélium des capillaires alvéolaires. L'épithélium est constitué de deux types cellulaires soit les AT I et II, encore appelés pneumocytes de type I et II. Les cellules sont réunies par différents types de jonctions (zonula ocludens, jonctions serrées, desmosomes) qui assurent un passage sélectif des ions, molécules et fluides, par la voie intercellulaire.

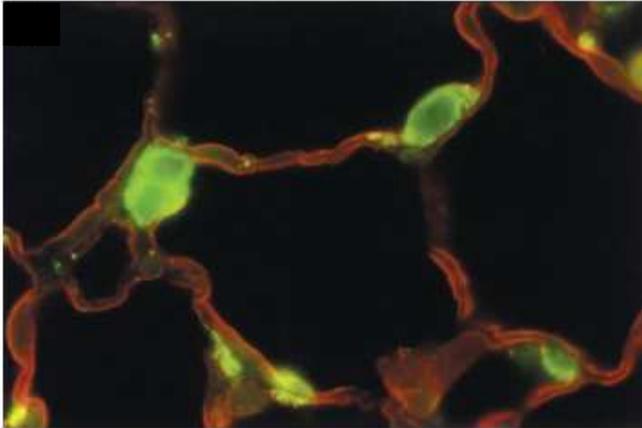


Fig. 5 : L'épithélium alvéolaire (Fehrenbach H, 2001).

Les AT II sont marquées en vert pour SP-D et les AT I avec la lectine *Lycopersicon esculentum* en rouge.

Les AT I représentent 8% des cellules pulmonaires, et recouvrent environ 90% de la surface alvéolaire. Elles entourent les AT II dans leur voile cytoplasmique, fin et étendu. Les fonctions des AT I sont moins connues que celles des AT II à cause de difficultés d'isolation et de culture. Les AT I ont longtemps été considérées comme des cellules de structure, permettant l'échange des gaz. Suite au développement de nouvelles techniques, leur rôle dans la régulation des fluides alvéolaires a été mis en évidence (Borok Z, *et al.*, 2002, Farman N, *et al.*, 1997, Johnson MD, 2007). Suite au symposium « Experimental biology meeting », en 2006, un consensus semble avoir été établi selon lequel les AT I prendraient en charge les flux ioniques et aqueux en condition basale, tandis que les AT II se chargeraient des conditions stimulées (Guidot DM, *et al.*, 2006).

Les AT II représentent 15% des cellules pulmonaires et recouvrent 5 à 10 % de la surface alvéolaire (Fehrenbach H, 2001). Elles ont une forme cubique. Elles sont seules ou par groupes de deux ou trois cellules, encadrées par les AT I. Les AT II ont plusieurs rôles. Elles assument partiellement la ré-épithélialisation de l'alvéole endommagée lors d'une inflammation ou d'une infection, grâce à leurs capacités phagocytiques et progénitrices. En effet, elles peuvent phagocyter les corps apoptotiques des AT II voisines (Fehrenbach H, *et al.*, 2000). Une sous-population possède les capacités de dé-différenciation suivie de multiplication, nécessaires à la formation des AT I (Reddy R, *et al.*, 2004, Uhal BD, 1997).

En effet, il a été noté la présence de cellules alvéolaires de type intermédiaire entre II et I, lors de l'induction de lésions par *Staphylococcus aureus* chez le rat (Clegg GR, *et al.*, 2005). D'autre part, les AT II jouent un rôle primordial dans la régulation de l'homéostasie alvéolaire. La régulation du transport transépithélial des fluides contrôle incidemment le volume et la composition de l'hypophase alvéolaire (Fehrenbach H, 2001). Les AT II sont aussi des protagonistes de l'immuno-modulation par le métabolisme des éléments étrangers chimiques et biologiques (Dimova S, *et al.*, 2001), et l'interaction directe ou indirecte avec les cellules résidentes et mobiles de l'immunité (Fehrenbach H, 2001). Les AT II et les cellules de Clara sont les principales cellules sécrétant le surfactant [Fig. 6]. Les AT II sont aussi indispensables au recyclage du surfactant, qui est renouvelé toutes les 5 à 10h. Le surfactant est un film moléculaire protéo-lipidique (~90% du poids sont des lipides, ~10% sont des protéines). Le principal composant lipidique, la dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) associée aux cholestérols et phospholipides insaturés, avec l'aide de protéines du surfactant : SP-A, B et C, créent ce film tensio-actif qui empêche le collapsus des alvéoles. Le surfactant joue, en outre, un rôle dans la perméabilité alvéolaire (effet anti-œdémateux), l'effet chimiotactique, la production de radicaux libres et les mécanismes de défenses contre les micro-organismes (en piégeant les pathogènes, et en activant la prolifération des lymphocytes) (Fehrenbach H, 2001) [Fig. 6].

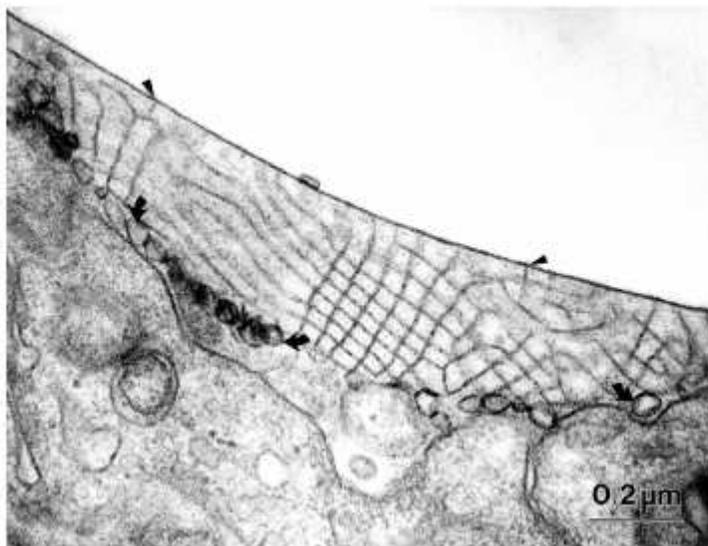


Fig. 6 : Le surfactant et l'hypophase (Fehrenbach H, 2001). Un microscope à transmission électronique (Transmission electron micrograph) permet de voir la myéline tubulaire dans l'hypophase, le surfactant (têtes de flèches), ainsi que les vésicules de surfactant à la surface de AT II (flèches grasses), chez le rat.

Dans le SDRA, il existe un déficit en surfactant, secondaire aux lésions de l'épithélium alvéolaire (Baker CS, *et al.*, 1999, Crim C, *et al.*, 1995, Gregory TJ, *et al.*, 1991, Seeger W, *et al.*, 1993a, Seeger W, *et al.*, 1993b).

En décrivant la structure du poumon, notamment de la zone distale, certaines fonctions pulmonaires qui deviennent des cibles lorsqu'elles sont altérées, pour des traitements, vont être exposées ci-dessous. Les hypothèses de travail quant aux approches thérapeutiques et la démarche expérimentale seront émises ultérieurement.

C) Les rôles fonctionnels de l'appareil respiratoire : cibles thérapeutiques potentielles et des traitements du SDRA

1 Généralités

Le rôle principal de l'appareil respiratoire consiste en l'échange gazeux au niveau du parenchyme respiratoire (Matthay MA, *et al.*, 1996) qui oxygène le sang et élimine le dioxyde de carbone. Ce transport d'air nécessite notamment sa conduction, sa purification et son humidification par l'ensemble des voies aériennes. L'appareil respiratoire assure d'autres rôles, qui ne seront pas étudiés dans cette thèse, dont :

- immunitaire : il participe à la défense de l'organisme par la présence de follicules et de tissus lymphoïdes diffus disséminés dans ses muqueuses.

- neuroendocrinien : il contient des cellules endocrines sécrétant des amines et des polypeptides ayant une activité hormonale ou de neurotransmetteur (sérotonine, bombésine, calcitonine, enképhaline).
- métabolique : les cellules endothéliales situées dans les poumons sont le lieu de transformation de l'angiotensine I en angiotensine II, le plus puissant vasoconstricteur de l'organisme, augmentant ainsi la pression sanguine. De plus, ces cellules captent et dégradent des substances contenues dans le sang comme la sérotonine, qui est excrétée au niveau de la muqueuse bronchique.

Afin d'assumer son rôle principal, l'épithélium doit assumer les échanges liquidiens et ioniques qui maintiennent les liquides mucociliaire et alvéolaire, être intègre et participer à l'élimination des éléments exogènes; tous mécanismes indispensables à la bonne dissolution des gaz menant à leur échange avec le sang. L'épithélium respiratoire a donc trois fonctions particulières qui lui permettent d'assurer les échanges gazeux : l'homéostasie liquidienne du poumon, le maintien de l'intégrité physique et la protection immunitaire. Ces trois fonctions que je vais m'attacher à décrire, sont aussi des cibles pour des traitements que je vais illustrer.

2 L'homéostasie liquidienne

L'épithélium respiratoire régule les phases liquidiennes à sa surface par le contrôle du transport ionique et conséquemment, le transport des fluides. Physiologiquement, la phase GEL et l'hypophase sont normalisées par le contrôle du transport ionique. La phase aqueuse ou liquide périciliaire sous la couche de mucus présente dans les voies aériennes permet le battement ciliaire, et ainsi l'élimination du mucus et des éléments exogènes piégés. Le film tensio-actif du surfactant assure une respiration sans collapsus alvéolaire. L'hypophase du surfactant est indispensable à la dissolution des gaz permettant les échanges avec le sang des capillaires (Maina JN, *et al.*, 2005).

À la surface de l'épithélium respiratoire alvéolaire se trouve l'hypophase. Cette phase liquidienne, sous-jacente au film tensio-actif du surfactant, est régulée par des gradients ioniques induisant des flux aqueux. Les deux types cellulaires formant le parenchyme respiratoire, les AT I et II, participent à la régulation des gradients ioniques, par la présence à leurs membranes de canaux, de pompes et de transporteurs [Fig. 8]. Aux membranes plasmiques de l'épithélium respiratoire alvéolaire ont été mis en évidence des transports actifs de sodium (Na^+) (Basset G, *et al.*, 1987, Berthiaume Y, *et al.*, 1987, Mason RJ, *et al.*, 1982) et de chlore (Cl^-) (Fang X, *et al.*, 2002, Lindert J, *et al.*, 2007, Schneider GT, *et al.*, 1985).

Le transport ionique actif transépithélial crée un gradient osmotique menant au transfert du liquide de l'espace alvéolaire en direction des capillaires (Matthay MA, *et al.*, 1982). Ce gradient de concentration ionique est principalement sodique (Sartori C, *et al.*, 2002). Il est composé par des canaux sodique amiloride-sensible et insensible et de la pompe NaKATPase (Sakuma T, *et al.*, 1994, Sartori C, *et al.*, 2002). Le principal canal amiloride-sensible est le canal ENaC, son importance a été démontré lors de la délétion de la sous-unité alpha; les souris meurent avant la 40^{ème} heure suivant la naissance de détresse respiratoire (Hummler E, *et al.*, 1996). La partie amiloride-insensible du gradient semble être assurée par le canal CNG (Pedersen LR, *et al.*). L'implication de la pompe NaKATPase mise en évidence par le Dr Matthay (Looney MR, *et al.*, 2005, Sartori C, *et al.*, 2002) avait été préalablement révélée par les travaux du Dr Sznajder lors de lésions induites par la ventilation (Lecuona E, *et al.*, 1999).

Une petite part du gradient de concentration ionique pourrait être assurée par les canaux chlore (16143588 - 11815669). Part grandissante en condition stimulée par les β -agonistes (1947462 - 11815669) ou l'AMPc (16143588 - 11815669 - 16505652). Le canal CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) serait l'un des canaux participant à la formation de ce gradient (16143588 - 11815669). D'autres possibilités sont l'échangeur d'anions $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ AE2 et les canaux voltages dépendants CLC5 et 2 (19684200).

L'eau suit le gradient osmotique en traversant l'épithélium principalement au niveau paracellulaire et par les aquaporines (Verkman AS, 2007).

Par ailleurs, dès les années 1940, des équipes travaillant à la compréhension du développement de l'œdème pulmonaire ont pu constater un lien entre les transports des ions potassium et calcium, et de l'eau (Hebb CO, *et al.*, 1949). Il est reconnu que les transports Na^+ et Cl^- transcellulaires sont interdépendants, entre autre liés au potentiel membranaire (O'Grady SM, *et al.*, 2003). D'autre part, lorsque la clairance alvéolaire est stimulée par un activateur des canaux potassium ATP-dépendant (K_{ATP}), l'amiloride est capable d'inhiber cette clairance. Ces résultats montrent comment la clairance liquidienne dépend des canaux Na^+ amiloride-sensible et comment les flux ioniques de potassium (K^+) peuvent moduler cette clairance (Leroy C, *et al.*, 2006, Sakuma T, *et al.*, 1998). Ces expériences montrent l'évidente co-dépendance régulationnelle des différents canaux Cl^- , K^+ et Na^+ .

Lors du SDRA, l'œdème alvéolaire impliquant la compromission des échanges gazeux, représente une incapacité à maintenir l'équilibre normal du transport des fluides. Lors des premiers travaux en 1967 sur le SDRA, il y avait peu de connaissances sur la régulation de l'homéostasie liquidienne par l'épithélium alvéolaire. Depuis, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires régulant le transport des solutés et des fluides dans les conditions physiologique et pathologique, n'a cessé de croître. C'est un réseau complexe de canaux et de pompes membranaires coordonnant la régulation des flux de chlore, potassium, sodium et eau, qui a été mis en évidence. Les canaux sodiques seront l'objet principal de l'étude sur la clairance alvéolaire dans la phase aiguë du SDRA en raison du rôle prépondérant du canal ENaC (*epithelial sodium channel*) dans ce mécanisme (voir § C.2.3).

2.1 Les canaux chlores

Le courant chlore au niveau du parenchyme respiratoire a été moins étudié. Il existe des transporteurs chlore basolatéraux dont les échangeurs Cl/HCO_3 (Lubman RL, *et al.*, 1995),

KCl 1 et 4 (Lee SY, *et al.*, 2003b), le cotransporteur NaK2Cl (Clerici C, *et al.*, 1995, Lee SY, *et al.*, 2003b) et les canaux voltages dépendants CLC5 et 2 (19684200). Différentes équipes ont mis en évidence la présence de canaux chlore apicaux (Kemp PJ, *et al.*, 1993, Schneider GT, *et al.*, 1985), et c'est en 2004 qu'une présence fonctionnelle du canal CFTR a été déterminée dans les AT II (Brochiero E, *et al.*, 2004) et en 2006 dans les AT I (Johnson MD, *et al.*, 2006). Comme décrit ci-dessus, la clairance alvéolaire serait menée principalement par l'influx de Na⁺ mais aussi par l'influx Cl⁻ (Berthiaume Y, *et al.*, 1987, Fang X, *et al.*, 2002, Lee SY, *et al.*, 2003b, Matthay MA, *et al.*, 2005). → L'inactivation du canal CFTR empêche, en effet, l'élimination adéquate de l'oedème lors d'un traitement à la solution saline (Fang X, *et al.*, 2002). De plus, l'activation de CFTR par l'AMPc dans les cellules épithéliales alvéolaires semble être une condition *sine qua none* de l'influx sodique par le canal apical ENaC. Les auteurs supposent que cet impact est dû à l'augmentation de la conductance électrique pour l'absorption du sodium à travers la membrane apicale *via* les canaux amiloride-sensible et non à l'augmentation de la perméabilité au sodium (O'Grady SM, *et al.*, 2000).

2.2 Les canaux potassiques

La pompe NaKATPase (Basset G, *et al.*, 1988) produit un flux intracellulaire K⁺ qui est recyclé par les canaux K⁺ basolatéraux, contrôlant ainsi le potentiel de membrane. La première mise en évidence de canaux potassium voltage-dépendant dans les cellules alvéolaires date de 1988 (DeCoursey TE, *et al.*, 1988). Majoritairement, les canaux et autres transporteurs de K⁺ participant à la régulation des flux ioniques et aqueux, se trouvent à la membrane basolatérale. Le K⁺ peut transiter par des canaux K⁺ voltage-dépendant KvLQT1 (Leroy C, *et al.*, 2004) et Kv1.7 (Bourke S, *et al.*, 2005), des canaux Ca²⁺ dépendant (maxi-K_{Ca}) (Leroy C, *et al.*, 2004), des canaux K⁺ rectifiant entrant (Kir2.1) (Jeong JS, *et al.*, 2001, O'Grady SM, *et al.*, 2003), et des canaux potassiques K⁺ ATP dépendant (K_{ATP} = Kir6.1 + SUR2B) (Leroy C, *et al.*, 2004, Sakuma T, *et al.*, 1998). À la

membrane apicale se trouvent des canaux K^+ voltage-dépendant (Kv1.1, 1.3, 1.4, 4.2, 4.3) (Lee SY, *et al.*, 2003a), et possiblement la pompe HKATPase ainsi que l'échangeur KCl chez le cobaye (Kemp PJ, *et al.*, 1994).

La sécrétion de K^+ prévient notamment la dépolarisation cellulaire et permet de recouvrir l'électroneutralité suite à l'activation des canaux Cl^- et/ou des canaux Na^+ apicaux (Baro I, *et al.*, 1994, Vetter AE, *et al.*, 1997). Certains canaux participent à la clairance alvéolaire en condition physiologique et pathologique. Ainsi l'activation des canaux K_{ATP} concourt à la clairance alvéolaire (Sakuma T, *et al.*, 1998). De même, les canaux K_{ATP} et KvLQT1 contribuent à la régulation des transports des Na^+ et de Cl^- , à l'expression de ENaC et CFTR et à l'absorption liquidienne (Leroy C, *et al.*, 2006). Ces mêmes canaux participent à d'autres fonctions de l'épithélium alvéolaire, à savoir la régulation des différents mécanismes impliqués dans la réparation ((Trinh NT, *et al.*, 2007) ; voir § C.3.). De plus, les canaux K_{ATP} et Kv1.3 sont, quant à eux, impliqués dans la modulation de la réponse inflammatoire ((Pompermayer K, *et al.*, 2007, Vicente R, *et al.*, 2003) ; voir § C.4).

2.3 Les canaux sodiques

À la membrane basolatérale des AT I (Johnson MD, *et al.*, 2006) et II (Jones GS, *et al.*, 1982), le sodium est exporté par la pompe NaKATPase, ce qui crée un gradient sodium entrant qui peut être amiloride-insensible ou sensible. Le transport de sodium amiloride-insensible (Norlin A, *et al.*, 2001) peut se faire par le canal CNG1 (cyclic nucleotide gated channel) (Junor RW, *et al.*, 1999, Schwiebert EM, *et al.*, 1997), et les cotransporteurs Na^+ /glucose, Na^+ /acide aminé et Na^+ /phosphate (Saumon G, *et al.*, 1993). Parmi les canaux amiloride-sensible, il y a les canaux non-sélectifs aux cations (Junor RW, *et al.*, 1999, Schwiebert EM, *et al.*, 1997) et principalement le canal ENaC cloné en 1993 dans le colon par le Dre Canessa (Canessa CM, *et al.*, 1993), puis caractérisé dans les AT II (Yue G, *et al.*, 1995) et les AT I (Borok Z, *et al.*, 2002).

Le canal ENaC est un élément indispensable à la clairance alvéolaire physiologique et pathologique (Davis IC, *et al.*, 2007, Goolaerts A, *et al.*, 2010, Jayr C, *et al.*, 1994, Matthay MA, *et al.*, 2000, Matthay MA, *et al.*, 2005). De plus, les souris KO (*knock-out*) pour le gène α ENaC décèdent dans les 40h suivant leur naissance (Hummler E, *et al.*, 1996). Une compréhension plus fine de ce canal est ici nécessaire.

Complément : ENaC

En 1992, le Dr Palmer a classé les canaux apicaux amiloride-sensibles en trois sous-groupes en fonction de leur conductance, sélectivité et sensibilité aux inhibiteurs. Ces canaux ont aussi été classés en high (H-type) et low (L-type)-affinity channels. Le H-type possède une haute affinité pour l'amiloride associée à une haute résistance transépithéliale. Le L-type possède une faible affinité pour l'amiloride. En 1993, le canal sodique épithélial amiloride-sensible a été cloné et nommé ENaC par le Dr Canessa (Canessa CM, *et al.*, 1993). En 1994, la même équipe mettra à jour trois de ses possibles sous-unités (Canessa CM, *et al.*, 1994).

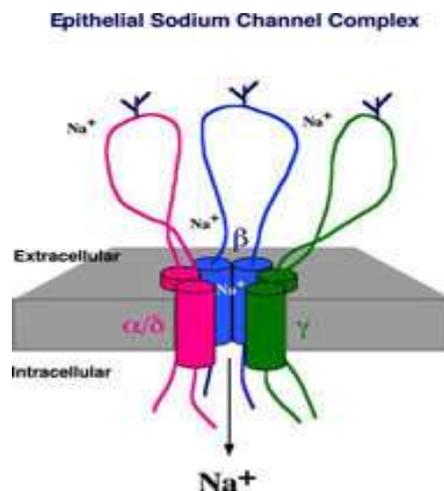


Fig. 7 : Schéma du canal ENaC avec les sous-unités α ou δ , et β et γ
(<http://phsl.otago.ac.nz/staff/mcdonald.html>)

Le canal ENaC est formé de plusieurs sous-unité, chacune d'elle possède deux domaines transmembranaires, une grande boucle hydrophile portant des sites de N-glycosylation et de courtes terminaisons NH₂- et -COOH hydrophiles [Fig. 7]. Le nombre de sous-unités formant le canal est sujet à controverse. La stœchiométrie comportant 4 sous-unités : $\alpha_2\beta\gamma$ est la plus couramment nommée (Firsov D, *et al.*, 1998), mais certaines études suggèrent la version à 9 sous-unités : $\alpha_3\beta_3\gamma_3$ (Snyder PM, *et al.*, 1998). La sous-unité α , seule, peut former un canal non-sélectif aux cations (NSC). La présence des trois sous-unités permet la formation d'un canal ayant les caractéristiques de la protéine native dont une haute sélectivité au sodium par rapport au potassium (20:1). Plusieurs études montrent qu'il existe une famille de canaux amiloride-sensible, de sélectivité variable. L'hypothèse en cours suggère que le type et le nombre de sous-unités formant le canal, résulterait en un canal « ENaC » aux caractéristiques différentes (Eaton DC, *et al.*, 2004). Le canal ENaC formé par une ou plusieurs sous-unités est localisé à la membrane apicale de cellules épithéliales (Garty H, *et al.*, 1988).

Les trois sous-unités ont été subséquentement clonées chez l'humain (Voilley N, *et al.*, 1995, Voilley N, *et al.*, 1994), et dans les AT II (Yue G, *et al.*, 1995) et les AT I (Borok Z, *et al.*, 2002) de rat. Elles sont présentes tout au long de l'appareil respiratoire (Farman N, *et al.*, 1997), en particulier dans le poumon (Canessa CM, *et al.*, 1994). Leur prévalence est variable. Ainsi la sous-unité α est nettement majoritaire dans l'épithélium nasal, tandis qu'elle partage la présence avec la sous-unité γ dans l'épithélium distal, et que la sous-unité β prédomine dans l'épithélium bronchique (Pitkanen OM, *et al.*, 2001).

Rôles

Dans les poumons, le transport de sodium est impliqué dans le maintien d'une phase liquidienne adéquate à la surface de l'épithélium et donc dans l'élimination de l'œdème le cas échéant. L'épithélium pulmonaire a un double rôle d'absorption et de sécrétion des ions et des fluides. Les canaux impliqués dans le transport du sodium participent à la réabsorption des fluides des zones proximale (Mall M, *et al.*, 2004) et distale (Berthiaume Y, *et al.*, 1987) pulmonaires. D'autres rôles lui sont attribués, comme une augmentation délétère de son activité associée à l'hypertension et aux maladies cardiaques (Boucher RC, 1994, Sagnella GA, *et al.*, 2006, Teiwes J, *et al.*, 2007) ou encore la présence de mutations liées au développement de syndromes rénaux tel celui de Liddle (Boucher RC, 1994, Ecelbarger CA, *et al.*, 2006). Le rôle du canal ENaC dans ces maladies ne sera pas traité ici, par contre son importance dans le SDRA sera étudiée.

Régulation du canal

ENaC est régulé par nombre de molécules à différents niveaux : transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel (formation, transport et stabilité à la membrane), et fonctionnel (activation, probabilité d'ouverture et conductance). Un exemple de régulation du niveau transcriptionnel est donné ci-dessous.

Les hormones corticostéroïdiennes sont secrétées par le cortex de la glande surrénale à partir du cholestérol et sous la dépendance de l'ACTH (adrenocortico-trophique hormone hypophysaire). Il a été montré que le cortisol endogène est nécessaire à la régulation de la clairance alvéolaire basale, certainement par la modulation de l'expression des sous-unités de ENaC (Ecelbarger CA, *et al.*, 2006) et la formation de canaux hautement sélectifs au sodium (HSC) (Eaton DC, *et al.*, 2004).

Les minérolo- et glucocorticoïdes se lient à un récepteur intracytoplasmique, qui se transloque alors dans le noyau et régule la transcription génique. Un élément GRE (glucocorticoid response element) a été localisé dans la région 5' de ENaC (Chow YH, *et al.*, 1999, Sayegh R, *et al.*, 1999). Les glucocorticoïdes augmentent l'expression d'ENaC, associée à celle du courant sodium de plus de 20 fois, dans une régulation tardive (3 à 24h). Il existe aussi une régulation précoce (1 à 3h), impliquant une augmentation du courant sodium par deux ou trois fois.

L'ensemble des transports ioniques régule les flux liquidiens, et ainsi la composition et le volume de l'hypophase, mais aussi, participe à l'élimination de l'œdème lorsque celui-ci survient.

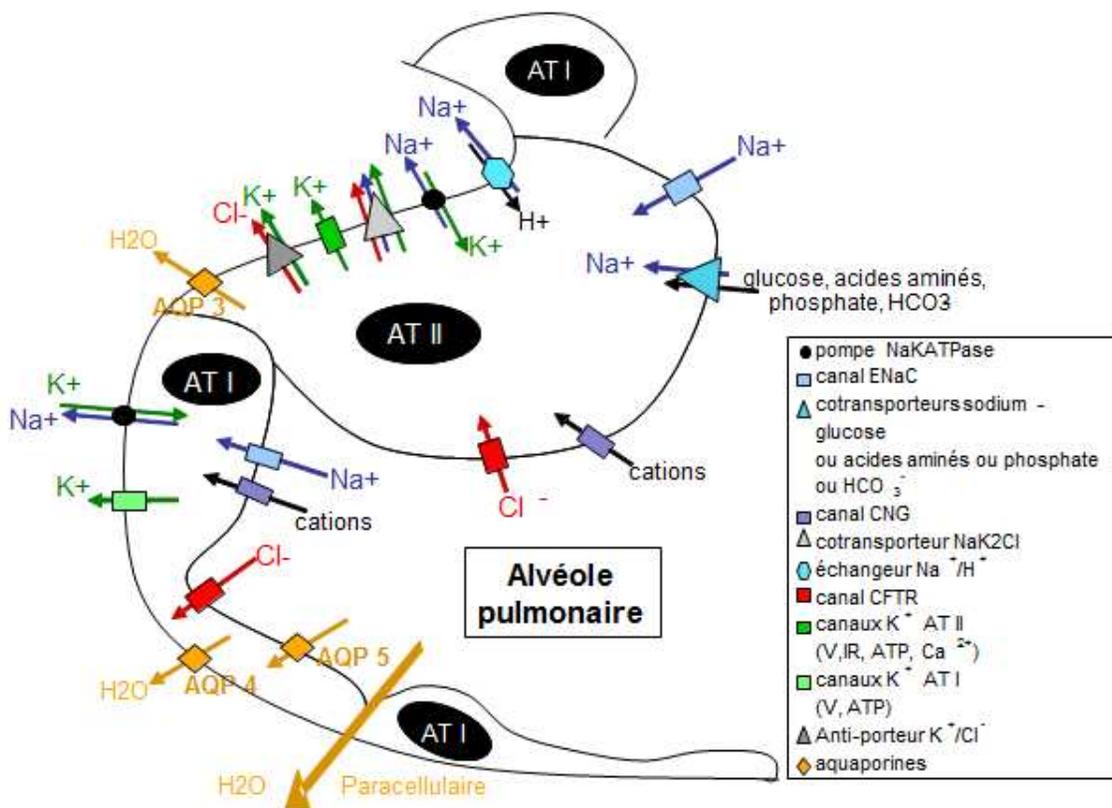


Fig. 8 : Les canaux et transporteurs au niveau des cellules AT I et II

► L'homéostasie liquidienne comme cible thérapeutique

L'homéostasie liquidienne dans différentes pathologies pulmonaires est perdue suite à une dérégulation des canaux ioniques comme c'est le cas dans la fibrose kystique qui concerne le canal CFTR (Wine JJ, *et al.*, 1991) ou, l'œdème pulmonaire de haute altitude (HAPE) et le SDRA (Davis IC, *et al.*, 2007) qui concerne le canal ENaC (Mairbaurl H, 2006). Chez les patients atteints du SDRA, c'est l'atteinte pulmonaire qui engendre l'œdème, nécessitant une modulation adaptée du transport ionique. De plus, il est observé une corrélation inverse entre la capacité de clairance alvéolaire, et le temps de ventilation mécanique et la mortalité (Ware LB, *et al.*, 2000), signifiant l'importance de l'élimination de l'œdème. Plusieurs études ont montré que la clairance alvéolaire qui permet d'éliminer l'œdème, est principalement conduite par des courants transépithéliaux de sodium (Matthay MA, *et al.*, 2002) et de chlore (Berthiaume Y, *et al.*, 1987, Fang X, *et al.*, 2002, Lee SY, *et al.*, 2003b, Matthay MA, *et al.*, 2005). En utilisant une approche inverse, l'équipe du Dr Matthay a montré que la présence d'un œdème (fluide présent dans les alvéoles) chez des patients ALI (*acute lung injury*) provoque la dérégulation du transport des fluides alvéolaires chez les AT II, et cela *via* la modulation de plusieurs canaux ioniques (i.e. ARNm et protéines de α ENaC, α 1NaKATPase, et CFTR) (Lee JW, *et al.*, 2007).

Une approche intéressante pour augmenter la résorption des œdèmes est la stimulation de la clairance des fluides alvéolaires par l'activation de canaux ioniques participant à cette clairance.

Des essais ont été faits avec le salbutamol et d'autres β -agonistes, capables d'augmenter le transport de sodium des cellules épithéliales alvéolaires (Matthay MA, *et al.*, 2002) et la vasodilatation, ce qui diminue la pression microvasculaire pulmonaire (Bonsignore MR, *et al.*, 1988). Ces traitements ont montré une réduction de l'œdème chez les patients SDRA (Perkins GD, *et al.*, 2006). Au-delà de ces effets sur les canaux et la clairance, les β -agonistes ont aussi des effets contradictoires sur la réparation des lésions. En effet, l'isoprotérénol diminue la fermeture de plaies préalablement stimulée par l'EGF (epithelial

growth factor), *in vitro* (Schnackenberg BJ, *et al.*, 2006), tandis que le salbutamol stimule à la fois la réparation des plaies, l'étalement et la prolifération (Perkins GD, *et al.*, 2008). Malheureusement, les résultats d'une étude menée par « l'ARDS network » ne montrent pas d'amélioration de la survie à 60 jours (National Heart L, *et al.*, 2011). Ces données mettent en lumière que certains traitements pourraient avoir des effets bénéfiques sur un aspect de l'évolution du syndrome, mais ne peuvent à eux-seuls le résoudre, ni seulement le stopper. D'autres molécules jouent sur la modulation des fluides alvéolaires. C'est le cas des hormones glucocorticoïdes qui stimulent la clairance alvéolaire par l'augmentation du transport de sodium, possiblement *via* ENaC, *in vivo* et *in vitro* ((Folkesson HG, *et al.*, 2000, Sznajder JI, 1999, Tchepichev S, *et al.*, 1995); et voir § Régulation du canal ENaC p23). Le dexaméthasone, une hormone glucocorticoïde de synthèse ayant un effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur, dont la puissance est environ 40 fois celle du cortisol a été particulièrement étudiée. Certains effets de cette molécule sur le canal ENaC semblent divergents. Notamment au niveau de la régulation de l'ARNm, certaines équipes montrent une augmentation de l'ARNm de α ENaC dans des cellules épithéliales alvéolaires en culture primaire et issues de lignée H441 (Dagenais A, *et al.*, 2001, Sayegh R, *et al.*, 1999), tandis que d'autres ont montré un niveau d'ARNm et de protéines de β - et γ -ENaC modulés à la hausse et une faible variation de l'ARNm de α -ENaC dans les A549 (Lazrak A, *et al.*, 2000). Cette non-concordance des résultats pourrait indiquer un effet cellulaire dépendant qui ne remet cependant pas en cause son potentiel activateur. Par ailleurs, le dexaméthasone diminue la conductance et augmente la sélectivité pour le sodium (Lazrak A, *et al.*, 2000). De plus, il semble qu'en présence de dexaméthasone, l'augmentation du courant amiloride-sensible (Dagenais A, *et al.*, 2001) soit liée à l'augmentation du nombre de canaux ENaC HSC par rapport aux canaux ENaC NSC (Eaton DC, *et al.*, 2004, Jain L, *et al.*, 2001). L'impact du dexaméthasone sur le canal ENaC montre un potentiel d'utilisation lors du traitement du SDRA que ce soit au niveau de la résorption de l'œdème ou de l'inflammation.

La modulation du canal ENaC, si fortement impliqué dans la régulation des flux liquidiens, nécessaire à l'élimination de l'œdème et donc au maintien de l'homéostasie liquidienne, a été étudiée dans la première partie de ma thèse sur le traitement de la phase exsudative du SDRA.

3 L'intégrité physique de l'épithélium respiratoire

Le transport et les échanges gazeux dépendent de la présence et de l'intégrité de l'épithélium respiratoire (Meban C, 1987). L'intégrité permet aussi le maintien de l'homéostasie liquidienne. En effet, l'épithélium respiratoire est une partie de la barrière alvéolo-capillaire qui sert de filtre lors de la diffusion de l'eau, des ions et des macromolécules. Le maintien de l'intégrité physique nécessite d'abord une cohésion épithéliale qui passe par la préservation des jonctions intercellulaires. Cette fonction est assumée en particulier par les AT I dont la cohésion limite le passage du plasma filtrant depuis les capillaires vers la lumière alvéolaire. Les AT I et II développent des jonctions serrées et communicantes, qui participent au maintien de l'intégrité de l'épithélium (Lee YC, *et al.*, 1997, Schneeberger EE, *et al.*, 1978). L'intégrité est aussi assurée par la régénération et la réparation de l'épithélium lors de la formation de lésions de quelque origine que ce soit. Trois mécanismes essentiels entre en jeu : la production d'une nouvelle matrice extracellulaire (MEC) ou son renouvellement, le remplacement des cellules et la sécrétion de facteurs (cytokines, facteurs de croissance, chimiokines, etc) [Fig. 9]. Ces différents mécanismes sont inter-reliés et se chevauchent dans le temps. Leur présence au niveau du parenchyme respiratoire sera développée ci-après.

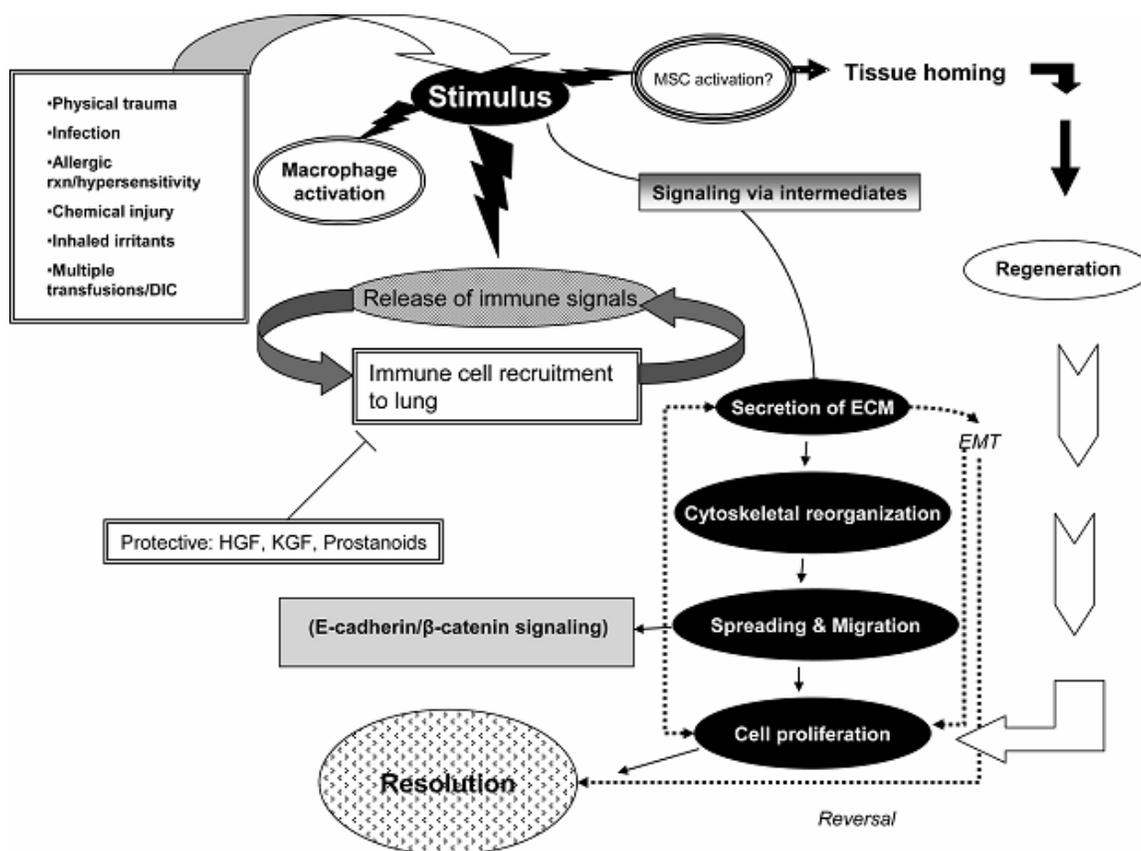


Fig. 9 : Séquence des événements permettant la réparation épithéliale (Crosby LM, *et al.*, 2010)

3.1 La matrice extracellulaire

La reconstitution de la MEC, lorsque la barrière alvéolo-capillaire est altérée, implique l'utilisation de protéines plasmatiques comme l'albumine, le fibrinogène, le plasminogène et des protéines du complément qui peuvent alors entrer dans l'espace alvéolaire. Certaines de ces protéines contribuent ainsi au dépôt de fibrine intra-alvéolaire qui sert de matrice à la migration des cellules (McGowan SE, 1992). Les composants de la MEC permettent l'adhésion et/ou la migration des cellules. Par exemple, la vitronectine participe au mécanisme de réparation de plaies mécaniques sur les cellules en culture A549 (Adair JE,

et al., 2009). Ces mêmes protéines plasmatiques peuvent cependant aussi participer au développement de la fibrose (réparation inadéquate), comme c'est le cas lors du SDRA (Idell S, *et al.*, 1987).

3.2 Cellules progénitrices et cellules souches

Deuxièmement, la régénération et la réparation de l'épithélium alvéolaire passe par la mobilisation de cellules progénitrices dont majoritairement les AT II (Bishop AE, 2004, Otto WR, 2002). En effet, les AT II participent à la régénération de l'épithélium alvéolaire suite à la formation de lésions épithéliales (Adamson IY, *et al.*, 1974b, Evans MJ, *et al.*, 1978, Reddy R, *et al.*, 2004, Uhal BD, 1997). Plus récemment, il a été montré que les AT I prolifèrent aussi. Elles expriment Oct4 qui est un marqueur de cellules pluripotentes et montrent une plasticité phénotypique *in vitro* (Gonzalez RF, *et al.*, 2009). Les cellules souches de la moelle osseuse sont une autre source de renouvellement des AT I (Kotton DN, *et al.*, 2001) et des AT II (Theise ND, *et al.*, 2002). Il est à noter que ces cellules s'encrent plus ou moins dans le poumon en fonction de la source des lésions (Chang JC, *et al.*, 2005, Wang W, *et al.*, 2009). L'idée actuelle est partagée entre une action directe des cellules souches au processus de réparation ou par une action indirecte de celles-ci *via* la sécrétion de facteurs (Lee JW, *et al.*, 2009). Parmi les cellules de la moelle osseuse, une sous-population exprimant la protéine de sécrétion des cellules de Clara (CCSP) contribuent à la réparation épithéliale pulmonaire (Wong AP, *et al.*, 2009).

La réparation de l'épithélium à l'aide des cellules progénitrices locales se fait en plusieurs étapes dont le détachement, la migration, la prolifération et la différenciation. L'ordre exact de ces événements n'est pas connu mais plusieurs équipes cherchent à déterminer cette séquence (Berthiaume Y, *et al.*, 1999, Uhal BD, 1997) [Fig. 10]. Au niveau de l'épithélium alvéolaire lorsqu'une lésion survient, les cellules progénitrices AT II migreraient d'abord vers le site de lésion, puis elles proliféreraient afin de recoloniser la zone lésée et enfin,

pour une part d'entre elles, se différencieraient en AT I, reformant un épithélium intact (Adamson IY, *et al.*, 1974a, b).

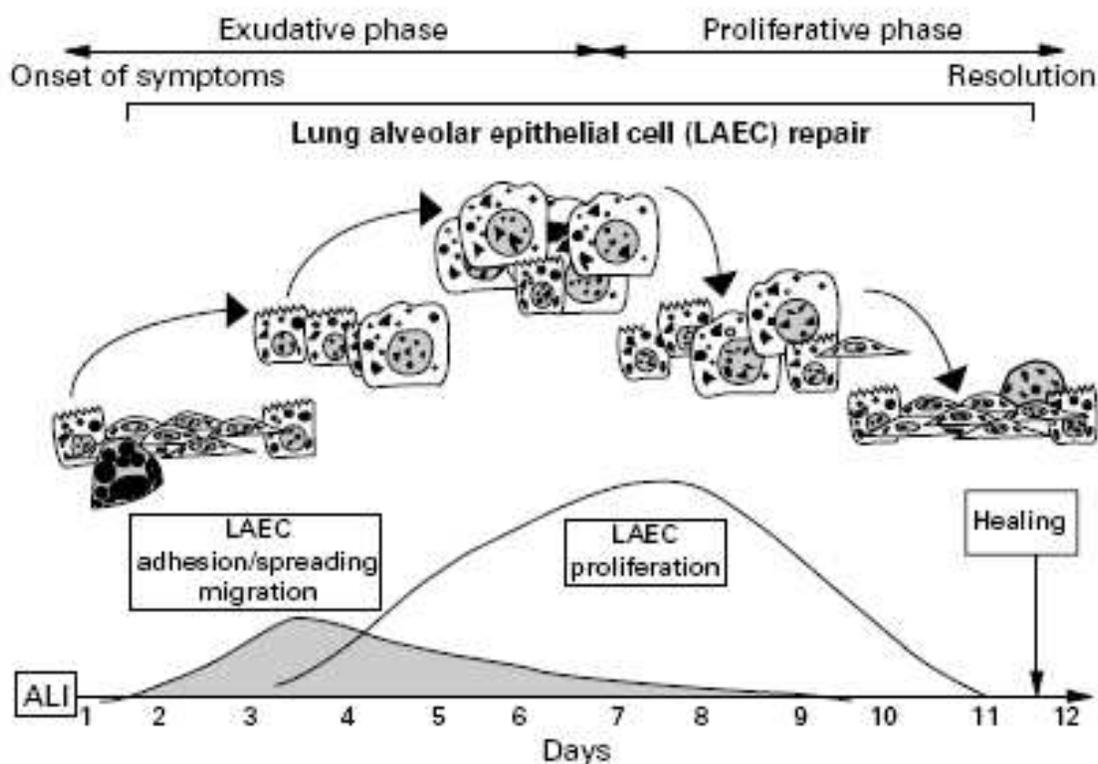


Fig. 10 : Les différentes phases du processus de réparation des cellules alvéolaires.

Le premier événement à avoir lieu serait l'ensemble désadhésion-dissémination-migration, puis aurait lieu la prolifération, avant la différenciation pour la réparation finale (Berthiaume Y, *et al.*, 1999).

Pour tous ces processus participant à la ré-épithélialisation, la modification du cytosquelette et son interaction avec la MEC sont en constant remaniement. La migration nécessite des modifications du cytosquelette permettant la formation d'extensions membranaires, l'attachement à la MEC, la traction de l'arrière de la cellule vers l'avant et le détachement des adhésions à l'arrière de la cellule (Small JV, *et al.*, 1999) [Fig. 11]. Ces mouvements sont notamment liés à l'interaction entre cytosquelette d'actine, complexe d'adhésion et intégrines (Desai LP, *et al.*, 2008, Rottner K, *et al.*, 1999, Small JV, *et al.*, 1999).

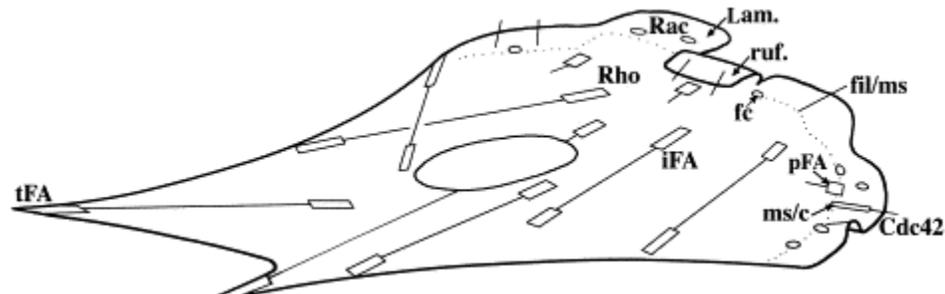


Fig. 11 : Théorie de la cellule en migration

En haut à droite se trouve l'avant de la cellule : la cellule entre en contact avec la MEC grâce aux excroissances cellulaires lam et ruf (*protruding and ruffling lamellipodium*) et aux complexes moléculaires fc et ms/c (*punctuate focal complexes and linear contacts associated with some microspike bundles*). Chacun de ces contacts permet le développement d'un pFA (*precursor focal adhesion*), qui devient iFA (*intermediate focal adhesion*), ou tFA (*focal adhesion at a trailing cell edge*). En bas à gauche se trouve l'arrière de la cellule : ce sont les mêmes points focaux d'adhésion qui ont crû. Leur formation et croissance étant régulées de façon antagoniste par les petites GTPases Rho et Rac. Cet antagonisme est nécessaire à la polarisation de la cellule. Il contrôle les cytosquelettes d'actine et de microtubule, qui collaborent à la régulation de la polarité cellulaire et la locomotion (Small JV, *et al.*, 1999).

3.3 Les facteurs moléculaires

Des facteurs de croissance et les cytokines sont impliqués et imbriqués dans les processus de réparation comme nous allons le découvrir.

3.3.1 Les facteurs de croissance

Lors de la réponse aux lésions, il a été montré que parmi les facteurs de croissance, la voie EGF / TGF- α / REGF participe au processus de réparation. Ainsi, TGF- α (*transforming growth factor- α*) est fortement présent dans l'œdème des patients ALI/SDRA (Hyers TM, *et al.*, 1991) et augmente la fermeture de plaies *in vitro* (Kheradmand F, *et al.*, 1994). Dans

un modèle animal d'ALI induit par le naphthalène l'EGF, le TGF α et leur récepteur REGF voient leur expression augmentée sur le site des lésions pulmonaires (Van Winkle LS, *et al.*, 1997). Il semble que cette voie appartienne notamment au chemin d'activation de l'interleukine IL-1 β (Geiser T, 2003, Geiser T, *et al.*, 2000). L'IL-1 β lui-même augmente la fermeture de plaies *in vitro* dans une concentration proche de celle trouvée dans le BAL de patients SDRA (Geiser T, 2003). L'EGF et le TGF- α agiraient par activation de la migration des AT II (Lesur O, *et al.*, 1996). Cela se ferait *via* la stimulation de l'expression et de l'activités des canaux KvLQT1 et K_{ATP} (Trinh NT, *et al.*, 2007).

Dans la famille des FGF (*fibroblaste growth factor*), le KGF (*keratinocyte growth factor*) produit par les fibroblastes induit la prolifération des AT II *in vitro* (Panos RJ, *et al.*, 1993) et *in vivo* (Ulich TR, *et al.*, 1994). Il participe aussi à la prolifération (Panos RJ, *et al.*, 1995, Ulich TR, *et al.*, 1994), ainsi qu'à la migration et l'adhésion (Desai LP, *et al.*, 2007, Galiacy S, *et al.*, 2003). L'activation de la migration se fait partiellement par l'augmentation du dépôt de fibronectine et sa réorganisation en bordure des cellules (Galiacy S, *et al.*, 2003). L'induction de l'adhésion par le KGF se fait notamment par le REGF (Atabai K, *et al.*, 2002). Les cytokines pro-inflammatoires activant l'expression de KGF, incluent les IL-1 α , -1 β et 6, le TNF α (*tumor necrosis factor alpha*), TGF- α et le PDGF-BB (*platelet-derived growth factor-BB*) (Ware LB, *et al.*, 2002). Toutefois, il est à noter que le KGF n'est pas augmenté dans l'œdème des patients ALI/SDRA (Verghese GM, *et al.*, 1998), alors que le HGF (*hepatocyte growth factor*) l'est.

Le HGF a une action mitogénique sur les cellules alvéolaires *in vitro* et *in vivo* (Ohmichi H, *et al.*, 1996). De plus, le HGF donné post-bléomycine diminue la fibrose induite par celle-ci chez la souris (Yaekashiwa M, *et al.*, 1997). Cela pourrait être lié à l'inhibition de l'accumulation du collagène, à l'augmentation de la synthèse de plasmine, de l'activité de u-PA (*plasminogen activator*) et de la migration cellulaire (Dohi M, *et al.*, 2000), ainsi qu'à la dégradation de la membrane basale (Furuyama A, *et al.*, 2004). Le HGF augmenterait aussi les capacités fibrinolytiques des cellules épithéliales alvéolaires, leur assurant la possibilité de se mouvoir (Dohi M, *et al.*, 2000).

3.3.2 Les cytokines

L'évaluation de trois pathologies pulmonaires humaines, l'IPF (*idiopathic pulmonary fibrosis*), le SDRA et le cancer, a montré que plusieurs cytokines sont impliquées. Dans la réponse aux lésions et l'inflammation ont été retrouvés les IL-1, -8, le MCP-1 (*monocyte chemoattractic protein-1*), le TNF α . Dans la réparation et la fibrose, ça a été le PDGF, l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), le TGF- β et le b-FGF (*basic-fibroblast growth factor*) (Martinet Y, *et al.*, 1996).

Parmi les cytokines, TGF- β est présent très tôt dans le lavage broncho-alvéolaire (BAL) des patients SDRA (Martinet Y, *et al.*, 1996, Synenki L, *et al.*, 2007) et dans des modèles animaux d'ALI (Khalil N, *et al.*, 1989, Wesselkamper SC, *et al.*, 2005). Lorsque TGF- β ou sa cascade de signalisation sont inhibés, il y a une diminution de l'œdème, de l'inflammation, du dépôt de collagène, du taux de fibrose, et incidemment de l'ALI, dans des modèles animaux (Nishioka A, *et al.*, 2004, Pittet JF, *et al.*, 2001, Shenkar R, *et al.*, 1994, Zhang K, *et al.*, 1995), indiquant son importance dans le développement des phases aiguë et tardive du syndrome. Un de ses modes d'action pour augmenter la perméabilité épithéliale alvéolaire semble être la déplétion du taux de glutathion (Pittet JF, *et al.*, 2001) par, au moins en partie, l'inhibition de la transcription du gène codant pour le gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit (γ GCSHs) (Arsalane K, *et al.*, 1997). Les trois isoformes TGF- β 1, 2 et 3 seraient présents à l'initiation des lésions, puis TGF- β 1 serait majoritairement exprimé lors de la progression du processus lésionnel (Coker RK, *et al.*, 1997, Zhang K, *et al.*, 1995). La participation de TGF- β a été montrée dans de nombreux processus cellulaires pathologiques du SDRA. Au niveau des cellules épithéliales, il semble avoir des effets paradoxaux. Il est tout à la fois un activateur de la croissance et de la différenciation des cellules épithéliales alvéolaires. Il active aussi la synthèse de molécules de la MEC en affectant leur transcription, dont l'augmentation de la synthèse de collagène (Kaminski N, *et al.*, 2000) et de laminine (Kumar NM, *et al.*, 1995), inhibe la production de collagénase (Kaminski N, *et al.*, 2000), et module les protéines transmembranaires dont les

intégrines (Munger JS, *et al.*, 1999) et les ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase* ; (Keating DT, *et al.*, 2006)). Mais, il conduit aussi leur apoptose *via* la caspase 3 et le Fas ligand (Hagimoto N, *et al.*, 2002, Kumar NM, *et al.*, 1995). D'autre part, *in vitro* et *in vivo*, il induit la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules alvéolaires (Degryse AL, *et al.*, 2011, Yao HW, *et al.*, 2004), qui participe du remodelage épithélial. Dans la même veine, TGF- β 1 inhibe la synthèse de KGF produit par les fibroblastes, ce qui réduit la prolifération des cellules épithéliales alvéolaires induite par le KGF (Chandel NS, *et al.*, 2009, Zhang F, *et al.*, 2004). Autre aspect contradictoire, à une dose de 1 ng/ml, le TGF- β 1 augmente la synthèse de molécules de la MEC - laminine, collagène de type IV, perlecan, entactin - et leur intégration homogène à la membrane basale. Cette synthèse est dose dépendante. Cependant à une dose de 5 ng/ml, ces molécules ne sont plus intégrées de façon homogène à la membrane basale (Furuyama A, *et al.*, 1999), autre phénomène prenant part au remodelage. Ces effets semblant paradoxaux indiquent qu'au stade inflammatoire le TGF- β 1 induit un déséquilibre dans le phénomène de la réparation, qui tend alors vers le remodelage.

Parmi les autres cytokines, notons la fonction de l'IL-1 β qui est actif dans l'œdème de patient en phase précoce d'ALI/SDRA (Pugin J, *et al.*, 1996) et augmente la fermeture des plaies *in vitro* (Geiser T, *et al.*, 2001, Geiser T, *et al.*, 2000). Cet effet semble s'étendre vers la fibrose et remodelage tissulaire lors de la surexpression de l'IL-1 β dans un modèle murin qui induit des lésions pulmonaires (Kolb M, *et al.*, 2001).

Un dernier exemple de cytokine participant positivement à la reconstruction de l'épithélium est l'IL-2 qui augmente la migration des AT II et réduit l'apoptose de ces cellules (Lesur O, *et al.*, 2004).

L'intégrité de l'épithélium - fonction essentielle au poumon - est donc assurée par le renouvellement de la MEC, le remplacement des cellules lésées et la sécrétion de facteurs favorisant ce processus. Le maintien de l'intégrité assure l'homéostasie liquidienne et par suite, les échanges gazeux.

► **L'intégrité épithéliale comme cible thérapeutique** sera étudiée indirectement dans la seconde partie de cette thèse dédiée au processus inflammatoire. Ce choix a été fait en raison de l'influence de l'inflammation sur la réparation épithéliale. En effet, en présence d'une inflammation (qui participerait normalement au processus de réparation de l'épithélium) devenue chronique (ce qui est une caractéristique du SDRA) il y a induction de nouvelles lésions, participant à une réparation atypique ou fibreuse.

4 La protection immunitaire dans l'épithélium respiratoire

La fonction principale du poumon est la respiration, et pour cela la surface d'échange entre l'environnement extérieur et le sang est d'environ 100m^2 . Cela nécessite un important système de protection contre les éléments pathogènes et exogènes.

Premièrement, l'épithélium respiratoire permet une défense immunitaire passive des voies aériennes (Bang FB, 1961) nécessitant la coordination des cellules caliciformes (sécrétant le mucus) et des cellules ciliées. Les éléments inhalés, d'un diamètre supérieur ou égal au micron, sont piégés par le mucus et dirigés grâce aux cils vers l'oropharynx ou sont expectorés. Que ce soit dans les fosses nasales ou dans les bronches, l'efficacité de ce « tapis roulant » dépend du mouvement des cils (intégrité, nombre et motilité) (Sleigh MA, *et al.*, 1988) et de l'état du mucus (viscoélasticité, épaisseur de la phase SOL et qualité de la phase GEL) (King M, 1987). Par ailleurs, il existe des formations tissulaires immunitaires localisées depuis le pharynx jusqu'aux bronches. Ce sont en particulier des formations lymphoïdes qui protègent des voies aériennes sous-jacentes. Il y a l'anneau de Waldeyer, les amygdales linguales, pharyngées, palatines et tubaires, mais aussi du tissu diffus. Les lymphocytes B et les plasmocytes présents dans les formations lymphoïdes, produisent des anticorps, spécialement des IgA (agglutination, neutralisation des bactéries,

virus), qui se retrouvent dans le mucus. Les cellules séreuses des glandes mixtes du chorion produisent du lysozyme (destruction de la paroi bactérienne), présent dans le mucus.

En deuxième ligne de défense, les macrophages alvéolaires phagocytent et tuent nombre de pathogènes, sans initier le recrutement d'autres leucocytes.

Troisièmement, il existe une haute concentration de neutrophiles dans les capillaires sanguins pulmonaires, appelée « marginated pool » que je traduirai par « en réserve », lequel est prêt à être recruté. L'accumulation de neutrophiles dans les capillaires sanguins de poumon non-inflammé est dite « en réserve », de poumon inflammé est dite « séquestration ».

Finalement, les macrophages et neutrophiles activés peuvent induire un large recrutement de leucocytes.

Seuls les éléments du système immunitaire participant à l'inflammation lors de la phase aiguë du SDRA seront décrits ci-après. Les principaux leucocytes impliqués sont les macrophages et les neutrophiles, tandis que le TNF α et les IL -1 β , -6, -8, -10 sont parmi les cytokines principalement modulées (Fudala R, *et al.*, 2008, Jin X, *et al.*, 2011, Lin WC, *et al.*, 2010, Mukhopadhyay S, *et al.*, 2006, Park WY, *et al.*, 2001, Thickett DR, *et al.*, 2008).

Table 1. Inflammatory mediators in ARDS

Inflammatory mediator	Function
TNF- α	Pro-inflammatory: neutrophil activation in ARDS
IL-1 β	Pro-inflammatory: neutrophil activation in ARDS
IL-6	Leukocyte growth/activation; proliferation of myeloid progenitor cells; acute phase response; pyrexia 2
IL-10	Anti-inflammatory; inhibits release of pro-inflammatory cytokines
TGF- β	Resolution of tissue injury; pro-inflammatory
GM-CSF	Host defence; haematological growth factor
PAF	Platelet activation; neutrophil activation and chemotaxis
ICAM-1	Neutrophil adhesion
C5a	Leukocyte chemoattractant; dual pro- and anti-inflammatory role
Substance P	Pro-inflammatory
Chemokines	Leukocyte activation and chemotaxis
VEGF	Endothelial cytokine; plays a role in angiogenesis and vascular permeability
IGF-1	Alveolar macrophage-derived growth factor; pro-fibrotic
KGF	Epithelial specific growth factor; important for lung development, repair
Reactive oxygen and nitrogen species	Regulation of vascular tone, antimicrobial action

Tableau 2 : Médiateurs de l'inflammation dans le SDRA (Bhatia M, *et al.*, 2004)

4.1 Les cellules participant à l'immunité

Les macrophages présents dans l'interstitium et l'hypophase sont issus des monocytes sanguins circulants. Ils représentent 90% des cellules recueillies au cours d'un lavage broncho-alvéolaire (BAL) en condition contrôle. Ils séjournent un temps variable dans le parenchyme respiratoire (certains y demeurent), puis ils sont soit véhiculés par les vaisseaux lymphatiques jusqu'aux ganglions hilaires, soit entraînés à travers les bronchioles, les bronches et la trachée, englués dans le tapis muqueux. Suite à une invasion de l'alvéole par des germes infectieux, les macrophages constituent la première ligne de défense relativement spécifique puisqu'ils sont capables d'organiser une réponse inflammatoire adaptée, en recrutant les polynucléaires et en utilisant les compétences des AT II (Bowden DH, 1984) (endocytose, dégradation du surfactant et des éléments piégés par celui-ci (Dimova S, *et al.*, 2001)). Chez les patients survivants, les macrophages deviennent majoritaires deux semaines après le début du SDRA, alors que débute le processus fibroprolifératif, évoluant vers la fibrose (Steinberg KP, *et al.*, 1994). Pour leur part les neutrophiles sont impliqués dans la phase aiguë du SDRA (Powe JE, *et al.*, 1982, Weiland JE, *et al.*, 1986).

4.1.1 Les neutrophiles

Il est considéré que l'activation et la transmigration des neutrophiles jouent un rôle clef dans la progression de l'ALI/SDRA (Abraham E, 2003, Chollet-Martin S, *et al.*, 1996, Thommasen HV, 1985, Weiland JE, *et al.*, 1986). En effet, chez les patients atteints de SDRA, la concentration de neutrophiles dans le BAL est corrélée avec la gravité et l'issue du syndrome (Steinberg KP, *et al.*, 1994). Leur accumulation corrèle avec les lésions pulmonaires qui induisent l'augmentation de la perméabilité de la membrane alvéolo-capillaire (Worthen GS, *et al.*, 1987). La présence excessive de neutrophiles et leur accumulation induisent par elles-mêmes des dommages épithéliaux (Matthay MA, *et al.*, 2011), conduisant à une boucle rétro-positive lésionnelle. Toutefois, le rôle naturel des neutrophiles est principalement la destruction de microorganismes envahissants par contact avec des agents anti-microbiens, dont les ROS et les défensines (Harada RN, *et al.*, 1985).

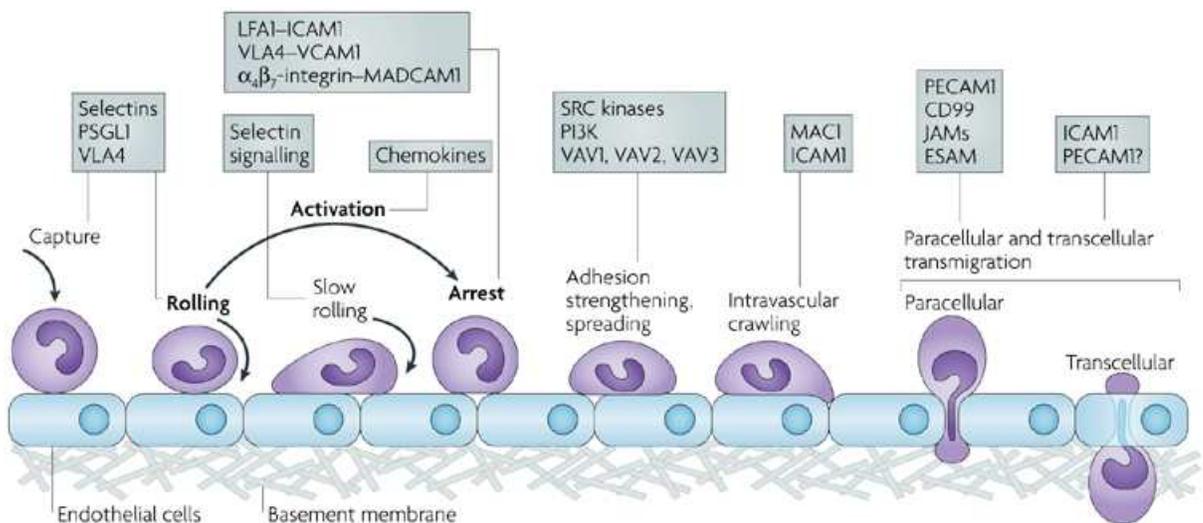
4.1.1.1 Attraction et rétention des neutrophiles sur le site de lésion

Dans la pathogénèse du SDRA, les neutrophiles sont attirés depuis la circulation sur le site des lésions par différents chémoattractants (Doerschuk CM, 2001, Drost EM, *et al.*, 2002, Ford-Hutchinson AW, *et al.*, 1980, Powell WS, *et al.*, 1993). Les différents mécanismes conduisant à leur présence dans l'espace broncho-alvéolaire, est une séquence d'événements qui se recourent dans le temps (Doerschuk CM, 2001, Reutershan J, *et al.*, 2005). Ainsi, il y a un délai entre leur recrutement dans les capillaires pulmonaires et leur extravasation dans l'espace aérien. Les médiateurs inflammatoires induisent ce délai en diminuant transitoirement la capacité de déformation, en augmentant le volume cellulaire, et en modifiant la structure du cytosquelette (formation du cytosquelette d'actine F à la périphérie cellulaire) des neutrophiles (Doerschuk CM, 2001). De ce fait, ils se retrouvent coincés dans les capillaires (Thommasen HV, *et al.*, 1984) puisque leur capacité de déformation est indispensable à la traversée des capillaires pulmonaires (Downey GP, *et al.*, 1990). La séquestration des neutrophiles seule n'induit pas le développement de l'ALI (Martin TR, *et al.*, 1989, Webster RO, *et al.*, 1982), pas plus que l'émigration dans le

poumon (Grommes J, *et al.*, 2011). Par contre, il est nécessaire que les neutrophiles soient activés (Grommes J, *et al.*, 2011). Suite au blocage des neutrophiles dans les capillaires pulmonaires, leur migration est associée à l'augmentation de la perméabilité de la membrane alvéolo-capillaire et la formation d'un œdème (Ware LB, *et al.*, 2000).

4.1.1.2 Traversée de l'endothélium

Traditionnellement, la migration des neutrophiles à travers l'endothélium est décrite en trois phases : le roulement, l'activation et l'adhésion des neutrophiles (Ley K, *et al.*, 2007). Des études plus récentes ont précisé ces étapes en ajoutant la capture, le ralentissement du roulement, la modulation de la force d'adhésion, l'infiltration intraluminaire, la migration trans- et para-cellulaire et la migration à travers la membrane basale (Ley K, *et al.*, 2007) [Fig. 12].



Nature Reviews | Immunology

Fig. 12 : Les étapes de l'extravasation des neutrophiles.

Les trois étapes traditionnellement décrites sont en gras, les étapes ajoutées sont en normal, les principales molécules impliquées dans ces étapes sont indiquées dans les cadres gris (Ley K, *et al.*, 2007).

4.1.1.3 Traversée de l'épithélium

Suite au passage de l'endothélium, les neutrophiles doivent se frayer un chemin à travers la membrane basale. Il semble que cela puisse se faire grâce à des trous pré-existants dans l'interstitium (Burns AR, *et al.*, 2003). Analogue à la migration transendothéliale, la migration à travers l'épithélium se divise aussi en trois principales phases : l'adhésion, la migration et les événements post-migratoires (Zemans RL, *et al.*, 2009) [Fig. 13].

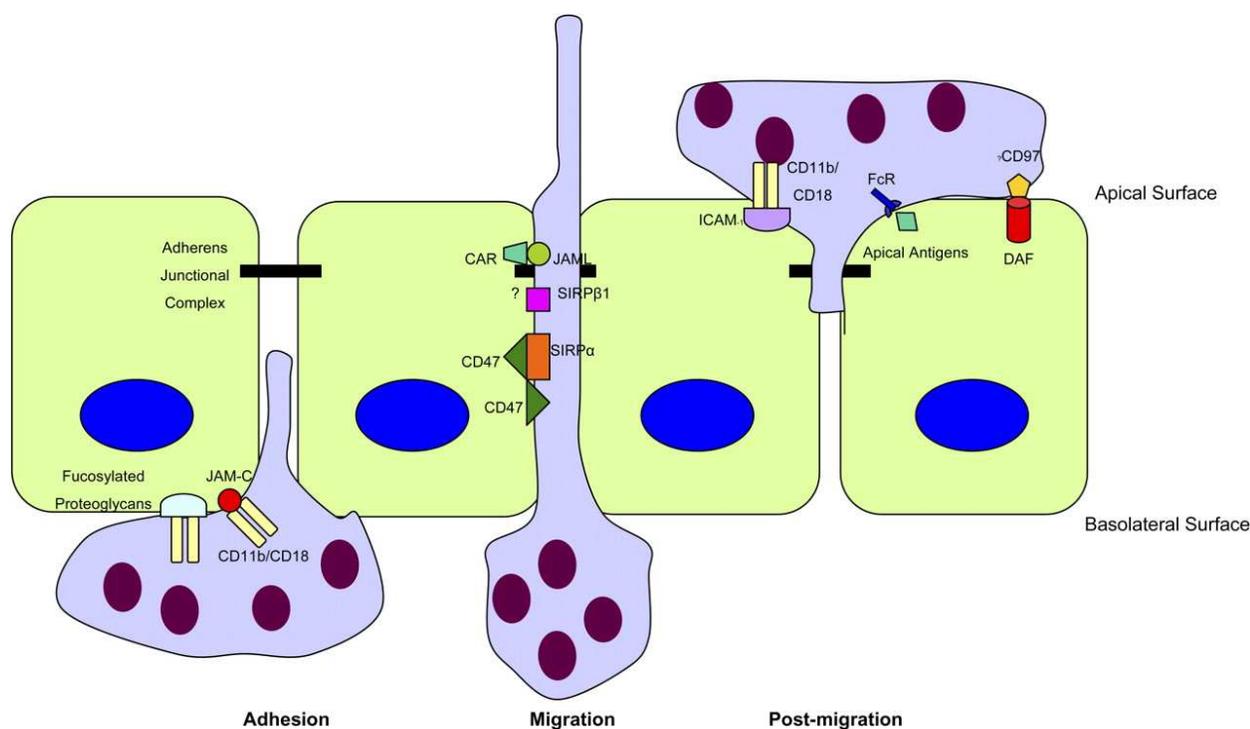


Fig. 13 : Migration des neutrophiles à travers l'épithélium.

La migration des neutrophiles à travers l'épithélium se fait en trois principales étapes. Le neutrophile doit d'abord adhérer à la membrane basolatérale, puis s'infiltrer à la jonction de deux ou trois cellules épithéliales. Finalement les neutrophiles s'attachent à la membrane apicale des cellules épithéliales afin de résister au flot liquidien et aux forces mécaniques déployées lors de la défense contre les microorganismes (Zemans RL, *et al.*, 2009).

En condition normale, le passage des neutrophiles n'endommage pas l'épithélium et pourrait même contribuer à le refermer (Colgan SP, *et al.*, 2006, Lawrence DW, *et al.*, 2002). Une des hypothèses expliquant une partie de leur effet délétère est la présence de deux vagues d'influx neutrophilique; la seconde étant celle qui serait liée au taux de mortalité (Petty JM, *et al.*, 2007). Une autre hypothèse qui n'est pas incompatible avec la première, c'est le grand nombre de neutrophiles activés présent aux alvéoles puissent induire des lésions, permettant ou augmentant la perméabilité. Les mécanismes impliqués dans le processus lésionnel des neutrophiles concerne la modulation des jonctions serrées, la force de compression résultant du passage des neutrophiles entre les cellules épithéliales et la dégradation issue de la sécrétion des granules neutrophiliques (Zemans RL, *et al.*, 2009). Le relâchement des agents cytotoxiques par les neutrophiles activés ne se fait que s'il y a contact avec l'endothélium, l'épithélium ou la MEC (Downey GP, *et al.*, 1999). Les neutrophiles sont donc la source de protéinases dont l'élastase, de polypeptides cationiques dont les défensines, de chémokines, de cytokines, de métalloprotéinases (MMP), et de ROS (Zemans RL, *et al.*, 2009). Par exemple, les MMPs qui sont en proportion élevée dans le BAL (Delclaux C, *et al.*, 1997, Ricou B, *et al.*, 1996, Torii K, *et al.*, 1997), participent à l'influx neutrophilique en agissant sur les molécules des jonctions comme l'occludine et l'E-cadherine, modulant ainsi le cytosquelette d'actine et les molécules d'adhésion à la surface cellulaire et dégradant alors la MEC (Zemans RL, *et al.*, 2009). De plus, les dommages induits par plusieurs des substances produites par les neutrophiles participent à l'augmentation de la perméabilité paracellulaire caractéristique du SDRA (Hogg JC, 1994), participant à la formation de la boucle rétro-positive lésionnelle.

L'une des caractéristiques de la résolution de l'inflammation est l'apoptose des neutrophiles (Lee WL, *et al.*, 2001). Un délai dans ce processus pourrait participer au développement ou à la perpétuation de l'ALI (Lee WL, *et al.*, 2001). En effet, la survie prolongée des neutrophiles par retardement de l'apoptose a été noté au niveau des sites d'inflammation/infection et les neutrophiles issus de patients atteints du SDRA ont cette

même caractéristique (Galani V, *et al.*, 2010). Cependant, les patients neutropéniques développent le SDRA (Ognibene FP, *et al.*, 1986, Vansteenkiste JF, *et al.*, 1989), indiquant la possibilité du développement d'un ALI neutrophiles-indépendant.

L'ensemble des cellules du système alvéolaire participe à la formation de molécules concourant à la protection immune. En particulier, les cellules de l'épithélium respiratoire produisent des métabolites de l'acide arachidonique, des radicaux libres, des cytokines pro et anti-inflammatoires (IL-3, TGF- β , RANTES), des enzymes membranaires anti-inflammatoires (anti-neuropeptides et anti-protéases), des molécules d'adhérence, des sous-unités du complément, participant ainsi à la réponse immune.

4.2 Quelques molécules inflammatoires

4.2.1 Les ROS

Plusieurs études laissent supposer l'importante implication des ROS lors du développement du SDRA. En effet, chez les patients SDRA, cela est révélé par une plus grande quantité de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans leurs urines (Mathru M, *et al.*, 1994) et dans l'air exhalé (Kietzmann D, *et al.*, 1993). De plus, une peroxydation lipidique (Kumar KV, *et al.*, 2000) et protéique (Lamb NJ, *et al.*, 1999, Lenz AG, *et al.*, 1999) a été notée, ainsi qu'une diminution du taux de molécules anti-oxydantes dans le plasma (Metnitz PG, *et al.*, 1999) et dans le fluide alvéolaire (Pacht ER, *et al.*, 1991). Des équipes ont mis en évidence un déséquilibre oxydants / antioxydants, à la fois par une augmentation de la production de ROS et la diminution du taux d'antioxydants (Haddad JJ, *et al.*, 2000, Metnitz PG, *et al.*, 1999). Cette augmentation des oxydants conduit, *in vivo*, à la diminution de la clairance alvéolaire (Modelska K, *et al.*, 1999, Sakuma T, *et al.*, 2000). Cet impact du stress oxydant sur la clairance pourrait être lié à des effets sur les courants et canaux ioniques impliqués.

Il ressort que selon le type de stress oxydant appliqué, les effets semblent divers. Ainsi une condition sub-létale en oxygène (85%) induit l'augmentation de la synthèse de ARNm α ENaC *in vitro* et *in vivo*, une augmentation de la protéine ENaC (Yue G, *et al.*, 1995), du nombre de canaux et de la probabilité d'ouverture (Po), et du courant sodium amiloride-sensible (Wang HC, *et al.*, 2000, Yue G, *et al.*, 1995). Tandis qu'une condition aiguë en oxygène (100%) induirait l'augmentation des ARNm et protéines de la pompe NaKATPase (Carter EP, *et al.*, 1994, Nici L, *et al.*, 1991) bien qu'il semblerait y avoir une diminution de l'activité de la NaKATPase (Olivera WG, *et al.*, 1995). Par ailleurs, en présence de H₂O₂ en concentration non-létale, l'ARNm α ENaC est inhibé (Wang HC, *et al.*, 2000, Xu H, *et al.*, 2007). Pour compliquer le schéma, ce même traitement induit une augmentation de γ ENaC (Xu H, *et al.*, 2007), ce qui indiquerait l'augmentation de canaux ENaC HSC (voir § C.2.3). Il est certain que le stress oxydant a un impact sur les transports sodiques liés à l'élimination de l'œdème. Cependant cet impact semble lié à la nature et à la concentration des agents oxydants.

4.2.2 Des cytokines

Chez les patients souffrants de SDRA, les cytokines TNF α , IL-1 β , -6 et -8 sont en concentration plus élevée dans le BAL (Meduri GU, *et al.*, 1995, Park WY, *et al.*, 2001, Perkins GD, *et al.*, 2007, Siler TM, *et al.*, 1989). De plus, il a été montré que l'expression de leurs ARNm est modulée à la hausse dans la phase tardive du SDRA (Hashimoto S, *et al.*, 2000). Pourtant si ce haut niveau de cytokines est associé avec un faible taux de survie des patients, il ne semble pas lié avec l'évolution clinique des fonctions respiratoires : LIS (*lung injury score*) et PaO₂ / FiO₂ (*ratio of arterial oxygen tension to inspired oxygen concentration*) (Meduri GU, *et al.*, 1995). Sécrétées par différents types cellulaires dont les neutrophiles, les macrophages et les cellules endothéliales, l'une des fonctions de ces cytokines est la modulation de l'activation du système d'adhésion entre les cellules endothéliales et les neutrophiles. Ces derniers peuvent alors s'infiltrer dans l'espace

alvéolaire et par une boucle rétro-positive augmenter la sécrétion de TNF α et d'IL-1 β (Downey GP, *et al.*, 1999, Lee WL, *et al.*, 2001). Plusieurs modèles animaux de lésions épithéliales pulmonaires, dont celui à la bléomycine, induisent une augmentation de l'ARNm de TNF α (Piguet PF, *et al.*, 1989). Indiquant l'importance du TNF α , le double KO des récepteurs de TNF α chez la souris empêche la bléomycine d'induire des lésions pulmonaires (Ortiz LA, *et al.*, 1998). De plus, la neutralisation du TNF α inhibe l'activité cytotoxique de la bléomycine sur les cellules endothéliales, dont l'altération est une part importante de la phase précoce du SDRA (Hamacher J, *et al.*, 2002). En plus du recrutement de leucocytes sur le site de l'inflammation et bien que le mécanisme exact n'ait pas été déterminé, l'un des impacts majeurs du TNF α est une diminution du ratio antioxydant glutathion (GSH/GSSG) cellulaire (Glosli H, *et al.*, 2002, Ishii Y, *et al.*, 1992). Il a aussi été constaté *in vivo* et *in vitro* que le TNF α stimule la génération de ROS (Corda S, *et al.*, 2001, Ferro TJ, *et al.*, 1993). Cette augmentation peut être selon le cas associée à une réponse de survie ou apoptotique (Deshpande SS, *et al.*, 2000, Mukherjee TK, *et al.*, 2005). Notamment, la production de ROS mène à la synthèse de molécules d'adhésion et pro-inflammatoires dont RAGE (*receptor of advanced glycation end products*) (Atsuta J, *et al.*, 1997, Mukherjee TK, *et al.*, 2005). Cependant, il a été démontré que l'association de 3 cytokines pro-inflammatoires : TNF α , IL-1 β et interféron (IFN) γ présentes dans les poumons de patients atteints de SDRA, induit *in vitro* la sécrétion de RTNF (récepteur au TNF α) 1 et 2 solubles. Ces récepteurs solubles lient le TNF α circulant, et compétitionnent avec les récepteurs cellulaires et donc réduisent l'activation des voies sous-jacentes (Jiang L, *et al.*, 2005, Parsons PE, *et al.*, 2005). Ces récepteurs solubles ont été retrouvés dans le BAL de patients souffrants du SDRA (Goodman RB, *et al.*, 2003), et l'augmentation du ratio cytokines pro-inflammatoires/antagonistes est associé à la gravité du syndrome (Goodman RB, *et al.*, 2003). De même est retrouvé un antagoniste à l'IL-1 β . Dommageablement, le ratio chez ces patients penche vers l'IL-1 β et corrèle avec la gravité et l'issue du syndrome (Goodman RB, *et al.*, 2003). D'autre part, l'IL-1 β est sécrété par les macrophages de souris sensibles traitées à la bléomycine, mais pas par les souris résistantes

(Phan SH, *et al.*, 1992). Des expérimentations diminuant le taux de TNF α ou d'IL-1 β , ou bloquant le récepteur de l'IL-1 β dans des modèles de lésions pulmonaires se sont avérés bénéfiques (Denis M, *et al.*, 1994, Frank JA, *et al.*, 2008, Leff JA, *et al.*, 1994). Malheureusement, les essais cliniques utilisant des anti-TNF ou des anti-IL-1 n'ont pu démontrer d'effet favorable pour les patients atteints de sepsis, probablement parce que ces cytokines appartiennent à la réponse précoce, tandis que le sepsis était déjà installé chez ces patients (Abraham E, *et al.*, 2001, Opal SM, *et al.*, 1997). Une des raisons pouvant aussi expliquer que l'inhibition de IL-1 n'ait pas d'effet positif est que l'IL-1 β est aussi impliqué dans les mécanismes de réparation des lésions tissulaires, un mécanisme qui serait dépendant de la sécrétion d'EGF et de TGF (Geiser T, *et al.*, 2001, Geiser T, *et al.*, 2000, Perkins GD, *et al.*, 2007). Donc une stratégie anti-IL-1 β ne pourrait être bénéfique qu'administré lors de la phase aiguë du SDRA quand l'inflammation est déjà présente mais pas dans une phase plus tardive où la réparation a commencé. Ce serait une thérapeutique temps-spécifique.

Chez les patients atteints de SDRA, plusieurs autres cytokines sont présentes dont IL-8 et IL-6, tandis que IL-10, anti-inflammatoire, est réduit.

Une concentration élevée de l'IL-8 dans le BAL est corrélée à l'augmentation de l'influx neutrophilique dans l'espace alvéolaire (Goodman RB, *et al.*, 1996, Miller EJ, *et al.*, 1992), probablement *via* son rôle chimiotactique dans la phase précoce post-lésions (Aggarwal A, *et al.*, 2000, Pallister I, *et al.*, 2002) et l'inhibition de l'apoptose (Kettritz R, *et al.*, 1998). Le traitement par immunisation préventive de modèles animaux avec des anticorps anti-IL-8 donnent des résultats variables selon la condition initiatrice du SDRA (Ikeda N, *et al.*, 1995, Martich GD, *et al.*, 1991, Strieter RM, *et al.*, 1999). D'autre part, la présence de complexes IL-8 / auto-anticorps anti-IL8 a été détectée chez les patients ALI/SDRA. Cette association réduit la liaison de l'IL-8 aux neutrophiles et supprime son activité chimio-attractive (Kurdowska A, *et al.*, 1996). Malgré cela, ces complexes semblent contribuer à la pathogenèse du SDRA (Kurdowska A, *et al.*, 1996, Kurdowska A, *et al.*, 2002, Kurdowska A, *et al.*, 1999, Kurdowska A, *et al.*, 2001), par une activité pro-inflammatoire et de

prolongation de la survie neutrophilique *in vitro* (Fudala R, *et al.*, 2007, Krupa A, *et al.*, 2004). De plus, ils induisent plusieurs caractéristiques de l'ALI chez la souris (Krupa A, *et al.*, 2007).

Un niveau élevé d'IL-6 sanguin est un signe d'un pronostic grave de différentes causes conduisant au SDRA (Leser HG, *et al.*, 1991, Remick DG, *et al.*, 2002). En effet, l'instillation d'IL-6 mène à l'infiltration de neutrophiles dans l'interstitium et l'espace alvéolaire, une élévation du nombre total de cellules dans le BAL et une augmentation de l'œdème (Hierholzer C, *et al.*, 1998). De même, l'IL-6 produit par les cellules épithéliales des voies aériennes, active différents leucocytes dont les macrophages pulmonaires en réponse à différents agents infectieux ou médiateurs de l'inflammation (Shelhamer JH, *et al.*, 1995).

Chez les patients souffrants de SDRA, le niveau de IL-10 (Fiorentino DF, *et al.*, 1991a, Fiorentino DF, *et al.*, 1991b) est diminué dans le BAL et le sang (Armstrong L, *et al.*, 1997, Donnelly SC, *et al.*, 1996). D'autre part, parmi les variations phénotypiques de l'IL-10, 1082g/g est associée à une plus faible fréquence de survenue du SDRA et de mortalité chez les patients l'ayant contracté (Jin X, *et al.*, 2011). L'un des modes d'action de l'IL-10 est l'inhibition de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires *in vivo* (Arai T, *et al.*, 2000, Howard M, *et al.*, 1993, van der Poll T, *et al.*, 1997).

L'équilibre entre molécules pro- et anti-inflammatoires est aussi assumé par les agonistes et les récepteurs solubles des cytokines pro-inflammatoires. Les ratio de chaque couple de molécules pro- et anti-inflammatoire peut être calculé à chaque phase du SDRA. Ainsi, l'impact du TNF α et de l'IL-1 β est localisé aux jours 1 à 7 du SDRA déclaré, tandis que l'IL-6 est significativement élevé chez les patients à risque et jusqu'au 21ème jour de SDRA déclaré. Suite à une analyse associative, chacun des ratio semble lié à la compliance pulmonaire, et pour le ratio IL-6 / sIL-6R à la mortalité (Park WY, *et al.*, 2001). Il apparaîtrait donc qu'il ne faille pas considérer la mesure de cytokines prises isolément, mais au sein de leurs molécules régulatrices.

4.2.3 Des chémokines et facteurs de croissance

D'autres molécules inflammatoires sont impliquées dans la régulation de la réponse immune/inflammatoire, entre autres les chémokines et les facteurs de croissances. Ces molécules peuvent être régulées par les cytokines et inversement. En effet, les cytokines TNF α et IL-1 β pourraient augmenter l'expression et la sécrétion de MCP-1 (Brieland JK, *et al.*, 1995) par les macrophages (Brieland JK, *et al.*, 1993) et l'expression de MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein-1 alpha*) (Smith RE, *et al.*, 1998) par les cellules bronchiques et les macrophages (Smith RE, *et al.*, 1994). Les chémokines, MCP-1 et MIP-1 α sont exprimées et produites *in vitro*, *in vivo* -suite à un traitement à la bléomycine (Brieland JK, *et al.*, 1993, Smith RE, *et al.*, 1994) et chez les patients souffrants de SDRA (Lin WC, *et al.*, 2010). L'élévation de ces chémokines est d'ailleurs corrélée à la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire ainsi qu'à plusieurs paramètres cliniques mais pas à l'issue du syndrome (Lin WC, *et al.*, 2010). Si selon le type d'infection MCP-1 conduit à une réponse anti- ou pro-inflammatoire (Maus U, *et al.*, 2001, Nakano Y, *et al.*, 1994, Zisman DA, *et al.*, 1997), l'inhibition du récepteur à MIP-1 α réduit l'accumulation des cellules inflammatoires et augmente la survie dans un modèle murin à la bléomycine (Tokuda A, *et al.*, 2000).

Parmi les facteurs de croissance, le niveau de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) est diminué dans les poumons et augmenté dans le sérum de patients atteints de SDRA (Azamfirei L, *et al.*, 2010). Selon les études, il a été associé à des rôles pathologique (Kaner RJ, *et al.*, 2000) ou protecteur (Maitre B, *et al.*, 2001) du poumon distal. D'autres facteurs de croissance auraient des effets antagonistes. Ainsi, il semble que le TGF- β 1 présent dans le BAL de patients SDRA inhibe l'expression du KGF (Chandel NS, *et al.*, 2009) qui réverse partiellement les effets de plusieurs modèles animaux de SDRA (Barazzone C, *et al.*, 1999, Yano T, *et al.*, 1996, Yi ES, *et al.*, 1996). Les KGF et HGF sont présents dans le BAL de patients ALI (Verghese GM, *et al.*, 1998). À nouveau, un niveau

élevé de HGF dans le BAL est associé à un mauvais pronostic pour les patients ALI (Verghese GM, *et al.*, 1998), tandis que donné en traitement post-lésions induites par la bléomycine chez la souris, le HGF réduit le dépôt de collagène (Dohi M, *et al.*, 2000). Ces effets apparemment contradictoires sont probablement liés à des impacts qui sont temporels et/ou cellules spécifiques.

L'inflammation, en détruisant l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire, induit une augmentation de la perméabilité et donc la formation d'un œdème protéiné. Il s'infiltré alors des neutrophiles qui participent, notamment avec les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par le tissu lésé, à l'inflammation non-contrôlée de la phase aiguë du SDRA.

► L'inflammation comme cible thérapeutique

L'inflammation est définie par un nombre élevé de cytokines dont TNF α et IL-8. Des essais portant sur leur inhibition ont été faits. Ainsi, dans des modèles animaux, des anticorps anti-TNF α ou IL-8 ont montré une réduction de la sévérité des lésions induites et de la mortalité (Folkesson HG, *et al.*, 1995, Goldman G, *et al.*, 1990, Windsor AC, *et al.*, 1993, Yokoi K, *et al.*, 1997). Les anticorps anti-TNF α améliorent l'état des patients atteints de sepsis, mais pas leur survie (Abraham E, *et al.*, 1998). Aucune étude clinique portant sur des patients atteints de SDRA n'a été faite utilisant ce type d'inhibiteurs de l'inflammation. D'autre part, il faudrait ségréger les patients traités selon l'origine du SDRA, notamment parce que le TNF α est indispensable à la lutte anti-bactérienne.

D'autres éléments de l'inflammation ont été ciblés dont le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), la thromboxane synthase, la 5-lipoxygénase, qui ont parfois montré une amélioration des paramètres respiratoires, mais pas de la survie (ARDSNetwork, 2000, Presneill JJ, *et al.*, 2002). De même, le traitement avec l'anti-oxydant N-acetylcystéine augmente le taux de glutathion, réduit la durée de l'ALI, mais pas le taux de mortalité (Bernard GR, *et al.*, 1997). Ces traitements pourraient être efficaces utilisés en co-traitement pour l'amélioration de l'évolution du syndrome.

Un autre type moléculaire, plus intensément étudié et très controversé, sont les glucocorticoïdes. Les modèles animaux démontrent leur efficacité lorsqu'utilisés en prétraitement (Held HD, *et al.*, 2001, Shu LH, *et al.*, 2007a, Shu LH, *et al.*, 2007b). Les études cliniques montrent que si certaines conditions ne sont pas réunies, les corticostéroïdes augmentent les complications et le taux de mortalité (Steinberg KP, *et al.*, 2006). Il semble toutefois qu'une faible dose de méthylprednisolone donnée précocement soit suffisante pour contrer le développement du SDRA (Meduri GU, *et al.*, 2007). Notamment, il y a une diminution du temps de ventilation mécanique et du temps de présence dans les unités de soins intensifs (Guglani L, *et al.*, 2006, Koontz CS, *et al.*, 2006, Meduri GU, *et al.*, 2007). Éclairant peut-être cette controverse, il a été montré dans des modèles animaux que l'efficacité de ce traitement dépend de l'origine du syndrome (Leite-Junior JH, *et al.*, 2008). L'utilisation des glucocorticoïdes peut donc s'avérer utile afin d'assurer de meilleures conditions de vie et/ou d'augmenter les chances de survie, d'au moins une partie des patients SDRA (Meduri GU, *et al.*, 2005).

La modulation de l'inflammation par un traitement anti-inflammatoire aux glucocorticoïdes a été l'objet de la seconde partie de ma thèse sur le traitement de la phase exsudative du SDRA.

D. Hypothèses et objectifs

Le SDRA est un syndrome qui se développe en trois phases : exsudative, proliférative et fibrosante. Mon étude s'attarde plus particulièrement à la première, où les lésions de l'épithélium alvéolaire brisent l'intégrité de la barrière alvéolaire, diminuant le transport ionique responsable de la gestion des fluides pulmonaires, induisant la présence et la persistance d'un œdème. En effet, une faible clairance des fluides alvéolaires est associée à un taux de mortalité plus élevé (Matthay MA, 2002, Tonkova-Iampol'skaia RV, *et al.*,

1989). Les lésions épithéliales et l'œdème participent à la mise en place d'une inflammation persistante qui entretient les lésions (Pittet JF, *et al.*, 1997).

Une fonctionnalité intacte de la barrière épithéliale est nécessaire à la recouvrance de la capacité respiratoire des patients. Cette fonctionnalité peut être améliorée voir restaurée par l'élimination de l'œdème, la réparation de la membrane alvéolo-capillaire et/ou la réduction de l'inflammation.

Mon hypothèse de travail est que l'inhibition de l'inflammation dans la phase aiguë du SDRA est un préalable à tout autre traitement dont la modulation de la clairance alvéolaire, car cela permettrait secondairement la réparation de la barrière alvéolo-capillaire et la résolution de l'œdème, puisque l'inflammation entretient les lésions tissulaires et, de ce fait, l'influx œdémateux.

Afin d'examiner cette hypothèse, je me suis attachée à l'étude de deux processus de la phase aiguë du SDRA à savoir la modulation A) des fluides alvéolaires et B) de l'inflammation.

A. La phase aiguë du SDRA est caractérisée par la mise en place d'un œdème. La clairance de celui-ci se fait à l'aide de la régulation des transports ioniques sodium et chlore (Fang X, *et al.*, 2002, Jiang X, *et al.*, 1998, Matthay MA, *et al.*, 2002). L'étude du transport sodique par le canal ENaC en condition normale et lésionnelle (bléomycine ; voir § Méthodologie A.2.1) dans les alvéoles, met en lumière son impact sur le développement de la première phase du syndrome. A cette fin, deux méthodes ont été employées.

La méthode, *in vitro*, consiste en l'utilisation de cellules épithéliales alvéolaires de type II (AT II) (voir § Méthodologie B.1). Ces cellules sont pluripotentes, plus résistantes aux dommages, participant entre autre à la ré-épithélialisation des alvéoles et au transport des ions (Adamson IY, *et al.*, 1974a, b, Geiser T, 2003, Wang Y, *et al.*, 1999b). Leurs réactions électrophysiologiques ont été étudiées en

conditions normale et pathologique (bléomycine), afin de vérifier l'innocuité de la bléomycine sur l'activité de ENaC.

In vivo, des souris transgéniques pour la sous-unité alpha du canal ENaC, qui sont sensibles au développement de l'œdème (voir § Méthodologie A.1) ont été traitées avec de la bléomycine, afin d'induire la phase exsudative du SDRA (voir § Méthodologie A.2.1).

L'utilisation des cellules épithéliales alvéolaires ainsi que d'un modèle murin *in vivo* a permis de déterminer l'importance du transport sodique lié au canal ENaC dans l'évolution du syndrome.

- B. Classiquement les glucocorticoïdes sont utilisés pour le traitement de pathologies pulmonaires dont l'asthme (Rodrigo GJ, *et al.*, 2011), le MPOC (maladie pulmonaire obstructive chronique) (Ohar JA, *et al.*, 2010) ou encore le *neonatal chronic lung disease* (Lister P, *et al.*, 2010) en raison de leur effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur. Pour le SDRA, les études cliniques démontrent une suppression de l'inflammation systémique (Meduri GU, *et al.*, 2002) puis, une amélioration significative de la dysfonction pulmonaires et des autres organes, une réduction du temps de ventilation mécanique et une diminution du temps passé aux soins intensifs (Meduri GU, *et al.*, 2007).

In vivo, l'injection intra-péritonéale de glucocorticoïdes (dexaméthasone ou méthylprednisolone ; voir § Méthodologie A.3) à des souris *Wild Type* (WT) a été utilisée afin de vérifier s'il est possible de ralentir ou empêcher les effets délétères de la bléomycine. De plus, les AT II étant fortement impliquées dans la reconstitution de l'épithélium alvéolaire, les mécanismes de réparation dans des conditions normale et pathologique (bléomycine), ont été évalués.

L'utilisation des souris et des AT II a permis de vérifier l'impact du traitement aux glucocorticoïdes sur l'évolution du syndrome.

Mon doctorat vise deux objectifs :

A Évaluer l'importance du canal ENaC lors de la phase exsudative du SDRA, *in vivo* et *in vitro*.

B Déterminer l'impact du traitement aux glucocorticoïdes sur la phase exsudative du SDRA, *in vivo* et *in vitro*.

MÉTHODOLOGIE

A. In vivo

1 Le modèle animal

Afin de déterminer le rôle du transport ionique, et en particulier du transport sodique par le canal ENaC lors de la mise en place et de la persistance de l'œdème dans un modèle SDRA, une colonie de souris transgéniques a été importée au CRCHUM. Suite à des croisements une lignée homozygote a été obtenue. Cette lignée a été initialement créée par le Dre Hummler (Hummler E, *et al.*, 1997), à partir de la souche NMRI (Naval Medical Research Institute, Bethesda, Maryland, USA). Les animaux dits transgéniques (Tg) sont KO pour le gène «*alpha epithelium sodium channel*» α ENaC (Hummler E, *et al.*, 1996), et le transcrit du gène α ENaC, sous promoteur CMV (cytomegalovirus), a été ajouté sur le chromosome X, induisant une plus faible expression de ENaC (Hummler E, *et al.*, 1997). Cette expression est suffisante pour permettre à l'animal de dépasser le seuil de létalité (40h) des souris KO. Ces animaux sont plus petits à la naissance, mais leur courbe de croissance est identique à celle des animaux sauvage (WT) (Hummler E, *et al.*, 1997).

Ces animaux transgéniques sont KO pour le gène α ENaC et «*rescue*» grâce à un transgène α ENaC, localisé sur le chromosome X (Hummler E, *et al.*, 1997). Le «*rescue*» est indispensable à la survie de ces souris qui en son absence meurent avant leur quarantième heure de la non-résorption du liquide pulmonaire (Hummler E, *et al.*, 1996). Egli et al ont montré que ces souris sont plus sensibles à la persistance de l'œdème induit par la thiourée (Egli M, *et al.*, 2004), impliquant que la modulation du canal α ENaC module la régulation de l'œdème.

Des souris WT (α ENaC $+/+$) et Tg hétérozygotes (α ENaC $+/-$ Tg+) nous ont été envoyées par le laboratoire de Dre Hummler. Pour former les trois couples fondateurs de la colonie et obtenir une lignée Tg homozygote, il a fallu génotyper 185 souris (voir Tableau 3 p82). La colonie ainsi obtenue comprenait des souris WT (α ENaC $+/+$) et Tg homozygote (α ENaC $-/-$ Tg+). Elle a été conservée par croisements consanguins. Les souris sont utilisées sur 10

générations, puis un rafraîchissement génétique doit avoir lieu pendant 5 à 7 générations, avant de pouvoir ré-utiliser la lignée.

2 Les traitements oxydants

2.1 La bléomycine

◆ La bléomycine a été isolée du champignon *Streptomyces verticillus* par le Dr Umezawa en 1965 (Umezawa H, 1965). C'est un antibiotique utilisé comme anti-tumoral dans le cadre de cancer testiculaire et de lymphome. Il a été déterminé qu'au-delà d'une dose cumulative de 150mg par personne, à vie, (Sostman HD, *et al.*, 1977), la bléomycine entraîne le développement d'une fibrose pulmonaire chez l'humain (Jules-Elysee K, *et al.*, 1990), mais aussi chez la souris.

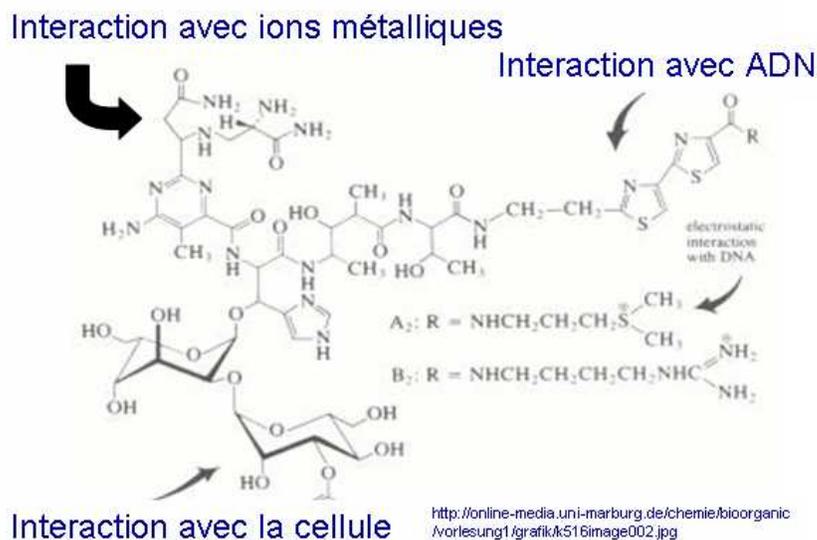
◆ Le modèle bléomycine, souvent employé, est facile à réaliser et à reproduire, il est bien standardisé et reproduit le développement de l'ALI/SDRA : création d'un stress oxydant induisant des lésions épithéliales associées au développement d'un œdème, et ultérieurement à la mise en place de la fibrose (Matute-Bello G, *et al.*, 2008). Précisément, la bléomycine induit une réponse inflammatoire (lymphocytes et cellules plasmatiques), une nécrose des AT I, une hyperplasie des AT II, la mise en place de membranes hyalines, le développement d'une fibrose et le dépôt excessif de collagène. La bléomycine instillée intra-trachéalement est utilisée depuis 1979 afin de développer chez l'animal des lésions et une inflammation, associées à la mise en place d'un œdème alvéolaire, puis d'une fibrose pulmonaire (Thrall RS, *et al.*, 1979), mimant le développement de plusieurs pathologies dont le SDRA (Folkesson HG, *et al.*, 1998, Holley A, *et al.*, 2007, Shimabukuro DW, *et al.*, 2003).

L'effet tardif de la bléomycine est fréquemment utilisé comme modèle fibrotique, cependant l'effet précoce peut aussi servir comme modèle de phase aiguë de l'ALI/SDRA

(Borzone G, *et al.*, 2001, Matute-Bello G, *et al.*, 2008). En effet, il a été démontré que suite à la création de lésions se développe un œdème (Cutillo AG, *et al.*, 2002), une inflammation avec présence de cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, HMGB1 (*high-mobility group protein B1*)) (Cheong SH, *et al.*, 2009, Jenkins RG, *et al.*, 2006, Li Q, *et al.*, 2002) et infiltration de cellules inflammatoires (neutrophiles) (Koshika T, *et al.*, 2005, Sharma SK, *et al.*, 1996). L'architecture alvéolaire présente un collapsus alvéolaire et un épaissement des septas inter-alvéolaires (Brown RF, *et al.*, 1988). De plus, ce modèle montre des caractéristiques conforme à l'analyse de la phase précoce du SDRA faite par Wiedemann HP et al (Biondi JW, *et al.*, 1986), qui nous ont convaincus de sa pertinence. Ce modèle animal permet l'étude du développement de la phase aiguë du SDRA : i) œdème, ii) lésions et iii) inflammation.

♦ La bléomycine est formée de trois domaines : le domaine carbohydrate permet l'entrée dans la cellule, le domaine N-terminal permet la liaison aux métaux comme le fer et le cuivre, et le domaine C-terminal permet la liaison à l'ADN (*acide désoxyribonucléique*). Après son entrée dans la cellule la bléomycine forme un réactif oxydatif avec le fer et l'oxygène. Elle s'intercale alors dans la double-hélice d'ADN, provoquant des ruptures de la chaîne d'ADN (Kemsley JN, *et al.*, 2003) et la production de ROS, qui peuvent conduire à l'apoptose *via* la voie mitochondriale (Lee VY, *et al.*, 2005, Wallach-Dayana SB, *et al.*, 2006). La bléomycine induit donc initialement un stress oxydatif [Figures 14 et 15].

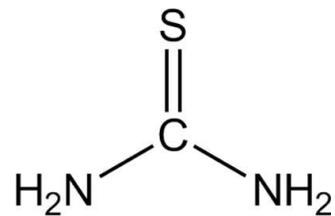
Fig. 14 : Molécule bléomycine



2.2 La thiourée

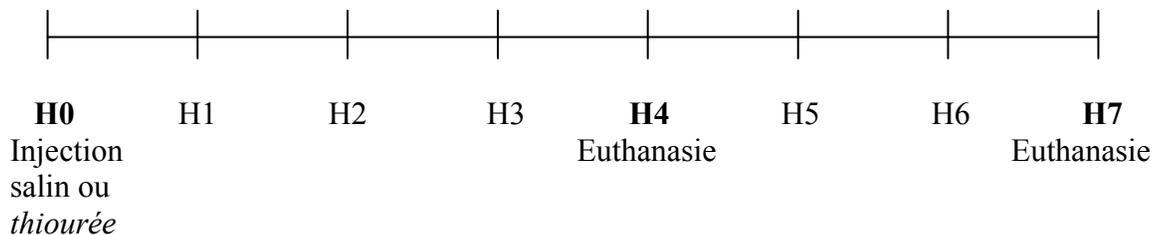
◆ Le thiourée et les molécules dérivées, peuvent être le substrat d'enzymes oxygénantes comme les FMO (*flavin-containing monooxygenases*). Il se forme alors des acides sulféniques qui peuvent être convertis en acides sulfiniques, toujours par ajout d'oxygène. Les acides sulfiniques réagissent, de façon réversible, avec le GSH (glutathion réduit), produisant du GSSG (glutathion disulfide oxydé), régénérant la molécule de *thiourée* (Henderson MC, *et al.*, 2004). Cette déplétion du GSH intracellulaire peut conduire à la mise en place d'un stress oxydatif. Une autre forme de toxicité est la liaison de l'acide sulfénique avec les résidus cystéines de diverses protéines (Henderson MC, *et al.*, 2004).

Fig. 16 : Molécule *thiourea*



◆ Les souris ont été injectées intra-péritonéalement (i.p.) avec 150µl de *thiourea* (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)) à 40mg/kg (poids de souris) ou 150µl de salin 0,9%. Afin de reproduire l'expérience faite par l'équipe du Dr Scherrer, le *thiourea* est injecté pour 4 ou 7h, puis les animaux sont euthanasiés (Egli M, *et al.*, 2004).

Échelle de temps



3 Le traitement anti-inflammatoire aux glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes jouent un rôle inhibiteur sur les réponses inflammatoires, allergiques et immunitaires.

◆ Par exemple, les glucocorticoïdes inhibent la production du TNF α et de l'IL-1 β par les monocytes-macrophages (Gifford GE, *et al.*, 1987, Pezeshki G, *et al.*, 1996) qui sont des cytokines inflammatoires majeures du SDRA (Meduri GU, *et al.*, 1995, Park WY, *et al.*, 2001, Perkins GD, *et al.*, 2007, Siler TM, *et al.*, 1989). De plus, les glucocorticoïdes sont depuis longtemps utilisés pour réduire le nombre de cellules inflammatoires, i.e. neutrophiles et macrophages (Powe JE, *et al.*, 1982, Vernon-Roberts B, *et al.*, 1973, Weiland JE, *et al.*, 1986). Ils exercent des effets inhibiteurs sur l'activation et le fonctionnement des neutrophiles comme le chimiotactisme, l'adhérence, la transmigration, l'apoptose, la sécrétion des ROS, et la phagocytose (Goulding NJ, *et al.*, 1998).

◆ Précisément, le dexaméthasone en se fixant aux récepteurs des glucocorticoïdes, permet leur dimérisation, leur translocation au noyau, puis leur fixation aux éléments GRE (*glucocorticoid-responsive element*), présents en 5' du promoteur de divers gènes. Les glucocorticoïdes peuvent aussi agir sur des gènes ne possédant pas d'élément GRE dans leur promoteur, en interagissant avec les facteurs de transcription AP-1 (Rahman I, 2000) et NF κ B (*nuclear factor-kappaB*) (van der Saag PT, *et al.*, 1996, Wissink S, *et al.*, 1998). Ce sont des régulations lentes qui prennent quelques heures. Il existe aussi une régulation rapide (secondes à minutes) non-génomique (Steiner A, *et al.*, 1988, Verriere VA, *et al.*, 2005).

◆ Si l'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes n'est plus à démontrer, il a aussi été constaté qu'ils peuvent stimuler la clairance alvéolaire en augmentant le transport de sodium (Noda M, *et al.*, 2003). Les glucocorticoïdes sont aptes à agir précocement (augmentation du courant I_{sc} amiloride-sensible) et tardivement (augmentation de l'ARNm de α ENaC) sur la régulation du canal ENaC (Chow YH, *et al.*, 1999, Dagenais A, *et al.*, 2001, Sayegh R, *et al.*, 1999). De plus, le stress oxydant et les glucocorticoïdes semblent

montrer une possible imbrication de leurs effets sur le canal ENaC (Guney S, *et al.*, 2007, Jovanovic S, *et al.*, 2001). D'autre part, les glucocorticoïdes peuvent agir sur les mécanismes de la réparation épithéliale (Rendina EA, *et al.*, 1992, Wadsworth SJ, *et al.*, 2006). Les glucocorticoïdes ont donc un effet bénéfique sur chacun des éléments (œdème, réparation, inflammation) de la phase aiguë du SDRA.

3.1 Le dexaméthasone

◆ Le dexaméthasone est un stéroïde cortico-surrénal synthétique. Par sa structure il s'apparente à la famille des glucocorticoïdes (corticostéroïdes), qui sont synthétisés par les glandes surrénales.

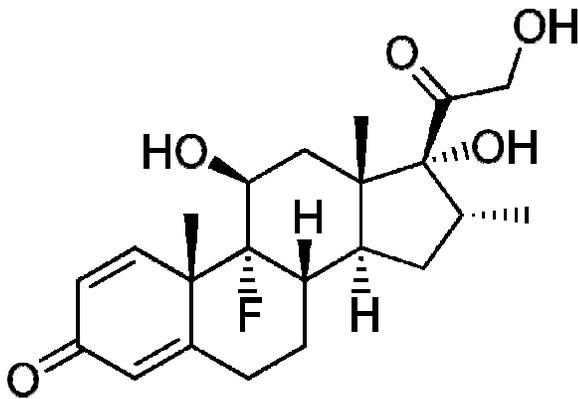
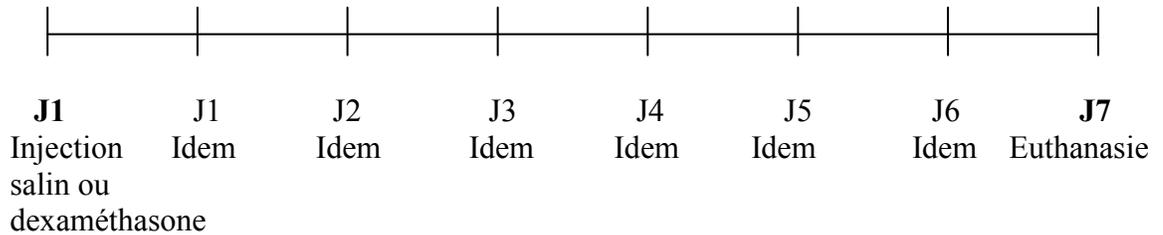
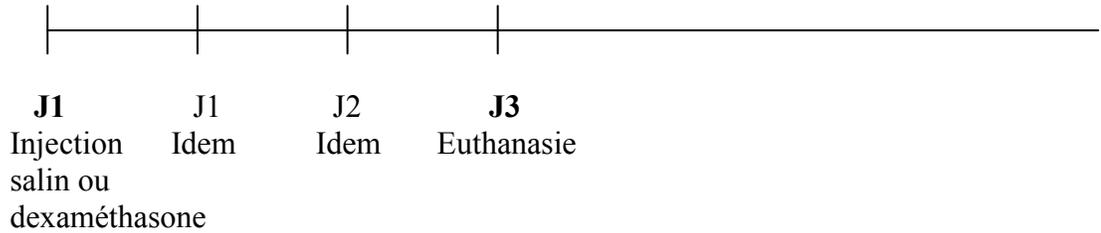


Fig. 17 : Molécule dexaméthasone

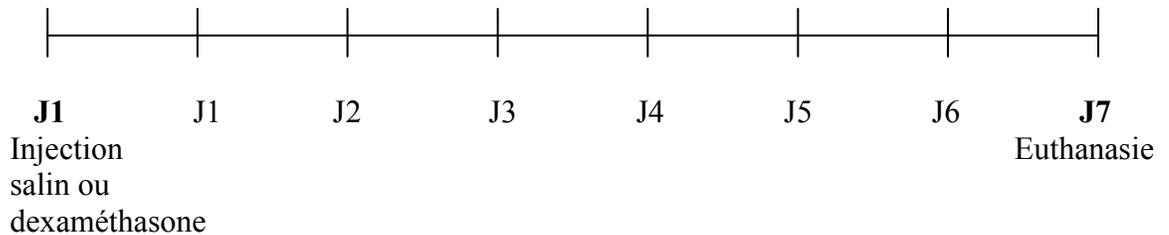
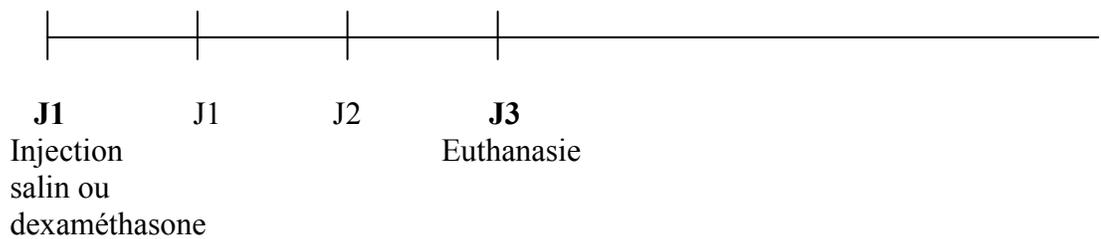
◆ Les souris ont été injectées intra-péritonéalement (i.p.) avec 100µl de dexaméthasone (Sandoz Canada (Boucherville QC)) à 0,5 ou 10 mg/kg (poids de souris) ou 100µl de salin 0,9% (contrôle). Le traitement dure 3 ou 7j. Deux protocoles détaillés ci-après ont été utilisés. Soit le dexaméthasone est injecté quotidiennement car il est éliminé en environ 40h. Soit une seule injection est faite à J1 car une étude a montré qu'une seule injection de dexaméthasone augmente la clairance alvéolaire chez le rat (Noda M, *et al.*, 2003).

Échelles de temps

- Injections quotidiennes



- Injection unique



3.2 Le méthylprednisolone

◆ Le méthylprednisolone (mp) est un stéroïde cortico-surrénal synthétique. Il appartient à la famille des glucocorticoïdes ou corticostéroïdes (voir § A.3 pour les caractéristiques des glucocorticoïdes). L'usage du méthylprednisolone comme anti-inflammatoire dans le traitement du SDRA a été mis de l'avant par le Dr Meduri. En effet, il note des effets bénéfiques lors d'un traitement à faible dose débutant avant le 14^{ème} jour du SDRA (Meduri GU, *et al.*, 2007). Le méthylprednisolone a été choisi dans plusieurs études animales pour sa propension à se concentrer dans les tissus pulmonaires, un temps de résistance à la dégradation plus long et un temps de présence dans les fluides alvéolaires plus élevé (Greos LS, *et al.*, 1991).

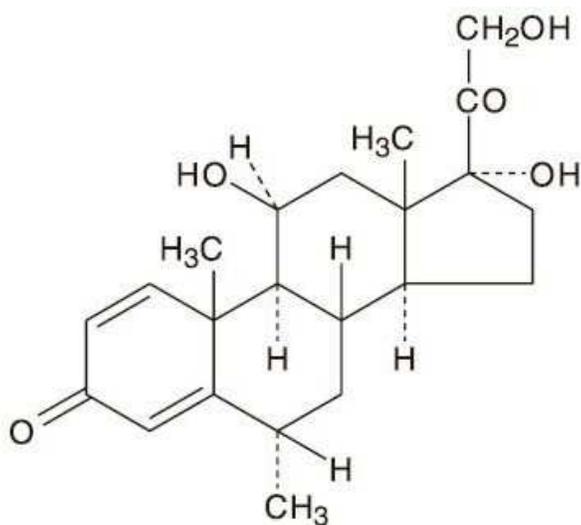


Fig. 18 : Molécule méthylprednisolone

◆ Les souris ont été injectées intra-péritonéalement (i.p.) avec 100µl de méthylprednisolone (NovoPharm) à 1 ou 5 mg/kg (poids de souris) ou 100µl de salin 0,9% (contrôle). Le traitement dure 3 ou 7j, le méthylprednisolone est soit injecté quotidiennement car il est éliminé en 24 à 48 h, soit une seule injection est faite à J1.

Les échelles de temps sont les mêmes que pour le dexaméthasone ci-dessus.

4 Procédures générales suivant les traitements aux animaux

4.1 Euthanasie et nécropsie

Quelque-soit le traitement subit, la souris reçoit une dose létale d'anesthésiant soit 0,2 ml du mélange kétamine-xylazine pour chaque 10g (poids de souris) en injection intrapéritonéale, puis la souris est installée en position dorsale. Une incision ventrale latérale est pratiquée, suivie d'une exsanguination par rupture de la veine cave abdominale. Suite à l'ouverture de la cage thoracique, le bloc cœur-poumons est prélevé. Les poumons droit et gauche sont alors séparés et déposés sur des contenants pré-pesés contenus dans une boîte humide (voir § A.4.2 Wet to Dry). Si la suite de l'euthanasie consiste en un BAL, alors l'animal reçoit la même anesthésie létale avant la suite de la procédure § A.4.5.

4.2 Wet to Dry ou Mesure poids mouillé/poids sec

Le principe est de peser le poumon juste après la nécropsie (poids mouillé ou Wet), puis après 24 h de séchage à 95°C (poids sec ou Dry), de façon à estimer de façon relative la quantité de liquide présente dans le poumon. Le calcul est : $(\text{poids mouillé} - \text{tare}) / (\text{poids sec} - \text{tare})$.

4.3 Mesure du poids

Chaque souris est pesée avant son traitement, afin de déterminer la dose de bléomycine à lui instiller et/ou les doses de *thiourea*, dexaméthasone ou méthylprednisolone à injecter. Elle est ensuite pesée à la fin de son traitement. Ces mesures permettent ainsi la détermination de la prise ou perte de poids que subit l'animal suite au traitement.

4.4 Histologie

Après 7 jours de traitement les souris sont soumises à une anesthésie létale. Elles sont installées en position dorsale. Une incision ventrale latérale est ensuite pratiquée, suivie d'une exsanguination par coupure de la veine cave abdominale. Les poumons sont prélevés et déposés dans de la formaline 10%. Ils sont conservés à 4°C jusqu'à leur prise en charge par le département d'histologie de l'IRIC (institut de recherche en immunologie et en cancérologie) de l'Université de Montréal. La coloration utilisée est de l'hémalum - éosine (HE). Les lames sont photographiées à l'aide d'une caméra digitale (DP71) montée sur un microscope Olympus BX61. Puis différentes caractéristiques de l'ALI ont été analysées à l'aveugle par l'anatomopathologiste Dr. Gaboury.

4.5 Lavage broncho-alvéolaire : BAL

La souris est anesthésiée non-létalement, placée sur le dos. Une trachéotomie est faite afin d'insérer un cathéter 20G. 6 x 1ml de PBS est instillé et stocké à 4°C sur glace. Le liquide est centrifugé à 200g pendant 8 minutes à 4°C. Le surnageant est aliquoté et stocké à -80°C jusqu'à son utilisation. Le culot est resuspendu et le compte cellulaire est fait à l'aide d'un hémacytomètre. Suite à une centrifugation de ce culot au cyospin (300rpm - 3min - vitesse maximale ; cyospin 3 Shandon), une coloration en hématoxyline-éosine (Hema 3 (Fisher, MI, USA)) a été faite. Le décompte des leucocytes peut alors être effectué.

4.7 AlphaLISA pour le TNF α

L'estimation de la quantité de TNF α présent dans les BAL a été faite en utilisant la technologie AlphaLISA (PerkinElmer) avec un kit souris pour le TNF α (AL505 C/F, PerkinElmer, Montreal, QC, Canada), qui est la technologie capable de détecter de très faibles quantités allant de 2 à 30,000 pg/ml. Chaque expérience a été faite en triplicat. En

résumé, les échantillons sont incubés avec des billes acceptrices recouvertes avec un anticorps anti-TNF α pendant 30 min. Puis un second anticorps anti-TNF α biotinylé est ajouté pour une incubation de 60 min. Enfin, les billes donneuses recouvertes à la streptavidine sont additionnées pour une dernière incubation de 30 min. Toutes les étapes se font à température pièce. La lecture est faite par le logiciel « EnVision-Alpha Reader ».

B. In vitro

1 Le modèle cellulaire

1.1 La chirurgie

Des rats mâles Sprague-Dawley pesant de 175 à 200g, sont utilisés pour recueillir les AT II dont la culture primaire sera faite. Les rats d'abord anesthésiés par injection intrapéritonéale de somnotol (40mg/kg), sont ouverts de l'abdomen au cou, et la veine cave abdominale est sectionnée pour une exsanguination. Suite à une thoracotomie, un écarteur est placé de façon à dégager un accès au bloc cœur-poumons. La trachéotomie est faite parallèlement à une incision dans l'artère pulmonaire. L'accès à la trachée par un cathéter 18G permet l'insufflation d'air tandis que l'accès à l'artère pulmonaire permet l'injection de la solution II (voir annexe 1). Ces deux actions menées dans le même temps permettent la perfusion du sang dans les poumons tout en empêchant l'atélectasie. Les oreillettes droite et gauche sont aussi incisées de façon à permettre une meilleure perfusion. Ensuite le bloc cœur-poumons est prélevé, lié au cathéter, ce qui permet l'injection de 10ml de solution I (voir annexe 1), 10 fois, et à chaque fois retirée pour éliminer le surfactant et les macrophages alvéolaires. L'élastase est injectée (1 x 1 ml x 1min et 3 x 1ml x 10 min pour 160U par rat), elle permet la digestion du tissu pulmonaire. Pendant ce temps le bloc cœur-

poumons est maintenu dans un bain-marie à 37°C, dans une solution de SGGS (sodium glucose gentamycine sepra).

1.2 Isolation des cellules AT II

Les poumons sont émincés dans 5ml de solution II (voir ci-dessus) additionnée de 806,45µM de désoxyribonucléase (DNase) I pendant 5min. Les activités de l'élastase et de la DNase sont arrêtées par l'ajout de 5ml de SVF pur (sérum de veau fœtal ou *foetal bovine serum* (FBS)). La suspension cellulaire est ensuite mise sous agitation pendant 5min, puis filtrée à travers 2 gazes, puis deux filtres de 150µm, et de 30µm. Le filtrat est centrifugé pendant 10min à 200g, puis le culot est resuspendu dans du MEM (voir annexe 1). Cette suspension cellulaire est distribuée dans 3 pétris de bactériologie recouverts d'IgG rat (Sigma # I-4131) et incubée de 30 à 60min dans un incubateur (5% CO₂, 37°C), de façon à éliminer les macrophages encore présents (Dobbs LG, *et al.*, 1986). Le surnageant est ensuite récupéré et à nouveau centrifugé (10min à 200g). Le culot cellulaire est alors resuspendu avec du MEM additionné de 10% SVF et 367,9µM sepra. Le comptage des cellules est fait à l'aide d'un hémacytomètre, et le taux de mortalité est évalué à l'aide d'une coloration au bleu trypan. La technique de purification cellulaire des AT II a été vérifiée à plusieurs reprises (Brochiero E, *et al.*, 2004, Dobbs LG, *et al.*, 1986, Jones GS, *et al.*, 1982). Comme elle permet d'obtenir une population cellulaire constituée d'au moins 80% de cellules épithéliales alvéolaires de type II, nous ne l'avons pas re-testée. Les AT II sont cultivées pendant les trois premiers jours en MEM + Septra + 10%SVF. Au jour 3, le milieu est changé pour du MEM + 10% SVF. Les AT II sont utilisées au jour 4. Dans nos expériences, les AT II ne subissent pas de passage.

2 Les traitements oxydants

2.1 La bléomycine

- ◆ Comme décrit dans le § A.2.1, la bléomycine forme un réactif oxydatif avec le fer et l'oxygène. Afin de se stabiliser, elle s'intercale dans la double-hélice d'ADN, provoquant des ruptures de la chaîne (Kemsley JN, *et al.*, 2003) et la production de ROS. La bléomycine induit donc un stress oxydatif qui permet de reproduire *in vitro*, non seulement le stress oxydatif présent *in vivo*, mais aussi l'aspect lésionnel engendré par sa capacité apoptotique (voir Résultats § B.2 dont Fig. 34-37-38 : effet toxique lors des expériences de réparation).
- ◆ Une courbe dose-réponse de sensibilité à la bléomycine (12,5-25-50-100-150 mU/ml) dans le cadre d'une expérience de réparation épithéliale a été faite. Cela nous a permis de déterminer les valeurs seuils pour l'effet de toxicité. Les concentrations de 50 ou 100mU/ml de bléomycine, à 24h, seront utilisées dans les expériences subséquentes (voir Résultats Fig. 34B).

3 Le traitement anti-inflammatoire aux glucocorticoïdes

3.1 Le dexaméthasone

- ◆ Comme décrit dans le § A.3.1, le dexaméthasone (stéroïde cortico-surrénal synthétique) induit l'activation de gènes portant l'élément GRE en 5' de leur promoteur, comme c'est le cas des différentes sous-unités du gène ENaC.
- ◆ Le dexaméthasone est utilisé à 100nM car différentes équipes ont déterminé qu'à cette concentration, son action est maximale sur l'activation de la transcription et le courant

amiloride-sensible (Champigny G, *et al.*, 1994, Dagenais A, *et al.*, 2006, Venkatesh VC, *et al.*, 1997).

4 Procédures générales des travaux cellulaires

4.1 Mesure de courants ioniques et résistance (Ussing)

◆ Les cellules AT II sontensemencées à J1 à raison de 4×10^6 cellules par filtre (4cm^2 , Costar 3412, Corning Life Sciences), dans du MEM + SVF + sepra. À J2 les cellules peuvent être pré-traitées avec du dexaméthasone 100nM, côté apical, dans du MEM + SVF. À J3 les cellules sont traitées avec le DMNQ (2,3-dimethoxy-1,4-naphtoquinone) $10\mu\text{M}$, la bléomycine 50 mU/ml et/ou le dexaméthasone 100nM, côté apical, dans du MEM + SVF. Après 24h de traitement (48h de pré-traitement), à J4, les filtres sont déposés en chambre de Ussing, dans un gradient sodium (apical $[\text{Na}] = 141\text{mM}$ et basolatéral $[\text{Na}] = 25\text{mM}$) ou une solution physiologique, à 37°C . Le gradient sodium oblige les cellules à former un influx sodium (apical vers basolatéral). Pour étudier l'implication du courant amiloride-sensible dans le courant total, il est ajouté 10^{-5}M d'amiloride côté apical. Pour étudier le courant total ou amiloride-sensible, apicaux uniquement, la membrane basolatérale est perméabilisée avec de l'amphotéricine b $7,5\mu\text{M}$. Le logiciel « Chart 5 » nous permet de suivre en direct l'application du potentiel de membrane (mV) et la lecture de la résistance (Ohm), puis suite à un traitement des données d'obtenir le courant (μA).

◆ La chambre de Ussing a été développée par l'équipe du Dr H.H. Ussing en 1958. Cette chambre a été adaptée pour nos besoins et mise en place dans le laboratoire, par les Drs Berthiaume, Brochiero et Grygorczyk. Elle consiste en deux chambres, apicale et basolatérale, séparées par le filtre portant une monocouche cellulaire. Il est appliqué une différence de potentiel (U) de 0mV, qui permet, lorsque le voltage est clampé à 1mV de façon intermittente, de mesurer la résistance (R) de la monocouche cellulaire en Ohm. Par

la loi de Ohm ($U=R \times I$) il est alors possible de mesurer le courant de court-circuit (I_{sc}) en μA .

4.2 Mesure de la réparation des plaies

À jour 1 (J1) les cellules AT II sontensemencées à 10^6 cellules dans un pétri de 35mm de diamètre dans 5ml de MEM + SVF + septra.   J2, les cellules peuvent être pré-traitées si nécessaire.   J3 les AT II forment une monocouche cellulaire possédant des jonctions serr es (Cavanaugh KJ, Jr., *et al.*, 2001), des plaies y sont faites à l'aide d'une pointe de pipette de 10 μ l (Gilson). Suite à l'élimination du milieu, le traitement peut être ajouté. Après 30min, une photo est prise de chaque plaie dans le milieu du pétri le long d'une ligne pré-trac e.   24, 36 et 48h post-plaies, de nouvelles photos sont prises au même endroit. La mesure de la fermeture de la plaie est faite à l'aide du calcul suivant : largeur de la plaie au temps X, divisé par largeur de la plaie au temps 30min, multiplié par 100. Cette technique a été mise au point dans la laboratoire du Dre Brochiero (Trinh NT, *et al.*, 2007).

Le pré-traitement fait à J3, est le dexaméthasone (100nM) dans du MEM + SVF. Les traitements sont la bléomycine à 12,5-25-50-100-150 mU/ml, le DMNQ (2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone)   7,5-10-12,5-15 μ M et le dexaméthasone à 100nM dans du MEM + SVF.

Les expériences sont r alis es en duplicata sur les cellules provenant de rats différents.

4.3 Mesures de l'apoptose

L'apoptose est dos e à l'aide du kit « Caspase Glo » (Promega) qui dose l'activité des caspases 3 et 7.

Les cellules AT II sontensemencées à J1 à raison 500 000 cellules/puits dans une plaque de 24 puits, en MEM + SVF + septra.   J3 le milieu des cellules est changé pour du MEM + SVF.   J4 les cellules sont traitées avec la bléomycine 50 mU/ml et/ou le dexaméthasone

100 nM dans du MEM complet + SVF. A J5, suite aux instructions du kit, les résultats sont analysés en mesurant la DO630nm sur la DO595nm.

Dans les mêmes conditions de culture cellulaire, le z-Vad-FMK (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) qui agit comme inhibiteur irréversible et général des caspases, a été ajouté à J4 en présence ou non de bléomycine 50 mU/ml pour 24h. À J5, la mesure de l'activation des caspases 3 et 7 a été mesurée comme précédemment expliqué. Des doses de 20 μ M à 200 μ M ont été testées pour la fermeture des plaies (Data not shown). Le z-Vad-FMK a un effet inhibiteur sur l'activation des caspases dès 20 μ M, cette dose a donc été utilisée pour la suite des expériences.

Les expériences sont réalisées sur les cellules provenant de rats différents.

L'apoptose est dosée à l'aide du kit « *Cell Death Detection Elisa* » (#11 774 425 001 ; Roche).

Les cellules AT II sontensemencées à J1 à raison 500 000 cellules/puits dans une plaque de 24 puits, en MEM + SVF + sepra. À J3 le milieu des cellules est changé pour du MEM + SVF. À J4 les cellules sont traitées avec la bléomycine 50 mU/ml dans du MEM complet + SVF. A J5, suite aux instructions du kit, la DO à 490nm est mesurée dans le surnageant et le culot cellulaire. Les données du surnageant donnant le degré de nécrose et celles du culot le degré d'apoptose induits par le traitement. C'est le ratio traitement sur contrôle qui est analysé.

Les expériences sont réalisées sur les cellules provenant de rats différents.

4.4 Mesure de l'adhésion

L'adhésion des cellules à leur substrat est évaluée à l'aide d'une technique modifiée du Dre Lorraine Ware (Atabai K, *et al.*, 2002).

Les cellules AT II sontensemencées à J1 à raison 1 000 000 cellules/puits dans une plaque de 12 puits, en MEM + SVF + sepra. À J3 le milieu des cellules est changé pour du MEM + SVF. À J4 les cellules sont traitées avec du dexaméthasone 100mM dans du MEM

complet + SVF. A J5, après lavage au PBS, les cellules sont trypsinées (0,25% ; 100µl) dans un agitateur 120rpm 37°C 5' (*Orbital incubator Shaker #4628 LabLine*). Les cellules récoltées après ce premier traitement de 5' font partie du pool de cellules décollées. Après arrêt de la trypsination au sérum et récupération des cellules décollées, une seconde trypsination est faite : 0.25% 150µl 37°C 15'. Les cellules récoltées après trypsination complète de la monocouche sont les cellules attachées. À nouveau l'arrêt est fait à l'aide de sérum. Les cellules décollées et attachées sont comptées, puis le ratio cellules adhérentes / cellules totales est déterminé.

Les expériences sont réalisées sur les cellules provenant de rats différents.

4.5 Mesure de la prolifération

La prolifération cellulaire est estimée à partir de la mesure d'incorporation de thymidine tritiée à l'ADN des cellules en croissance.

Les cellules AT II sontensemencées à J1 à raison de 150 000 cellules par puits de plaque de 12 puits, en MEM + SVF + septra. À J3 les cellules peuvent être pré-traitées avec du dexaméthasone à 100nM, dans du MEM + SVF. À J4 les cellules sont traitées avec la bléomycine 100 mU/ml, le DMNQ 2,5µM et le dexaméthasone 100nM, dans du MEM complet + SVF, en présence de thymidine ³H à 1µCi/ml.

À J5 soit après 24h d'incorporation de thymidine ³H, le milieu est éliminé, les cellules sont fixées 10min avec du TCA (trichloroacetic acid) 5%, puis rincées dans 3 bacs d'eau glacée, puis lysées avec du NaOH 0,1N. Seule la radioactivité internalisée est ainsi comptée (compteur à scintillation liquide (Liquid Scintillation Analyser Packard)), mesure des coups par minute (cpm)) pour chaque puits). Un dosage protéique est réalisé pour chaque puits, selon le protocole du fabricant du Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce), afin de normaliser nos expériences. Cette technique a été mise au point dans la laboratoire du Dre Brochiero (Trinh NT, *et al.*, 2007).

Les expériences sont réalisées sur 4 réplicats technique pour chaque condition expérimentale avec des cellules provenant de rats différents.

C. Statistiques

Tous les résultats expérimentaux ont été analysés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 avec les fonctions ANOVA one-way ou ANOVA two-ways suivies d'un Tuckey/Kramer post test, d'un Dunn post test ou d'un Bonferroni post test. Une différence est dite significative lorsque le $p < 0,05$.

RÉSULTATS

A. Importance du canal ENaC dans la résolution de l'œdème d'un modèle de phase aiguë du SDRA à la bléomycine

La présence d'un œdème alvéolaire due à la perméabilité de la membrane alvéolo-capillaire est l'une des caractéristiques des patients atteints de SDRA. En effet, le SDRA est défini comme suit : -1- l'hypoxémie (rapport $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200\text{mmHg}$, -2- la présence d'infiltrats floconneux bilatéraux à la radiographie du thorax, -3- un facteur de risque pour le développement du SDRA et -4- l'absence d'une insuffisance cardiaque ou une pression capillaire bloquée inférieure à $18\text{cm H}_2\text{O}$ (Ware LB, *et al.*, 2000). La clairance de cet œdème est liée à la régulation des canaux ioniques, dont majoritairement ENaC (Hummler E, *et al.*, 2010). La bléomycine est l'un des modèles utilisés pour induire la formation de lésions pulmonaires apparentées à l'ALI/SDRA (Matute-Bello G, *et al.*, 2008).

1 Réponse à la bléomycine *in vitro*

1.1 Le modèle cellulaire

Comme elles recouvrent 90% de la surface des alvéoles en une très fine monocouche cellulaire, les AT I sont la cible majeure des lésions pulmonaires dans l'ALI/SDRA (Geiser T, 2003). C'est une sous-population des AT II qui agissent en tant que cellules progénitrices, qui assument la réparation de l'épithélium et le rétablissement de la clairance alvéolaire (Guidot DM, *et al.*, 2006). Des cellules épithéliales alvéolaires issues de rat ont donc été utilisées en culture primaire pour l'ensemble de nos expériences.

1.2 Le courant du canal ENaC

L'importance du rôle de ENaC dans la clairance des fluides alvéolaires n'est plus à démontrer (Berthiaume Y, *et al.*, 2007, Hummler E, *et al.*, 1996). L'impact de la

bléomycine, qui induit un œdème *in vivo*, est donc évalué sur le courant lié au canal ENaC dans les cellules épithéliales alvéolaires, afin de vérifier qu'elle n'a pas d'impact direct sur l'activité de ENaC.

Les cellules AT II sont cultivées sur un filtre poreux de 4 cm². Le filtre est déposé dans une chambre de Ussing à J5, afin de mesurer les courants sodium transépithélial et apical de court-circuit. Des exemples sont montrés aux Figures 19 A et B.

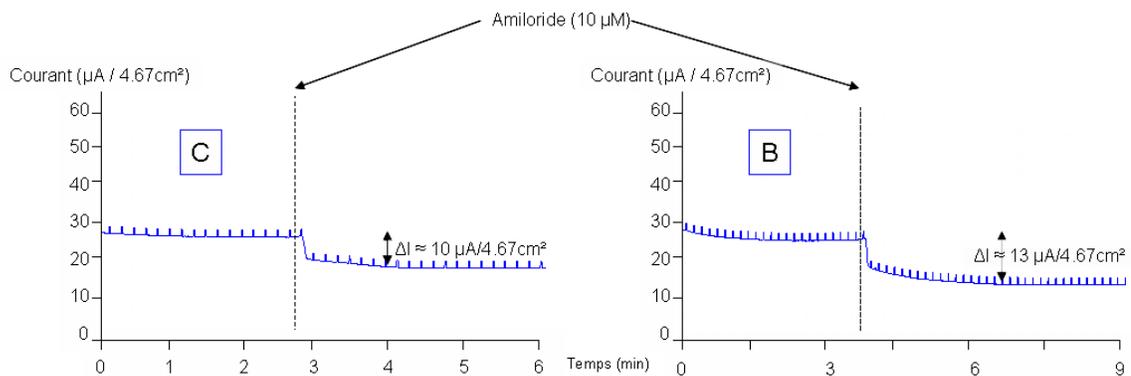


Fig. 19 A : Exemple de courant sodium transépithélial en condition contrôle [C] et bléomycine [B] Le courant transépithélial est mesuré en présence dans une solution physiologique, puis suite à l'obtention d'un courant stable, la variation du courant (ΔI) est mesurée avant et après l'ajout d'amiloride (10 μ M).

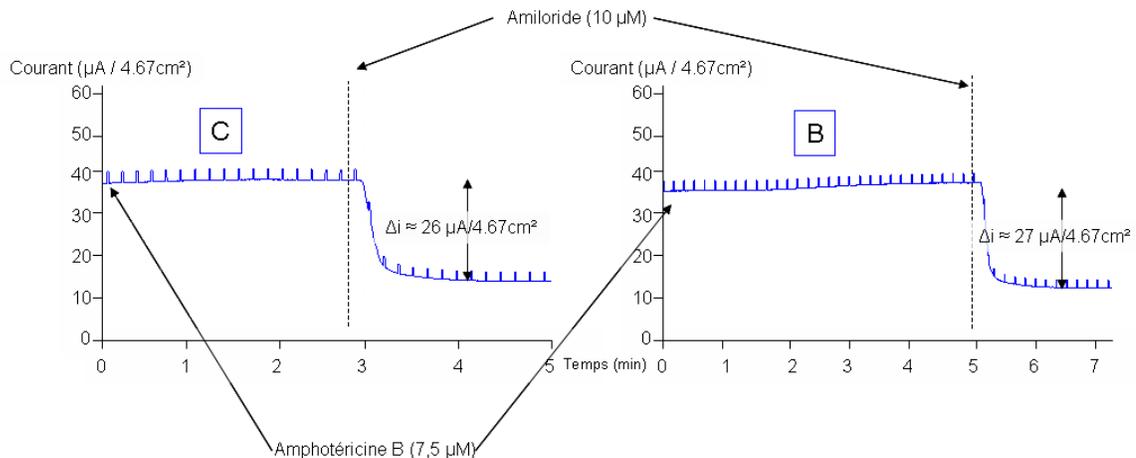


Fig. 19 B : Exemple de courant sodium apical en condition contrôle [C] et bléomycine [B] Le courant apical est mesuré en présence d'un gradient sodium et de l'amphotéricine B (7,5 μ M) en baso-latéral, puis suite à l'obtention d'un courant stable la variation du courant (Δi) est mesurée avant et après l'ajout d'amiloride (10 μ M).

L'impact de la bléomycine est mesuré sur le courant transépithélial amiloride-sensible en solution physiologique d'une part, et sur le courant apical amiloride-sensible en présence d'un gradient sodium d'autre part. Dans le premier cas, une monocouche intacte de AT II est utilisée, dans le second une monocouche de AT II perméabilisée à l'amphotéricine B, en basolatéral.

Le traitement à la bléomycine ne modifie aucun des courants trans-épithéliaux et apicaux, totaux et amiloride-sensibles, par rapport aux conditions contrôles [Fig. 20].

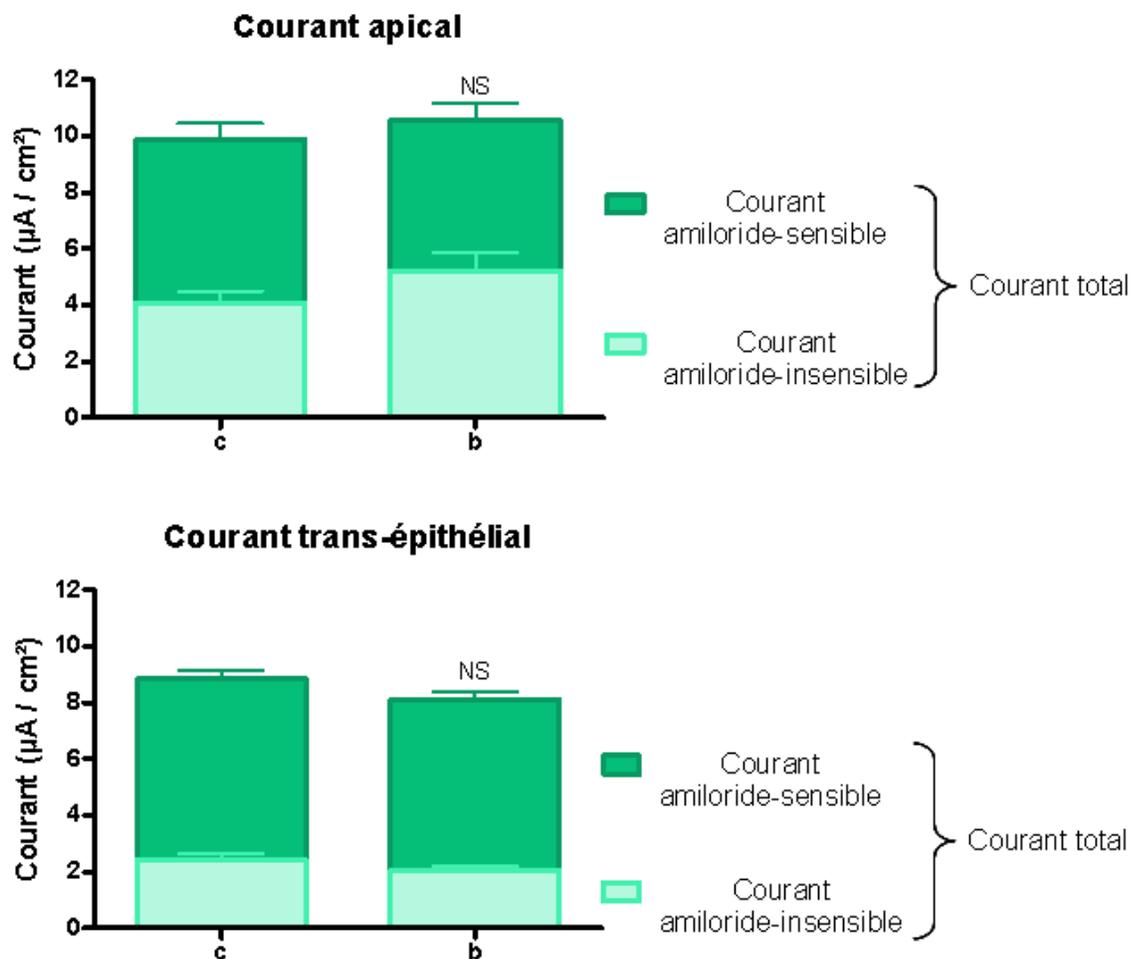


Fig. 20 : Effet de la bléomycine sur les courants apical et transépithélial des AT II

Les AT II, en culture primaire sur filtre, sont soumises ou non, à la présence de 50mM de bléomycine [b] (apical), pour 24h. Les mesures sont faites en chambre de Ussing, comme reporté dans les Fig. 19 A et B (NS pour les courants amiloride-sensibles et totaux ; $n = 7$ par condition).

2 Réponse à la bléomycine *in vivo*

La bléomycine forme un complexe avec l'oxygène et les métaux tel le Fe^{2+} , conduisant à la production de radicaux libres, qui vont induire des coupures de l'ADN et ultimement la mort cellulaire. Physiologiquement cela se traduit d'abord par le bris de la membrane alvéo-capillaire qui permet le développement d'un œdème associé à l'inflammation. Il sera suivi d'une fibrose (Cuttillo AG, *et al.*, 2002, Matute-Bello G, *et al.*, 2008).

2.1 Le modèle murin transgénique

Le modèle bléomycine de lésions pulmonaires aiguës est utilisé *in vivo* sur des souris WT et Tg pour le canal ENaC, fournies par le Dre Hummler (Hummler E, *et al.*, 1997) afin de déterminer l'implication de ce canal.

Le Dre Hummler nous a fourni les souris de souche NMRI (Naval Medical Research Institute), de génotypes sauvage (WT) et ENaC +/- Tg+. Des croisements ont été effectués pour obtenir les lignées WT et ENaC -/- Tg+ (Tg). Pour la lignée Tg :

une souris femelle ENaC +/- Tg+ peut produire 4 types de gamètes :

ENaC+ (X)Tg+ ENaC+ (X)Tg- ENaC- (X)Tg+ ENaC- (X)Tg-

une souris mâle ENaC +/- Tg+ peut produire 4 types de gamètes :

ENaC+ (X)Tg+ ENaC+ (Y)Tg- ENaC- (X)Tg+ ENaC- (Y)Tg-

Lors de l'accouplement de ces souris, les croisements suivants peuvent avoir lieu :

		femelle ENaC ^{+/-} Tg ⁺				
		Gamètes	ENaC ⁺ (X)Tg ⁺	ENaC ⁺ (X)Tg ⁻	ENaC ⁻ (X)Tg ⁺	ENaC ⁻ (X)Tg ⁻
mâle ENaC ^{+/-} Tg ⁺	ENaC ⁺ (X)Tg ⁺	ENaC ^{+/+} (XX)Tg ^{+/+}	ENaC ^{+/+} (XX)Tg ^{+/-}	ENaC ^{+/-} (XX)Tg ^{+/+}	ENaC ^{+/-} (XX)Tg ^{+/-}	
	ENaC ⁺ (Y)Tg ⁻	ENaC ^{+/+} (XY)Tg ^{+/-}	ENaC ^{+/+} (XY)Tg ^{-/-}	ENaC ^{+/-} (XY)Tg ^{+/-}	ENaC ^{+/-} (XY)Tg ^{-/-}	
	ENaC ⁻ (X)Tg ⁺	ENaC ^{+/-} (XX)Tg ^{+/+}	ENaC ^{+/-} (XX)Tg ^{+/-}	ENaC ^{-/-} (XX)Tg ^{+/+}	ENaC ^{-/-} (XX)Tg ^{+/-}	
	ENaC ⁻ (Y)Tg ⁻	ENaC ^{+/-} (XY)Tg ^{+/-}	ENaC ^{+/-} (XY)Tg ^{-/-}	ENaC ^{-/-} (XY)Tg ^{+/-}	ENaC ^{-/-} (XY)Tg ^{-/-}	

Tableau 3 : Tableau de croisements des souris ENaC ^{+/-} Tg⁺ 1/16^e des animaux pourra être WT (case verte ou ENaC^{+/+} Tg^{-/-}), 1/16^e des animaux décèdera dans les 40h suivant leur naissance (case rouge ou ENaC^{-/-} Tg^{-/-}) (Hummler E, *et al.*, 1996) et 3/16e des animaux seront porteurs de la délétion (KO) pour ENaC et d'au moins un copie du transgène (cases oranges ou ENaC ^{-/-} Tg⁺).

La technique d'instillation intra-trachéale est indolore pour les souris. Elle consiste en l'anesthésie de l'animal, puis en l'instillation intra-trachéale par voie orale à l'aide d'un guide et d'un cathéter, de la solution choisie (voir Méthodologie § A.2.1). Seule les souris Tg homozygotes mâles seront utilisées afin de s'assurer de la présence d'une seule copie du transgène.

2.2 Le modèle thiourée

Nous avons reproduit les expériences de Dr Scherrer, afin de vérifier que notre colonie de souris Tg possède bien une sensibilité au développement de l'œdème (Egli M, *et al.*, 2004). Dr Scherrer utilise pour cela la molécule de thiourée qui induit un stress oxydant à la mitochondrie et le développement d'un œdème pulmonaire par lésion de l'endothélium pulmonaire (Cunningham AL, *et al.*, 1972). En reprenant la même technique, nous avons injecté, tout comme eux, 40mg/kg de thiourée aux souris WT et Tg pour une durée de 4h ou 7h. L'estimation de l'œdème a été classiquement mesurée par la méthode du Wet/Dry.

En condition contrôle, les souris Tg développent plus d'œdème, que les souris WT à 7h. D'autre part, les deux modèles de souris développent, en présence de *thiourea*, un œdème significativement plus important qu'en présence de solution saline ($p \leq 0,05$). De plus, nous constatons une persistance de l'œdème chez les souris Tg à 7h, par rapport aux souris WT ($p \leq 0,05$) [Fig. 21].

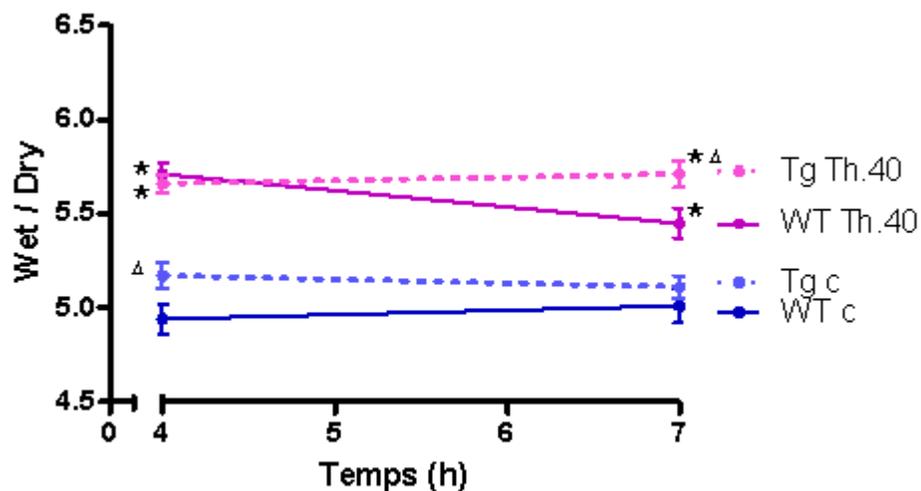


Fig. 21 : Effet du thiourée sur le développement de l'œdème chez les souris WT et Tg
 Les souris WT et Tg sont injectées intra-péritonéalement avec une dose de salin (0,9%) [c] ou de thiourée (40mg/kg) [th.40] à J1. Elles sont euthanasiées après 4 ou 7h. Le poids des poumons post-nécropsie, et après 24h à 95°C, est mesuré, permettant de calculer le rapport Wet/Dry. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $\Delta \leq 0.05$ WT vs Tg en condition Th40 ; $n = 8-12$ par condition).

2.3 La survie

La survie des souris WT et Tg suite à l'instillation de bléomycine (4 U/ml) a tout d'abord été évaluée.

La bléomycine induit une mortalité significative pour les deux génotypes de souris. Les décès débutent dès J7 et J5, respectivement pour les souris WT et Tg. À 12 jours, les souris WT et Tg ont un taux de survie de 43% et 17% respectivement. Il y a une tendance non significative de survie plus élevée pour les souris Tg [Fig. 22].

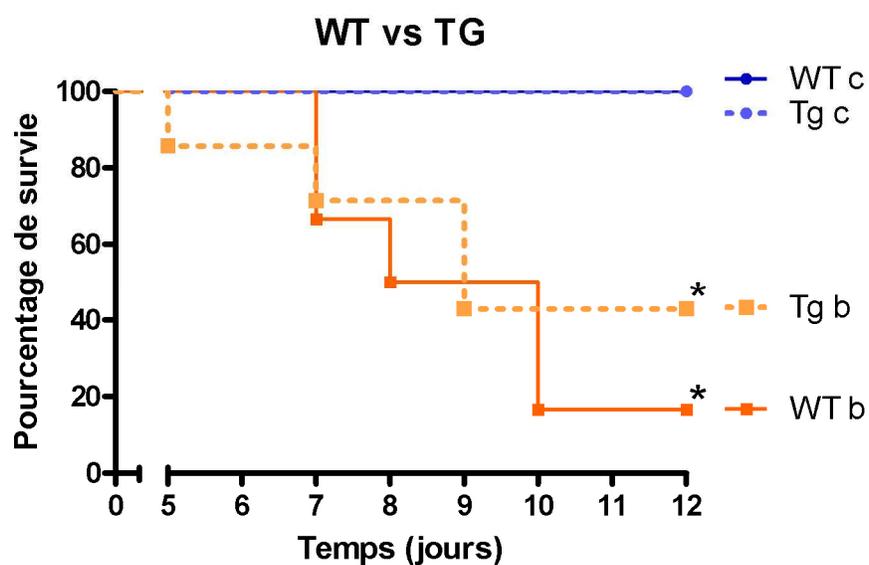


Fig. 22 : Effet de la bléomycine sur la mortalité des souris WT et Tg Les souris WT et Tg sont instillées intra-trachéalement avec de la solution saline (0,9%) [c] ou de la bléomycine (4U/kg) [b] à J1, pour 12 jours. La survie est vérifiée au fur et à mesure de l'expérience. ($* \leq 0.05$ vs contrôle ; $n = 5-7$ par condition)

2.4 La variation de poids

L'impact de la bléomycine sur le poids des souris WT et Tg a ensuite été mesuré.

Les souris WT prennent du poids en condition contrôle, tandis que les souris Tg sont stables. À la suite de l'instillation de bléomycine, les souris WT et Tg ont une perte de poids significative ($p \leq 0,05$). Il y a aussi une différence significative entre les souris WT et Tg traitées à la bléomycine pendant 7 jours.

Les données obtenues à 12 jours n'apparaissent pas en raison du taux de mortalité élevé survenant à partir du jour 9, suite au traitement à la bléomycine [Fig. 23].

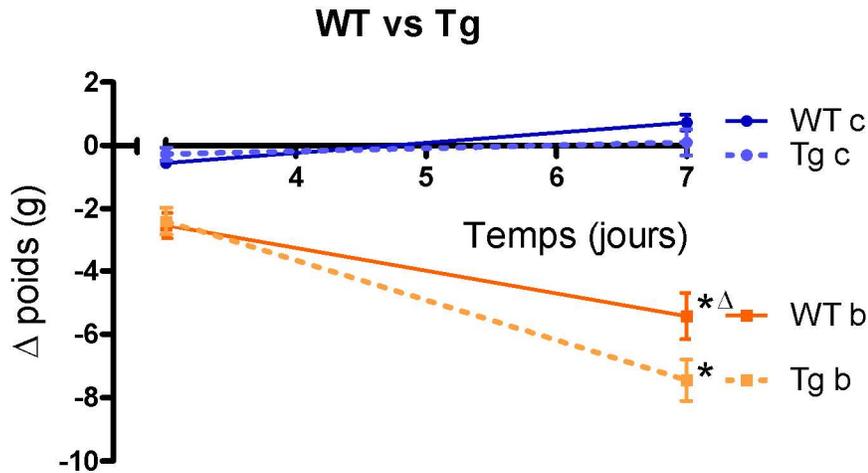


Fig. 23 : Effet de la bléomycine sur la variation de poids chez les souris WT et Tg

Les souris WT et Tg sont instillées intra-trachéalement avec de la solution saline (0,9%) [c] ou de la bléomycine (4U/kg) [b] à J1, pour 3 et 7 jours. Le poids des souris est mesuré le jour du traitement et de l'euthanasie. (* $\leq 0,05$ vs contrôle ; $\Delta \leq 0,05$ WT vs Tg en condition b ; $n = 6-25$ par condition)

2.5 L'œdème

Puis, le développement de l'œdème chez les souris WT et Tg a été estimé.

Les comparaisons entre les souris WT et ENaC $-/-$ Tg $+$ se font aux jours 3 à 7, en raison du niveau élevé de mortalité des souris à partir du jour 9. Il est important de savoir que le taux « Wet/Dry » sans instillat, varie entre 4.5 et 5 (Arensman JB, *et al.*, 1977, Hummler E, *et al.*, 1997, Mansour H, *et al.*, 1988).

En présence de solution saline [c], au jour 3, les souris Tg présentent un ratio *Wet/Dry* plus élevé que les souris WT ($p \leq 0.05$), ce qui est congruent avec le fait que ces souris ont une sensibilité au développement de l'œdème. Les deux groupes de souris développent un œdème significativement plus important en présence de bléomycine par rapport au salin ($p \leq 0.05$), mais il n'y a pas de différence significative entre eux [Fig. 24].

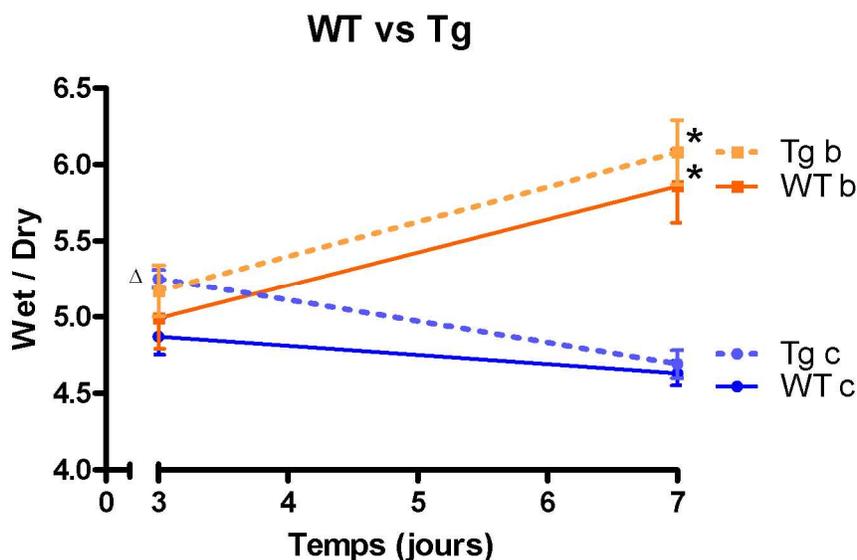


Fig. 24 : Effet de la bléomycine sur le développement de l'œdème chez les souris WT et Tg Le ratio Wet/Dry (poids mouillé/poids sec) permet d'estimer le développement de l'œdème pulmonaire. Les souris WT et Tg sont instillées intra-trachéalement avec de la solution saline (0,9%) [c] ou de la bléomycine (4U/kg) [b] à J1, pour 3 et 7 jours. Le poids des poumons post-nécropsie et après 24h à 95°C, est calculé, permettant d'évaluer le rapport Wet/Dry. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $\Delta \leq 0.05$ WT vs Tg en condition c ; $n = 10-12$ par condition)

2.6 Les lésions tissulaires

L'histologie des poumons des souris a été observée 7 jours après l'instillation de solution saline (c) ou de bléomycine (b). Les photos sont prises à un grossissement 20x.

Il est facile de constater qu'en présence de bléomycine, les alvéoles présentent un dépôt de fibrine, un infiltrat leucocytaire et érythrocytaire, et l'épithélium bronchique semble fortement endommagé par rapport aux souris instillées à la solution saline [Fig. 25 A].

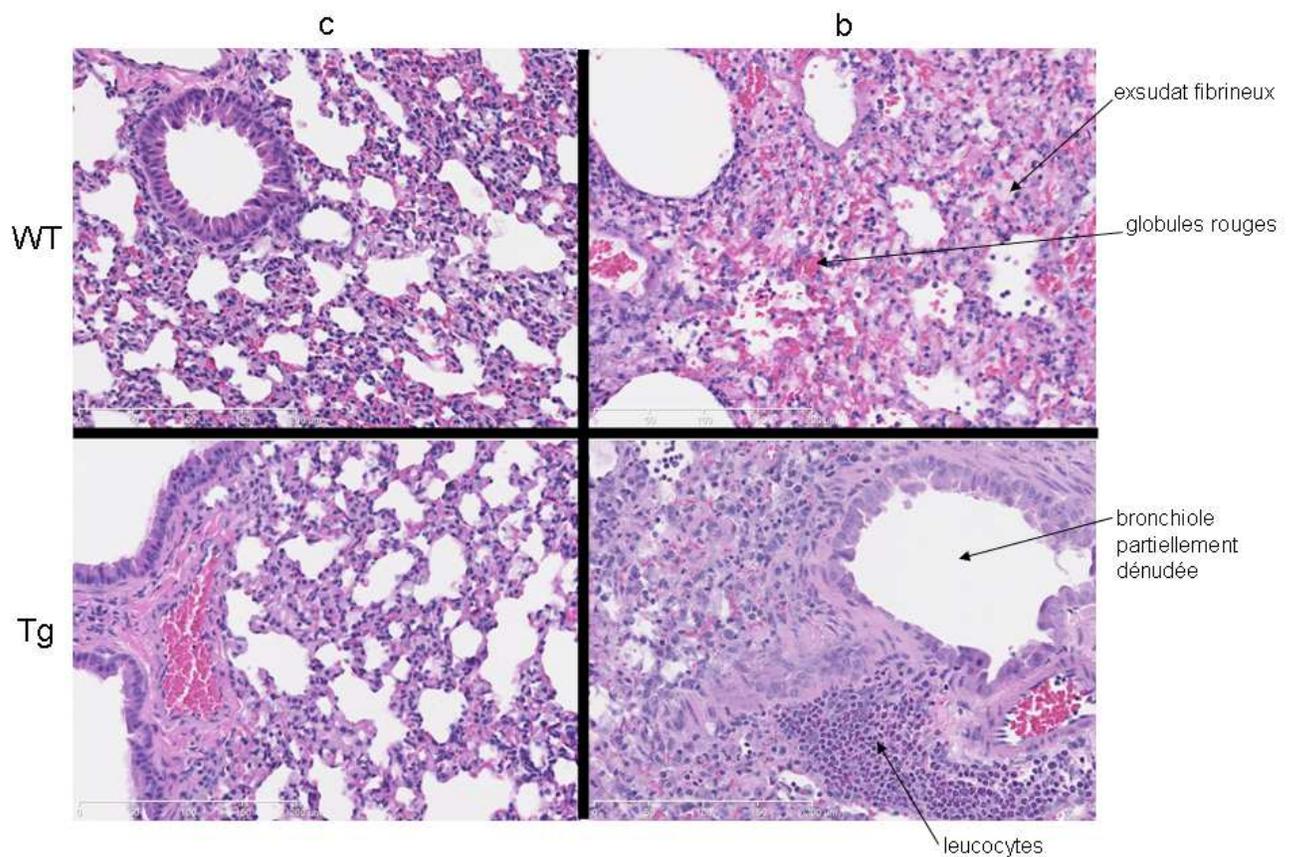


Fig. 25 A : Histologie des souris WT et Tg Les souris ont été instillées à J1 avec de la solution saline (0,9%) [c], ou de la bléomycine (4U/kg) [b]. Les animaux ont été euthanasiés par surdose d'anesthésique à J7. Les poumons ont été fixés avec de la paraformaldéhyde 4% et conservés à 4°C. La technique d'histologie a été réalisée à l'IRIC (Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie). Les photos sont faites avec un grossissement 20x, à l'aide d'une coloration hématoxyline éosine.

Les coupes histologiques ont été analysées à l'aveugle par un anatomo-pathologiste. Il a déterminé la présence ou absence de 6 paramètres permettant d'établir l'ALI. Les paramètres sont : hémorragie intra-alvéolaire, atypie régénérative / karyomégalocytes, cellules alvéolaires atypiques / débris cellulaires, œdème / congestion, exsudat bronchique et exsudat fibrineux / membrane hyaline. La somme des souris portant l'un ou plusieurs de ces paramètres permet d'évaluer quel type de traitement induit des caractéristiques typiques de l'ALI. On peut constater que la bléomycine induit plus de lésions caractéristiques de l'ALI que la condition contrôle, chez les souris WT et Tg [Fig. 25 B].

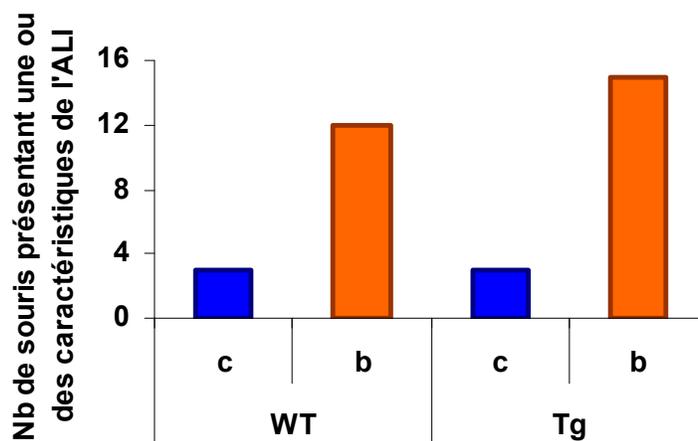


Fig. 25 B : Effet de la bléomycine sur la sévérité des lésions chez les souris WT et Tg

Les souris ont été instillées à J1 avec de la solution saline (0,9%) [c], ou de la bléomycine (4U/kg) [b]. Les animaux ont été euthanasiés par surdose d'anesthésique à J7. Les poumons ont été fixés avec de la paraformaldéhyde 4% et conservés à 4°C. La technique d'histologie a été réalisée à l'IRIC. L'analyse a été faite à l'aveugle par un anatomo-pathologiste, qui a établi une échelle de sévérité allant de 1 à 4. ($n = 6-9$ par condition)

2.7 L'inflammation

Dans le lavage broncho-alvéolaire, la concentration en protéine (qui est un indice de la perméabilité membranaire), le dosage du TNF α et le décompte des leucocytes ont été faits.

Suite au traitement à la bléomycine, les souris WT et Tg montrent une augmentation de la concentration protéique dans le BAL à jour 7, signifiant l'augmentation de la perméabilité de la membrane alvéolo-capillaire et donc la présence de lésions de celle-ci. Il n'y a aucune différence de concentration protéique suite au traitement à la bléomycine dans le BAL de souris WT et Tg au jour 7 [Fig. 26 A].

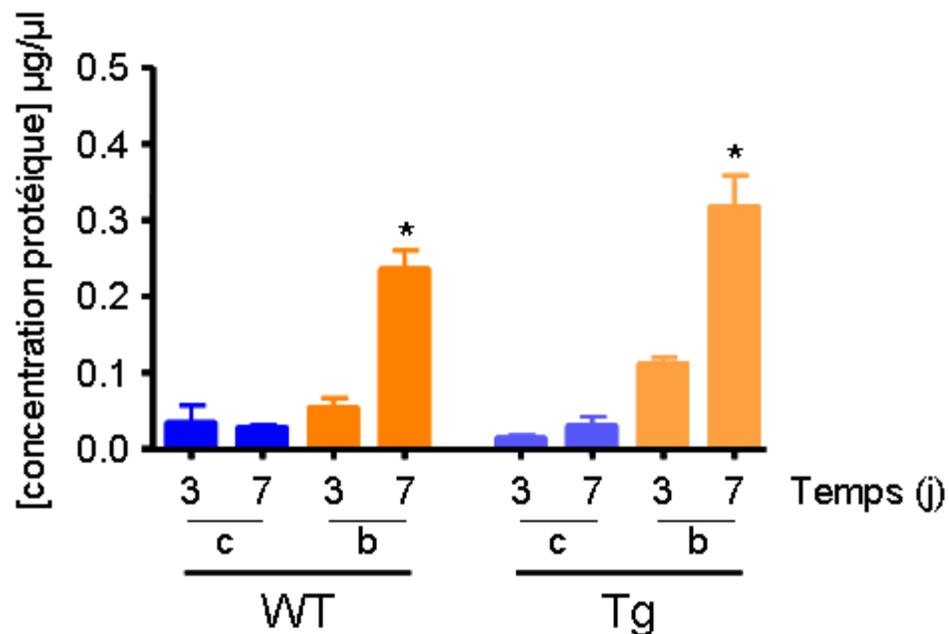


Fig. 26 A : Effet de la bléomycine sur la concentration protéique du BAL chez les souris WT et Tg Les souris ont été instillées à J1 avec de la solution saline (0,9%) [c], ou de la bléomycine (4U/kg) [b] pour 3 et 7 jours. Le BAL a été fait à l'aide de 6 répétitions de l'instillation de 1 ml de salin. La concentration protéique a été analysée dans le surnageant du BAL suite à l'élimination des cellules par centrifugation. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $n = 5-6$ par condition)

Suite au traitement à la bléomycine, les souris WT et Tg montrent une augmentation de la concentration en TNF α dans le BAL, signifiant la présence d'inflammation. De plus, cette augmentation est significativement plus élevée chez les souris Tg, indiquant potentiellement une sensibilité accrue à l'inflammation de ces souris après 3j de traitement [Fig. 26 B].

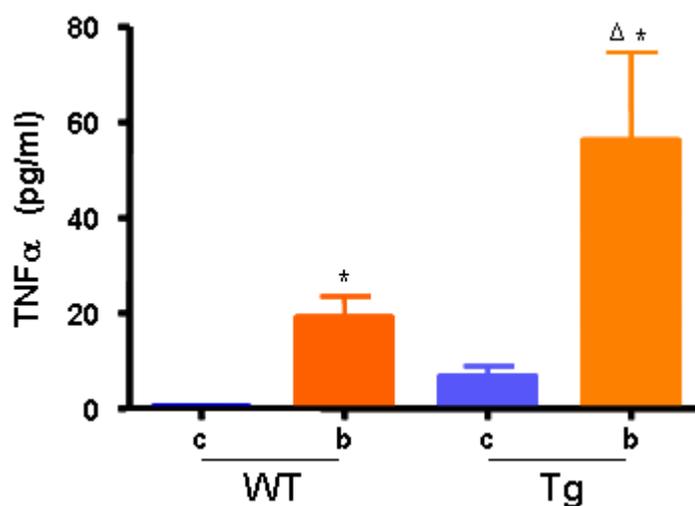


Fig. 26 B : Effet de la bléomycine sur la concentration en TNF α du BAL chez les souris WT et Tg Les souris ont été instillées à J1 avec de la solution saline (0,9%) [c], ou de la bléomycine (4U/kg) [b] pour 3 jours. Le BAL a été fait à l'aide de 6 répétitions de l'instillation de 1 ml de salin. La concentration en TNF α a été analysée dans le surnageant du BAL suite à l'élimination des cellules par centrifugation. (* \leq 0.05 vs contrôle ; n = 6 par condition)

Enfin, le décompte des leucocytes présents dans le BAL a été évalué chez les souris WT et Tg. Les comparaisons entre les souris WT et Tg se font aux jours 3 à 7, en raison du niveau élevé de mortalité des souris à partir du jour 9.

Les éosinophiles ne présentent aucune différence significative quel que soient les groupes comparés. Les profils neutrophilique et macrophagique sont inversés. En effet, les neutrophiles sont significativement plus élevés ($p \leq 0.05$) pour les deux génotypes de souris à jour 3 et 7. Tandis que les macrophages sont significativement plus faibles ($p \leq 0.05$) pour les deux génotypes de souris à jour 3 et 7. Il n'y a aucune différence de profil entre les deux génotypes. Au niveau des lymphocytes, seules les souris Tg ont un taux significativement plus élevé à jour 3 et 7. Toujours pour les lymphocytes, il est à noter qu'il existe une différence significative entre les deux génotypes pour le traitement bléomycine à J7 [Fig. 26 C].

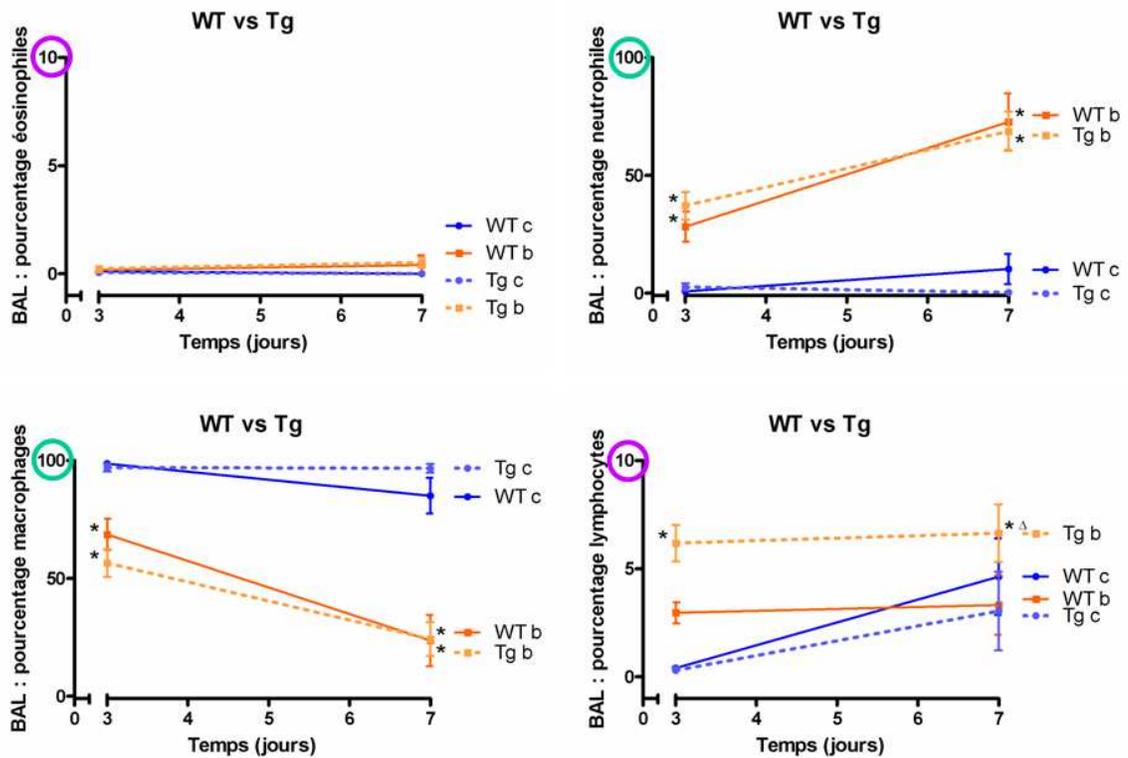


Fig. 26 C : Effet de la bléomycine sur l'infiltration leucocytaire chez les souris WT et Tg Les souris ont été instillées à J1 avec de la solution saline (0,9%) [c], ou de la bléomycine (4U/kg) [b] pour 3 et 7 jours. Le BAL a été fait à l'aide de 6 répétitions de l'instillation de 1 ml de salin. Le décompte leucocytaire a été fait à partir du culot cellulaire recueilli suite à la centrifugation. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $\Delta \leq 0.05$ WT vs Tg en condition b ; $n = 5-6$ par condition) Note : les cercles violets montrent une échelle de 10, les cercles verts une échelle de 100.

B. Impact du traitement aux glucocorticoïdes dans le modèle de phase aiguë du SDRA à la bléomycine

Afin de moduler la résolution de la phase aiguë du SDRA, le dexaméthasone a été utilisé. En effet, les glucocorticoïdes sont impliqués dans les différents aspects de la première phase du SDRA. Le dexaméthasone stimule la clairance par l'augmentation du transport de sodium, possiblement *via* ENaC (voir Méthodologie § A.3), prolonge le potentiel de réparation des cellules épithéliales bronchiques *in vitro* (Wadsworth SJ, *et al.*, 2006), stimule la réparation du tissu épithélial nasal (Li CW, *et al.*, 2009), et semble ralentir la progression de la fibrose cicatricielle lors de lésions à répétition comme c'est le cas lors de sinusites chroniques (Beule AG, *et al.*, 2008). L'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes n'est plus à démontrer, notons toutefois que cet effet anti-inflammatoire permet notamment une meilleure réparation du tissu épithélial lésé (Nguyen MD, *et al.*, 2000). L'effet du dexaméthasone sur le développement œdémateux, lésionnel et inflammatoire induit par le modèle bléomycine a donc été étudié.

1 Réponse aux glucocorticoïdes *in vivo*

1.1 La survie

L'impact du co-traitement par l'injection intra-péritonéale (i.p.) de dexaméthasone (0.5 mg/kg/jour) sur la survie des souris WT co-instillée à la bléomycine (4 U/ml) a tout d'abord été évalué.

Le dexaméthasone ne renverse pas l'induction de la mortalité par la bléomycine. Les décès débutent dès J6. À 12 jours, les souris ont un taux de survie de 17% (b) et 33% (bd) [Fig. 27].

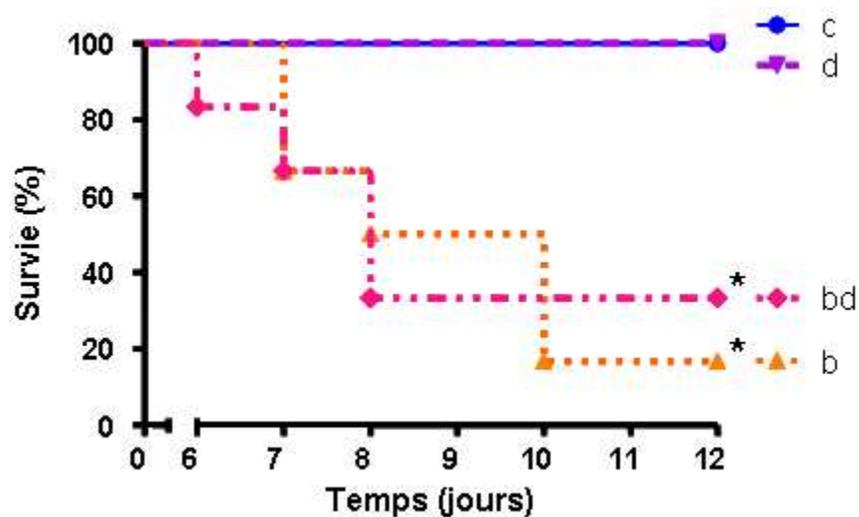


Fig. 27 : Effet du dexaméthasone sur la survie du modèle bléomycine murin Les souris WT sont instillées intra-trachéalement avec de la solution saline (0,9%) [c] ou de la bléomycine (4 U/kg) [b], et injectées (i.p.) avec du salin (0,9%) ou du dexaméthasone (0,5 mg/kg/jour) [d], à J1, pour 12 jours. La survie est vérifiée au fur et à mesure de l'expérience. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $n = 6$ par condition)

1.2 La variation de poids

L'impact du dexaméthasone sur la perte de poids des souris traitées à la bléomycine a été mesuré.

Le dexaméthasone seul n'induit pas de différence de variation de poids significative par rapport au traitement contrôle. Suite à l'instillation de bléomycine, les souris ont une perte de poids significative ($p \leq 0,05$) à 7 et 12 jours de traitement [Fig. 28] en présence ou en absence de dexaméthasone. Il y a aussi une différence significative ($p \leq 0,05$) entre les souris traitées à la bléomycine à 7 jours [Fig. 28].

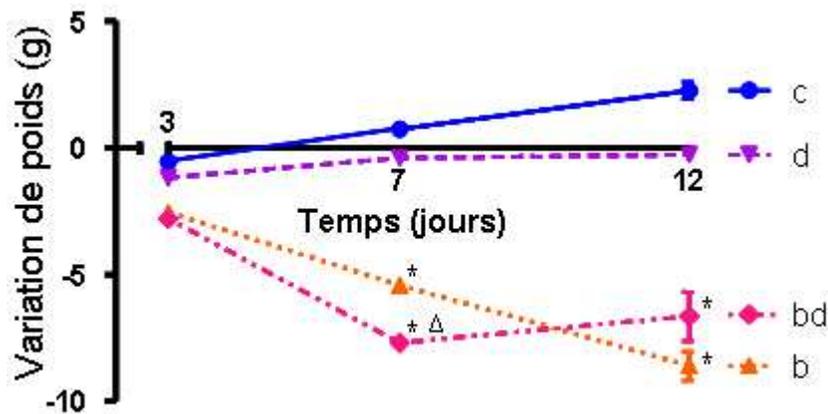


Fig. 28 : Effet du dexaméthasone sur la variation de poids du modèle bléomycine murin Les souris sont instillées intra-trachéalement avec de la solution saline (0,9%) [c] ou de la bléomycine (4U/kg) [b] et injectées (i.p.) avec du salin (0,9%) ou du dexaméthasone (0,5 mg/kg/jour) [d], à J1, pour 3 à 12 jours. Le poids des souris est mesuré le jour du traitement et de l'euthanasie. ($* \leq 0,05$ vs contrôle ; $\Delta \leq 0,05$ b vs bd ; $n = 3-21$ par condition)

1.3 L'œdème

Le développement de l'œdème chez les souris a été estimé des jours 3 à 12 dans les 4 conditions précédemment décrites (i.e. contrôle, bléomycine, dexaméthasone, bléomycine+dexaméthasone).

Les souris présentent plus d'œdème en condition bléomycine par rapport au contrôle ($p \leq 0,05$). Le dexaméthasone seul n'a pas d'effet significatif. De plus, le dexaméthasone s'avère incapable de réduire l'œdème induit par la bléomycine. La tendance à la hausse en coprésence de bléomycine et dexaméthasone n'est pas significative [Fig. 29 A]. Une dose de dexaméthasone de 10 mg/kg/j a été testée et abandonnée car elle induit la mortalité dès J5 [Data not shown].

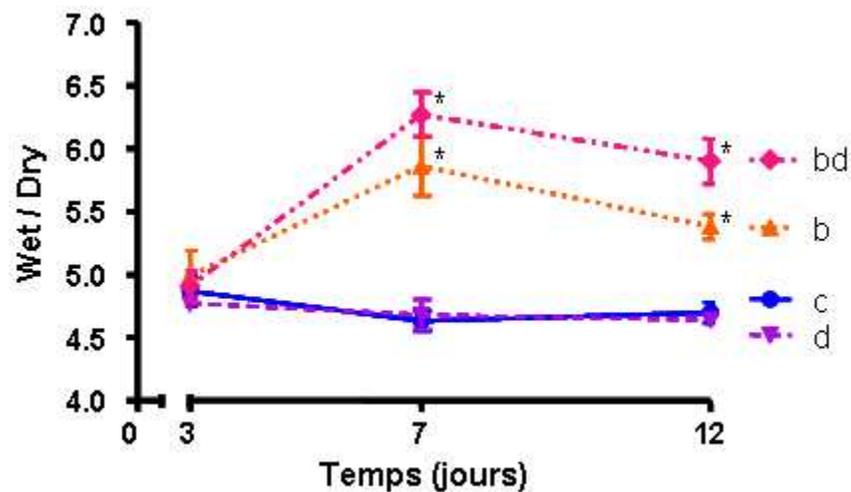


Fig. 29 A : Effet du dexaméthasone sur l'œdème du modèle bléomycine murin

Le ratio Wet/Dry (poids mouillé/poids sec) permet d'estimer le développement de l'œdème pulmonaire. Les souris sont instillées intra-trachéalement (i.t.) à J1 avec du salin (0,9%) ou de la bléomycine (4U/kg) [b], et injectées (i.p.) avec du salin (0,9%) ou du dexaméthasone (0,5 mg/kg/jour) [d], à J1, pour 3 à 12 jours. Le poids des poumons post-nécropsie et après 24h à 95°C, est calculé, permettant de mesurer le ratio Wet/Dry. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $n = 6-12$ par condition)

Le méthylprednisolone, un autre glucocorticoïde ayant la capacité de mieux se concentrer dans les poumons grâce à un plus grand volume de distribution et un temps de séjour moyen plus long permettant une conservation plus longue dans les alvéoles (Greos LS, *et al.*, 1991), a aussi été utilisé, à une dose équivalente de celle testée par le Dr Meduri chez les patients SDRA (i.e. 1 mg/kg/jour) (Meduri GU, *et al.*, 2007).

Le développement de l'œdème chez les souris a été estimé aux jours 3 et 7 dans les 4 conditions suivantes : contrôle, bléomycine, méthylprednisolone, bléomycine+méthylprednisolone.

Les données montrent plus d'œdème en condition bléomycine en absence ou en présence de méthylprednisolone, par rapport au contrôle ($p \leq 0,05$), tandis que le méthylprednisolone seul a déjà un effet significatif ($p \leq 0,05$) [Fig. 29B].

Une dose de méthylprednisolone de 5 mg/kg/j a été testée et abandonnée car elle induit la mortalité dès J5 [Data not shown].

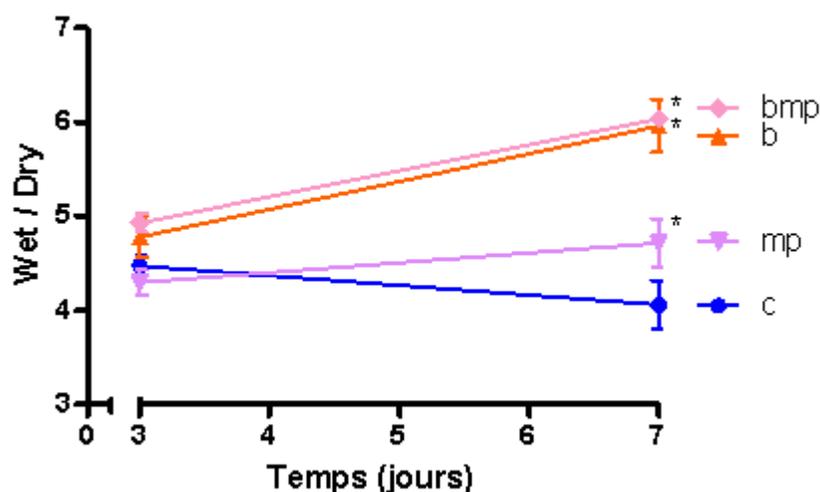


Fig. 29 B : Effet du méthylprednisolone sur l'œdème du modèle bléomycine murin Les souris sont instillées intra-trachéalement (i.t.) à J1 avec du salin (0,9%) ou de la bléomycine (4U/kg) [b], et injectées (i.p.) avec du salin (0,9%) ou du méthylprednisolone (1 mg/kg/jour) [mp], à J1, pour 3 et 7 jours. Le poids des poumons post-nécropsie et après 24h à 95°C, est calculé, permettant de mesurer le ratio Wet/Dry. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $n = 6$ par condition)

Les mêmes doses de dexaméthasone de 0.5 et 10 mg/kg, et de méthylprednisolone de 1 et 5 mg/kg ont été testées en injection unique à J1.

Aucun de ces traitements ne réduit l'œdème induit par la bléomycine [Fig. 29 C].

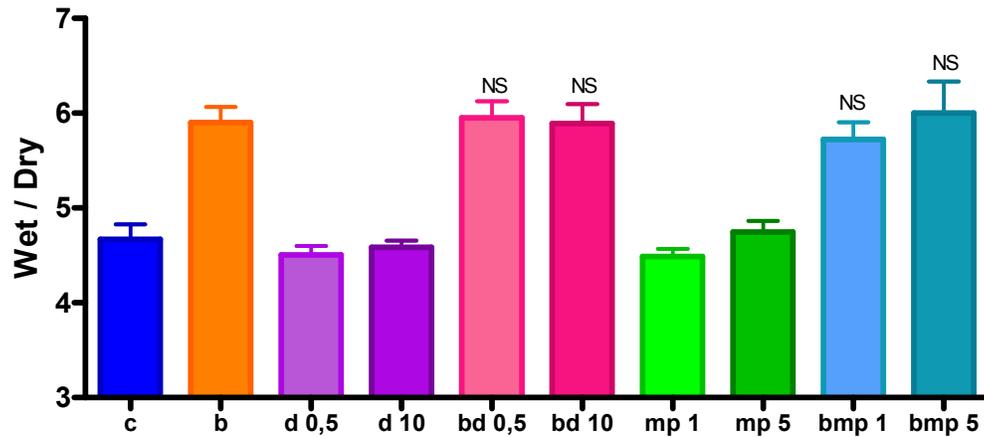


Fig. 29 C : Effet de la dexaméthasone ou du méthylprednisolone sur l'œdème du modèle bléomycine murin

Les souris sont instillées intra-trachéalement (i.t.) à J1 avec du salin (0,9%) ou de la bléomycine (4U/kg) [b], et injectées (i.p.) avec du salin (0,9%), du dexaméthasone (0,5 ou 10 mg/kg) [d0.5 ou d10] ou du méthylprednisolone (1 ou 5 mg/kg) [mp1 ou mp5]. Le poids des poumons post-nécropsie et après 24h à 95°C, est calculé, permettant de mesurer le ratio Wet/Dry. (NS vs bléomycine ; $n = 4-10$ par condition)

1.4 Les lésions tissulaires

L'histologie des poumons des souris a été observée 7 jours après l'instillation de solution saline (c), de bléomycine (b), et/ou l'injection de dexaméthasone (d). Les photos sont prises à un grossissement 20x.

Il est constaté qu'en présence de bléomycine avec ou sans dexaméthasone, les alvéoles présentent un dépôt de fibrine, un infiltrat leucocytaire et érythrocytaire, et l'épithélium bronchique semble fortement endommagé par rapport aux souris instillées à la solution saline ou au dexaméthasone seul [Fig. 30 A].

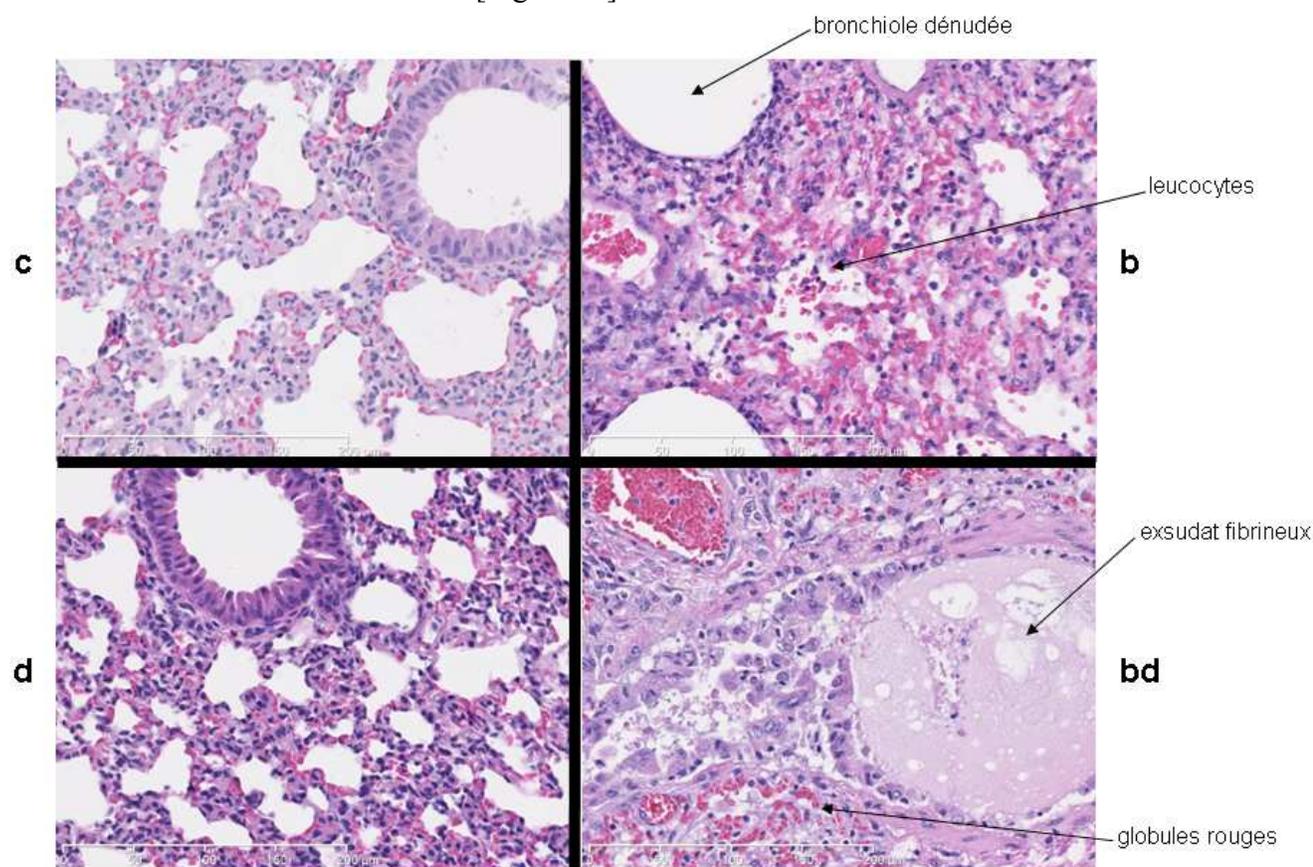


Fig. 30 A : Histologie des souris WT Les souris sont instillées intra-trachéalement (i.t.) à J1 avec du salin (0,9%) ou de la bléomycine (4U/kg) [b], et injectées (i.p.) avec du salin (0,9%) ou du dexaméthasone (0,5 mg/kg/jour) [d], à J1, pour 7 jours. Les animaux ont été euthanasiés par surdose d'anesthésique à J7. Les poumons ont été fixés avec de la paraformaldéhyde 4% et conservés à 4°C. La technique d'histologie a été réalisée à l'IRIC. Les photos sont faites avec un grossissement 20x, à l'aide d'une coloration hématoxyline éosine.

Les coupes histologiques ont été analysées à l’aveugle par un anatomo-pathologiste. Il a déterminé la présence ou absence de 6 paramètres permettant d’établir l’ALI. Les paramètres sont : hémorragie intra-alvéolaire, atypie régénérative / karyomégalocytes, cellules alvéolaires atypiques / débris cellulaires, œdème / congestion, exsudat bronchique et exsudat fibrineux / membrane hyaline. La somme des souris portant l’un ou plusieurs de ces paramètres permet d’évaluer quel type de traitement induit des caractéristiques typiques de l’ALI. On peut constater que la bléomycine induit plus de lésions caractéristiques de l’ALI que les conditions contrôle et dexaméthasone, et que ce dernier ne semble pas pouvoir renverser l’effet de la bléomycine [Fig. 30 B].

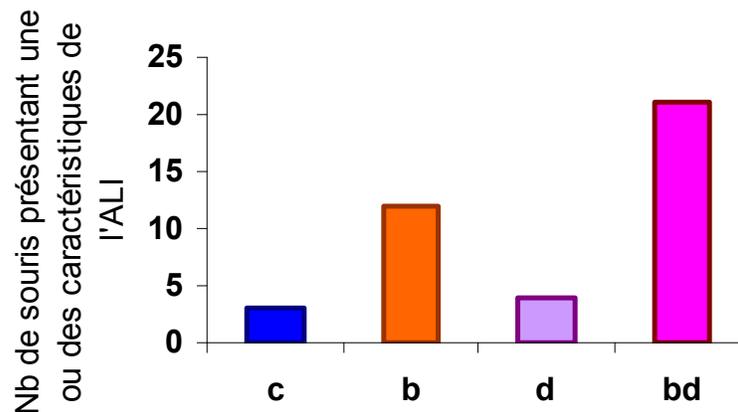


Fig. 30 B : Effet du dexaméthasone sur la sévérité des lésions du modèle bléomycine murin
 Les souris sont instillées intra-trachéalement (i.t.) à J1 avec du salin (0,9%) ou de la bléomycine (4U/kg) [b], et injectées (i.p.) avec du salin (0,9%) ou du dexaméthasone (0,5 mg/kg/jour) [d], à J1, pour 7 jours. Les animaux ont été euthanasiés par surdose d’anesthésique à J7. Les poumons ont été fixés avec de la paraformaldéhyde 4% et conservés à 4°C. La technique d’histologie a été réalisée à l’IRIC. L’analyse a été faite à l’aveugle par un anatomo-pathologiste, qui a détecté la présence ou l’absence de 6 critères présents lors de l’ALI. ($n = 6$ par condition)

1.5 L'inflammation

Dans le lavage broncho-alvéolaire, la concentration en protéine (qui est un indice de la perméabilité membranaire), le dosage du TNF α et le décompte des leucocytes ont été faits.

La concentration protéique dans le BAL est augmentée en présence de bléomycine accompagnée ou non de dexaméthasone ($p \leq 0,05$). Il n'y a aucune différence dans la concentration protéique du BAL suite au traitement à la bléomycine en absence ou en présence de dexaméthasone au jour 7 [Fig. 31 A].

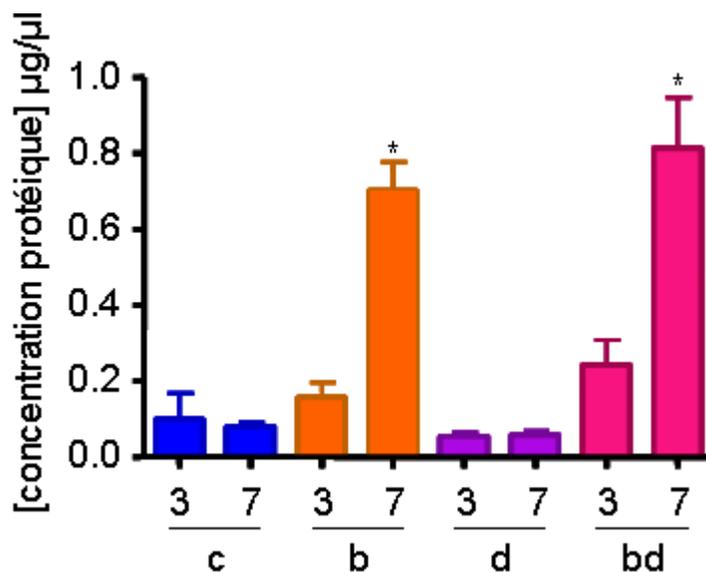


Fig. 31 A : Effet du dexaméthasone sur la concentration protéique du BAL du modèle bléomycine Les souris sont instillées intra-trachéalement (i.t.) à J1 avec du salin (0,9%) ou de la bléomycine (4U/kg) [b], et injectées (i.p.) avec du salin (0,9%) ou du dexaméthasone (0,5 mg/kg/jour) [d], à J1, pour 3 ou 7 jours. Le BAL a été fait à l'aide de 6 répétitions de l'instillation de 1 ml de salin. La concentration protéique a été analysée dans le surnageant du BAL suite à l'élimination des cellules par centrifugation. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $n = 5-6$ par condition)

La concentration de $\text{TNF}\alpha$ dans le BAL est augmentée en présence de bléomycine ($p \leq 0,05$). Le dexaméthasone, seul, n'a pas d'effet. En combinaison avec la bléomycine, il diminue l'augmentation du $\text{TNF}\alpha$ dans le BAL due à cette dernière ($p \leq 0,05$) [Fig. 31 B]. Le dexaméthasone a donc un effet anti-inflammatoire précoce, i.e. J3.

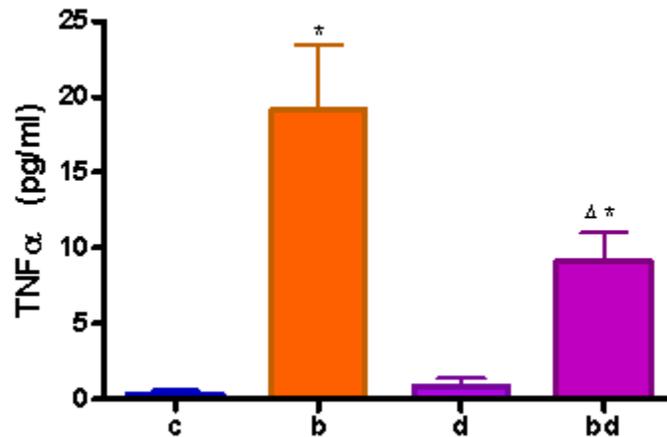


Fig. 31 B : Effet du dexaméthasone sur la concentration en $\text{TNF}\alpha$ du BAL du modèle bléomycine Les souris sont instillées intra-trachéalement (i.t.) à J1 avec du salin (0,9%) ou de la bléomycine (4U/kg) [b], et injectées (i.p.) avec du salin (0,9%) ou du dexaméthasone (0,5 mg/kg/jour) [d], à J1, pour 3 jours. Le BAL a été fait à l'aide de 6 répétitions de l'instillation de 1 ml de salin. La concentration en $\text{TNF}\alpha$ a été analysée dans le surnageant du BAL suite à l'élimination des cellules par centrifugation. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $\Delta \leq 0.05$ b vs bd ; $n = 6$ par condition)

Enfin, le décompte des leucocytes présents dans le BAL a été évalué aux jours 3 et 7.

Les éosinophiles, ni les lymphocytes ne présentent de différence significative, sauf pour les éosinophiles concernant le co-traitement bléomycine-dexaméthasone. Les profils des neutrophiles et des macrophages sont inversés. En effet, les neutrophiles sont significativement plus élevés ($p \leq 0.05$) pour les souris traitées à la bléomycine sans ou avec dexaméthasone à jour 3 et 7. Tandis que les macrophages sont significativement plus faibles ($p \leq 0.05$) à jour 3 et 7 [Fig. 31 C].

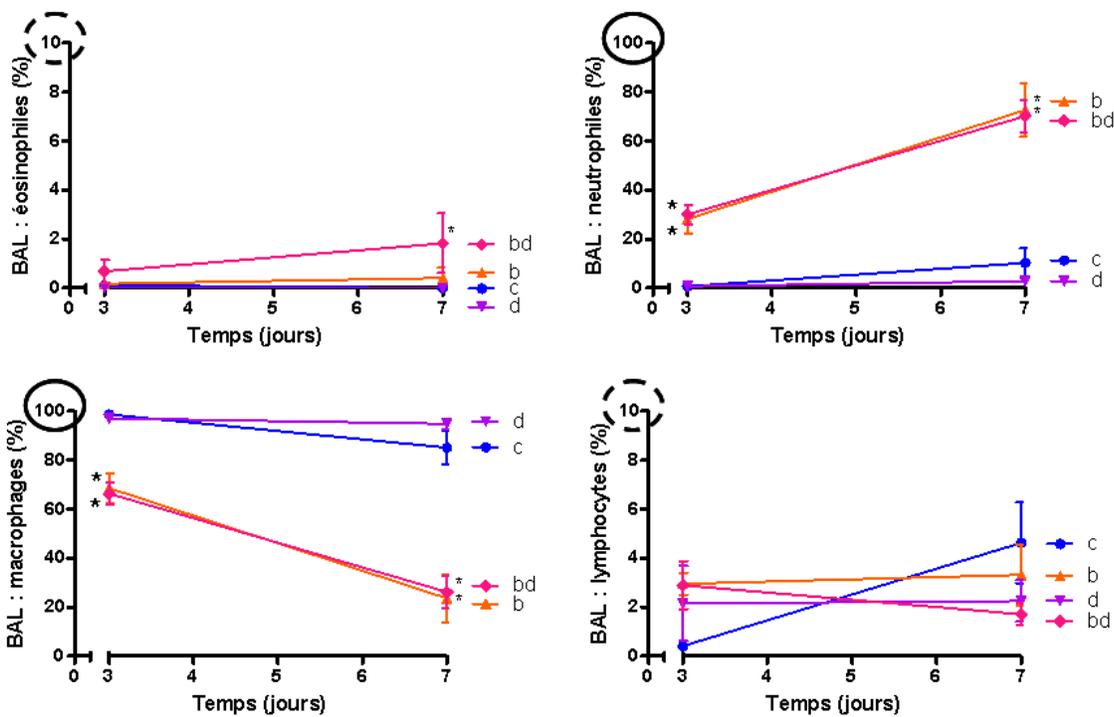


Fig. 31 C : Effet du dexaméthasone sur l'infiltration leucocytaire du modèle bléomycine Les souris sont instillées intra-trachéalement (i.t.) à J1 avec du salin (0,9%) ou de la bléomycine (4U/kg) [b], et injectées (i.p.) avec du salin (0,9%) ou du dexaméthasone (0,5 mg/kg/jour) [d], à J1, pour 3 ou 7 jours. Le BAL a été fait à l'aide de 6 répétitions de l'instillation de 1 ml de salin. Le décompte leucocytaire a été fait à partir du culot cellulaire recueilli suite à la centrifugation. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $n = 5-7$ par condition)

Note : les cercles en trait pointillé montrent une échelle de 10, les cercles en trait plein une échelle de 100.

2 Réponse au dexaméthasone *in vitro*

2.1 Les processus modulant la réparation épithéliale

Le SDRA est un syndrome dont l'une des étapes majeures est le développement des lésions pulmonaires (voir Introduction § A.4). Au niveau alvéolaire, les AT II ont la charge de restaurer l'architecture normale des alvéoles (voir Introduction § C.3.2).

Le modèle bléomycine permet de reprendre la caractéristique inflammatoire et d'évaluer son impact sur les processus de réparation (migration, prolifération, différenciation).

2.1.1 La fermeture des plaies

La fermeture de plaies sur AT II en condition contrôle a tout d'abord été étudiée [Fig. 32 A et B].

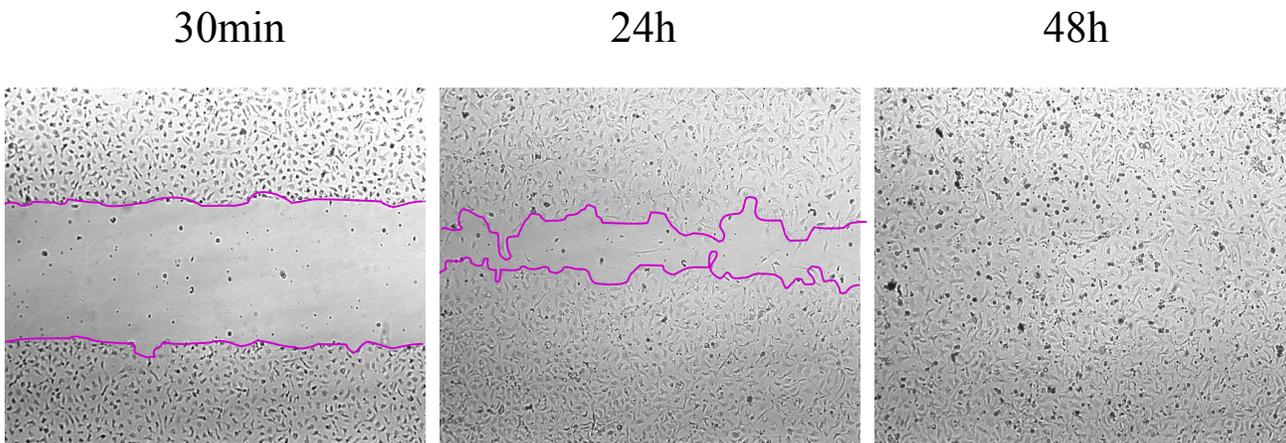


Fig. 32 A : Modèle de fermeture de plaies sur une monocouche de AT II, en condition contrôle, aux temps 30min, 24h et 48h

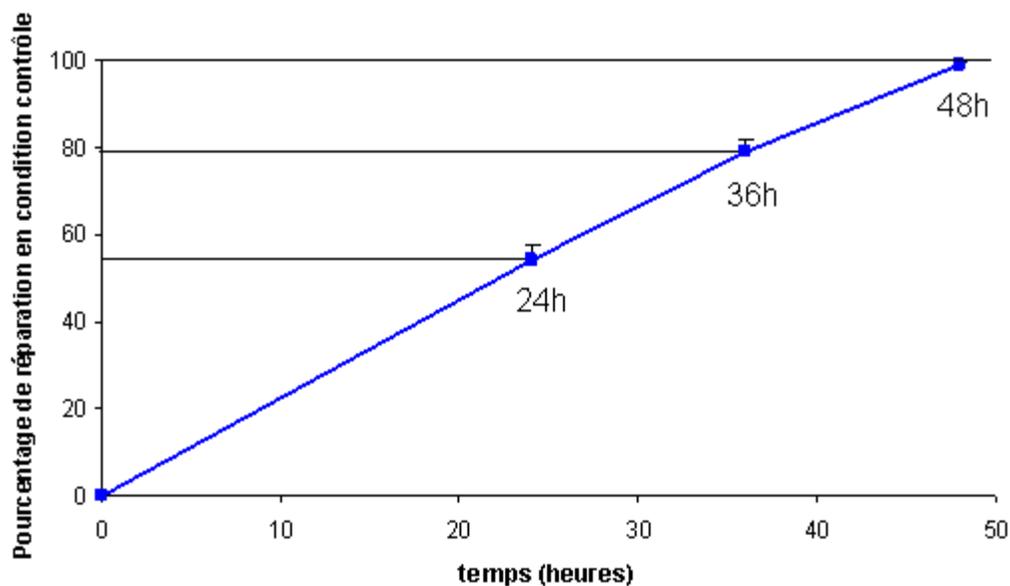


Fig. 32 B : Fermeture de plaies en condition contrôle sur les AT II
À 24 h, les cellules AT II ferment la plaie de 54%, et de 98% à 48 h.

La bléomycine inhibe la fermeture des plaies de façon dose et temps dépendants ($p \leq 0,05$) [Fig. 33 B].

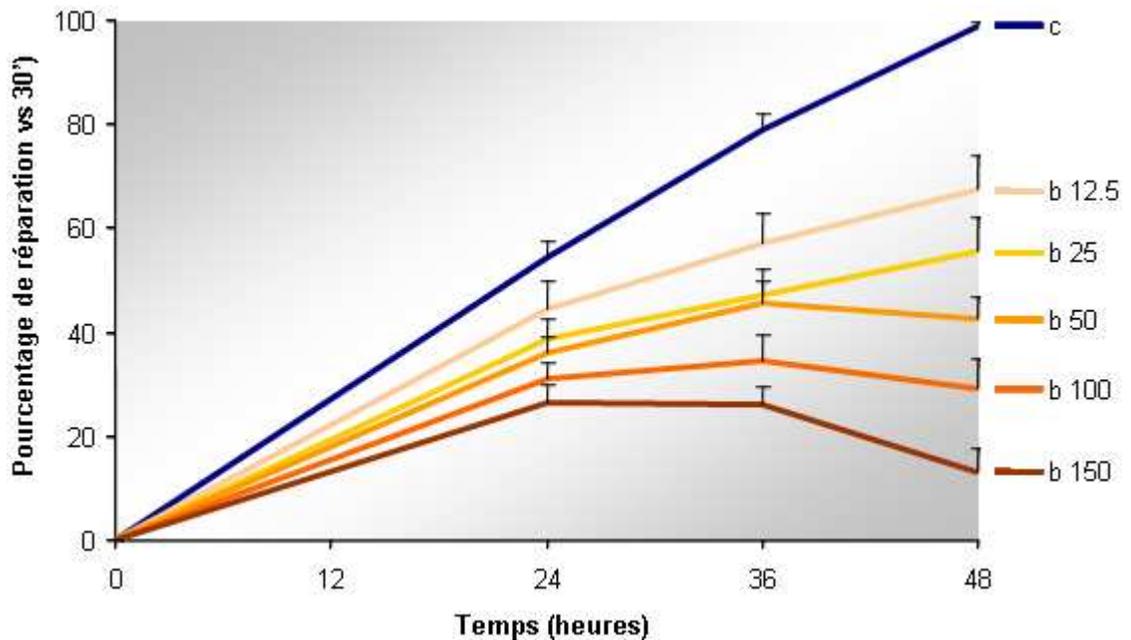
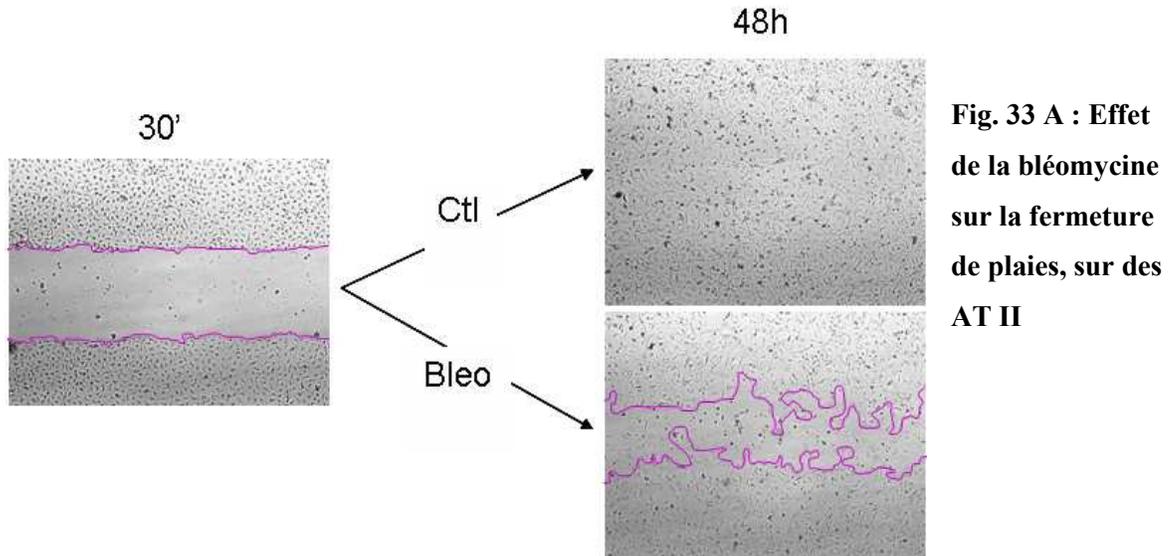


Fig. 33 B : Effet de doses croissantes de bléomycine sur la réparation des plaies mécaniques sur des AT II Une monocouche de AT II en culture primaire, a été lésée mécaniquement. Différentes doses de bléomycine [b] ont été ajoutées au moment de la lésion (12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 150 mU/ml). La réparation des plaies a été mesurée après 24, 36 et 48h ($n=8$ par condition).

Le stress oxydant (Geiser T, *et al.*, 2004), mais aussi les glucocorticoïdes (Beule AG, *et al.*, 2008, Gupta A, *et al.*, 1997, Nguyen MD, *et al.*, 2000, Wadsworth SJ, *et al.*, 2006), influencent la reconstruction de l'épithélium lésé. *In vitro*, en pré-traitement sur AT II, le dexaméthasone permet de vérifier s'il est possible d'empêcher, au moins partiellement, l'effet délétère de la bléomycine sur la réparation.

Dans cette série d'expériences, en condition contrôle [c], la fermeture des plaies est de 75% à 24h et de 100% à 48h. Elle est donc croissante dans le temps ($p \leq 0.05$). La bléomycine inhibe la fermeture des plaies à 24 et 48h ($p \leq 0.05$). D'autre part, le dexaméthasone inhibe la fermeture des plaies à 24h et en présence de bléomycine augmente l'inhibition de fermeture due à la bléomycine, quelque-soit le temps étudié ($p \leq 0.05$) [Fig. 34].

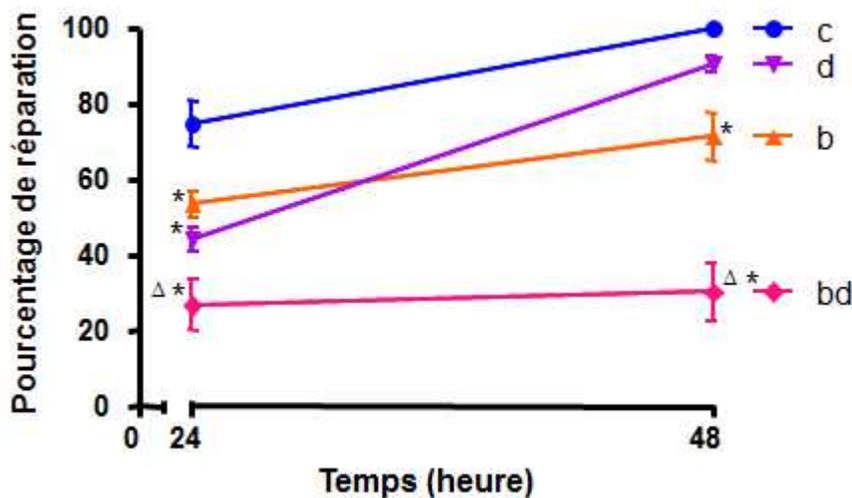


Fig. 34 : Effets de la bléomycine et du dexaméthasone sur la réparation des plaies mécaniques sur des AT II Une monocouche de AT II en culture primaire, a été lésée mécaniquement. Le dexaméthasone (100 nM) [d] a été ajouté 24h avant les lésions et renouvelé le jour des lésions. La bléomycine (50 mU/ml) [b] a été ajoutée au moment de la lésion. La réparation des plaies a été mesurée après 24 et 48h. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $\Delta \leq 0.05$ b vs bd ; $n = 6$ par condition)

2.1.2 L'apoptose

L'inhibition de la réparation des plaies en présence de dexaméthasone pourrait être liée à l'induction de l'apoptose. En effet, il a été montré que les glucocorticoïdes peuvent induire l'apoptose des cellules des voies aériennes (Dorscheid DR, *et al.*, 2006). L'effet de la bléomycine et/ou du dexaméthasone en absence ou en présence de plaies mécaniques a été estimé par dosage luminescent des caspases 3/7. L'absence ou la présence de plaies n'induit pas de différence significative dans l'induction des caspase 3/7. Comme attendu, la bléomycine induit l'activation des caspases 3/7 ($p \leq 0.05$), ce qui n'est pas le cas du dexaméthasone. Le dexaméthasone inhibe partiellement l'effet de la bléomycine, mais uniquement en absence des plaies ($p \leq 0.05$) [Fig. 35].

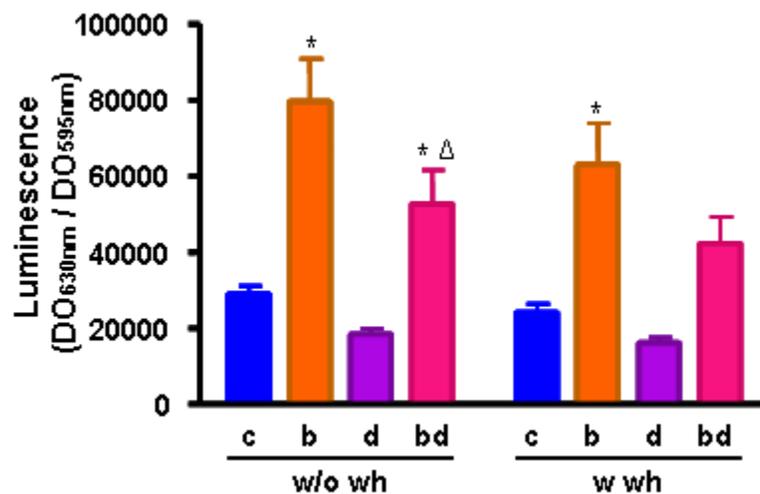


Fig. 35 : Effets de la bléomycine et du dexaméthasone sur l'apoptose des AT II L'apoptose est estimée par la mesure du ratio DO 630nm sur DO 595nm chez les AT II en culture primaire, en absence [w/o wh] ou en présence [w wh] de plaies mécaniques, à 24h. Elle est comparée dans des conditions contrôle [c], bléomycine (50mU/ml) [b] et/ou dexaméthasone (100nM) [d]. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $\Delta \leq 0.05$ b vs bd ; $n = 10$ par condition)

Afin de vérifier que les modulations des caspases 3/7 appartiennent bien au registre de l'apoptose et non de l'inflammation (Lamkanfi M, *et al.*, 2010), l'induction de l'apoptose par la bléomycine a été vérifiée par le dosage des nucléosomes dans les cellules (apoptose) et le milieu de culture (nécrose). La bléomycine induit de l'apoptose ($p \leq 0.05$) et pas de nécrose à une dose de 50 mU/ml [Fig. 36A].

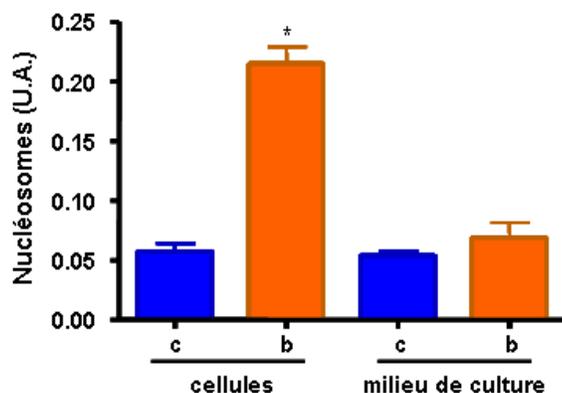


Fig. 36 A : Effet de la bléomycine sur l'apoptose des AT II L'apoptose est estimée par la mesure de la DO 490nm chez les AT II en culture primaire, à 24h. Elle est comparée dans des conditions contrôle [c], bléomycine (50mU/ml) [b]. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $n = 3$ par condition)

Nous avons ensuite observé qu'en présence de l'inhibiteur général des caspases, le z-Vad-FMK, l'induction des caspases 3/7 par la bléomycine est bien inhibée [Fig. 36B]. Par contre, le z-Vad-FMK n'inhibe pas la fermeture des plaies induites par la bléomycine, au contraire [Fig. 36C].

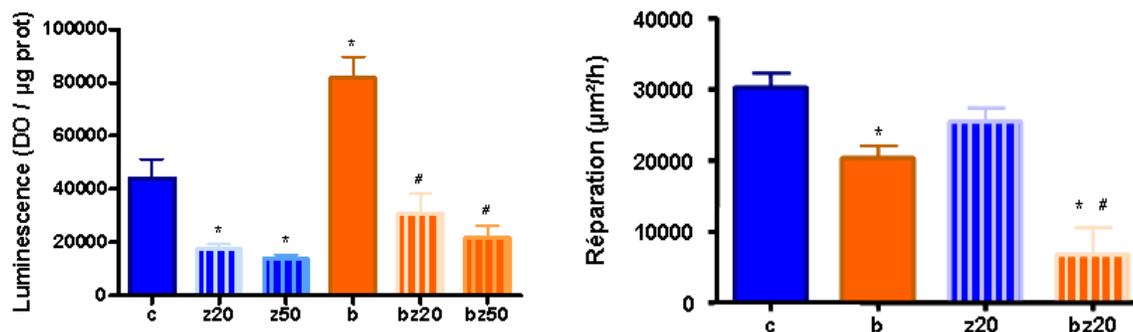


Fig 36 B / C : (B) Effets de la bléomycine et du z-Vad-FMK sur l'apoptose des AT II L'apoptose est estimée par la mesure du ratio DO 630nm sur DO 595nm chez les AT II en culture primaire, à 24h. Elle est comparée dans des conditions contrôle [c], bléomycine (50mU/ml) [b] et/ou z-Vad-FMK (20 -50 µM) [z20-z50]. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; # ≤ 0.05 b vs bz20 ou bz50 ; $n = 6$ par condition). **(C) Effet de l'inhibiteur général des caspases sur les plaies en présence de bléomycine** Une monocouche de AT II en culture primaire, a été lésée mécaniquement. La bléomycine (50 mU/ml) [b] et ou le z-vad (20 µM) ont été ajoutés au moment de la lésion. La réparation des plaies a été mesurée après 24h. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; # ≤ 0.05 bz20 vs z20 ; $n = 6-14$ par condition).

2.1.3 L'adhésion

L'inhibition de la fermeture des plaies induites par le dexaméthasone ne semble pas liée à l'induction de l'apoptose. Une autre cause à cet effet néfaste pourrait être l'augmentation de l'adhésion des cellules à leur substrat. L'évaluation de l'adhésion a été faite par modification de celle développée par Dre Ware (Atabai K, *et al.*, 2002). Le calcul est le suivant :

$$\frac{\text{cellules attachées}}{(\text{cellules attachées} + \text{cellules détachées})}$$

Le dexaméthasone augmente l'adhérence des cellules AT II ($p \leq 0.05$) [Fig. 37].

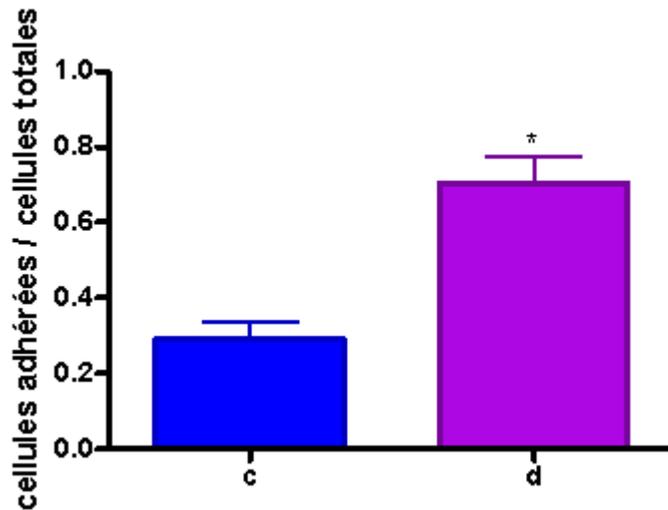


Fig. 37 : Effet du dexaméthasone sur l'adhésion des AT II L'adhésion est estimée par la mesure du rapport cellules adhérentes / cellules totales des AT II en culture primaire, suite à 24h de traitement. Elle est comparée dans des conditions contrôle [c] et dexaméthasone (100 nM) [d]. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $n = 6$ par condition)

2.1.4 La prolifération

L'inhibition de la réparation pourrait être liée à une modification du degré d'adhésion cellulaire. Cependant, cette inhibition pourrait aussi être due à l'inhibition de la prolifération. L'effet de la bléomycine et/ou du dexaméthasone a été évalué par l'incorporation de thymidine ^3H .

La bléomycine inhibe la prolifération des AT II de 70% ($p \leq 0.05$). Par contre, le dexaméthasone augmente la prolifération des AT II de 41% ($p \leq 0.05$). Toutefois le dexaméthasone ne peut renverser l'effet inhibiteur de la bléomycine (NS) [Fig. 38].

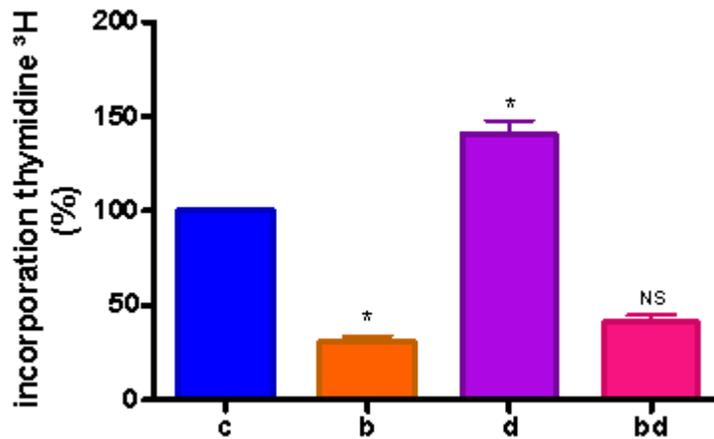


Fig. 38 : Effets de la bléomycine et du dexaméthasone sur la prolifération des AT II

La prolifération est estimée par la mesure de l'incorporation de thymidine tritiée dans les AT II en culture primaire, sous-confluente. L'incorporation de thymidine ^3H est dosée à 24h. Elle est comparée dans des conditions contrôle [c], bléomycine (50mU/ml) [b] et/ou dexaméthasone (100nM) [d]. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; NS b vs bd ; $n = 8$ par condition)

DISCUSSION

Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) est un ensemble de symptômes se développant suite à une atteinte pulmonaire directe (intra-pulmonaire) ou indirecte (par le système vasculaire). Le développement comporte trois phases : aiguë ou exsudative, fibroproliférative et fibrosante. Je me suis particulièrement intéressée à la phase exsudative d'un SDRA d'origine directe. Cette phase se caractérise par l'infiltration d'un exsudat d'origine plasmatique conduisant à un œdème protéiné associé à l'inflammation suite aux lésions créées à l'épithélium par un élément exogène. L'œdème est associé à une infiltration de leucocytes, macrophages puis neutrophiles. La persistance des leucocytes participe à l'inflammation qui accentue les dommages de la barrière alvéolo-capillaire, créant ainsi une boucle rétroactive lésionnelle (Voir Introduction § C.4).

La phase aiguë présente donc trois aspects sur lesquels il est possible d'intervenir : l'œdème, les lésions et l'inflammation. Nous avons étudié la modulation de l'œdème et le traitement de l'inflammation dans des modèles *in vivo* de la phase aiguë du SDRA et *in vitro*.

A) Évaluation de l'importance du canal ENaC lors de la phase aiguë du SDRA

1 Rationnelle

Il est connu que la clairance des fluides alvéolaires se fait à l'aide de canaux ioniques présents aux membranes des cellules alvéolaires. Ils permettent un flux ionique et aqueux en direction des capillaires pulmonaires. Parmi les canaux impliqués, le canal sodique ENaC a pu être étudié à l'aide notamment d'un modèle de souris transgéniques pour ce canal. Les souris sont KO pour la sous-unité α ENaC, dont la présence et la fonctionnalité sont partiellement rétablies par l'ajout d'un transgène de α ENaC sur le chromosome X (Tg) (Hummler E, *et al.*, 1997). L'ajout du transgène est indispensable car les souris KO pour α ENaC décèdent de détresse respiratoire dans les 40 premières heures suivant leur

naissance (Hummler E, *et al.*, 1996). Ce modèle a permis de démontrer que ENaC est indispensable à l'élimination des fluides pulmonaires lors de la naissance (Hummler E, *et al.*, 1996). De plus, la réduction de la fonction du canal ENaC dans ce modèle implique une sensibilité au développement d'un œdème qui persiste dans le temps suite au traitement par la thiourée, un agent œdémateux (Egli M, *et al.*, 2004). Fort de cette connaissance et puisque la phase exsudative du SDRA comporte un œdème, nous avons émis l'hypothèse que les souris Tg seraient plus sensibles à l'induction de cette phase du SDRA par la bléomycine.

Parmi divers modèles d'étude du SDRA, le modèle de la bléomycine a été choisi car il permet la création d'un stress oxydant induisant des lésions épithéliales associées au développement d'un œdème et de l'inflammation, suivis de la mise en place de la fibrose (Goto H, *et al.*, 2010, Matute-Bello G, *et al.*, 2008). La bléomycine est une molécule qui en induisant le clivage de l'ADN, conduit à la formation de radicaux oxydants. En bref, la bléomycine forme un réactif oxydatif avec le fer et l'oxygène, lui permettant de s'insérer dans la double-hélice d'ADN, provoquant des ruptures de la chaîne d'ADN et la production de ROS (Voir Méthodologie § A.2.1).

Le traitement à la bléomycine de ces animaux Tg et de leur contrôle, les souris WT, a permis l'étude comparative du développement de la phase exsudative du SDRA en matière d'œdème, de lésions, et d'inflammation.

2 Interprétation et discussion de nos résultats

Avant tout, il nous a fallu vérifier l'impact direct de la bléomycine sur l'activité du canal ENaC. En effet, si la bléomycine l'inhibait, la variation d'activité présente chez nos souris transgéniques serait masquée.

Des cellules épithéliales alvéolaires de rat en culture primaire, cultivées sur filtre, ont été montées en chambre de Ussing. Les cellules ne présentent pas de modification du courant amiloride-sensible ($10\mu\text{M}$; spécifique du canal ENaC à la dose utilisée) lors du traitement à la bléomycine [Fig. 20].

L'action de la bléomycine passe par la création de stress oxydant. Nous avons alors voulu vérifier si l'absence d'impact de la bléomycine est liée à une absence de production de stress oxydant. Cependant, nous n'avons pu en faire la mesure directe. D'autre part, l'impact du stress oxydatif sur l'activité de ENaC est controversé. En effet, il a pour le moment été démontré que la présence de H_2O_2 entraîne une réduction de l'ARNm et des protéines de la sous-unité alpha de ENaC dans certaines lignées pulmonaires (Xu H, *et al.*, 2007). Néanmoins, si l'intégrité d'une monocouche de AT II est effectivement altérée en présence de H_2O_2 , ce n'est que lorsque celui-ci est placé en basolatéral (Kim KJ, *et al.*, 1993). D'autre part, une étude plus récente sur le néphron montre que la présence de H_2O_2 augmente la probabilité d'ouverture, l'amplitude du courant d'un canal seul mais pas la conductance unitaire de ENaC (Ma HP, 2011). L'ensemble de ces études ne permet pas de conclure clairement de l'impact du stress oxydant sur l'activité du canal ENaC.

Nous avons alors décidé d'utiliser le DMNQ, qui interagit avec la chaîne respiratoire mitochondriale produisant des radicaux libres tel que $l'O_2^-$ et le H_2O_2 , et diminue la concentration intracellulaire de GSH. Tout comme la bléomycine, le DMNQ ne modifie pas le courant amiloride-sensible (voir Annexe 2), nous indiquant que ces molécules ne modifient probablement pas l'activité du canal ENaC par elles-mêmes.

L'ensemble de ces résultats indiquerait que si les résultats des études *in vivo* ne varient pas entre les souris WT et Tg, cette absence de variation ne sera pas due à l'inhibition de l'activité du canal ENaC par la bléomycine.

Afin de vérifier la sensibilité au développement de l'œdème pulmonaire de notre modèle de souris transgéniques, le traitement au *thiourée* utilisé par Dr Scherrer (Egli M, *et al.*, 2004), a été fait. En effet, les souris WT et Tg développent un œdème dès la 4^{ème} heure post-injection de thiourée. Cet œdème est significativement plus élevé, donc persistant, à la 7^{ème} heure chez les souris Tg [Fig. 21]. De plus, nous avons pu noter que suite à l'instillation de

salin, un œdème est significativement plus important chez les souris WT versus Tg [Fig. 24]. Ces résultats indiquent que notre modèle de souris transgéniques est bien sensible à l'induction de l'œdème. Ce qui nous a permis de procéder à la suite de l'étude.

Suite à l'instillation de bléomycine, les souris Tg montrent une tendance à la sensibilité par rapport aux souris WT. En effet, la perte de poids, l'œdème à J3 en présence de salin et la concentration en TNF α dans le BAL à J3 sont significativement différents entre les souris WT et Tg [Fig. 23-24 et 26B]. Cependant, les résultats de mortalité à J12, et ceux d'œdème (Wet/Dry) et d'inflammation (BAL : protéines, leucocytes) à J7 sont les mêmes chez les souris WT et Tg, lorsque traitées à la bléomycine [Fig. 22-24-26A et C]. L'ensemble de ces résultats semblent contradictoire. En fait, ils indiquent que même si les souris Tg ont une sensibilité plus élevée au développement d'un œdème, cela n'induit pas une augmentation de la sensibilité à la bléomycine. En effet, la phase aiguë comporte certes la mise en place d'un œdème, mais aussi des lésions et de l'inflammation comme on peut le voir par les analyses histologiques [Fig. 25A].

Cependant, d'autres modèles d'animaux transgéniques ont montré une augmentation de sensibilité à la bléomycine. Ainsi, les souris *knock-out* pour l'apolipoprotéine SPA du surfactant qui a un rôle anti-microbien et participe au contrôle de la production de surfactant, conduit lors d'un traitement à la bléomycine, à une augmentation de la mortalité associée notamment à une augmentation de la perméabilité alvéolaire et de l'inflammation (neutrophiles, TNF α , KC et IL-1 β) (Goto H, *et al.*, 2010). De même, dans le modèle de souris déficiente pour le peroxiredoxin (Prx) I, qui est une enzyme anti-oxydante, la bléomycine induit une diminution de la survie associée à une augmentation de l'inflammation (TNF α , MIP-2, (*monocyte chemoattractant protein*) MCP-1) et de la fibrose, par rapport à leurs consœurs WT (Kikuchi N, *et al.*, 2011).

Cette différence d'impact par rapport à nos résultats pourrait s'expliquer par l'élimination totale du gène dans les modèles KO SPA et Prx, tandis que l'activité du canal ENaC est seulement réduite chez nos souris. Il a malheureusement été impossible de tester des souris KO pour le gène α -ENaC (puisque celles-ci décèdent

peu après la naissance ; (Hummler E, *et al.*, 1996)) et ainsi de déterminer l'impact d'une réduction forte de la clairance alvéolaire.

Cette différence d'impact pourrait aussi être expliquée par l'effet cumulatif de stress oxydant. En effet, les souris Prx KO ont, à l'état basal, un niveau de stress oxydant plus élevé que les souris WT qui se cumule à l'effet de la bléomycine. Les souris SP-A KO sont, elles-aussi plus sensibles à la présence de stress oxydant à l'état basal, puisque le SP-A est un puissant inhibiteur endogène de la peroxydation lipidique et de l'oxydation (Bridges JP, *et al.*, 2000). Par rapport à nos souris Tg, la sensibilité au stress oxydant présente chez les souris KO est un facteur pouvant expliquer la différence d'impact de la bléomycine.

L'absence d'augmentation de sensibilité à la bléomycine peut aussi être expliquée par le fait que le stress oxydant produit par la bléomycine induit des lésions de la barrière alvéolo-capillaire si importantes que la modulation des canaux ioniques permettant l'élimination de l'œdème est rendue *quasi* inefficace par le degré de détérioration des AT I et II. La réduction de l'activité, même du principal agent de régulation des flux alvéolaires, le canal ENaC, pourrait donc ne pas pouvoir modifier l'œdème induit par la destruction de la barrière alvéolo-capillaire.

En effet, une revue analyse que, suite à la présence de bléomycine dans un modèle animal ou chez l'homme, cette destruction de l'épithélium alvéolaire est liée à la nécrose des AT I et à l'altération de la différenciation des AT II qui conduit à leur métaplasie (Adamson IY, 1984). Elle relève aussi que les AT II à renouvellement lent (3j) seraient touchées pendant le cycle cellulaire, produisant alors des cellules anormales et mal différenciées, dont des cellules géantes binucléées, des cellules ciliées sans corps lamellaires, des cellules avec des microvilli ou encore des cellules squameuses. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ces anomalies seraient dues à une atteinte sévère et répétée de l'épithélium. Or, il se trouve que dans notre modèle bléomycine de phase aiguë du SDRA l'ensemble de nos animaux subissent non-seulement une atteinte initiale sévère, mais aussi une atteinte répétée, liée à la persistance de l'inflammation [Fig. 26 A et C]. Ces atteintes se reflètent sur l'état

lésionnel des poumons de nos souris [Fig. 25 A et B]. Nos données, bien que ne détaillant pas la structure fine des AT I et II, étayent l'hypothèse selon laquelle une atteinte sévère ou répétée de l'épithélium induit une destruction de la barrière alvéolo-capillaire telle que la modulation du canal ENaC ne puisse empirer le développement de la phase aiguë du SDRA induit par la bléomycine.

D'autre part, l'absence d'augmentation de sensibilité à la bléomycine peut aussi être expliquée par le fait que l'activité du canal ENaC pourrait être inhibée par la réponse inflammatoire induite suite à l'instillation de la bléomycine. *In vivo*, nous avons constaté à J3 la présence de la cytokine pro-inflammatoire TNF α [Fig. 26B]. *In vitro*, l'impact de la réponse inflammatoire sur l'activité du canal ENaC a pu être étudié en utilisant le TNF α . En effet, cette expérience a été réalisée par notre équipe dans un modèle de cellules épithéliales alvéolaires en culture lors d'une expérience de mesure du courant de court-circuit en chambre de Ussing. Il a été montré que le TNF α inhibe le courant sodique issu du canal ENaC (Dagenais A, *et al.*, 2004, Yamagata T, *et al.*, 2009). Ce résultat implique que l'activité de ENaC est inhibée en présence d'inflammation. Il est possible que cette inhibition, présente chez les souris WT et Tg, masque l'impact du transgène de ENaC. Cet impact de l'inflammation pourrait aussi expliquer pourquoi les beta-agonistes ne semblent pas pouvoir prévenir l'ALI (National Heart L, *et al.*, 2011) malgré des effets réducteurs sur la clairance alvéolaire (McGraw DW, *et al.*, 2001, Wang Y, *et al.*, 1999a) et l'inflammation (Johnson M, 2002).

Ainsi, nous pouvons postuler que même si les souris Tg révèlent une sensibilité importante au traitement aigu au *thiourée* et une certaine sensibilité au traitement à la bléomycine par rapport aux souris WT, cette sensibilité est masquée par la persistance de l'inflammation induite par la bléomycine chez les deux génotypes de souris. Ainsi, le contrôle de l'inflammation et *via* l'inflammation, de la réparation, pourrait permettre de ralentir le développement de la phase aiguë du SDRA.

3 Conclusion

Chez les patients, durant l'ALI/SDRA, la capacité à éliminer les fluides alvéolaires a été associée à une amélioration de l'oxygénation et une diminution de la ventilation mécanique (Matthay MA, *et al.*, 1990, Sartori C, *et al.*, 2002, Ware LB, *et al.*, 2001). Cependant, l'activation de mécanismes permettant l'amélioration du transport des fluides, ne semble pas suffisante pour réduire le développement du SDRA (National Heart L, *et al.*, 2011). En accord avec ces études, nos résultats obtenus dans le cadre d'un modèle de phase aiguë de SDRA direct induit par la bléomycine, indique que l'élimination de l'œdème devrait être envisagé une fois la membrane alvéolo-capillaire réparée et l'inflammation réduite à un niveau adéquat. En ce sens, une étude a montré que le KGF induisant la prolifération des AT II, augmente le transport des fluides qui peut être renforcé par l'ajout de stimulateur des transporteurs ioniques (agoniste β -adrenergique) (Wang Y, *et al.*, 1999a). L'atténuation des lésions tissulaires serait donc au moins aussi importante que l'activation des canaux ioniques favorisant la clairance alvéolaire et la réabsorption de l'œdème. D'autre part, la réparation des lésions tissulaires est retardée et/ou anormale en présence d'une inflammation persistante (Shimabukuro DW, *et al.*, 2003, Vaillant P, *et al.*, 1996). Un traitement visant à réduire l'inflammation pourrait donc être la cible première de tout traitement de la phase aiguë du SDRA.

B) Impact du traitement aux glucocorticoïdes sur la phase aiguë du SDRA

1 Rationnelle

Compte tenu de l'importance de restaurer l'intégrité de la barrière épithéliale pour la résolution du SDRA, des stratégies visant à favoriser la réparation épithéliale devrait être envisagée. Il existe toutefois une théorie décrivant l'inflammation (leucocytes et cytokines) comme cause de la persistance des lésions épithéliales, de l'œdème et de la baisse du

transport de l'oxygène (Chopra M, *et al.*, 2009, Weiland JE, *et al.*, 1986). Une des façons dont les neutrophiles (principaux leucocytes dans la phase aiguë du SDRA ; (Pittet JF, *et al.*, 1997)) induisent la persistance de ces lésions et leurs conséquences physiologiques, est leur migration massive à travers la membrane alvéolo-capillaire (Zemans RL, *et al.*, 2009). Les sécrétions d'élastase, de métalloprotéinases, de défensines et de ROS localement (Baker CS, *et al.*, 1999, Hogg JC, 1994, Kawano T, *et al.*, 1987) sont également des facteurs responsables des lésions épithéliales. Stimuler la réparation tissulaire, en présence d'une inflammation persistante, pourrait donc s'avérer inefficace. Le traitement de l'inflammation a donc été le prochain objectif de mes travaux.

Sachant que l'inflammation est un mécanisme utile à la défense de l'organisme, il est nécessaire de la réduire sans toutefois l'éliminer. En effet, l'inhibition totale des leukotriènes B4 lors du traitement de patients atteints de fibrose kystique par exemple s'est révélé néfaste, probablement en raison du rôle anti-microbien de ceux-ci (Konstan MW, *et al.*, 2005). De plus, l'inflammation a un rôle complexe, puisque qu'elle participe à la composante lésionnelle mais elle peut aussi à l'inverse stimuler certains mécanismes de réparation épithéliale. En effet, il a été montré que le TNF α , sur 24h et 48h, accélère la fermeture de plaies mécaniques sur des cellules des voies aériennes (Maille E, *et al.*, 2011). De plus, les cellules inflammatoires recrutées lors de la phase de réparation permettent l'élimination par phagocytose des débris cellulaires (Moodley Y, *et al.*, 2003) et la suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires dont le TGF β , essentiel à la prolifération des fibroblastes (Nakagome K, *et al.*, 2006). Toutefois l'importance des cellules immunitaires pour mener à bien la réparation est discutée (Martin P, *et al.*, 2005). Il est cependant certain que lorsque le processus inflammatoire persiste, il participe à l'augmentation des lésions et de la fibrose dans le syndrome ALI/SDRA (Martinet Y, *et al.*, 1996, Rocco PR, *et al.*, 2009), ainsi que dans la bronchiolite oblitérante (Borthwick LA, *et al.*, 2010), les allergies (Wenzel SE, *et al.*, 2002) ou encore l'asthme (Elovic AE, *et al.*, 1998). Compte tenu des rôles complexes de l'inflammation dans la défense contre les agresseurs, dans le développement de lésions épithéliales et dans les processus de

réparation, il est donc clair que les thérapies anti-inflammatoires devraient être étudiées finement avant de les administrer aux patients SDRA.

Les glucocorticoïdes, utilisés depuis les années 1960, sont parmi les médications anti-inflammatoires les plus efficaces pour le traitement de pathologies inflammatoires et immunes chroniques, dont l'asthme (Mikami R, *et al.*, 1966), l'arthrite rhumatoïde (Mathies H, *et al.*, 1967), la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (Korelitz BI, 1995), ainsi que les maladies auto-immunes (Zietz E, 1957). Cependant l'usage des glucocorticoïdes dans le traitement du SDRA est l'objet d'une forte controverse. En effet, une étude du Dr Meduri montre que le traitement au méthylprednisolone (1mg/kg/jour) donné avant le 14^{ème} jour d'apparition du SDRA, aurait un effet protecteur. Il a rapporté une réduction des marqueurs de l'inflammation systémique, des scores de dysfonction des poumons et d'autres organes, du temps de ventilation mécanique et de séjour en service de soins intensifs (Meduri GU, *et al.*, 2007). Drs Diaz, Calfee, Matthay, and Brower remettent au cause la validité de cette méta-analyse en raison de l'absence de randomisation de 3 des 8 études utilisées et de la pertinence de l'inclusion de 3 études cas-témoins dans cette méta-analyse. De plus, la méthode de méta-analyse employée n'utilisait pas des critères méthodologiques très robustes et il y avait un déséquilibre dans le nombre de sujets entre les groupes contrôle et traité aux stéroïdes rendant cette analyse critiquable (Meduri GU, *et al.*, 2011). D'autre part, ce même traitement, donné après le 14^{ème} jour, augmente le taux de mortalité des patients (Steinberg KP, *et al.*, 2006). Afin de contribuer à l'éclaircissement de cette controverse et parce que le dexaméthasone, glucocorticoïde synthétique, pourrait avoir un effet bénéfique sur chacun de ces trois paramètres : œdème, réparation, inflammation, nous l'avons utilisé pour le traitement de la phase aiguë du SDRA.

En effet, le dexaméthasone stimule la clairance alvéolaire en augmentant le transport de sodium, module les mécanismes de réparation épithéliales et sont anti-inflammatoires. Par exemple, ils peuvent stimuler la clairance alvéolaire en augmentant le transport de sodium (Noda M, *et al.*, 2003). En effet, ils agissent sur l'activité et l'expression du canal ENaC (Chow YH, *et al.*, 1999, Dagenais A, *et al.*, 2001, Sayegh R, *et al.*, 1999). D'autre part, les glucocorticoïdes ont des effets bénéfiques sur les mécanismes de la réparation épithéliale

des bronches (Rendina EA, *et al.*, 1992, Wadsworth SJ, *et al.*, 2006). Le traitement aux glucocorticoïdes pourrait donc être profitable immédiatement dans la réduction de l'inflammation, permettant indirectement la réparation de l'épithélium et à long terme l'élimination de l'œdème en agissant sur le canal ENaC.

Afin vérifier cette hypothèse, un traitement aux glucocorticoïdes (dexaméthasone ou méthylprednisolone) a été utilisé sur le modèle bléomycine de phase aiguë du SDRA avec des souris WT.

Le dexaméthasone est un glucocorticoïde de synthèse puissant (voir Méthodologie § A.3.1) utilisé comme traitement dans divers modèles d'ALI/SDRA en des doses allant de 0.01 mg/kg à 80 mg/kg avec des succès divers (Crisafulli C, *et al.*, 2006, Guney S, *et al.*, 2007, Noda M, *et al.*, 2003, Van den Steen PE, *et al.*, 2010, Wang XQ, *et al.*, 2008, Xu T, *et al.*, 2009). La dose de 0.5 mg/kg utilisée dans nos expériences découle de celle utilisée pour le traitement de rats dans une étude préalable faite au laboratoire sur la clairance liquidienne [Données non publiées]. Dans mon étude, le dexaméthasone a été injecté chaque jour car son temps de dégradation est d'environ 45h et que nos données chez le rat n'indiquent aucun effet si la dose n'est pas répétée après le jour 1 (voir Annexe 3).

Contrairement à nos résultats, une étude montre qu'une seule injection de dexaméthasone augmente la clairance alvéolaire basale chez le rat (Noda M, *et al.*, 2003). Il n'y a donc ni œdème, ni lésions de la barrière alvéolo-capillaire, ni inflammation comme c'est le cas dans le SDRA et dans notre modèle murin. Cependant, nous avons tout de même testé l'impact d'une dose seule de dexaméthasone, sachant qu'ainsi les possibles effets secondaires seraient atténués.

Dans les mêmes conditions que le dexaméthasone, nous avons aussi utilisé le méthylprednisolone (voir Méthodologie § A.3.2) afin de reproduire au plus près les travaux de Dr Meduri (Steinberg KP, *et al.*, 2006). Cela permet aussi de vérifier que nos résultats ne sont pas liés à un effet particulier du dexaméthasone, mais représenterait l'effet des glucocorticoïdes en général.

De plus, des doses plus élevées de ces deux glucocorticoïdes, en traitement quotidien ou unique à J1, ont été testées afin de confirmer les résultats que nous obtenions.

2 Interprétation et discussion de nos résultats

Nos données montrent que le traitement à la bléomycine induit une mortalité élevée (~ 80% à 12j) [Fig. 27], une perte de poids drastique (~ 15% à 7j et ~ 24% à 12j) [Fig. 28], le développement d'un œdème (Wet/Dry : c ~ 4,7 vs b ~ 5,7) [Fig. 29A], une augmentation de la perméabilité alvéolaire (concentration en protéines dans le BAL : c ~ 0,1µg/µl vs b ~ 0,7 µg/µl) [Fig. 31A] et de l'inflammation (concentration en TNFα dans le BAL : c ~ 0,5pg/ml vs b ~ 20 pg/ml ; pourcentage de neutrophiles dans le BAL : c ~ 10% vs b ~ 70 %) [Fig. 31 B et C]. Ces impacts physiologiques de la bléomycine sont caractéristiques de la phase aiguë du SDRA telle que décrite par Dr Matthay (Biondi JW, *et al.*, 1986). Les images histologiques en montrent un exemple frappant [Fig. 30A].

Nous avons pu malheureusement constater qu'aucun des paramètres mesurés : mortalité, variation de poids, œdème (Wet/Dry, histologie), lésions (histologie), inflammation (BAL : protéines, leucocytes) ne sont améliorés par le traitement aux glucocorticoïdes [Fig. 27-28-29-30A et B-31 A et C].

Seule la concentration en TNFα dans le BAL à trois jours est significativement diminuée de 52% [Fig. 31B]. Le dexaméthasone est en effet connu pour inhiber la production de TNFα (Waage A, *et al.*, 1988) et d'autres cytokines pro-inflammatoires (IL-1a (Kamberi M, *et al.*, 2002), IL-6 (Li YH, *et al.*, 2001), IL-8 (John M, *et al.*, 1998)). Cela signifie que le dexaméthasone initie bien un effet anti-inflammatoire, sur le niveau de TNFα, pendant la phase précoce. Il ne semble pas avoir d'impact à plus long terme, puisque cet effet disparaît à 7 jours (data not shown) et que le nombre de neutrophiles infiltrés augmente après 7 jours de traitement [Fig. 30A et 31C].

Il est à noter que le traitement au dexaméthasone seul induit une tendance non significative à la perte de poids qui devient significative en cas de co-traitement avec la bléomycine. Cette perte de poids a également été rapportée dans de précédents travaux effectués sur le rat (voir Annexe 4) ainsi que dans un modèle d'ALI dû aux

LPS (Wang XQ, *et al.*, 2008). Cela s'explique par un effet secondaire des glucocorticoïdes entraînant une augmentation du métabolisme glucidique (Pontremoli S, *et al.*, 1975) et protéique (Rannels SR, *et al.*, 1980), induisant ainsi une perte de poids (Beatty WW, *et al.*, 1971).

Afin de savoir si l'effet du dexaméthasone est généralisable aux glucocorticoïdes et puisque l'équipe du Dr Meduri a déterminé une amélioration de la survie des patients suite au traitement au méthylprednisolone, cette molécule a aussi été utilisée. Tout d'abord avec une concentration identique à celle utilisée chez les patients (1 mg/kg/jour) et injectée quotidiennement, nous avons constaté une absence d'amélioration du Wet/Dry lors du co-traitement avec la bléomycine [Fig. 29B]. Ceci est en accord avec les résultats sur le dexaméthasone et ceux de l'équipe de Dr Stewart (Langenbach SY, *et al.*, 2007). En effet, les auteurs ont montré que suite à l'instillation de bléomycine, le nombre de cellules et le niveau protéique restent inchangés dans le BAL suite au co-traitement au méthylprednisolone. De plus, les espaces alvéolaires sont élargis tandis que le déclin de la compliance pulmonaire est exacerbé avec ce même traitement (Langenbach SY, *et al.*, 2007).

Nous avons aussi testé une injection unique à J1 pour les deux glucocorticoïdes à deux doses différentes. À nouveau, les résultats ne diffèrent pas de ceux obtenus avec le dexaméthasone à faible dose chaque jour [Fig. 29C]. Ceci indiquerait que quelque-soit le glucocorticoïde employé, sa dose ou le nombre de fois qu'il est délivré, ce type de traitement ne contre pas l'impact de la bléomycine.

Cependant d'autres études faites avec le budesonide, un glucocorticoïde ayant un métabolisme rapide et une plus faible incidence systémique, montrent une diminution de l'inflammation (Babin AL, *et al.*, 2011) et même de la fibrose lorsque instillé intra-trachéalement (Kohno M, *et al.*, 2010). Cependant, les modèles utilisés dans ces études n'entraînaient pas un taux de mortalité élevé à court terme, indiquant un degré de lésions pulmonaires et d'inflammation inférieurs à ceux que nous observons. Ceci permet certainement au traitement d'être plus effectif quelque-soit le type de

glucocorticoïde utilisé. Néanmoins, ce traitement pourra être testé dans des expériences ultérieures.

Par ailleurs, dans un type de lésions induit par l'acide oléique chez le rat, le dexaméthasone et le méthylprednisolone réduisent l'inflammation et augmentent la compliance à J1 (Shiue ST, *et al.*, 1991). Cependant, à J3 et J7, le niveau de protéines dans le BAL est plus élevé en présence des stéroïdes et le retour à une compliance normale ne se fait qu'en absence de stéroïdes. Cette équipe indique que si la thérapie aux stéroïdes est bénéfique lors de la phase aiguë des lésions pulmonaires, elle devient néfaste lors de la phase de réparation. Ils émettent l'hypothèse qu'une inhibition du processus de réparation pourrait être en cause (Shiue ST, *et al.*, 1991).

Nos résultats montrent aussi que le dexaméthasone ne réduit pas la concentration de protéines dans le BAL suite à l'instillation de bléomycine [Fig. 31A]. Or une concentration protéique élevée peut être à la fois un indice d'inflammation et d'une perméabilité anormalement élevée de la membrane alvéolo-capillaire. De plus, d'autres études ont montré une altération des mécanismes de prolifération, différenciation et maturation des AT II *in vivo* lors de l'ajout de glucocorticoïdes (Smith LJ, *et al.*, 1981). Nous avons choisi de compléter nos travaux sur les glucocorticoïdes *in vivo*, par des études de réparation *in vitro* sur les cellules épithéliales alvéolaires en culture primaire, afin d'évaluer un possible impact de la bléomycine sur les mécanismes de réparation.

En accord avec notre hypothèse, nous avons observé que la bléomycine inhibe la fermeture des plaies mécaniques [Fig. 33]. On a pu constater *in vivo* que la bléomycine induit la présence d'inflammation [Fig. 30-31] qui elle-même conduit, à travers divers mécanismes dont l'apoptose, à augmenter les lésions (Chopra M, *et al.*, 2009). De plus, la bléomycine induit l'apoptose suite à l'activation du stress oxydant (Lee VY, *et al.*, 2005, Wallach-Dayana SB, *et al.*, 2006). Afin de vérifier si l'induction de l'apoptose par la bléomycine participerait à l'inhibition de la fermeture des plaies, la présence d'indices apoptotiques induits par la bléomycine a été vérifiée par le dosage des caspases 3/7 et des nucléosomes. Si la bléomycine induit effectivement

l'apoptose [Fig. 35-36A], cette apoptose ne participe pas à l'inhibition de la fermeture des plaies [Fig. 36B-C].

D'autre part, nos résultats montrent que le dexaméthasone inhibe, lui aussi, la fermeture des plaies mécaniques. De plus, il augmente aussi l'effet inhibiteur de la bléomycine [Fig. 34]. Cependant, il a été montré, sur cellules bronchiques, que si le dexaméthasone inhibe la fermeture des plaies, il l'améliore par contre lorsque ce sont des plaies répétées, modèle plus proche des plaies créées *in vivo* (Wadsworth SJ, *et al.*, 2006). Selon cette étude, le dexaméthasone semble avoir un effet bénéfique en cas de chronicité des lésions. Il est possible, bien que le type cellulaire soit différent, que le dexaméthasone puisse avoir un effet bénéfique en cas de plaies répétées dans notre modèle. Cependant, même si c'était le cas, nous avons pu constater, *in vivo*, dans notre modèle de phase aiguë du SDRA - i.e. chronicité des lésions – que cet effet bénéfique est absent [Fig. 30-31]. Cela indiquerait que même si les glucocorticoïdes ont un effet bénéfique *in vitro* en cas de chronicité des lésions, cet effet disparaît *in vivo*. La différence peut en être la présence de l'inflammation qui masquerait l'effet potentiellement bénéfique des glucocorticoïdes. En effet, une étude clinique montre que les glucocorticoïdes améliorent l'évolution postopératoire chez les patients subissant une ablation d'un fragment bronchique (Wadsworth SJ, *et al.*, 2006), donc sans inflammation chronique.

Outre cette hypothèse de l'inflammation qui masquerait les effets bénéfiques des glucocorticoïdes, l'impact du dexaméthasone sur divers mécanismes touchant ou participant à la réparation a aussi été exploré.

Comme cela a été fait pour la bléomycine, nous avons tout d'abord vérifié l'impact des glucocorticoïdes sur l'apoptose. Contrairement à la bléomycine, le dexaméthasone induit une diminution de l'apoptose en présence de bléomycine; significative en absence de plaies mécaniques [Fig. 35]. Cette dernière remarque peut indiquer deux événements. Il est possible que le dexaméthasone ne puisse renverser l'effet conjoint de la bléomycine et des plaies. Il est aussi possible qu'une partie de l'inhibition de l'apoptose est induite par les plaies elles-mêmes, puisque l'ensemble

des mesures d'apoptose en présence de plaies a une tendance plus faible. Cette induction se ferait par la sécrétion de facteurs de croissance ou l'augmentation de l'expression de leurs récepteurs (Trinh NT, *et al.*, 2008). Par ailleurs, il a déjà été montré dans un modèle de cellules A549 que le dexaméthasone induit l'expression d'un inhibiteur de l'apoptose hIAP-1, aussi connu comme cIAP2 (Wen LP, *et al.*, 1997), ce qui appuie nos résultats.

Puisque le dexaméthasone ne ralentit pas la fermeture des plaies en activant l'apoptose des cellules alvéolaires, nous avons alors vérifié son impact sur les mécanismes de la réparation. Plus spécifiquement, la réparation des lésions est assurée par différents mécanismes cellulaires dont la désadhésion, l'étalement des cellules saines, leur migration et prolifération, suivi de leur re-différentiation [Fig. 10]

Le degré d'adhésion a été mesuré en présence de dexaméthasone et montre une augmentation par rapport à la condition contrôle [Fig. 37]. Cet accroissement pourrait signifier que l'un des effets secondaires du dexaméthasone sur la fermeture des plaies passe par l'inhibition de la mobilité cellulaire. Ce type d'impact a été montré lors d'études sur le cancer montrant que l'augmentation de l'adhésion cellulaire réduit la migration et la formation de métastases (Piotrowicz RS, *et al.*, 2011). La capacité d'adhésion/désadhésion des cellules à la matrice extracellulaire (MEC) est dépendante de plusieurs familles moléculaires dont les protéines du cytosquelette et de la MEC (Akiyama SK, *et al.*, 1989, Doornaert B, *et al.*, 2003).

Nous avons étudié la modulation de plusieurs protéines cytosquelettiques. Notamment, la vinculine qui participe à la formation des points focaux d'adhésion en liant les micro-filaments d'actine et aux intégrines. Ainsi que la caldesmone dépendante de la concentration en calcium, qui régule les interactions actine-myosine. Et enfin, la gelsoline activée par la fixation de calcium, qui se lie au corps du filament (induisant une cassure) ou à son extrémité positive bloquant ainsi à la fois la

dépolymérisation et la repolymérisation de sous-unités d'actine. Physiologiquement, la gelsoline participe à l'inflammation pulmonaire chez l'homme (Oikonomou N, *et al.*, 2009) et est nécessaire à l'infiltration neutrophilique (Maniatis NA, *et al.*, 2009). Nos données préliminaires indiquent que le dexaméthasone ne module l'expression d'aucune de ces molécules (voir Annexe 5). Cependant, je n'ai pu mener à bout ce projet. En effet, l'immunofluorescence a été faite sur des cellules isolées. La modulation du cytosquelette doit être toute différente en présence de plaies sur une monocouche confluente (Crosby LM, *et al.*, 2011), et encore plus en présence de plaies sur des cellules différenciées poussées sur filtre. De plus, les western blot ont été réalisés à partir de cellules simplement traitées au dexaméthasone et non issues de la co-présence des plaies et du dexaméthasone. Afin de déterminer précisément l'implication probable des molécules du cytosquelette dans l'inhibition de la fermeture des plaies par le dexaméthasone, il faudra donc optimiser les conditions expérimentales.

La modification du degré d'adhésion pourrait aussi être liée à un effet sur les molécules de la matrice extracellulaire dont les *matrix metalloproteinases* (MMP). En effet, il a été montré que chez les patients ALI/SDRA les MMP-2, -8 et -9 sont élevées dans le BAL (Fligiel SE, *et al.*, 2006). Les MMP-1 et -3 sont plus rarement présentes mais associées à un taux de mortalité plus élevé (Fligiel SE, *et al.*, 2006). *In vitro*, l'inflammation modélisée par le TNF α , induit l'augmentation de la sécrétion de la MMP-9 et l'activité des MMPs des cellules bronchiques (Maille E, *et al.*, 2011). Un phénomène analogue se produit lors de l'administration de bléomycine. En effet, les cellules alvéolaires expriment MT1-MMP et activent la MMP-2 sur leur surface, leur permettant de s'allonger et de migrer (Kunugi S, *et al.*, 2001). De plus, il a été montré que la MMP-1 accélère le processus de réparation des

cellules épithéliales alvéolaires en diminuant l'adhésion et la rigidité cellulaire (Planus E, *et al.*, 1999), tandis que la MMP-9 est nécessaire à la fermeture des plaies (O'Kane CM, *et al.*, 2009). Or les glucocorticoïdes semblent réduire la production de MMP-2 et 9 dans le BAL lors d'un ALI induit par les LPS (Corbel M, *et al.*, 1999). L'ensemble de ces études laissent penser que les MMP sont impliquées dans la migration cellulaire potentiellement en modulant la capacité d'adhésion/désadhésion des cellules, et que les glucocorticoïdes pourraient modifier négativement cet équilibre.

Nous nous sommes ensuite penchés sur le mécanisme de la prolifération. Le dexaméthasone seul augmente la prolifération, et n'a pas d'effet inhibiteur supplémentaire à celui de la bléomycine en co-traitement [Fig. 38]. Cependant, des études *in vitro* et *ex-vivo* montrent une régulation négative de la prolifération dépendant de la concentration en glucocorticoïdes (Kinnard WV, *et al.*, 1994, Mouhieddine OB, *et al.*, 1996). Cet effet serait dû à un arrêt du cycle cellulaire (blocage de l'entrée des cellules épithéliales alvéolaires en phase S) par l'altération spécifique de l'activation du complexe de la cycline E-CDK2 et par l'induction de l'inhibiteur de CDK p21Cip1 (Corroyer S, *et al.*, 1997). De plus, une étude *in vivo* montre que l'effet des glucocorticoïdes sur la prolifération dépend du moment où ils sont administrés et de la dose injectée (Smith LJ, *et al.*, 1981). Cette étude indique aussi que des interactions semblent exister entre la prolifération, la différenciation et la maturation des AT II, suggérant que les agents qui influencent l'un de ces processus peuvent influencer tous les aspects du fonctionnement cellulaire. Cette influence du dexaméthasone sur la prolifération survient aussi lors du développement fœtal. Les voies d'activation de la prolifération, de la division et du cycle cellulaire sont inhibées, tandis que celles du métabolisme des carbohydrates, de l'activité des kinases et de la réponse immunitaire sont activées (Bird AD, *et al.*, 2007). Il semble que les processus de prolifération et différenciation ne puissent être

menés de front. Le fait que nos résultats expérimentaux ne concordent pas avec les études qui montrent un impact des glucocorticoïdes sur la prolifération (Kinnard WV, *et al.*, 1994, Mouhieddine OB, *et al.*, 1996, Smith LJ, *et al.*, 1981), pourrait s'expliquer par le fait que l'impact des glucocorticoïdes dépend du microenvironnement des cellules et de leur stade de différenciation. En effet, une étude indique que la densité cellulaire et l'exposition au sérum modifient la localisation et le fonctionnement des récepteurs aux glucocorticoïdes (Yang JQ, *et al.*, 2008). Il semble donc que même si dans notre modèle *in vitro* nous ne voyons pas d'effet sur la prolifération, cet impact n'est pas à exclure *in vivo*.

L'absence d'impact des glucocorticoïdes *in vivo*, étudié *in vitro* sous l'angle des mécanismes liés à la réparation, nous laisse penser que cette absence d'impact pourrait aussi être liée à une réduction de la réparation.

L'impact du dexaméthasone sur l'augmentation de la perméabilité alvéolaire [Fig. 31A] a donc été exploré du point de vue des mécanismes de réparation. Une autre voie de questionnement s'ouvre sur l'intégrité de la membrane alvéolo-capillaire personnalisée par la résistance cellulaire et la perméabilité.

Nous avons donc vérifié l'impact de la bléomycine et du dexaméthasone sur la résistance de cellules épithéliales alvéolaires en culture primaire. Nous avons pu constater une diminution de la résistance induite par le dexaméthasone (voir Annexe 5). Cependant d'autres équipes ont montré que les glucocorticoïdes

(1) participent à la formation des structures jonctionnelles (zonula occludens -1 pour les jonctions serrées et E-cadherin pour les jonctions adhérentes), permettant la polarisation des cellules, le développement d'une résistance et la réduction de la perméabilité lors d'une co-culture de NCI H441 (*human lung epithelial cell lines*) et de HPMEC (*primary human pulmonary microvascular endothelial cells*) (Hermanns MI, *et al.*, 2004),

(2) préservent l'intégrité épithéliale et réduit la perméabilité en réponse à des protéases ou des dommages mécaniques sur 16HBE14o- (*transformed*

epithelial cell line derived from normal human bronchial) (Salter M, *et al.*, 2007),

(3) augmentent la résistance des cellules épithéliales alvéolaires en culture primaire (Note personnelle de Dr Kwang-Jin Kim).

(4) n'altèrent pas la résistance des cellules des voies aériennes chez le lapin (Matheson M, *et al.*, 2004).

Si nos résultats *in vitro* sont différents par rapport à ceux des équipes des points (1) et (2), incriminant une différence de type cellulaire, de culture et/ou d'expérimentation, nos conditions sont exactement les mêmes que celles de Dr Kim (3) sauf peut-être en ce qui concerne le sérum utilisé. Je ne peux alors expliquer clairement cette différence. Par contre, lorsque l'on se déplace *in vivo*, on peut constater que le dexaméthasone ne modifie pas la résistance au point (4) tout comme il ne modifie pas notre perméabilité [Fig. 31A], ce qui est congruent. Quelques soient les résultats *in vitro*, ils ne représentent que partiellement les conditions *in vivo* où il y a présence d'inflammation, d'hypoxie et de stress oxydant, qui peuvent tous modifier l'impact des glucocorticoïdes.

Parmi les phénomènes que nous n'avons pas étudiés mais qui pourraient contribuer à la réduction de l'efficacité des glucocorticoïdes, il y a l'hypoxie. L'hypoxie réduit l'expression génique et protéique du récepteur alpha aux glucocorticoïdes de façon temps dépendante. De plus, l'hypoxie empêche les effets inhibiteurs du dexaméthasone sur la libération d'IL-8 induite par LPS (Huang Y, *et al.*, 2009). L'hypoxie secondaire au développement des paramètres d'ARDS pourrait donc réduire, voire empêcher l'action des glucocorticoïdes.

Le stress oxydatif est également un facteur majeur modulant la réparation (Tasaka S, *et al.*, 2008). Or, il a été montré au niveau des cellules alvéolaires que les effets toxiques d'un stress oxydatif sont augmentés lors d'un pré-traitement au dexaméthasone (Walther UI, *et al.*, 2009). La bléomycine étant elle-même à l'origine d'un stress oxydant, l'interaction avec les

glucocorticoïdes pourrait partiellement expliquer l'absence d'impact positif de ces derniers, puisque l'augmentation du stress oxydant pourrait masquer l'impact anti-inflammatoire du dexaméthasone. Un phénomène identique est retrouvé dans nos travaux puisque le dexaméthasone inhibe bien l'augmentation de TNF α dans le BAL induite par la bléomycine à J3 [Fig. 31B], tandis qu'à J7 le dexaméthasone ne peut renverser l'impact de la bléomycine sur l'infiltration protéique [Fig. 31A] et neutrophilyque [Fig. 31C]. Or chez l'ensemble des patients SDRA, peu importe l'origine du syndrome, il est retrouvé un degré élevé de stress oxydant (Kietzmann D, *et al.*, 1993, Metnitz PG, *et al.*, 1999, Quinlan GJ, *et al.*, 1996, Sittipunt C, *et al.*, 2001). Si le stress oxydant est responsable de l'absence d'effet positif des glucocorticoïdes à long terme, alors le traitement des patients devrait associer glucocorticoïdes et anti-oxydants. Cependant certains modèles de ALI/SDRA sont réceptifs aux glucocorticoïdes (Meduri GU, *et al.*, 2009, Wang XQ, *et al.*, 2008), posant la question de la validité de notre modèle bléomycine.

L'instillation intra-trachéale de bléomycine est un modèle direct de la phase aiguë du SDRA. Ce modèle, souvent employé, est facile à réaliser et à reproduire, il est bien standardisé et reproduit le développement de l'ALI/SDRA. La bléomycine induit une réponse inflammatoire, une nécrose des AT I, une hyperplasie des AT II, la mise en place de membranes hyalines, le développement d'une fibrose et le dépôt excessif de collagène (Brown RF, *et al.*, 1988, Thrall RS, *et al.*, 1979), mimant ainsi le développement de plusieurs pathologies pulmonaires dont le SDRA (Folkesson HG, *et al.*, 1998, Holley A, *et al.*, 2007, Shimabukuro DW, *et al.*, 2003). L'effet tardif de la bléomycine est fréquemment utilisé comme modèle fibrotique, cependant l'effet précoce peut aussi servir comme modèle de phase aiguë de l'ALI/SDRA (Borzzone G, *et al.*, 2001, Matute-Bello G, *et al.*, 2008). En effet, il a été démontré que suite à la création de lésions se développe une inflammation avec présence de cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, HMGB1) (Cheong SH, *et al.*, 2009, Jenkins RG, *et*

al., 2006, Li Q, *et al.*, 2002) et infiltration de cellules inflammatoires (neutrophiles) (Koshika T, *et al.*, 2005, Sharma SK, *et al.*, 1996). De plus, l'architecture alvéolaire présente un collapsus des alvéoles et un épaississement des septas inter-alvéolaires (Brown RF, *et al.*, 1988). Cependant, le principal inconvénient est que la pertinence physiologique de la bléomycine est souvent remise en question. L'argument étant que l'instillation de la bléomycine intratrachéale est un «stimulus écrasant» qui porte peu d'intérêt pour le milieu clinique (Matute-Bello G, *et al.*, 2008). Toutefois, notre modèle montre des caractéristiques conforme à l'analyse de la phase précoce du SDRA faite par Wiedemann HP et al (Biondi JW, *et al.*, 1986), qui nous ont convaincus de son efficacité. Ce modèle animal direct et précoce permet l'étude du développement de la phase aiguë du SDRA comprenant œdème, lésions et inflammation.

L'ensemble de ces données semble indiquer que l'origine de l'ALI/SDRA influencerait le type de stress oxydant et d'inflammation induits, modulant alors la réponse aux glucocorticoïdes.

3 Conclusion

Notre modèle de bléomycine mimant la phase aiguë du SDRA induit une inflammation et des lésions pulmonaires qui ne peuvent être réduits par le dexaméthasone. Selon les études menées par Dr Meduri, les glucocorticoïdes ont un effet bénéfique sur les patients lorsqu'administrés précocement, quand le SDRA est au début de son développement. De plus, d'autres études utilisant les glucocorticoïdes ont montré des effets variables (Van den Steen PE, *et al.*, 2010, Wang XQ, *et al.*, 2008, Xu T, *et al.*, 2009). Donc, l'usage des glucocorticoïdes ne semble pouvoir être généralisé sans prendre en considération plusieurs paramètres du SDRA (origine - stade - co-traitement).

C) Conclusion générale sur le traitement de la phase aiguë du SDRA

Traiter le SDRA en visant la modulation de la clairance alvéolaire ou le phénomène inflammatoire n'ont, d'après nos résultats, pas donné les bénéfices attendus. Nos résultats laissent entrevoir que la modulation de la clairance alvéolaire serait masquée par la chronicité des lésions épithéliales et l'inflammation, et que le traitement anti-inflammatoire aux glucocorticoïdes n'est pas toujours efficace. D'autre part, différents modèles employés pour modéliser le SDRA montrent des résultats variables suite au traitement aux glucocorticoïdes (Van den Steen PE, *et al.*, 2010, Wang XQ, *et al.*, 2008, Xu T, *et al.*, 2009). Ceci nous laisse supposer que ce n'est pas le fait de traiter l'inflammation qui est une cible inadéquate mais le type de traitement employé qui pourrait être plus ou moins judicieux. Parmi les causes rendant plus ou moins judicieux le traitement aux glucocorticoïdes, il y aurait l'hétérogénéité des sources du SDRA (Gattinoni L, *et al.*, 1998). En effet, notre modèle d'induction du SDRA à la bléomycine, celui modélisé par le virus H1N1 (Xu T, *et al.*, 2009) ou encore un modèle inflammatoire comparable comme celui de la pleurésie (Crisafulli C, *et al.*, 2006), le traitement anti-inflammatoire au dexaméthasone ne semble pouvoir résoudre le développement de l'inflammation. Par contre, les glucocorticoïdes se sont avérés bénéfiques dans des modèles de SDRA lié à la malaria (Van den Steen PE, *et al.*, 2010) et aux LPS (Wang XQ, *et al.*, 2008). Ces différences de réaction face au même type de traitement pourraient être dues à l'origine des lésions, qui engendrent des processus oxydants et inflammatoires potentiellement différents. Il a en effet été constaté que la réceptivité au traitement pour un surfactant manufacturé peut varier selon l'origine du SDRA (Bosma KJ, *et al.*, 2010), comme c'est aussi le cas pour un traitement à la prostaglandine I2 (Domenighetti G, *et al.*, 2001).

Il est aussi possible que le degré de redondance et de hiérarchie entre les mécanismes impliqués dans l'inflammation, mal compris, soient en cause. Le ciblage d'un seul élément de l'inflammation n'aurait alors pas ou peu d'impact. Comme il est possible de le voir dans

la figure 39, il y a sécrétion de plusieurs médiateurs de l'inflammation tels les cytokines et les ROS.

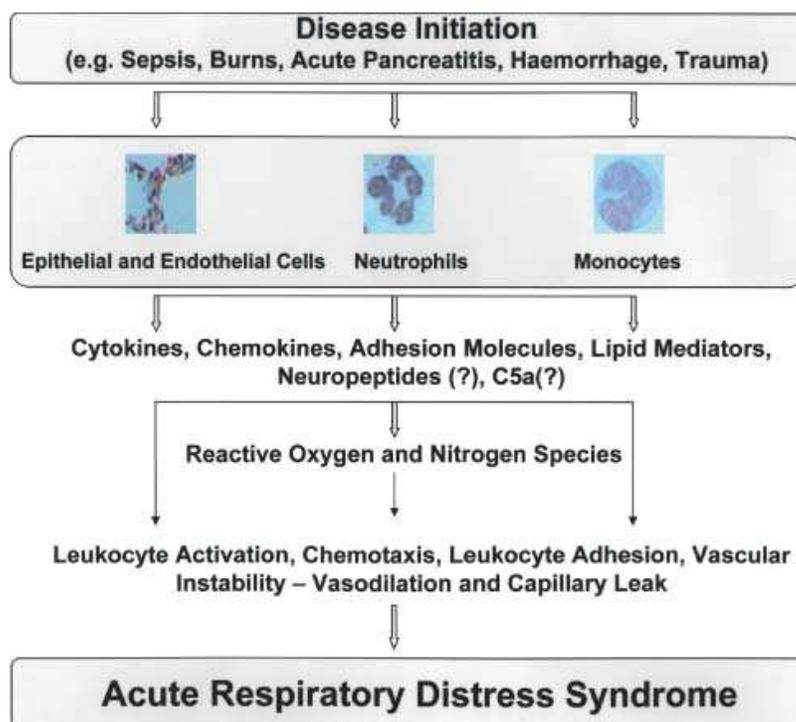


Figure 39 : Rôle des médiateurs inflammatoires dans la pathophysiologie du SDRA (Bhatia M, *et al.*, 2004)

Afin de palier à la redondance des mécanismes, la combinaison de plusieurs cibles majeures pourrait être une approche efficace pour réduire l'inflammation et ainsi permettre une réparation normale des tissus lésés (Bhatia M, *et al.*, 2004, Crimi E, *et al.*, 2004). En effet, certaines études sur des modèles de lésions pulmonaires montrent qu'un co-traitement est efficace, alors que les molécules prises séparément ont moins ou aucun effet bénéfique (Crisafulli C, *et al.*, 2006, Johnson M, 2002).

Dans une approche totalement différente, des études précliniques montrent l'efficacité des cellules souches mésenchymateuses dans la réduction des lésions pulmonaires dues aux endotoxines, à des bactéries, à la bléomycine ou encore l'hyperoxie; causes diverses de

SDRA. Certaines études révèlent que le traitement avec le milieu de culture de cellules souches mésenchymateuses a été aussi efficace que les cellules elles-mêmes. Plusieurs médiateurs paracrins pouvant influencer l'effet des cellules souches mésenchymateuses ont été identifiés dans ce milieu dont IL-10, IL-1ra, KGF et prostaglandin-E2. Cependant d'autres études précliniques seront nécessaires et, le cas échéant, la planification d'essais cliniques pour l'ALI/SDRA (Matthay MA, *et al.*, 2010). Le traitement aux cellules souches pourrait être une méthode globale de traitement du "si divers" syndrome de détresse respiratoire aiguë.

Notre étude de la phase aiguë du SDRA du point de vue de l'œdème et de l'inflammation nous mène à penser qu'il serait impératif d'adapter le traitement en fonction de l'origine du syndrome (Dos Santos CC, 2008) et du stade de développement du syndrome. Le ciblage spécifique de plusieurs molécules au sein d'un même mécanisme d'action majeur dans un stade déterminé (Crisafulli C, *et al.*, 2006), devra également être pris en compte lors d'études cliniques ultérieures. Les études fondamentales devront être conceptualisées et interprétées selon ces mêmes critères.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham E: **Neutrophils and acute lung injury**. *Critical care medicine* 2003, **31**(4 Suppl):S195-9.
- Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G. *et al.*: **Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock**. NORASEPT II Study Group. *Lancet* 1998, **351**(9107):929-33.
- Abraham E, Laterre PF, Garbino J. *et al.*: **Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients**. *Critical care medicine* 2001, **29**(3):503-10.
- Adair JE, Stober V, Sobhany M. *et al.*: **Inter-alpha-trypsin inhibitor promotes bronchial epithelial repair after injury through vitronectin binding**. *The Journal of biological chemistry* 2009, **284**(25):16922-30.
- Adamson IY: **Drug-induced pulmonary fibrosis**. *Environmental health perspectives* 1984, **55**:25-36.
- Adamson IY, Bowden DH: **The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice**. *The American journal of pathology* 1974a, **77**(2):185-97.
- Adamson IY, Bowden DH: **The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen**. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1974b, **30**(1):35-42.
- Aggarwal A, Baker CS, Evans TW. *et al.*: **G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome**. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2000, **15**(5):895-901.
- Akiyama SK, Yamada SS, Chen WT. *et al.*: **Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization**. *The Journal of cell biology* 1989, **109**(2):863-75.
- Arai T, Abe K, Matsuoka H. *et al.*: **Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo**. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2000, **278**(5):L914-22.
- ARDSNetwork: **Ketoconazole for early treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial**. The ARDS Network. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2000, **283**(15):1995-2002.
- Arensman JB, Dominik JW, Hilmas DE: **Effects of small-particle aerosols of rimantadine and ribavirin on arterial blood pH and gas tensions and lung water content of A2 influenza-infected mice**. *Antimicrob Agents Chemother* 1977, **12**(1):40-6.
- Armstrong L, Millar AB: **Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome**. *Thorax* 1997, **52**(5):442-6.
- Arsalane K, Dubois CM, Muanza T. *et al.*: **Transforming growth factor-beta1 is a potent inhibitor of glutathione synthesis in the lung epithelial cell line A549: transcriptional effect on the GSH rate-limiting enzyme gamma-**

- glutamylcysteine synthetase.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1997, **17**(5):599-607.
- Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL. *et al.*: **Acute respiratory distress in adults.** *Lancet* 1967, **2**(7511):319-23.
- Atabai K, Ishigaki M, Geiser T. *et al.*: **Keratinocyte growth factor can enhance alveolar epithelial repair by nonmitogenic mechanisms.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2002, **283**(1):L163-9.
- Atsuta J, Sterbinsky SA, Plitt J. *et al.*: **Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of the adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1997, **17**(5):571-82.
- Azamfirei L, Gurzu S, Solomon R. *et al.*: **Vascular endothelial growth factor: a possible mediator of endothelial activation in acute respiratory distress syndrome.** *Minerva anesthesiologica* 2010, **76**(8):609-16.
- Babin AL, Cannet C, Gerard C. *et al.*: **Noninvasive assessment of bleomycin-induced lung injury and the effects of short-term glucocorticosteroid treatment in rats using MRI.** *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI* 2011, **33**(3):603-14.
- Baker CS, Evans TW, Randle BJ. *et al.*: **Damage to surfactant-specific protein in acute respiratory distress syndrome.** *Lancet* 1999, **353**(9160):1232-7.
- Bang FB: **Mucociliary function as protective mechanism in upper respiratory tract.** *Bacteriological reviews* 1961, **25**:228-36.
- Barazzone C, Donati YR, Rochat AF. *et al.*: **Keratinocyte growth factor protects alveolar epithelium and endothelium from oxygen-induced injury in mice.** *The American journal of pathology* 1999, **154**(5):1479-87.
- Baro I, Roch B, Hongre AS. *et al.*: **Concomitant activation of Cl⁻ and K⁺ currents by secretory stimulation in human epithelial cells.** *The Journal of physiology* 1994, **478 Pt 3**:469-82.
- Basset G, Bouchonnet F, Crone C. *et al.*: **Potassium transport across rat alveolar epithelium: evidence for an apical Na⁺-K⁺ pump.** *The Journal of physiology* 1988, **400**:529-43.
- Basset G, Crone C, Saumon G: **Fluid absorption by rat lung in situ: pathways for sodium entry in the luminal membrane of alveolar epithelium.** *The Journal of physiology* 1987, **384**:325-45.
- Beatty WW, Scouten CW, Beatty PA: **Differential effects of dexamethasone and body weight loss on two measures of activity.** *Physiology & behavior* 1971, **7**(6):869-71.
- Bernard GR, Wheeler AP, Arons MM. *et al.*: **A trial of antioxidants N-acetylcysteine and procysteine in ARDS. The Antioxidant in ARDS Study Group.** *Chest* 1997, **112**(1):164-72.
- Bersten AD, Edibam C, Hunt T. *et al.*: **Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002, **165**(4):443-8.

- Berthiaume Y, Lesur O, Dagenais A: **Treatment of adult respiratory distress syndrome: plea for rescue therapy of the alveolar epithelium.** *Thorax* 1999, **54**(2):150-60.
- Berthiaume Y, Matthay MA: **Alveolar edema fluid clearance and acute lung injury.** *Respiratory physiology & neurobiology* 2007, **159**(3):350-9.
- Berthiaume Y, Staub NC, Matthay MA: **Beta-adrenergic agonists increase lung liquid clearance in anesthetized sheep.** *The Journal of clinical investigation* 1987, **79**(2):335-43.
- Beule AG, Scharf C, Biebler KE. *et al.*: **Effects of topically applied dexamethasone on mucosal wound healing using a drug-releasing stent.** *The Laryngoscope* 2008, **118**(11):2073-7.
- Bhatia M, Mochhala S: **Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome.** *The Journal of pathology* 2004, **202**(2):145-56.
- Bin-Jaliah I, Dallak M, Haffor AS: **Effect of hyperoxia on the ultrastructural pathology of alveolar epithelium in relation to glutathione peroxidase, lactate dehydrogenase activities, and free radical production in rats, *Rattus norvegicus*.** *Ultrastructural pathology* 2009, **33**(3):112-22.
- Biondi JW, Hines RL, Barash PG. *et al.*: **The adult respiratory distress syndrome.** *The Yale journal of biology and medicine* 1986, **59**(6):575-97.
- Bird AD, Tan KH, Olsson PF. *et al.*: **Identification of glucocorticoid-regulated genes that control cell proliferation during murine respiratory development.** *The Journal of physiology* 2007, **585**(Pt 1):187-201.
- Bishop AE: **Pulmonary epithelial stem cells.** *Cell proliferation* 2004, **37**(1):89-96.
- Bonsignore MR, Jerome EH, Culver PL. *et al.*: **Effects of beta-adrenergic agents in lungs of normal and air-embolized awake sheep.** *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 1988, **64**(6):2647-52.
- Borok Z, Liebler JM, Lubman RL. *et al.*: **Na transport proteins are expressed by rat alveolar epithelial type I cells.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2002, **282**(4):L599-608.
- Borthwick LA, McIlroy EI, Gorowiec MR. *et al.*: **Inflammation and epithelial to mesenchymal transition in lung transplant recipients: role in dysregulated epithelial wound repair.** *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 2010, **10**(3):498-509.
- Borzzone G, Moreno R, Urrea R. *et al.*: **Bleomycin-induced chronic lung damage does not resemble human idiopathic pulmonary fibrosis.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **163**(7):1648-53.
- Bosma KJ, Taneja R, Lewis JF: **Pharmacotherapy for prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome: current and experimental approaches.** *Drugs* 2010, **70**(10):1255-82.
- Boucher RC: **Human airway ion transport. Part one.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994, **150**(1):271-81.

- Bourke S, Mason HS, Borok Z. *et al.*: **Development of a lung slice preparation for recording ion channel activity in alveolar epithelial type I cells.** *Respiratory research* 2005, **6**:40.
- Bowden DH: **The alveolar macrophage.** *Environmental health perspectives* 1984, **55**:327-41.
- Bridges JP, Davis HW, Damodarasamy M. *et al.*: **Pulmonary surfactant proteins A and D are potent endogenous inhibitors of lipid peroxidation and oxidative cellular injury.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(49):38848-55.
- Brieland JK, Flory CM, Jones ML. *et al.*: **Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression and secretion in rat pulmonary alveolar macrophages by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1995, **12**(1):104-9.
- Brieland JK, Jones ML, Flory CM. *et al.*: **Expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) by rat alveolar macrophages during chronic lung injury.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1993, **9**(3):300-5.
- Brochiero E, Dagenais A, Prive A. *et al.*: **Evidence of a functional CFTR Cl(-) channel in adult alveolar epithelial cells.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2004, **287**(2):L382-92.
- Brown RF, Drawbaugh RB, Marrs TC: **An investigation of possible models for the production of progressive pulmonary fibrosis in the rat. The effects of repeated intratracheal instillation of bleomycin.** *Toxicology* 1988, **51**(1):101-10.
- Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G. *et al.*: **Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study.** *Intensive care medicine* 2004, **30**(1):51-61.
- Burns AR, Smith CW, Walker DC: **Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung.** *Physiological reviews* 2003, **83**(2):309-36.
- Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC: **Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration.** *Nature* 1993, **361**(6411):467-70.
- Canessa CM, Schild L, Buell G. *et al.*: **Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits.** *Nature* 1994, **367**(6462):463-7.
- Carter EP, Duvick SE, Wendt CH. *et al.*: **Hyperoxia increases active alveolar Na⁺ resorption in vivo and type II cell Na,K-ATPase in vitro.** *Chest* 1994, **105**(3 Suppl):75S-78S.
- Cavanaugh KJ, Jr., Oswari J, Margulies SS: **Role of stretch on tight junction structure in alveolar epithelial cells.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2001, **25**(5):584-91.
- Champigny G, Voilley N, Lingueglia E. *et al.*: **Regulation of expression of the lung amiloride-sensitive Na⁺ channel by steroid hormones.** *The EMBO journal* 1994, **13**(9):2177-81.
- Chandel NS, Budinger GR, Mutlu GM. *et al.*: **Keratinocyte growth factor expression is suppressed in early acute lung injury/acute respiratory distress syndrome by smad and c-Abl pathways.** *Critical care medicine* 2009, **37**(5):1678-84.

- Chang JC, Summer R, Sun X. *et al.*: **Evidence that bone marrow cells do not contribute to the alveolar epithelium.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2005, **33**(4):335-42.
- Cheong SH, Lee JH, Lee KM. *et al.*: **The effects of hemodilution on acute inflammatory responses in a bleomycin-induced lung injury model.** *Experimental lung research* 2009, **35**(10):841-57.
- Chollet-Martin S, Jourdain B, Gibert C. *et al.*: **Interactions between neutrophils and cytokines in blood and alveolar spaces during ARDS.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996, **154**(3 Pt 1):594-601.
- Chopra M, Reuben JS, Sharma AC: **Acute lung injury:apoptosis and signaling mechanisms.** *Experimental biology and medicine* 2009, **234**(4):361-71.
- Chow YH, Wang Y, Plumb J. *et al.*: **Hormonal regulation and genomic organization of the human amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha subunit gene.** *Pediatric research* 1999, **46**(2):208-14.
- Clegg GR, Tyrrell C, McKechnie SR. *et al.*: **Coexpression of RTI40 with alveolar epithelial type II cell proteins in lungs following injury: identification of alveolar intermediate cell types.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2005, **289**(3):L382-90.
- Clerici C, Couette S, Loiseau A. *et al.*: **Evidence for Na-K-Cl cotransport in alveolar epithelial cells: effect of phorbol ester and osmotic stress.** *The Journal of membrane biology* 1995, **147**(3):295-304.
- Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S. *et al.*: **Transforming growth factors-beta 1, -beta 2, and -beta 3 stimulate fibroblast procollagen production in vitro but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis.** *The American journal of pathology* 1997, **150**(3):981-91.
- Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T. *et al.*: **Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73).** *Purinergic signalling* 2006, **2**(2):351-60.
- Corbel M, Lagente V, Theret N. *et al.*: **Comparative effects of betamethasone, cyclosporin and nedocromil sodium in acute pulmonary inflammation and metalloproteinase activities in bronchoalveolar lavage fluid from mice exposed to lipopolysaccharide.** *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 1999, **12**(3):165-71.
- Corde S, Laplace C, Vicaut E. *et al.*: **Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2001, **24**(6):762-8.
- Corroyer S, Nabeyrat E, Clement A: **Involvement of the cell cycle inhibitor CIP1/WAF1 in lung alveolar epithelial cell growth arrest induced by glucocorticoids.** *Endocrinology* 1997, **138**(9):3677-85.
- Crim C, Longmore WJ: **Sublethal hydrogen peroxide inhibits alveolar type II cell surfactant phospholipid biosynthetic enzymes.** *The American journal of physiology* 1995, **268**(1 Pt 1):L129-35.

- Crimi E, Slutsky AS: **Inflammation and the acute respiratory distress syndrome.** *Best practice & research Clinical anaesthesiology* 2004, **18**(3):477-92.
- Crisafulli C, Mazzone E, Muia C. *et al.*: **Effects of combination of melatonin and dexamethasone on acute lung injury in a mice model of carrageenan-induced pleurisy.** *Journal of pineal research* 2006, **41**(3):228-37.
- Crosby LM, Luellen C, Zhang Z. *et al.*: **Balance of life and death in alveolar epithelial type II cells: proliferation, apoptosis, and the effects of cyclic stretch on wound healing.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011, **301**(4):L536-46.
- Crosby LM, Waters CM: **Epithelial repair mechanisms in the lung.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2010, **298**(6):L715-31.
- Cunningham AL, Hurley JV: **Alpha-naphthyl-thiourea-induced pulmonary oedema in the rat: a topographical and electron-microscope study.** *The Journal of pathology* 1972, **106**(1):25-35.
- Cuttillo AG, Chan PH, Ailion DC. *et al.*: **Characterization of bleomycin lung injury by nuclear magnetic resonance: correlation between NMR relaxation times and lung water and collagen content.** *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 2002, **47**(2):246-56.
- Dagenais A, Denis C, Vives MF. *et al.*: **Modulation of alpha-ENaC and alpha1-Na⁺-K⁺-ATPase by cAMP and dexamethasone in alveolar epithelial cells.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2001, **281**(1):L217-30.
- Dagenais A, Frechette R, Clermont ME. *et al.*: **Dexamethasone inhibits the action of TNF on ENaC expression and activity.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2006, **291**(6):L1220-31.
- Dagenais A, Frechette R, Yamagata Y. *et al.*: **Downregulation of ENaC activity and expression by TNF-alpha in alveolar epithelial cells.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2004, **286**(2):L301-11.
- Davis IC, Matalon S: **Epithelial sodium channels in the adult lung--important modulators of pulmonary health and disease.** *Advances in experimental medicine and biology* 2007, **618**:127-40.
- DeCoursey TE, Jacobs ER, Silver MR: **Potassium currents in rat type II alveolar epithelial cells.** *The Journal of physiology* 1988, **395**:487-505.
- Degryse AL, Tanjore H, Xu XC. *et al.*: **TGFbeta signaling in lung epithelium regulates bleomycin-induced alveolar injury and fibroblast recruitment.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011, **300**(6):L887-97.
- Delclaux C, d'Ortho MP, Delacourt C. *et al.*: **Gelatinases in epithelial lining fluid of patients with adult respiratory distress syndrome.** *The American journal of physiology* 1997, **272**(3 Pt 1):L442-51.

- Denis M, Guojian L, Widmer M. *et al.*: **A mouse model of lung injury induced by microbial products: implication of tumor necrosis factor.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1994, **10**(6):658-64.
- Desai LP, Chapman KE, Waters CM: **Mechanical stretch decreases migration of alveolar epithelial cells through mechanisms involving Rac1 and Tiam1.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2008, **295**(5):L958-65.
- Desai LP, Sinclair SE, Chapman KE. *et al.*: **High tidal volume mechanical ventilation with hyperoxia alters alveolar type II cell adhesion.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007, **293**(3):L769-78.
- Deshpande SS, Angekew P, Huang J. *et al.*: **Rac1 inhibits TNF-alpha-induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2000, **14**(12):1705-14.
- Dierynck I, Bernard A, Roels H. *et al.*: **The human Clara cell protein: biochemical and biological characterisation of a natural immunosuppressor.** *Multiple sclerosis* 1996, **1**(6):385-7.
- Dimova S, Hoet PH, Nemery B: **Xenobiotic-metabolizing enzyme activities in primary cultures of rat type II pneumocytes and alveolar macrophages.** *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2001, **29**(10):1349-54.
- Dobbs LG, Gonzalez R, Williams MC: **An improved method for isolating type II cells in high yield and purity.** *The American review of respiratory disease* 1986, **134**(1):141-5.
- Doerschuk CM: **Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs.** *Microcirculation* 2001, **8**(2):71-88.
- Dohi M, Hasegawa T, Yamamoto K. *et al.*: **Hepatocyte growth factor attenuates collagen accumulation in a murine model of pulmonary fibrosis.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000, **162**(6):2302-7.
- Domenighetti G, Stricker H, Waldspuehl B: **Nebulized prostacyclin (PGI₂) in acute respiratory distress syndrome: impact of primary (pulmonary injury) and secondary (extrapulmonary injury) disease on gas exchange response.** *Critical care medicine* 2001, **29**(1):57-62.
- Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT. *et al.*: **The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome.** *Annals of internal medicine* 1996, **125**(3):191-6.
- Doornaert B, Leblond V, Planus E. *et al.*: **Time course of actin cytoskeleton stiffness and matrix adhesion molecules in human bronchial epithelial cell cultures.** *Experimental cell research* 2003, **287**(2):199-208.
- Dorscheid DR, Patchell BJ, Estrada O. *et al.*: **Effects of corticosteroid-induced apoptosis on airway epithelial wound closure in vitro.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2006, **291**(4):L794-801.

- Dos Santos CC: **Advances in mechanisms of repair and remodelling in acute lung injury.** *Intensive care medicine* 2008, **34**(4):619-30.
- Downey GP, Doherty DE, Schwab B, 3rd. *et al.*: **Retention of leukocytes in capillaries: role of cell size and deformability.** *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 1990, **69**(5):1767-78.
- Downey GP, Dong Q, Kruger J. *et al.*: **Regulation of neutrophil activation in acute lung injury.** *Chest* 1999, **116**(1 Suppl):46S-54S.
- Drost EM, MacNee W: **Potential role of IL-8, platelet-activating factor and TNF-alpha in the sequestration of neutrophils in the lung: effects on neutrophil deformability, adhesion receptor expression, and chemotaxis.** *European journal of immunology* 2002, **32**(2):393-403.
- Eaton DC, Chen J, Ramosevac S. *et al.*: **Regulation of Na⁺ channels in lung alveolar type II epithelial cells.** *Proceedings of the American Thoracic Society* 2004, **1**(1):10-6.
- Ecelbarger CA, Tiwari S: **Sodium transporters in the distal nephron and disease implications.** *Current hypertension reports* 2006, **8**(2):158-65.
- Egli M, Duplain H, Lepori M. *et al.*: **Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice.** *The Journal of physiology* 2004, **560**(Pt 3):857-65.
- Elovic AE, Ohyama H, Sauty A. *et al.*: **IL-4-dependent regulation of TGF-alpha and TGF-beta1 expression in human eosinophils.** *Journal of immunology* 1998, **160**(12):6121-7.
- Erickson SE, Martin GS, Davis JL. *et al.*: **Recent trends in acute lung injury mortality: 1996-2005.** *Critical care medicine* 2009, **37**(5):1574-9.
- Estensoro E, Dubin A, Laffaire E. *et al.*: **Incidence, clinical course, and outcome in 217 patients with acute respiratory distress syndrome.** *Critical care medicine* 2002, **30**(11):2450-6.
- Evans MJ, Dekker NP, Cabral-Anderson LJ. *et al.*: **Quantitation of damage to the alveolar epithelium by means of type 2 cell proliferation.** *The American review of respiratory disease* 1978, **118**(4):787-90.
- Fang X, Fukuda N, Barbry P. *et al.*: **Novel role for CFTR in fluid absorption from the distal airspaces of the lung.** *The Journal of general physiology* 2002, **119**(2):199-207.
- Farman N, Talbot CR, Boucher R. *et al.*: **Noncoordinated expression of alpha-, beta-, and gamma-subunit mRNAs of epithelial Na⁺ channel along rat respiratory tract.** *The American journal of physiology* 1997, **272**(1 Pt 1):C131-41.
- Fehrenbach H: **Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited.** *Respiratory research* 2001, **2**(1):33-46.
- Fehrenbach H, Kasper M, Koslowski R. *et al.*: **Alveolar epithelial type II cell apoptosis in vivo during resolution of keratinocyte growth factor-induced hyperplasia in the rat.** *Histochemistry and cell biology* 2000, **114**(1):49-61.

- Ferro TJ, Hocking DC, Johnson A: **Tumor necrosis factor-alpha alters pulmonary vasoreactivity via neutrophil-derived oxidants.** *The American journal of physiology* 1993, **265**(5 Pt 1):L462-71.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR. *et al.*: **IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.** *Journal of immunology* 1991a, **147**(11):3815-22.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P. *et al.*: **IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.** *Journal of immunology* 1991b, **146**(10):3444-51.
- Firsov D, Gautschi I, Merillat AM. *et al.*: **The heterotetrameric architecture of the epithelial sodium channel (ENaC).** *The EMBO journal* 1998, **17**(2):344-52.
- Fligiel SE, Standiford T, Fligiel HM. *et al.*: **Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in acute lung injury.** *Human pathology* 2006, **37**(4):422-30.
- Folkesson HG, Matthay MA, Hebert CA. *et al.*: **Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms.** *The Journal of clinical investigation* 1995, **96**(1):107-16.
- Folkesson HG, Nitenberg G, Oliver BL. *et al.*: **Upregulation of alveolar epithelial fluid transport after subacute lung injury in rats from bleomycin.** *The American journal of physiology* 1998, **275**(3 Pt 1):L478-90.
- Folkesson HG, Norlin A, Wang Y. *et al.*: **Dexamethasone and thyroid hormone pretreatment upregulate alveolar epithelial fluid clearance in adult rats.** *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 2000, **88**(2):416-24.
- Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV. *et al.*: **Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes.** *Nature* 1980, **286**(5770):264-5.
- Fowler AA, Hyers TM, Fisher BJ. *et al.*: **The adult respiratory distress syndrome. Cell populations and soluble mediators in the air spaces of patients at high risk.** *The American review of respiratory disease* 1987, **136**(5):1225-31.
- Frank JA, Pittet JF, Wray C. *et al.*: **Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade.** *Thorax* 2008, **63**(2):147-53.
- Fudala R, Krupa A, Matthay MA. *et al.*: **Anti-IL-8 autoantibody:IL-8 immune complexes suppress spontaneous apoptosis of neutrophils.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007, **293**(2):L364-74.
- Fudala R, Krupa A, Stankowska D. *et al.*: **Anti-interleukin-8 autoantibody:interleukin-8 immune complexes in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome.** *Clinical science* 2008, **114**(6):403-12.
- Furuyama A, Iwata M, Hayashi T. *et al.*: **Transforming growth factor-beta1 regulates basement membrane formation by alveolar epithelial cells in vitro.** *European journal of cell biology* 1999, **78**(12):867-75.
- Furuyama A, Mochitate K: **Hepatocyte growth factor inhibits the formation of the basement membrane of alveolar epithelial cells in vitro.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2004, **286**(5):L939-46.

- Galani V, Tatsaki E, Bai M. *et al.*: **The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review.** *Pathology, research and practice* 2010, **206**(3):145-50.
- Galiacy S, Planus E, Lepetit H. *et al.*: **Keratinocyte growth factor promotes cell motility during alveolar epithelial repair in vitro.** *Experimental cell research* 2003, **283**(2):215-29.
- Garty H, Benos DJ: **Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺ channel.** *Physiological reviews* 1988, **68**(2):309-73.
- Gattinoni L, Pelosi P, Suter PM. *et al.*: **Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease. Different syndromes?** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998, **158**(1):3-11.
- Geiser T: **Mechanisms of alveolar epithelial repair in acute lung injury--a translational approach.** *Swiss medical weekly* 2003, **133**(43-44):586-90.
- Geiser T, Atabai K, Jarreau PH. *et al.*: **Pulmonary edema fluid from patients with acute lung injury augments in vitro alveolar epithelial repair by an IL-1beta-dependent mechanism.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **163**(6):1384-8.
- Geiser T, Ishigaki M, van Leer C. *et al.*: **H(2)O(2) inhibits alveolar epithelial wound repair in vitro by induction of apoptosis.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2004, **287**(2):L448-53.
- Geiser T, Jarreau PH, Atabai K. *et al.*: **Interleukin-1beta augments in vitro alveolar epithelial repair.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2000, **279**(6):L1184-90.
- Gifford GE, Flick DA: **Natural production and release of tumour necrosis factor.** *Ciba Foundation symposium* 1987, **131**:3-20.
- Glosli H, Tronstad KJ, Wergedal H. *et al.*: **Human TNF-alpha in transgenic mice induces differential changes in redox status and glutathione-regulating enzymes.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2002, **16**(11):1450-2.
- Goldman G, Welbourn R, Kobzik L. *et al.*: **Tumor necrosis factor-alpha mediates acid aspiration-induced systemic organ injury.** *Annals of surgery* 1990, **212**(4):513-9; discussion 19-20.
- Gonzalez RF, Allen L, Dobbs LG: **Rat alveolar type I cells proliferate, express OCT-4, and exhibit phenotypic plasticity in vitro.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2009, **297**(6):L1045-55.
- Goodman RB, Pugin J, Lee JS. *et al.*: **Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury.** *Cytokine & growth factor reviews* 2003, **14**(6):523-35.
- Goodman RB, Strieter RM, Martin DP. *et al.*: **Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996, **154**(3 Pt 1):602-11.
- Goolaerts A, Roux J, Ganter MT. *et al.*: **Serotonin decreases alveolar epithelial fluid transport via a direct inhibition of the epithelial sodium channel.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2010, **43**(1):99-108.

- Goto H, Ledford JG, Mukherjee S. *et al.*: **The role of surfactant protein A in bleomycin-induced acute lung injury.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010, **181**(12):1336-44.
- Goulding NJ, Euzger HS, Butt SK. *et al.*: **Novel pathways for glucocorticoid effects on neutrophils in chronic inflammation.** *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 1998, **47 Suppl 3**:S158-65.
- Gregory TJ, Longmore WJ, Moxley MA. *et al.*: **Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome.** *The Journal of clinical investigation* 1991, **88**(6):1976-81.
- Greos LS, Vichyanond P, Bloedow DC. *et al.*: **Methylprednisolone achieves greater concentrations in the lung than prednisolone. A pharmacokinetic analysis.** *The American review of respiratory disease* 1991, **144**(3 Pt 1):586-92.
- Grommes J, Soehnlein O: **Contribution of neutrophils to acute lung injury.** *Molecular medicine* 2011, **17**(3-4):293-307.
- Guglani L, Jain S, Lodha R: **Methylprednisolone therapy in a child with unresolving ARDS.** *Indian pediatrics* 2006, **43**(7):639-42.
- Guidot DM, Folkesson HG, Jain L. *et al.*: **Integrating acute lung injury and regulation of alveolar fluid clearance.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2006, **291**(3):L301-6.
- Guney S, Schuler A, Ott A. *et al.*: **Dexamethasone prevents transport inhibition by hypoxia in rat lung and alveolar epithelial cells by stimulating activity and expression of Na⁺-K⁺-ATPase and epithelial Na⁺ channels.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007, **293**(5):L1332-8.
- Gupta A, Jamshidi M, Rubin JR: **Traumatic first rib fracture: is angiography necessary? A review of 730 cases.** *Cardiovascular surgery* 1997, **5**(1):48-53.
- Haddad JJ, Olver RE, Land SC: **Antioxidant/pro-oxidant equilibrium regulates HIF-1 α and NF-kappa B redox sensitivity. Evidence for inhibition by glutathione oxidation in alveolar epithelial cells.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(28):21130-9.
- Hagimoto N, Kuwano K, Inoshima I. *et al.*: **TGF-beta 1 as an enhancer of Fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells.** *Journal of immunology* 2002, **168**(12):6470-8.
- Hamacher J, Lucas R, Lijnen HR. *et al.*: **Tumor necrosis factor-alpha and angiostatin are mediators of endothelial cytotoxicity in bronchoalveolar lavages of patients with acute respiratory distress syndrome.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002, **166**(5):651-6.
- Harada RN, Repine JE: **Pulmonary host defense mechanisms.** *Chest* 1985, **87**(2):247-52.
- Hashimoto S, Kobayashi A, Kooguchi K. *et al.*: **Upregulation of two death pathways of perforin/granzyme and FasL/Fas in septic acute respiratory distress syndrome.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2000, **161**(1):237-43.
- Hebb CO, Nimmo-Smith RH: **Water, chloride and potassium exchanges in isolated blood-perfused dog lungs.** *The Journal of physiology* 1949, **110**(3-4):468-81.
- Held HD, Boettcher S, Hamann L. *et al.*: **Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by**

- steroids.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **163**(3 Pt 1):711-6.
- Henderson MC, Krueger SK, Stevens JF. *et al.*: **Human flavin-containing monooxygenase form 2 S-oxygenation: sulfenic acid formation from thioureas and oxidation of glutathione.** *Chemical research in toxicology* 2004, **17**(5):633-40.
- Hermanns MI, Unger RE, Kehe K. *et al.*: **Lung epithelial cell lines in coculture with human pulmonary microvascular endothelial cells: development of an alveolo-capillary barrier in vitro.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2004, **84**(6):736-52.
- Herridge MS, Cheung AM, Tansey CM. *et al.*: **One-year outcomes in survivors of the acute respiratory distress syndrome.** *The New England journal of medicine* 2003, **348**(8):683-93.
- Hierholzer C, Kalff JC, Omert L. *et al.*: **Interleukin-6 production in hemorrhagic shock is accompanied by neutrophil recruitment and lung injury.** *The American journal of physiology* 1998, **275**(3 Pt 1):L611-21.
- Hogg JC: **Felix Fleischner Lecture. The traffic of polymorphonuclear leukocytes through pulmonary microvessels in health and disease.** *AJR American journal of roentgenology* 1994, **163**(4):769-75.
- Holley A, Cartner M, Lipman J: **Acute respiratory distress in a bleomycin primed patient: a new use for nitric oxide.** *Anaesthesia and intensive care* 2007, **35**(1):86-90.
- Howard M, Muchamuel T, Andrade S. *et al.*: **Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia.** *The Journal of experimental medicine* 1993, **177**(4):1205-8.
- Huang Y, Zhao JJ, Lv YY. *et al.*: **Hypoxia down-regulates glucocorticoid receptor alpha and attenuates the anti-inflammatory actions of dexamethasone in human alveolar epithelial A549 cells.** *Life sciences* 2009, **85**(3-4):107-12.
- Hughes M, MacKirdy FN, Ross J. *et al.*: **Acute respiratory distress syndrome: an audit of incidence and outcome in Scottish intensive care units.** *Anaesthesia* 2003, **58**(9):838-45.
- Hummler E, Barker P, Gatzky J. *et al.*: **Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice.** *Nature genetics* 1996, **12**(3):325-8.
- Hummler E, Barker P, Talbot C. *et al.*: **A mouse model for the renal salt-wasting syndrome pseudohypoaldosteronism.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(21):11710-5.
- Hummler E, Planes C: **Importance of ENaC-mediated sodium transport in alveolar fluid clearance using genetically-engineered mice.** *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2010, **25**(1):63-70.
- Hung CH, Chen LC, Zhang Z. *et al.*: **Regulation of TH2 responses by the pulmonary Clara cell secretory 10-kd protein.** *The Journal of allergy and clinical immunology* 2004, **114**(3):664-70.

- Hyers TM, Tricomi SM, Dettenmeier PA. *et al.*: **Tumor necrosis factor levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid of patients with the adult respiratory distress syndrome.** *The American review of respiratory disease* 1991, **144**(2):268-71.
- Idell S, Gonzalez K, Bradford H. *et al.*: **Procoagulant activity in bronchoalveolar lavage in the adult respiratory distress syndrome. Contribution of tissue factor associated with factor VII.** *The American review of respiratory disease* 1987, **136**(6):1466-74.
- Ikeda N, Mukaida N, Kaneko S. *et al.*: **Prevention of endotoxin-induced acute lethality in Propionibacterium acnes-primed rabbits by an antibody to leukocyte integrin beta 2 with concomitant reduction of cytokine production.** *Infection and immunity* 1995, **63**(12):4812-7.
- Ishii Y, Partridge CA, Del Vecchio PJ. *et al.*: **Tumor necrosis factor-alpha-mediated decrease in glutathione increases the sensitivity of pulmonary vascular endothelial cells to H₂O₂.** *The Journal of clinical investigation* 1992, **89**(3):794-802.
- Jain L, Chen XJ, Ramosevac S. *et al.*: **Expression of highly selective sodium channels in alveolar type II cells is determined by culture conditions.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2001, **280**(4):L646-58.
- Jayr C, Garat C, Meignan M. *et al.*: **Alveolar liquid and protein clearance in anesthetized ventilated rats.** *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 1994, **76**(6):2636-42.
- Jenkins RG, Su X, Su G. *et al.*: **Ligation of protease-activated receptor 1 enhances alpha(v)beta6 integrin-dependent TGF-beta activation and promotes acute lung injury.** *The Journal of clinical investigation* 2006, **116**(6):1606-14.
- Jeong JS, Lee HJ, Jung JS. *et al.*: **Characterization of inwardly rectifying K(+) conductance across the basolateral membrane of rat tracheal epithelia.** *Biochemical and biophysical research communications* 2001, **288**(4):914-20.
- Jiang L, He B, Zhao MW. *et al.*: **Association of gene polymorphisms of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-13 with chronic obstructive pulmonary disease in Han nationality in Beijing.** *Chinese medical journal* 2005, **118**(7):541-7.
- Jiang X, Ingbar DH, O'Grady SM: **Adrenergic stimulation of Na⁺ transport across alveolar epithelial cells involves activation of apical Cl⁻ channels.** *The American journal of physiology* 1998, **275**(6 Pt 1):C1610-20.
- Jin X, Hu Z, Kang Y. *et al.*: **Association of interleukin-10-1082 G/G genotype with lower mortality of acute respiratory distress syndrome in a Chinese population.** *Genetic testing and molecular biomarkers* 2011, **15**(4):203-6.
- Johansson S, Wennergren G, Aberg N. *et al.*: **Clara cell 16-kd protein downregulates T(H)2 differentiation of human naive neonatal T cells.** *The Journal of allergy and clinical immunology* 2007, **120**(2):308-14.
- John M, Au BT, Jose PJ. *et al.*: **Expression and release of interleukin-8 by human airway smooth muscle cells: inhibition by Th-2 cytokines and corticosteroids.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1998, **18**(1):84-90.

- Johnson M: **Effects of beta2-agonists on resident and infiltrating inflammatory cells.** *The Journal of allergy and clinical immunology* 2002, **110**(6 Suppl):S282-90.
- Johnson MD: **Ion transport in alveolar type I cells.** *Molecular bioSystems* 2007, **3**(3):178-86.
- Johnson MD, Bao HF, Helms MN. *et al.*: **Functional ion channels in pulmonary alveolar type I cells support a role for type I cells in lung ion transport.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(13):4964-9.
- Jones GS, Miles PR, Lantz RC. *et al.*: **Ionic content and regulation of cellular volume in rat alveolar type II cells.** *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 1982, **53**(1):258-66.
- Jovanovic S, Land SC, Olver RE. *et al.*: **Hypoxic activation of an amiloride-sensitive cation conductance in alveolar epithelial cells.** *Biochemical and biophysical research communications* 2001, **286**(3):622-7.
- Jules-Elysee K, White DA: **Bleomycin-induced pulmonary toxicity.** *Clinics in chest medicine* 1990, **11**(1):1-20.
- Junor RW, Benjamin AR, Alexandrou D. *et al.*: **A novel role for cyclic nucleotide-gated cation channels in lung liquid homeostasis in sheep.** *The Journal of physiology* 1999, **520 Pt 1**:255-60.
- Kamberi M, Brummer E, Stevens DA: **Regulation of bronchoalveolar macrophage proinflammatory cytokine production by dexamethasone and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor after stimulation by Aspergillus conidia or lipopolysaccharide.** *Cytokine* 2002, **19**(1):14-20.
- Kaminski N, Allard JD, Pittet JF. *et al.*: **Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, **97**(4):1778-83.
- Kaner RJ, Ladetto JV, Singh R. *et al.*: **Lung overexpression of the vascular endothelial growth factor gene induces pulmonary edema.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000, **22**(6):657-64.
- Karupiah G, Chen JH, Mahalingam S. *et al.*: **Rapid interferon gamma-dependent clearance of influenza A virus and protection from consolidating pneumonitis in nitric oxide synthase 2-deficient mice.** *The Journal of experimental medicine* 1998, **188**(8):1541-6.
- Kawano T, Mori S, Cybulsky M. *et al.*: **Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung.** *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 1987, **62**(1):27-33.
- Keating DT, Sadlier DM, Patricelli A. *et al.*: **Microarray identifies ADAM family members as key responders to TGF-beta1 in alveolar epithelial cells.** *Respiratory research* 2006, **7**:114.
- Kemp PJ, MacGregor GG, Olver RE: **G protein-regulated large-conductance chloride channels in freshly isolated fetal type II alveolar epithelial cells.** *The American journal of physiology* 1993, **265**(4 Pt 1):L323-9.

- Kemp PJ, Roberts GC, Boyd CA: **Identification and properties of pathways for K⁺ transport in guinea-pig and rat alveolar epithelial type II cells.** *The Journal of physiology* 1994, **476**(1):79-88.
- Kemsley JN, Zaleski KL, Chow MS. *et al.*: **Spectroscopic studies of the interaction of ferrous bleomycin with DNA.** *Journal of the American Chemical Society* 2003, **125**(36):10810-21.
- Kettritz R, Gaido ML, Haller H. *et al.*: **Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils.** *Kidney international* 1998, **53**(1):84-91.
- Khalil N, Berezney O, Sporn M. *et al.*: **Macrophage production of transforming growth factor beta and fibroblast collagen synthesis in chronic pulmonary inflammation.** *The Journal of experimental medicine* 1989, **170**(3):727-37.
- Kheradmand F, Folkesson HG, Shum L. *et al.*: **Transforming growth factor-alpha enhances alveolar epithelial cell repair in a new in vitro model.** *The American journal of physiology* 1994, **267**(6 Pt 1):L728-38.
- Kietzmann D, Kahl R, Muller M. *et al.*: **Hydrogen peroxide in expired breath condensate of patients with acute respiratory failure and with ARDS.** *Intensive care medicine* 1993, **19**(2):78-81.
- Kikuchi N, Ishii Y, Morishima Y. *et al.*: **Aggravation of bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice lacking peroxiredoxin I.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2011, **45**(3):600-9.
- Kim KJ, Suh DJ: **Asymmetric effects of H₂O₂ on alveolar epithelial barrier properties.** *The American journal of physiology* 1993, **264**(3 Pt 1):L308-15.
- King M: **Role of mucus viscoelasticity in clearance by cough.** *European journal of respiratory diseases Supplement* 1987, **153**:165-72.
- Kinnard WV, Tuder R, Papst P. *et al.*: **Regulation of alveolar type II cell differentiation and proliferation in adult rat lung explants.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1994, **11**(4):416-25.
- Kohno M, Haramoto M, Nakajima O. *et al.*: **Antedrug budesonide by intrapulmonary treatment attenuates bleomycin-induced lung injury in rats with minimal systemic adverse effects.** *Biological & pharmaceutical bulletin* 2010, **33**(7):1206-11.
- Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC. *et al.*: **Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis.** *The Journal of clinical investigation* 2001, **107**(12):1529-36.
- Konstan MW, Doring G, Lands LC: **Results of a phase II clinical trial of BIIL 284 BS (a LTB₄ receptor antagonist) for the treatment of CF lung disease.** *Pediatr Pulmonol* 2005, **40**(Suppl 28):125-26.
- Koontz CS, Higdon KK, Ploger TL. *et al.*: **Glucocorticoid rescue for late-phase acute respiratory distress syndrome in trauma/surgical critical care patients.** *The American surgeon* 2006, **72**(7):644-8.
- Korelitz BI: **Immunosuppressive therapy of inflammatory bowel disease: a historical perspective.** *The Gastroenterologist* 1995, **3**(2):141-52.

- Koshika T, Hirayama Y, Ohkubo Y. *et al.*: **Tacrolimus (FK506) has protective actions against murine bleomycin-induced acute lung injuries.** *European journal of pharmacology* 2005, **515**(1-3):169-78.
- Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV. *et al.*: **Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium.** *Development* 2001, **128**(24):5181-8.
- Kristof AS, Goldberg P, Laubach V. *et al.*: **Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998, **158**(6):1883-9.
- Krupa A, Kato H, Matthay MA. *et al.*: **Proinflammatory activity of anti-IL-8 autoantibody:IL-8 complexes in alveolar edema fluid from patients with acute lung injury.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2004, **286**(6):L1105-13.
- Krupa A, Walencka MJ, Shrivastava V. *et al.*: **Anti-KC autoantibody:KC complexes cause severe lung inflammation in mice via IgG receptors.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2007, **37**(5):532-43.
- Kumar KV, Rao SM, Gayani R. *et al.*: **Oxidant stress and essential fatty acids in patients with risk and established ARDS.** *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 2000, **298**(1-2):111-20.
- Kumar NM, Sigurdson SL, Sheppard D. *et al.*: **Differential modulation of integrin receptors and extracellular matrix laminin by transforming growth factor-beta 1 in rat alveolar epithelial cells.** *Experimental cell research* 1995, **221**(2):385-94.
- Kunugi S, Fukuda Y, Ishizaki M. *et al.*: **Role of MMP-2 in alveolar epithelial cell repair after bleomycin administration in rabbits.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2001, **81**(9):1309-18.
- Kurdowska A, Miller EJ, Noble JM. *et al.*: **Anti-IL-8 autoantibodies in alveolar fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome.** *Journal of immunology* 1996, **157**(6):2699-706.
- Kurdowska A, Noble JM, Grant IS. *et al.*: **Anti-interleukin-8 autoantibodies in patients at risk for acute respiratory distress syndrome.** *Critical care medicine* 2002, **30**(10):2335-7.
- Kurdowska A, Noble JM, Steinberg KP. *et al.*: **Anti-IL-8 autoantibodies in alveolar fluid from patients at risk for ARDS and with well-defined ARDS.** *Chest* 1999, **116**(1 Suppl):9S.
- Kurdowska A, Noble JM, Steinberg KP. *et al.*: **Anti-interleukin 8 autoantibody: interleukin 8 complexes in the acute respiratory distress syndrome. Relationship between the complexes and clinical disease activity.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **163**(2):463-8.
- Lamb NJ, Gutteridge JM, Baker C. *et al.*: **Oxidative damage to proteins of bronchoalveolar lavage fluid in patients with acute respiratory distress syndrome: evidence for neutrophil-mediated hydroxylation, nitration, and chlorination.** *Critical care medicine* 1999, **27**(9):1738-44.

- Lamkanfi M, Kanneganti TD: **Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation.** *The international journal of biochemistry & cell biology* 2010, **42**(1):21-4.
- Langenbach SY, Wheaton BJ, Fernandes DJ. *et al.*: **Resistance of fibrogenic responses to glucocorticoid and 2-methoxyestradiol in bleomycin-induced lung fibrosis in mice.** *Canadian journal of physiology and pharmacology* 2007, **85**(7):727-38.
- Lawrence DW, Comerford KM, Colgan SP: **Role of VASP in reestablishment of epithelial tight junction assembly after Ca²⁺ switch.** *American journal of physiology Cell physiology* 2002, **282**(6):C1235-45.
- Lazrak A, Samanta A, Venetsanou K. *et al.*: **Modification of biophysical properties of lung epithelial Na⁽⁺⁾ channels by dexamethasone.** *American journal of physiology Cell physiology* 2000, **279**(3):C762-70.
- Lecuona E, Saldias F, Comellas A. *et al.*: **Ventilator-associated lung injury decreases lung ability to clear edema and downregulates alveolar epithelial cell Na,K-adenosine triphosphatase function.** *Chest* 1999, **116**(1 Suppl):29S-30S.
- Lee JW, Fang X, Dolganov G. *et al.*: **Acute lung injury edema fluid decreases net fluid transport across human alveolar epithelial type II cells.** *The Journal of biological chemistry* 2007, **282**(33):24109-19.
- Lee JW, Gupta N, Serikov V. *et al.*: **Potential application of mesenchymal stem cells in acute lung injury.** *Expert opinion on biological therapy* 2009, **9**(10):1259-70.
- Lee SY, Maniak PJ, Ingbar DH. *et al.*: **Adult alveolar epithelial cells express multiple subtypes of voltage-gated K⁺ channels that are located in apical membrane.** *American journal of physiology Cell physiology* 2003a, **284**(6):C1614-24.
- Lee SY, Maniak PJ, Rhodes R. *et al.*: **Basolateral Cl⁻ transport is stimulated by terbutaline in adult rat alveolar epithelial cells.** *The Journal of membrane biology* 2003b, **191**(2):133-9.
- Lee VY, Schroedl C, Brunelle JK. *et al.*: **Bleomycin induces alveolar epithelial cell death through JNK-dependent activation of the mitochondrial death pathway.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2005, **289**(4):L521-8.
- Lee WL, Downey GP: **Neutrophil activation and acute lung injury.** *Current opinion in critical care* 2001, **7**(1):1-7.
- Lee YC, Yellowley CE, Li Z. *et al.*: **Expression of functional gap junctions in cultured pulmonary alveolar epithelial cells.** *The American journal of physiology* 1997, **272**(6 Pt 1):L1105-14.
- Leff JA, Bodman ME, Cho OJ. *et al.*: **Post-insult treatment with interleukin-1 receptor antagonist decreases oxidative lung injury in rats given intratracheal interleukin-1.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994, **150**(1):109-12.
- Leite-Junior JH, Garcia CS, Souza-Fernandes AB. *et al.*: **Methylprednisolone improves lung mechanics and reduces the inflammatory response in pulmonary but not in extrapulmonary mild acute lung injury in mice.** *Critical care medicine* 2008, **36**(9):2621-8.

- Lenz AG, Jorens PG, Meyer B. *et al.*: **Oxidatively modified proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ARDS and patients at-risk for ARDS.** *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 1999, **13**(1):169-74.
- Leroy C, Dagenais A, Berthiaume Y. *et al.*: **Molecular identity and function in transepithelial transport of K(ATP) channels in alveolar epithelial cells.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2004, **286**(5):L1027-37.
- Leroy C, Prive A, Bourret JC. *et al.*: **Regulation of ENaC and CFTR expression with K+ channel modulators and effect on fluid absorption across alveolar epithelial cells.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2006, **291**(6):L1207-19.
- Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C. *et al.*: **Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis.** *Gastroenterology* 1991, **101**(3):782-5.
- Lesur O, Arsalane K, Lane D: **Lung alveolar epithelial cell migration in vitro: modulators and regulation processes.** *The American journal of physiology* 1996, **270**(3 Pt 1):L311-9.
- Lesur O, Brisebois M, Thibodeau A. *et al.*: **Role of IFN-gamma and IL-2 in rat lung epithelial cell migration and apoptosis after oxidant injury.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2004, **286**(1):L4-L14.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI. *et al.*: **Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.** *Nature reviews Immunology* 2007, **7**(9):678-89.
- Li CW, Cheung W, Lin ZB. *et al.*: **Oral steroids enhance epithelial repair in nasal polyposis via upregulation of the AP-1 gene network.** *Thorax* 2009, **64**(4):306-12.
- Li Q, Park PW, Wilson CL. *et al.*: **Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury.** *Cell* 2002, **111**(5):635-46.
- Li YH, Brauner A, Jonsson B. *et al.*: **Inhibition of macrophage proinflammatory cytokine expression by steroids and recombinant IL-10.** *Biology of the neonate* 2001, **80**(2):124-32.
- Lin WC, Lin CF, Chen CL. *et al.*: **Prediction of outcome in patients with acute respiratory distress syndrome by bronchoalveolar lavage inflammatory mediators.** *Experimental biology and medicine* 2010, **235**(1):57-65.
- Lindenschmidt RC, Tryka AF, Godfrey GA. *et al.*: **Intratracheal versus intravenous administration of bleomycin in mice: acute effects.** *Toxicology and applied pharmacology* 1986, **85**(1):69-77.
- Lindert J, Perlman CE, Parthasarathi K. *et al.*: **Chloride-dependent secretion of alveolar wall liquid determined by optical-sectioning microscopy.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2007, **36**(6):688-96.

- Lister P, Iles R, Shaw B. *et al.*: **WITHDRAWN. Inhaled steroids for neonatal chronic lung disease.** *Cochrane database of systematic reviews* 2010(1):CD002311.
- Looney MR, Sartori C, Chakraborty S. *et al.*: **Decreased expression of both the alpha1- and alpha2-subunits of the Na-K-ATPase reduces maximal alveolar epithelial fluid clearance.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2005, **289**(1):L104-10.
- Lu Y, Song Z, Zhou X. *et al.*: **A 12-month clinical survey of incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in Shanghai intensive care units.** *Intensive care medicine* 2004, **30**(12):2197-203.
- Lubman RL, Danto SI, Chao DC. *et al.*: **Cl(-)-HCO₃- exchanger isoform AE2 is restricted to the basolateral surface of alveolar epithelial cell monolayers.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1995, **12**(2):211-9.
- Ma HP: **Hydrogen peroxide stimulates the epithelial sodium channel through a phosphatidylinositide 3-kinase-dependent pathway.** *The Journal of biological chemistry* 2011, **286**(37):32444-53.
- Maille E, Trinh NT, Prive A. *et al.*: **Regulation of normal and cystic fibrosis airway epithelial repair processes by TNF-alpha after injury.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2011, **301**(6):L945-55.
- Maina JN, West JB: **Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood-gas barrier.** *Physiological reviews* 2005, **85**(3):811-44.
- Mairbaurl H: **Role of alveolar epithelial sodium transport in high altitude pulmonary edema (HAPE).** *Respiratory physiology & neurobiology* 2006, **151**(2-3):178-91.
- Maitre B, Boussat S, Jean D. *et al.*: **Vascular endothelial growth factor synthesis in the acute phase of experimental and clinical lung injury.** *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2001, **18**(1):100-6.
- Mall M, Grubb BR, Harkema JR. *et al.*: **Increased airway epithelial Na⁺ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice.** *Nature medicine* 2004, **10**(5):487-93.
- Maniatis NA, Harokopos V, Thanassopoulou A. *et al.*: **A critical role for gelsolin in ventilator-induced lung injury.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2009, **41**(4):426-32.
- Mansour H, Levacher M, Azoulay-Dupuis E. *et al.*: **Genetic differences in response to pulmonary cytochrome P-450 inducers and oxygen toxicity.** *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 1988, **64**(4):1376-81.
- Martich GD, Danner RL, Ceska M. *et al.*: **Detection of interleukin 8 and tumor necrosis factor in normal humans after intravenous endotoxin: the effect of antiinflammatory agents.** *The Journal of experimental medicine* 1991, **173**(4):1021-4.
- Martin P, Leibovich SJ: **Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly.** *Trends in cell biology* 2005, **15**(11):599-607.

- Martin TR, Pistorese BP, Chi EY. *et al.*: **Effects of leukotriene B4 in the human lung. Recruitment of neutrophils into the alveolar spaces without a change in protein permeability.** *The Journal of clinical investigation* 1989, **84**(5):1609-19.
- Martinet Y, Menard O, Vaillant P. *et al.*: **Cytokines in human lung fibrosis.** *Archives of toxicology Supplement = Archiv fur Toxikologie Supplement* 1996, **18**:127-39.
- Mason RJ, Williams MC, Widdicombe JH. *et al.*: **Transepithelial transport by pulmonary alveolar type II cells in primary culture.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982, **79**(19):6033-7.
- Matheson M, McClean M, Rynell AC. *et al.*: **Methylprednisolone reduces airway microvascular permeability but not airway resistance induced by N-formylmethionine leucyl-phenylalanine in the rabbit.** *Respirology* 2004, **9**(2):211-4.
- Mathies H, Schattenkirchner M: **[Cortisone therapy of rheumatism].** *Der Internist* 1967, **8**(3):117-23.
- Mathru M, Rooney MW, Dries DJ. *et al.*: **Urine hydrogen peroxide during adult respiratory distress syndrome in patients with and without sepsis.** *Chest* 1994, **105**(1):232-6.
- Matthay MA: **Alveolar fluid clearance in patients with ARDS: does it make a difference?** *Chest* 2002, **122**(6 Suppl):340S-43S.
- Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C: **Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema.** *Physiological reviews* 2002, **82**(3):569-600.
- Matthay MA, Folkesson HG, Verkman AS: **Salt and water transport across alveolar and distal airway epithelia in the adult lung.** *The American journal of physiology* 1996, **270**(4 Pt 1):L487-503.
- Matthay MA, Fukuda N, Frank J. *et al.*: **Alveolar epithelial barrier. Role in lung fluid balance in clinical lung injury.** *Clinics in chest medicine* 2000, **21**(3):477-90.
- Matthay MA, Goolaerts A, Howard JP. *et al.*: **Mesenchymal stem cells for acute lung injury: preclinical evidence.** *Critical care medicine* 2010, **38**(10 Suppl):S569-73.
- Matthay MA, Landolt CC, Staub NC: **Differential liquid and protein clearance from the alveoli of anesthetized sheep.** *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 1982, **53**(1):96-104.
- Matthay MA, Robriquet L, Fang X: **Alveolar epithelium: role in lung fluid balance and acute lung injury.** *Proceedings of the American Thoracic Society* 2005, **2**(3):206-13.
- Matthay MA, Wiener-Kronish JP: **Intact epithelial barrier function is critical for the resolution of alveolar edema in humans.** *The American review of respiratory disease* 1990, **142**(6 Pt 1):1250-7.
- Matthay MA, Zemans RL: **The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment.** *Annual review of pathology* 2011, **6**:147-63.
- Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR: **Animal models of acute lung injury.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2008, **295**(3):L379-99.

- Maus U, Huwe J, Maus R. *et al.*: **Alveolar JE/MCP-1 and endotoxin synergize to provoke lung cytokine upregulation, sequential neutrophil and monocyte influx, and vascular leakage in mice.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **164**(3):406-11.
- McGowan SE: **Extracellular matrix and the regulation of lung development and repair.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1992, **6**(11):2895-904.
- McGraw DW, Fukuda N, James PF. *et al.*: **Targeted transgenic expression of beta(2)-adrenergic receptors to type II cells increases alveolar fluid clearance.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2001, **281**(4):L895-903.
- Meban C: **Cytochemistry of the gas-exchange area in vertebrate lungs.** *Progress in histochemistry and cytochemistry* 1987, **17**(1):1-54.
- Meduri GU, Annane D, Chrousos GP. *et al.*: **Activation and regulation of systemic inflammation in ARDS: rationale for prolonged glucocorticoid therapy.** *Chest* 2009, **136**(6):1631-43.
- Meduri GU, Annane D, Marik PE: **Evidence-based support for prolonged glucocorticoid treatment in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome.** *Critical care medicine* 2011, **39**(1):225; author reply 25-6.
- Meduri GU, Golden E, Freire AX. *et al.*: **Methylprednisolone infusion in early severe ARDS: results of a randomized controlled trial.** *Chest* 2007, **131**(4):954-63.
- Meduri GU, Kohler G, Headley S. *et al.*: **Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome.** *Chest* 1995, **108**(5):1303-14.
- Meduri GU, Muthiah MP, Carratu P. *et al.*: **Nuclear factor-kappaB- and glucocorticoid receptor alpha- mediated mechanisms in the regulation of systemic and pulmonary inflammation during sepsis and acute respiratory distress syndrome. Evidence for inflammation-induced target tissue resistance to glucocorticoids.** *Neuroimmunomodulation* 2005, **12**(6):321-38.
- Meduri GU, Tolley EA, Chrousos GP. *et al.*: **Prolonged methylprednisolone treatment suppresses systemic inflammation in patients with unresolving acute respiratory distress syndrome: evidence for inadequate endogenous glucocorticoid secretion and inflammation-induced immune cell resistance to glucocorticoids.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002, **165**(7):983-91.
- Metnitz PG, Bartens C, Fischer M. *et al.*: **Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome.** *Intensive care medicine* 1999, **25**(2):180-5.
- Mikami R, Fukushima Y, Sasa S. *et al.*: **[Role of steroid therapy in respiratory tract diseases].** *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine* 1966, **24**(5):883-903.
- Milberg JA, Davis DR, Steinberg KP. *et al.*: **Improved survival of patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): 1983-1993.** *JAMA : the journal of the American Medical Association* 1995, **273**(4):306-9.

- Miller EJ, Cohen AB, Nagao S. *et al.*: **Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality.** *The American review of respiratory disease* 1992, **146**(2):427-32.
- Modelska K, Matthay MA, Brown LA. *et al.*: **Inhibition of beta-adrenergic-dependent alveolar epithelial clearance by oxidant mechanisms after hemorrhagic shock.** *The American journal of physiology* 1999, **276**(5 Pt 1):L844-57.
- Moodley Y, Rigby P, Bundell C. *et al.*: **Macrophage recognition and phagocytosis of apoptotic fibroblasts is critically dependent on fibroblast-derived thrombospondin 1 and CD36.** *The American journal of pathology* 2003, **162**(3):771-9.
- Morales MM, Pires-Neto RC, Inforsato N. *et al.*: **Small airway remodeling in acute respiratory distress syndrome: a study in autopsy lung tissue.** *Critical care* 2011, **15**(1):R4.
- Mouhieddine OB, Cazals V, Kuto E. *et al.*: **Glucocorticoid-induced growth arrest of lung alveolar epithelial cells is associated with increased production of insulin-like growth factor binding protein-2.** *Endocrinology* 1996, **137**(1):287-95.
- Mukherjee TK, Mukhopadhyay S, Hoidal JR: **The role of reactive oxygen species in TNFalpha-dependent expression of the receptor for advanced glycation end products in human umbilical vein endothelial cells.** *Biochimica et biophysica acta* 2005, **1744**(2):213-23.
- Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK: **Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology.** *Respiratory research* 2006, **7**:125.
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H. *et al.*: **The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis.** *Cell* 1999, **96**(3):319-28.
- Murray JF, Matthay MA, Luce JM. *et al.*: **An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome.** *The American review of respiratory disease* 1988, **138**(3):720-3.
- Nakagome K, Dohi M, Okunishi K. *et al.*: **In vivo IL-10 gene delivery attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting the production and activation of TGF-beta in the lung.** *Thorax* 2006, **61**(10):886-94.
- Nakano Y, Kasahara T, Mukaida N. *et al.*: **Protection against lethal bacterial infection in mice by monocyte-chemotactic and -activating factor.** *Infection and immunity* 1994, **62**(2):377-83.
- National Heart L, Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome Clinical Trials N, Matthay MA. *et al.*: **Randomized, placebo-controlled clinical trial of an aerosolized beta-agonist for treatment of acute lung injury.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2011, **184**(5):561-8.
- Nguyen MD, Simpson-Haidaris PJ: **Cell type-specific regulation of fibrinogen expression in lung epithelial cells by dexamethasone and interleukin-1beta.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2000, **22**(2):209-17.

- Nici L, Dowin R, Gilmore-Hebert M. *et al.*: **Upregulation of rat lung Na-K-ATPase during hyperoxic injury.** *The American journal of physiology* 1991, **261**(4 Pt 1):L307-14.
- Nishioka A, Ogawa Y, Mima T. *et al.*: **Histopathologic amelioration of fibroproliferative change in rat irradiated lung using soluble transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor mediated by adenoviral vector.** *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2004, **58**(4):1235-41.
- Noda M, Suzuki S, Tsubochi H. *et al.*: **Single dexamethasone injection increases alveolar fluid clearance in adult rats.** *Critical care medicine* 2003, **31**(4):1183-9.
- Norlin A, Lu LN, Guggino SE. *et al.*: **Contribution of amiloride-insensitive pathways to alveolar fluid clearance in adult rats.** *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 2001, **90**(4):1489-96.
- O'Grady SM, Jiang X, Ingbar DH: **Cl-channel activation is necessary for stimulation of Na transport in adult alveolar epithelial cells.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2000, **278**(2):L239-44.
- O'Grady SM, Lee SY: **Chloride and potassium channel function in alveolar epithelial cells.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2003, **284**(5):L689-700.
- O'Kane CM, McKeown SW, Perkins GD. *et al.*: **Salbutamol up-regulates matrix metalloproteinase-9 in the alveolar space in the acute respiratory distress syndrome.** *Critical care medicine* 2009, **37**(7):2242-9.
- Ognibene FP, Martin SE, Parker MM. *et al.*: **Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia.** *The New England journal of medicine* 1986, **315**(9):547-51.
- Ohar JA, Donohue JF: **Mono- and combination therapy of long-acting bronchodilators and inhaled corticosteroids in advanced COPD.** *Seminars in respiratory and critical care medicine* 2010, **31**(3):321-33.
- Ohmichi H, Matsumoto K, Nakamura T: **In vivo mitogenic action of HGF on lung epithelial cells: pulmotrophic role in lung regeneration.** *The American journal of physiology* 1996, **270**(6 Pt 1):L1031-9.
- Oikonomou N, Thanasopoulou A, Tzouvelekis A. *et al.*: **Gelsolin expression is necessary for the development of modelled pulmonary inflammation and fibrosis.** *Thorax* 2009, **64**(6):467-75.
- Oliveira RH, Basille Filho A: **Incidence of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in the intensive care unit of a university hospital: a prospective study.** *Jornal brasileiro de pneumologia : publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia* 2006, **32**(1):35-42.
- Olivera WG, Ridge KM, Sznajder JI: **Lung liquid clearance and Na,K-ATPase during acute hyperoxia and recovery in rats.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1995, **152**(4 Pt 1):1229-34.
- Opal SM, Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF. *et al.*: **Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind,**

- placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Critical care medicine* 1997, 25(7):1115-24.**
- Ortiz LA, Lasky J, Hamilton RF, Jr. *et al.*: **Expression of TNF and the necessity of TNF receptors in bleomycin-induced lung injury in mice. *Experimental lung research* 1998, 24(6):721-43.**
- Otto WR: **Lung epithelial stem cells. *The Journal of pathology* 2002, 197(4):527-35.**
- Pacht ER, Timerman AP, Lykens MG. *et al.*: **Deficiency of alveolar fluid glutathione in patients with sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Chest* 1991, 100(5):1397-403.**
- Pallister I, Dent C, Topley N: **Increased neutrophil migratory activity after major trauma: a factor in the etiology of acute respiratory distress syndrome? *Critical care medicine* 2002, 30(8):1717-21.**
- Panos RJ, Bak PM, Simonet WS. *et al.*: **Intratracheal instillation of keratinocyte growth factor decreases hyperoxia-induced mortality in rats. *The Journal of clinical investigation* 1995, 96(4):2026-33.**
- Panos RJ, Rubin JS, Csaky KG. *et al.*: **Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. *The Journal of clinical investigation* 1993, 92(2):969-77.**
- Park WY, Goodman RB, Steinberg KP. *et al.*: **Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, 164(10 Pt 1):1896-903.**
- Parsons PE, Matthay MA, Ware LB. *et al.*: **Elevated plasma levels of soluble TNF receptors are associated with morbidity and mortality in patients with acute lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2005, 288(3):L426-31.**
- Pedersen LR, Mullertz K, Amtorp O. *et al.*: **Enhanced alveolar fluid clearance following 72-h of continuous isoproterenol infusion in rats. *Acta Physiol (Oxf)*.**
- Perkins GD, Gao F, Thickett DR: **In vivo and in vitro effects of salbutamol on alveolar epithelial repair in acute lung injury. *Thorax* 2008, 63(3):215-20.**
- Perkins GD, McAuley DF, Thickett DR. *et al.*: **The beta-agonist lung injury trial (BALTI): a randomized placebo-controlled clinical trial. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2006, 173(3):281-7.**
- Perkins GD, Nathani N, McAuley DF. *et al.*: **In vitro and in vivo effects of salbutamol on neutrophil function in acute lung injury. *Thorax* 2007, 62(1):36-42.**
- Petty JM, Sueblinvong V, Lenox CC. *et al.*: **Pulmonary stromal-derived factor-1 expression and effect on neutrophil recruitment during acute lung injury. *Journal of immunology* 2007, 178(12):8148-57.**
- Pezeshki G, Pohl T, Schobitz B: **Corticosterone controls interleukin-1 beta expression and sickness behavior in the rat. *Journal of neuroendocrinology* 1996, 8(2):129-35.**
- Phalen RF, Oldham MJ: **Tracheobronchial airway structure as revealed by casting techniques. *The American review of respiratory disease* 1983, 128(2 Pt 2):S1-4.**

- Phan SH, Kunkel SL: **Lung cytokine production in bleomycin-induced pulmonary fibrosis.** *Experimental lung research* 1992, **18**(1):29-43.
- Piguet PF, Collart MA, Grau GE. *et al.*: **Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis.** *The Journal of experimental medicine* 1989, **170**(3):655-63.
- Piotrowicz RS, Damaj BB, Hachicha M. *et al.*: **A6 peptide activates CD44 adhesive activity, induces FAK and MEK phosphorylation, and inhibits the migration and metastasis of CD44-expressing cells.** *Molecular cancer therapeutics* 2011, **10**(11):2072-82.
- Pitkanen OM, Smith D, O'Brodovich H. *et al.*: **Expression of alpha-, beta-, and gamma-hENaC mRNA in the human nasal, bronchial, and distal lung epithelium.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **163**(1):273-6.
- Pittet JF, Griffiths MJ, Geiser T. *et al.*: **TGF-beta is a critical mediator of acute lung injury.** *The Journal of clinical investigation* 2001, **107**(12):1537-44.
- Pittet JF, Mackersie RC, Martin TR. *et al.*: **Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997, **155**(4):1187-205.
- Planus E, Galiacy S, Matthay M. *et al.*: **Role of collagenase in mediating in vitro alveolar epithelial wound repair.** *Journal of cell science* 1999, **112** (Pt 2):243-52.
- Pompermayer K, Amaral FA, Fagundes CT. *et al.*: **Effects of the treatment with glibenclamide, an ATP-sensitive potassium channel blocker, on intestinal ischemia and reperfusion injury.** *European journal of pharmacology* 2007, **556**(1-3):215-22.
- Pontremoli S, De Flora A, Salamino F. *et al.*: **Hormonal effects on structure and catalytic properties of fructose 1,6-bisphosphatase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975, **72**(8):2969-73.
- Powe JE, Short A, Sibbald WJ. *et al.*: **Pulmonary accumulation of polymorphonuclear leukocytes in the adult respiratory distress syndrome.** *Critical care medicine* 1982, **10**(11):712-8.
- Powell WS, Gravel S, MacLeod RJ. *et al.*: **Stimulation of human neutrophils by 5-oxo-6,8,11,14-eicosatetraenoic acid by a mechanism independent of the leukotriene B4 receptor.** *The Journal of biological chemistry* 1993, **268**(13):9280-6.
- Presneill JJ, Harris T, Stewart AG. *et al.*: **A randomized phase II trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in severe sepsis with respiratory dysfunction.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2002, **166**(2):138-43.
- Pugin J, Ricou B, Steinberg KP. *et al.*: **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**(6 Pt 1):1850-6.
- Pugin J, Verghese G, Widmer MC. *et al.*: **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**(2):304-12.

- Quinlan GJ, Lamb NJ, Evans TW. *et al.*: **Plasma fatty acid changes and increased lipid peroxidation in patients with adult respiratory distress syndrome.** *Critical care medicine* 1996, **24**(2):241-6.
- Rahman I: **Regulation of nuclear factor-kappa B, activator protein-1, and glutathione levels by tumor necrosis factor-alpha and dexamethasone in alveolar epithelial cells.** *Biochemical pharmacology* 2000, **60**(8):1041-9.
- Rannels SR, Jefferson LS: **Effects of glucocorticoids on muscle protein turnover in perfused rat hemitorus.** *The American journal of physiology* 1980, **238**(6):E564-72.
- Reddy R, Buckley S, Doerken M. *et al.*: **Isolation of a putative progenitor subpopulation of alveolar epithelial type 2 cells.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2004, **286**(4):L658-67.
- Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J. *et al.*: **Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days.** *Shock* 2002, **17**(6):463-7.
- Rendina EA, Venuta F, Ricci C: **Effects of low-dose steroids on bronchial healing after sleeve resection. A clinical study.** *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 1992, **104**(4):888-91.
- Reutershan J, Basit A, Galkina EV. *et al.*: **Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2005, **289**(5):L807-15.
- Reynolds SD, Reynolds PR, Snyder JC. *et al.*: **CCSP regulates cross talk between secretory cells and both ciliated cells and macrophages of the conducting airway.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007, **293**(1):L114-23.
- Ricou B, Nicod L, Lacraz S. *et al.*: **Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996, **154**(2 Pt 1):346-52.
- Rocco PR, Dos Santos C, Pelosi P: **Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome.** *Minerva anestesiologica* 2009, **75**(12):730-40.
- Rodrigo GJ, Neffen H, Castro-Rodriguez JA: **Efficacy and safety of subcutaneous omalizumab vs placebo as add-on therapy to corticosteroids for children and adults with asthma: a systematic review.** *Chest* 2011, **139**(1):28-35.
- Rottner K, Hall A, Small JV: **Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics.** *Current biology : CB* 1999, **9**(12):640-8.
- Rubinfeld GD, Caldwell E, Peabody E. *et al.*: **Incidence and outcomes of acute lung injury.** *The New England journal of medicine* 2005, **353**(16):1685-93.
- Sagnella GA, Swift PA: **The renal epithelial sodium channel: genetic heterogeneity and implications for the treatment of high blood pressure.** *Current pharmaceutical design* 2006, **12**(18):2221-34.
- Sakuma T, Okaniwa G, Nakada T. *et al.*: **Alveolar fluid clearance in the resected human lung.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994, **150**(2):305-10.

- Sakuma T, Takahashi K, Ohya N. *et al.*: **Effects of ATP-sensitive potassium channel opener on potassium transport and alveolar fluid clearance in the resected human lung.** *Pharmacology & toxicology* 1998, **83**(1):16-22.
- Sakuma T, Tsukano C, Ishigaki M. *et al.*: **Lung deflation impairs alveolar epithelial fluid transport in ischemic rabbit and rat lungs.** *Transplantation* 2000, **69**(9):1785-93.
- Salter M, Biggadike K, Matthews JL. *et al.*: **Pharmacological properties of the enhanced-affinity glucocorticoid fluticasone furoate in vitro and in an in vivo model of respiratory inflammatory disease.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007, **293**(3):L660-7.
- Sartori C, Matthay MA: **Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights.** *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2002, **20**(5):1299-313.
- Saumon G, Basset G: **Electrolyte and fluid transport across the mature alveolar epithelium.** *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 1993, **74**(1):1-15.
- Sayegh R, Auerbach SD, Li X. *et al.*: **Glucocorticoid induction of epithelial sodium channel expression in lung and renal epithelia occurs via trans-activation of a hormone response element in the 5'-flanking region of the human epithelial sodium channel alpha subunit gene.** *The Journal of biological chemistry* 1999, **274**(18):12431-7.
- Schnackenberg BJ, Jones SM, Pate C. *et al.*: **The beta-agonist isoproterenol attenuates EGF-stimulated wound closure in human airway epithelial cells.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2006, **290**(3):L485-91.
- Schneeberger EE, Walters DV, Olver RE: **Development of intercellular junctions in the pulmonary epithelium of the foetal lamb.** *Journal of cell science* 1978, **32**:307-24.
- Schneider GT, Cook DI, Gage PW. *et al.*: **Voltage sensitive, high-conductance chloride channels in the luminal membrane of cultured pulmonary alveolar (type II) cells.** *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 1985, **404**(4):354-7.
- Schwarz MA: **Acute lung injury: cellular mechanisms and derangements.** *Paediatric respiratory reviews* 2001, **2**(1):3-9.
- Schwiebert EM, Potter ED, Hwang TH. *et al.*: **cGMP stimulates sodium and chloride currents in rat tracheal airway epithelia.** *The American journal of physiology* 1997, **272**(3 Pt 1):C911-22.
- Seeger W, Elssner A, Gunther A. *et al.*: **Lung surfactant phospholipids associate with polymerizing fibrin: loss of surface activity.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1993a, **9**(2):213-20.
- Seeger W, Gunther A, Walmrath HD. *et al.*: **Alveolar surfactant and adult respiratory distress syndrome. Pathogenetic role and therapeutic prospects.** *The Clinical investigator* 1993b, **71**(3):177-90.

- Sharma SK, MacLean JA, Pinto C. *et al.*: **The effect of an anti-CD3 monoclonal antibody on bleomycin-induced lymphokine production and lung injury.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1996, **154**(1):193-200.
- Shelhamer JH, Levine SJ, Wu T. *et al.*: **NIH conference. Airway inflammation.** *Annals of internal medicine* 1995, **123**(4):288-304.
- Shenkar R, Coulson WF, Abraham E: **Anti-transforming growth factor-beta monoclonal antibodies prevent lung injury in hemorrhaged mice.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1994, **11**(3):351-7.
- Shimabukuro DW, Sawa T, Gropper MA: **Injury and repair in lung and airways.** *Critical care medicine* 2003, **31**(8 Suppl):S524-31.
- Shiue ST, Thrall RS: **Effect of corticosteroid therapy on the acute injury and recovery stage of oleic acid induced lung injury in the rat.** *Experimental lung research* 1991, **17**(3):629-38.
- Shu LH, Wei KL, Xue XD. *et al.*: **Effects of dexamethasone on the ultrastructure of alveolar type II cells in young rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury.** *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics* 2007a, **9**(6):521-5.
- Shu LH, Xue XD, Shu LH. *et al.*: **Effect of dexamethasone on the content of pulmonary surfactant protein D in young rats with acute lung injury induced by lipopolysaccharide.** *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics* 2007b, **9**(2):155-8.
- Siler TM, Swierkosz JE, Hyers TM. *et al.*: **Immunoreactive interleukin-1 in bronchoalveolar lavage fluid of high-risk patients and patients with the adult respiratory distress syndrome.** *Experimental lung research* 1989, **15**(6):881-94.
- Sittipunt C, Steinberg KP, Ruzinski JT. *et al.*: **Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **163**(2):503-10.
- Sleigh MA, Blake JR, Liron N: **The propulsion of mucus by cilia.** *The American review of respiratory disease* 1988, **137**(3):726-41.
- Small JV, Kaverina I, Krylyshkina O. *et al.*: **Cytoskeleton cross-talk during cell motility.** *FEBS letters* 1999, **452**(1-2):96-9.
- Smith LJ, Brody JS: **Influence of methylprednisolone on mouse alveolar type 2 cell response to acute lung injury.** *The American review of respiratory disease* 1981, **123**(4 Pt 1):459-64.
- Smith RE, Strieter RM, Phan SH. *et al.*: **TNF and IL-6 mediate MIP-1alpha expression in bleomycin-induced lung injury.** *Journal of leukocyte biology* 1998, **64**(4):528-36.
- Smith RE, Strieter RM, Phan SH. *et al.*: **Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1 alpha in bleomycin-induced lung injury.** *Journal of immunology* 1994, **153**(10):4704-12.
- Snyder PM, Cheng C, Prince LS. *et al.*: **Electrophysiological and biochemical evidence that DEG/ENaC cation channels are composed of nine subunits.** *The Journal of biological chemistry* 1998, **273**(2):681-4.

- Sostman HD, Matthay RA, Putman CE: **Cytotoxic drug-induced lung disease.** *The American journal of medicine* 1977, **62**(4):608-15.
- Steinberg KP, Hudson LD, Goodman RB. *et al.*: **Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome.** *The New England journal of medicine* 2006, **354**(16):1671-84.
- Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR. *et al.*: **Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1994, **150**(1):113-22.
- Steiner A, Vogt E, Locher R. *et al.*: **Stimulation of the phosphoinositide signalling system as a possible mechanism for glucocorticoid action in blood pressure control.** *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension* 1988, **6**(4):S366-8.
- Strieter RM, Kunkel SL, Keane MP. *et al.*: **Chemokines in lung injury: Thomas A. Neff Lecture.** *Chest* 1999, **116**(1 Suppl):103S-10S.
- Stripp BR, Reynolds SD, Boe IM. *et al.*: **Clara cell secretory protein deficiency alters clara cell secretory apparatus and the protein composition of airway lining fluid.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2002, **27**(2):170-8.
- Syrenki L, Chandel NS, Budinger GR. *et al.*: **Bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome induces myofibroblast differentiation.** *Critical care medicine* 2007, **35**(3):842-8.
- Szabo C, Billiar TR: **Novel roles of nitric oxide in hemorrhagic shock.** *Shock* 1999, **12**(1):1-9.
- Sznajder JI: **Strategies to increase alveolar epithelial fluid removal in the injured lung.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1999, **160**(5 Pt 1):1441-2.
- Tasaka S, Amaya F, Hashimoto S. *et al.*: **Roles of oxidants and redox signaling in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome.** *Antioxidants & redox signaling* 2008, **10**(4):739-53.
- Tchepichev S, Ueda J, Canessa C. *et al.*: **Lung epithelial Na channel subunits are differentially regulated during development and by steroids.** *The American journal of physiology* 1995, **269**(3 Pt 1):C805-12.
- Teiwes J, Toto RD: **Epithelial sodium channel inhibition in cardiovascular disease. A potential role for amiloride.** *American journal of hypertension* 2007, **20**(1):109-17.
- Theise ND, Henegariu O, Grove J. *et al.*: **Radiation pneumonitis in mice: a severe injury model for pneumocyte engraftment from bone marrow.** *Experimental hematology* 2002, **30**(11):1333-8.
- Thickett DR, Perkins GD: **IL1 may be elevated but is it all bad in ARDS?** *Thorax* 2008, **63**(8):750-1; author reply 51.
- Thommasen HV: **The role of the polymorphonuclear leukocyte in the pathogenesis of the adult respiratory distress syndrome.** *Clinical and investigative medicine Medecine clinique et experimentale* 1985, **8**(2):185-94.

- Thommasen HV, Russell JA, Boyko WJ. *et al.*: **Transient leucopenia associated with adult respiratory distress syndrome.** *Lancet* 1984, **1**(8381):809-12.
- Thrall RS, McCormick JR, Jack RM. *et al.*: **Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat: inhibition by indomethacin.** *The American journal of pathology* 1979, **95**(1):117-30.
- Tokuda A, Itakura M, Onai N. *et al.*: **Pivotal role of CCR1-positive leukocytes in bleomycin-induced lung fibrosis in mice.** *Journal of immunology* 2000, **164**(5):2745-51.
- Tomashefski JF, Jr.: **Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome.** *Clinics in chest medicine* 1990, **11**(4):593-619.
- Tonkova-Iampol'skaia RV, Chertok T: **[Preventive aspects in the development and health status of young children].** *Pediatrriia* 1989(5):72-9.
- Torii K, Iida K, Miyazaki Y. *et al.*: **Higher concentrations of matrix metalloproteinases in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997, **155**(1):43-6.
- Trinh NT, Prive A, Kheir L. *et al.*: **Involvement of KATP and KvLQT1 K⁺ channels in EGF-stimulated alveolar epithelial cell repair processes.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007, **293**(4):L870-82.
- Trinh NT, Prive A, Maille E. *et al.*: **EGF and K⁺ channel activity control normal and cystic fibrosis bronchial epithelia repair.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2008, **295**(5):L866-80.
- Tsushima K, King LS, Aggarwal NR. *et al.*: **Acute lung injury review.** *Internal medicine* 2009, **48**(9):621-30.
- Uhal BD: **Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium.** *The American journal of physiology* 1997, **272**(6 Pt 1):L1031-45.
- Ulich TR, Yi ES, Longmuir K. *et al.*: **Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo.** *The Journal of clinical investigation* 1994, **93**(3):1298-306.
- Umezawa H: **Bleomycin and other antitumor antibiotics of high molecular weight.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1965, **5**:1079-85.
- Vaillant P, Menard O, Vignaud JM. *et al.*: **The role of cytokines in human lung fibrosis.** *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace / Fondazione clinica del lavoro, IRCCS [and] Istituto di clinica fisiologica e malattie apparato respiratorio, Universita di Napoli, Secondo ateneo* 1996, **51**(2):145-52.
- Van den Steen PE, Geurts N, Deroost K. *et al.*: **Immunopathology and dexamethasone therapy in a new model for malaria-associated acute respiratory distress syndrome.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2010, **181**(9):957-68.
- van der Poll T, Jansen PM, Montegut WJ. *et al.*: **Effects of IL-10 on systemic inflammatory responses during sublethal primate endotoxemia.** *Journal of immunology* 1997, **158**(4):1971-5.

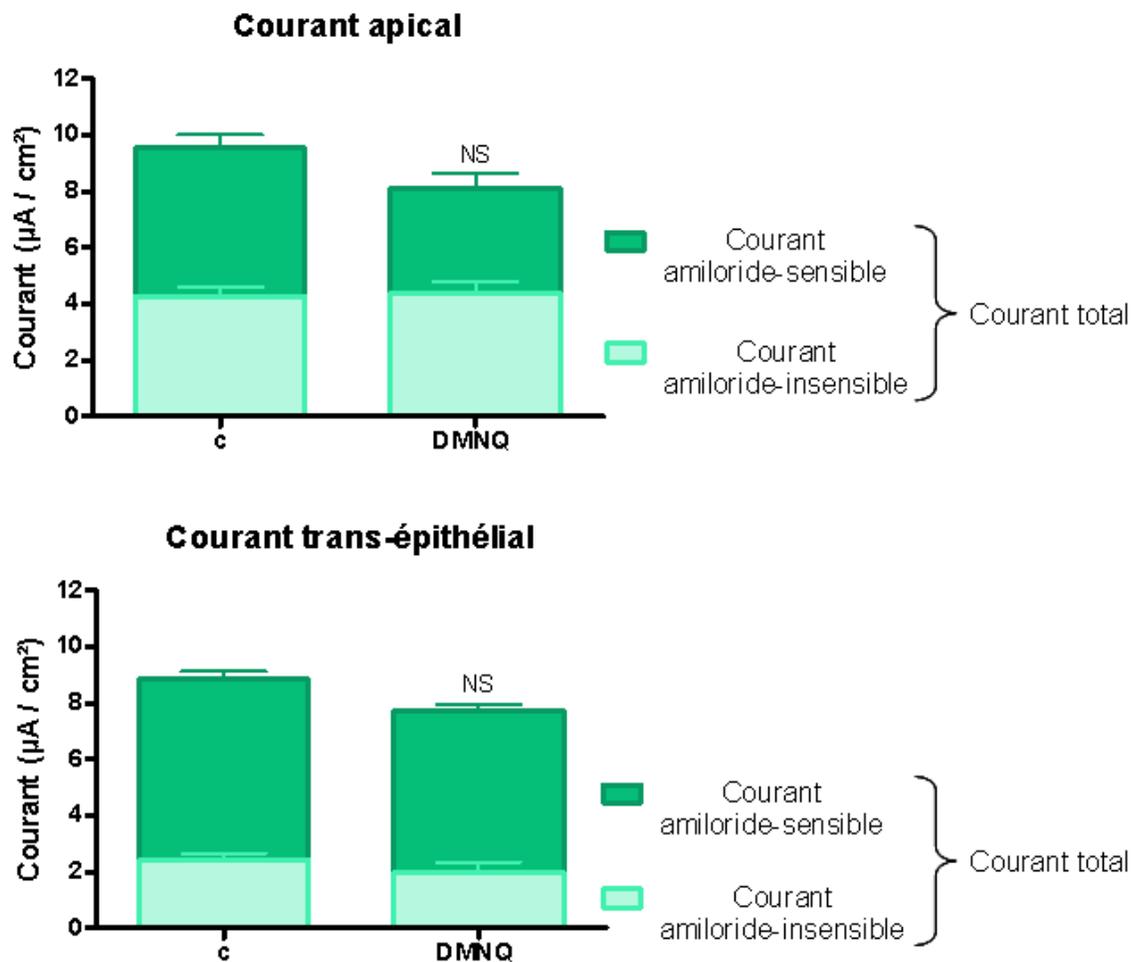
- van der Saag PT, Caldenhoven E, van de Stolpe A: **Molecular mechanisms of steroid action: a novel type of cross-talk between glucocorticoids and NF-kappa B transcription factors.** *The European respiratory journal Supplement* 1996, **22**:146s-53s.
- Van Winkle LS, Isaac JM, Plopper CG: **Distribution of epidermal growth factor receptor and ligands during bronchiolar epithelial repair from naphthalene-induced Clara cell injury in the mouse.** *The American journal of pathology* 1997, **151**(2):443-59.
- Vansteenkiste JF, Boogaerts MA: **Adult respiratory distress syndrome in neutropenic leukemia patients.** *Blut* 1989, **58**(6):287-90.
- Venkatesh VC, Katzberg HD: **Glucocorticoid regulation of epithelial sodium channel genes in human fetal lung.** *The American journal of physiology* 1997, **273**(1 Pt 1):L227-33.
- Verghese GM, McCormick-Shannon K, Mason RJ. *et al.*: **Hepatocyte growth factor and keratinocyte growth factor in the pulmonary edema fluid of patients with acute lung injury. Biologic and clinical significance.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998, **158**(2):386-94.
- Verkman AS: **Role of aquaporins in lung liquid physiology.** *Respiratory physiology & neurobiology* 2007, **159**(3):324-30.
- Vernon-Roberts B, Jessop JD, Dore J: **Effects of gold salts and prednisolone on inflammatory cells. II. Suppression of inflammation and phagocytosis in the rat.** *Annals of the rheumatic diseases* 1973, **32**(4):301-7.
- Verriere VA, Hynes D, Faherty S. *et al.*: **Rapid effects of dexamethasone on intracellular pH and Na⁺/H⁺ exchanger activity in human bronchial epithelial cells.** *The Journal of biological chemistry* 2005, **280**(43):35807-14.
- Vetter AE, Deachapunya C, O'Grady SM: **Na absorption across endometrial epithelial cells is stimulated by cAMP-dependent activation of an inwardly rectifying K channel.** *The Journal of membrane biology* 1997, **160**(2):119-26.
- Vicente R, Escalada A, Coma M. *et al.*: **Differential voltage-dependent K⁺ channel responses during proliferation and activation in macrophages.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(47):46307-20.
- Villar J, Slutsky AS: **The incidence of the adult respiratory distress syndrome.** *The American review of respiratory disease* 1989, **140**(3):814-6.
- Voilley N, Bassilana F, Mignon C. *et al.*: **Cloning, chromosomal localization, and physical linkage of the beta and gamma subunits (SCNN1B and SCNN1G) of the human epithelial amiloride-sensitive sodium channel.** *Genomics* 1995, **28**(3):560-5.
- Voilley N, Lingueglia E, Champigny G. *et al.*: **The lung amiloride-sensitive Na⁺ channel: biophysical properties, pharmacology, ontogenesis, and molecular cloning.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**(1):247-51.

- Waage A, Bakke O: **Glucocorticoids suppress the production of tumour necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes.** *Immunology* 1988, **63**(2):299-302.
- Wadsworth SJ, Nijmeh HS, Hall IP: **Glucocorticoids increase repair potential in a novel in vitro human airway epithelial wounding model.** *Journal of clinical immunology* 2006, **26**(4):376-87.
- Wallach-Dayana SB, Izbicki G, Cohen PY. *et al.*: **Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2006, **290**(4):L790-L96.
- Walther UI, Stets R: **Glucocorticoid pretreatment increases toxicity due to peroxides in alveolar epithelial-like cell lines.** *Toxicology* 2009, **256**(1-2):48-52.
- Wang HC, Zentner MD, Deng HT. *et al.*: **Oxidative stress disrupts glucocorticoid hormone-dependent transcription of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel alpha-subunit in lung epithelial cells through ERK-dependent and thioredoxin-sensitive pathways.** *The Journal of biological chemistry* 2000, **275**(12):8600-9.
- Wang W, Qian LL, Liu HP. *et al.*: **Engraftment of bone marrow stromal cells in lipopolysaccharide-injured mouse lungs.** *Zhongguo dang dai er ke za zhi = Chinese journal of contemporary pediatrics* 2009, **11**(5):321-7.
- Wang XQ, Zhou X, Zhou Y. *et al.*: **Low-dose dexamethasone alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats and upregulates pulmonary glucocorticoid receptors.** *Respirology* 2008, **13**(6):772-80.
- Wang Y, Folkesson HG, Jayr C. *et al.*: **Alveolar epithelial fluid transport can be simultaneously upregulated by both KGF and beta-agonist therapy.** *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 1999a, **87**(5):1852-60.
- Wang Y, Jayr C, Folkesson HG. *et al.*: **Alveolar epithelial fluid transport can be upregulated simultaneously in rats by two different mechanisms.** *Chest* 1999b, **116**(1 Suppl):98S-100S.
- Ware LB, Matthay MA: **The acute respiratory distress syndrome.** *The New England journal of medicine* 2000, **342**(18):1334-49.
- Ware LB, Matthay MA: **Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2001, **163**(6):1376-83.
- Ware LB, Matthay MA: **Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2002, **282**(5):L924-40.
- Webster RO, Larsen GL, Mitchell BC. *et al.*: **Absence of inflammatory lung injury in rabbits challenged intravascularly with complement-derived chemotactic factors.** *The American review of respiratory disease* 1982, **125**(3):335-40.
- Weiland JE, Davis WB, Holter JF. *et al.*: **Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance.** *The American review of respiratory disease* 1986, **133**(2):218-25.

- Weinacker AB, Vaszar LT: **Acute respiratory distress syndrome: physiology and new management strategies.** *Annual review of medicine* 2001, **52**:221-37.
- Wen LP, Madani K, Fahrni JA. *et al.*: **Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN-gamma and Fas.** *The American journal of physiology* 1997, **273**(5 Pt 1):L921-9.
- Wenzel SE, Trudeau JB, Barnes S. *et al.*: **TGF-beta and IL-13 synergistically increase eotaxin-1 production in human airway fibroblasts.** *Journal of immunology* 2002, **169**(8):4613-9.
- Wesselkamper SC, Case LM, Henning LN. *et al.*: **Gene expression changes during the development of acute lung injury: role of transforming growth factor beta.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 2005, **172**(11):1399-411.
- Wind J, Versteegt J, Twisk J. *et al.*: **Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in The Netherlands: a survey.** *Respiratory medicine* 2007, **101**(10):2091-8.
- Windsor AC, Walsh CJ, Mullen PG. *et al.*: **Tumor necrosis factor-alpha blockade prevents neutrophil CD18 receptor upregulation and attenuates acute lung injury in porcine sepsis without inhibition of neutrophil oxygen radical generation.** *The Journal of clinical investigation* 1993, **91**(4):1459-68.
- Wine JJ, Brayden DJ, Hagiwara G. *et al.*: **Cystic fibrosis, the CFTR, and rectifying Cl-channels.** *Advances in experimental medicine and biology* 1991, **290**:253-69; discussion 69-72.
- Wissink S, van Heerde EC, vand der Burg B. *et al.*: **A dual mechanism mediates repression of NF-kappaB activity by glucocorticoids.** *Molecular endocrinology* 1998, **12**(3):355-63.
- Wong AP, Keating A, Lu WY. *et al.*: **Identification of a bone marrow-derived epithelial-like population capable of repopulating injured mouse airway epithelium.** *The Journal of clinical investigation* 2009, **119**(2):336-48.
- Worthen GS, Haslett C, Rees AJ. *et al.*: **Neutrophil-mediated pulmonary vascular injury. Synergistic effect of trace amounts of lipopolysaccharide and neutrophil stimuli on vascular permeability and neutrophil sequestration in the lung.** *The American review of respiratory disease* 1987, **136**(1):19-28.
- Xu H, Chu S: **ENaC alpha-subunit variants are expressed in lung epithelial cells and are suppressed by oxidative stress.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2007, **293**(6):L1454-62.
- Xu T, Qiao J, Zhao L. *et al.*: **Effect of dexamethasone on acute respiratory distress syndrome induced by the H5N1 virus in mice.** *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 2009, **33**(4):852-60.
- Yaekashiwa M, Nakayama S, Ohnuma K. *et al.*: **Simultaneous or delayed administration of hepatocyte growth factor equally represses the fibrotic changes in murine lung injury induced by bleomycin. A morphologic study.** *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997, **156**(6):1937-44.

- Yamagata T, Yamagata Y, Nishimoto T. *et al.*: **The regulation of amiloride-sensitive epithelial sodium channels by tumor necrosis factor-alpha in injured lungs and alveolar type II cells.** *Respiratory physiology & neurobiology* 2009, **166**(1):16-23.
- Yang JQ, Rudiger JJ, Hughes JM. *et al.*: **Cell density and serum exposure modify the function of the glucocorticoid receptor C/EBP complex.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2008, **38**(4):414-22.
- Yano T, Deterding RR, Simonet WS. *et al.*: **Keratinocyte growth factor reduces lung damage due to acid instillation in rats.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1996, **15**(4):433-42.
- Yao HW, Xie QM, Chen JQ. *et al.*: **TGF-beta1 induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro.** *Life sciences* 2004, **76**(1):29-37.
- Yi ES, Williams ST, Lee H. *et al.*: **Keratinocyte growth factor ameliorates radiation- and bleomycin-induced lung injury and mortality.** *The American journal of pathology* 1996, **149**(6):1963-70.
- Yokoi K, Mukaida N, Harada A. *et al.*: **Prevention of endotoxemia-induced acute respiratory distress syndrome-like lung injury in rabbits by a monoclonal antibody to IL-8.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1997, **76**(3):375-84.
- Yue G, Russell WJ, Benos DJ. *et al.*: **Increased expression and activity of sodium channels in alveolar type II cells of hyperoxic rats.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995, **92**(18):8418-22.
- Zambon M, Vincent JL: **Mortality rates for patients with acute lung injury/ARDS have decreased over time.** *Chest* 2008, **133**(5):1120-7.
- Zemans RL, Colgan SP, Downey GP: **Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2009, **40**(5):519-35.
- Zhang F, Nielsen LD, Lucas JJ. *et al.*: **Transforming growth factor-beta antagonizes alveolar type II cell proliferation induced by keratinocyte growth factor.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2004, **31**(6):679-86.
- Zhang K, Flanders KC, Phan SH: **Cellular localization of transforming growth factor-beta expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis.** *The American journal of pathology* 1995, **147**(2):352-61.
- Zietz E: **[Protracted prednisone therapy of disseminated lupus erythematosus].** *Die Medizinische* 1957(24):909-12.
- Zisman DA, Kunkel SL, Strieter RM. *et al.*: **MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia.** *The Journal of clinical investigation* 1997, **99**(12):2832-6.

Annexe 2



Annexe 2 : Effet du DMNQ sur les courants apical et transépithélial des AT II Les AT II, en culture primaire sur filtre, sont soumises à la présence de 10µM de DMNQ [= DMNQ10] ou non [c], en apical, pour 24h. Les mesures sont faites en chambre de Ussing (* ≤ 0.05 vs contrôle ; n=8-9 par condition).

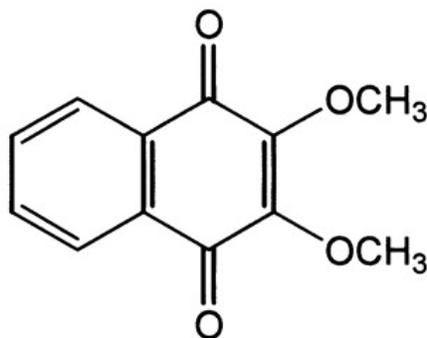
Le DMNQ (2,3-diméthoxy-1,4-naphthoquinone) produit un stress oxydant dans la cellule (voir Méthodologie). L'utilisation de DMNQ nous permet d'évaluer l'effet d'un stress oxydant connu *in vitro* sur les courants chez les AT II, et de comparer son impact avec celui de la bléomycine.

Le traitement DMNQ10 n'a d'effet significatif sur aucun des courants transépithélial ou apical total ou amiloride-sensible.

Méthodologie

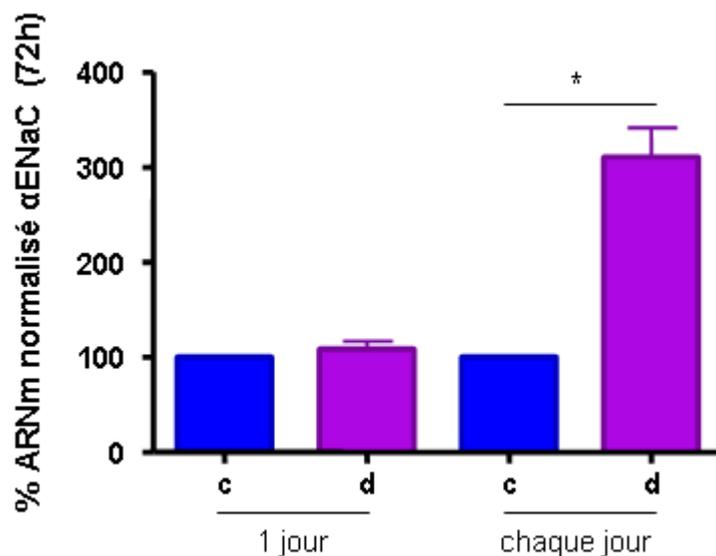
Le DMNQ ou 2,3-diméthoxy-1,4-naphtoquinone interagit avec la chaîne respiratoire mitochondriale produisant des radicaux libres tel que l' O_2^- , et le H_2O_2 , et diminue la concentration intracellulaire de GSH (3017211 ; 2354810 ; 1310736). Le DMNQ (Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, USA)) détériore l'équilibre « redox » et induit un stress oxydatif qui peut conduire à l'induction de l'apoptose cellulaire.

Molécule DMNQ



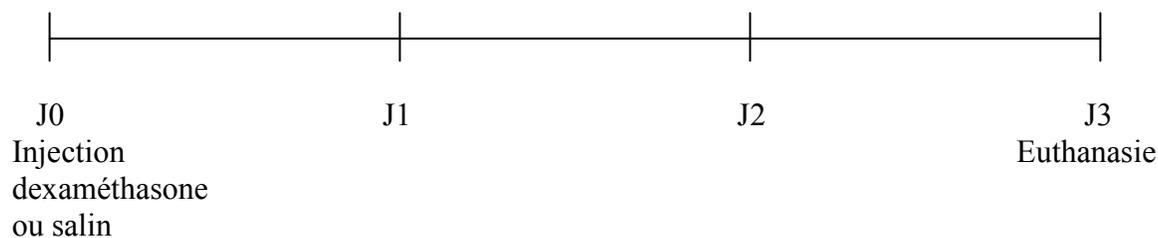
Une courbe dose-réponse de sensibilité au DMNQ (7,5-10-12,5-15 μ M) dans le cadre d'une expérience de réparation épithéliale a été faite lors de ma maîtrise. Cela nous a permis de déterminer une valeur seuil, pour l'effet de toxicité. Une concentration de 10 μ M de DMNQ, pendant 24h, sera utilisée dans les expériences de Ussing.

Annexe 3

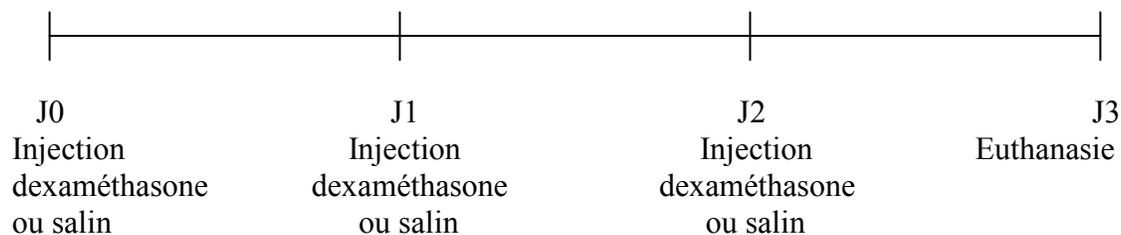


Annexe 3 : Effet du dexaméthasone sur l'ARNm de α ENaC pulmonaire chez le rat Les rats sont injectés (i.p.) avec du salin (0,9%) [c] ou du dexaméthasone (0,35 mg/kg/jour) [d], à J0 en une dose unique ou chaque jour pendant 3j. L'ARNm de α ENaC est mesuré par Northern blot et normalisé par dosage de l'ARNm 18S. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $n = 4-12$ par condition)

Méthodologie :



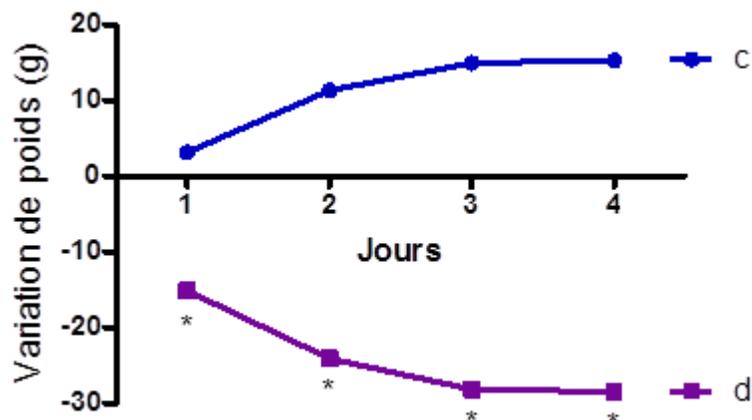
ou



L'ARN total des poumons a été isolé à l'aide du Trizol (Life Technologies). Pour le Northern blot, 10 µg d'ARN total a été électrophoré sur un gel dénaturant de 1% agarose-7% formaldéhyde et transféré sur une membrane de nylon GeneScreen (NEN, Boston, MA). L'hybridation a été faite avec successivement différentes sondes d'ADNc (α -ENaC et ARNr 18S). L'ARNm de α -ENaC a été détecté avec une sonde rat de 1900 pb codant pour les domaines transmembranaires 1 et 2. Afin de quantifier, l'expression de l'ARNm de α -ENaC a été normalisée avec l'ARNr 18S. La sonde de l'ARNr 18S consiste en un fragment d'ADNc de 639 pb. Pour l'hybridation, les sondes ont été marquées au phosphore 32 dans un four à hybridation. Les mesures sont faites à l'aide du PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

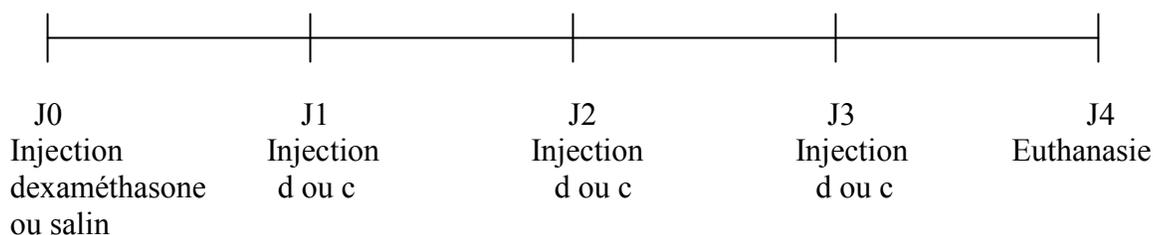
Expérience menée par Chantal Massé (B.Sc.)

Annexe 4



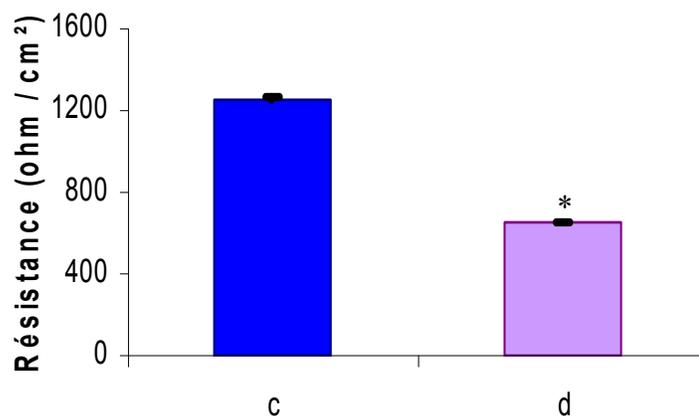
Annexe 4 : Effet du dexaméthasone sur la variation de poids des rats Les rats sont injectés (i.p.) avec du salin (c ; 0,9%) ou du dexaméthasone (d ; 0,35 mg/kg/jour), à partir de J0, chaque jour, pendant 4 jours. Le poids des rats est mesuré chaque jour jusqu'à l'euthanasie à J4. La variation de poids est mesurée par rapport à J0. (* ≤ 0.05 vs contrôle ; $n = 4-12$ par condition)

Méthodologie :



Expérience menées par Chantal Massé (B.Sc.)

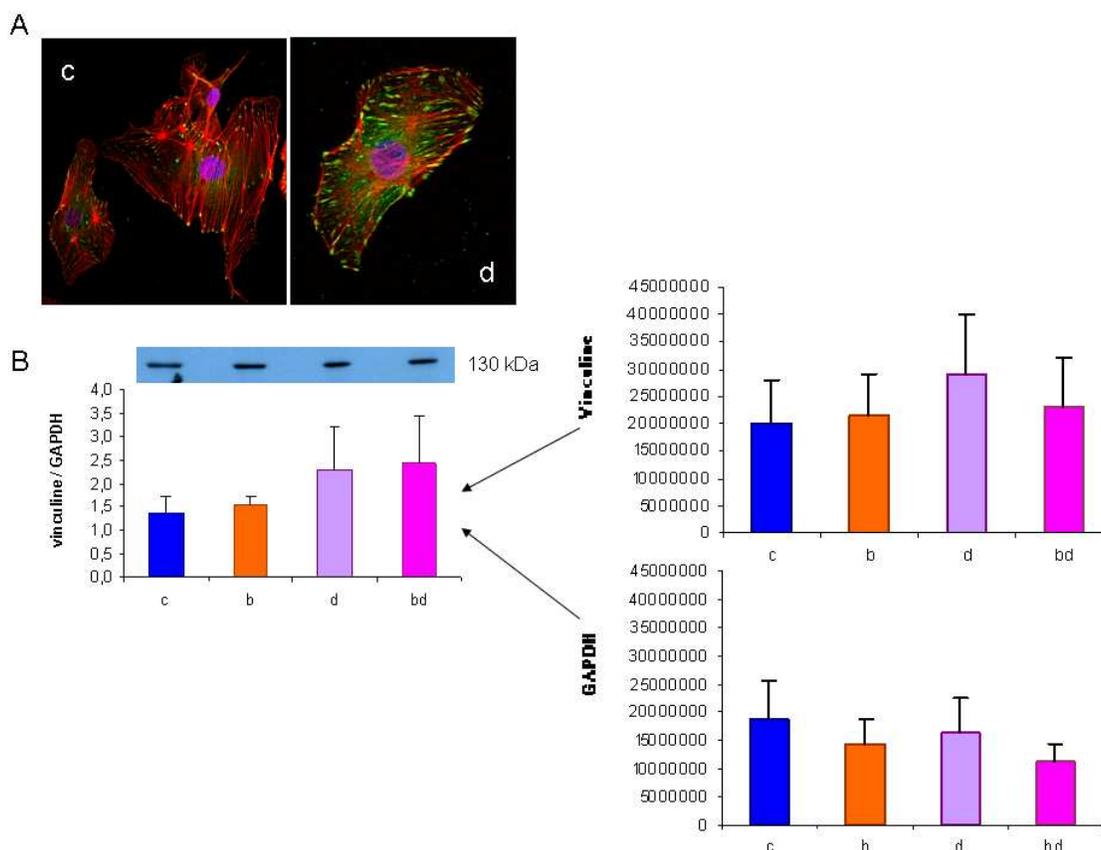
Annexe 5



Annexe 5 : Effet du dexaméthasone sur la résistance des AT II Les AT II, en culture primaire sur filtre, sont soumises ou non, à la présence de 100nM de dexaméthasone [d] (apical), pour 5j. Les mesures sont faites en chambre de Ussing, (* ≤ 0.05 vs contrôle; $n = 18$ par condition).

Voir Méthodologie § B.4.1.

Annexe 6



Annexe 6 : Effet du dexaméthasone sur la vinculine (A) Les AT II, en culture primaire sur labtek, sont soumises ou non, à la présence de 100nM de dexaméthasone [d], pour 48h. Les noyaux sont marqué en dapi (bleu), l'actine par la phalloïdine~Alexa 555 (rouge) et la vinculine par l'Alexa 488 (vert). (B) Les AT II, en culture primaire sur plastique, sont soumises aux conditions : contrôle [c], 50mU/ml de bléomycine [b] pour 24h, 100nM de dexaméthasone [d] pour 48h, ou bléomycine et dexaméthasone [bd], avant que soit procédé à l'extraction des protéines totales et au western blot ($n = 6$ par condition).

Nous avons montré qu'en présence de dexaméthasone, il y a une différence d'adhérence des cellules AT II. Nous nous sommes alors demandés si l'expression de molécules appartenant au cytosquelette était modifiée. Nous nous sommes penchés sur le cas de la vinculine qui participe aux points focaux d'adhésion, participant à l'adhésion et à la migration des cellules. Pour cela, nous avons d'abord fait un marquage de la vinculine in situ de AT II en sous-confluence en présence ou non de dexaméthasone. Nous n'avons pu

visualiser de différence marquante (A). Nous avons alors décidé de faire une analyse semi-quantitative par western blot, où à nouveau nous n'avons pu quantifier de différence significative entre les traitements (B). La phosphorylation de la vinculine, le caldesmone (qui est impliquée dans l'interaction entre l'actine et la myosine) et la gelsoline (qui est une protéine régulant l'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine) ont aussi été testés sans succès (Données non-montrées).

Méthodologie

Immunofluorescence

Des cellules AT II cells en culture primaire ont étéensemencées à raison de 50 000 cellules par puits (0.8 cm²) de labtek. Au jour 3, les cellules sont pré-traitées au dexaméthasone 100 nM. Le dexaméthasone est renouvelé à jour 4. À jour 5, la labtek est rincée au PBS, puis fixée au paraformaldéhyde 4% pour 10min. Toute l'expérience se déroule à température pièce. Après un nouveau rinçage au PBS, les cellules sont perméabilisées au triton X-100 0.1% pour 5 min. Après un blocage de 30min en BSA 1%, les labtek sont incubées avec l'anticorps anti-vinculine (1/100 ; PBS-BSA 1%) en chambre humide pour 40min. Après un lavage en PBS + 0.1 % Tween20, les labtek sont incubées avec la phalloïdine~Alexa 555 (1/40 ; PBS-BSA 1%) et l'anticorps secondaire anti-mouse lié Alexa 488 (1/200 ; PBS-BSA 1%) en chambre humide, à l'obscurité, pendant 1h. Les labtek sont alors à nouveau rincées en PBS + 0.1 % Tween20, puis le DAPI (1/2000 ; PBS-BSA 1%) est ajouté en chambre humide, à l'obscurité, pendant 10min. Enfin, le Prolonggold est ajouté et la lame est recouverte par une lamelle (1 oz ; 22x60 mm). Après 6h à 12h à l'obscurité, l'ensemble est scellé au vernis incolore. La fluorescence est observée à l'aide d'un microscope confocal de la plateforme de Bioimagerie de l'IRIC. Les images ont été prises en x63, à l'aveugle par M Charbonneau, responsable de la plateforme. Les marquages sont ceux de l'actine (rouge), de la vinculine (vert) et des noyaux (bleu).

Western blot

Les cellules AT II sontensemencées à J1 à raison 5×10^6 cellules dans un pétri de 100mm de diamètre, en MEM + sérum + sepra. À J3 le milieu des cellules est changé pour du MEM + sérum. À J4 les cellules sont traitées avec du dexaméthasone 100mM et / ou de la bléomycine 50 mU/ml dans du MEM complet + sérum. A J5, après lavage au PBS, les cellules sont grattées dans 1ml de PBS après avoir été incubées dans du tampon pour extraction des protéines du cytosquelette (Pipes 100mM pH7, KCl 50mM, MgCl₂ 5mM, EGTA 1mM, Triton x100 0.2% ; 2ml ; 10min ; sur glace). La suspension cellulaire est centrifugée à 15700g 10min. Le culot est resuspendu dans 150µl de PBS puis soniqué à une amplitude de 15µ 2 x 20sec, avant d'être stockée à -80°C jusqu'à utilisation.

Les protéines sont dosées par Bradford.

Elles sont chargées dans un gel de polyacrylamide 10%. Suite à la migration et au transfert sur membrane PVDF, les membranes sont bloquées en lait ou BSA 5%. Puis, les anticorps primaires anti-vinculine (1/400 ; TTBS-BSA 2%), ou GAPDH (1/1000 ; TTBS-lait 2%) sont incubés pour la nuit à 4°C. Suite aux lavages en TTBS, les anticorps secondaires anti-mouse ou anti-rabbit (1/2000 ; TTBS-lait 2% ou TTBS-BSA 2%) sont incubés pour 2h à température pièce. Les membranes sont révélées à l'aide de l'ECL plus selon les recommandations du producteur. Le Chemidoc de Biorad et son logiciel Image Lab software sont utilisés pour l'analyse.

Références produits et matériel

Les produits : anticorps anti-mouse~Alexa 488 #A11059, phalloïdine~Alexa 555 # A34055, prolonggold # P36930 ont été commandés chez Invitrogen, Eugene, Oregon, USA.

L'anticorps anti-GAPDH # MA1-10036 provient de Thermo Scientific, Rockford, IL, USA.

Les anticorps anti-gelsoline # ab74420 et anti-caldesmone # ab11016 sont produits par Abcam, Cambridge, MA, USA.

L'anticorps anti-mouse # 1858413 est fourni par Pierce, Rockford, IL, USA.

L'anticorps anti-rabbit # sc2004 est issu de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA.

L'anticorps anti-vinculine # v9131 et le Dapi # D9542 proviennent de chez Sigma, St Louis, MO, USA.

Les labtek # 154534 sont fournies par Nunc, Rochester, NY, USA.

Les lamelles # 12-544G ont été achetées chez Fisher Scientific, Ontario, Canada.

L'ECL plus # RPN2132 est produit par GE Healthcare, Buckinghamshire, UK.

Le microscope confocal LSM 510 META Zeiss est produit par Carl Zeiss Canada Ltd., Toronto, Canada.