



UNIVERSITE DE BOURGOGNE

I.N.R.A. – Agroécologie
Pôle Microbiologie Environnementale et Risque Sanitaire
Laboratoire Ventilation Immunité Pathogènes, U.M.R. 1347

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences de la Vie

par **Saber Davide BARBAR**

le 28 octobre 2014

IMPACT DE LA VENTILATION MECANIQUE SUR LA REPOSE INFLAMMATOIRE MEDIÉE PAR LES TOLL-LIKE RECEPTORS 2 ET 4 DANS UN MODELE DE PNEUMOPATHIE BACTERIENNE

Directeur de thèse
Prof. Pierre-Emmanuel CHARLES

Jury

Prof. LEFRANT Jean-Yves, PU-PH, président du jury
Prof. CHARLES Pierre-Emmanuel, PU-PH, directeur de thèse et membre du jury
Prof. RICARD Jean-Damien, PU-PH, rapporteur et membre du jury
Prof. CHAVANET Pascal, PU-PH, membre du jury
Prof. TISSIERES Pierre, PU-PH, membre du jury

alla mia piccola Arwen

RESUME

Introduction:

La pneumonie associée à la ventilation mécanique (VM) est fréquente chez les patients ventilés. L'étirement cyclique (EC) induit par la VM pourrait amorcer le poumon vers une réponse inflammatoire en cas d'exposition à des bactéries. Les Toll-like Receptors (TLR) reconnaissent les bactéries et déclenchent l'immunité. La VM pourrait moduler l'expression des TLR et leur réactivité aux agonistes.

Le décubitus ventral (DV) réduit l'étirement du poumon.

Méthodes:

Les niveaux de TLR2 et la réponse à ses agonistes ont été mesurés dans des cellules pulmonaires soumises à un EC, et dans un modèle de lapin ventilé. Une stimulation ex vivo du sang total prélevé sur lapins ventilés a été réalisée.

Une pneumonie a été induite chez des lapins soumis à VM et maintenus en décubitus dorsal ou tournés en DV.

Résultats:

L'EC des cellules ainsi que des poumons de lapins augmente les niveaux de TLR2 et la réponse inflammatoire à ses agonistes. La VM et l'exposition du poumon à des agonistes TLR2 induisent synergiquement des lésions.

Chez des lapins avec pneumonie sous VM la clairance bactérienne pulmonaire est réduite, la probabilité de bactériémie et le taux des cytokines circulantes augmentés. Le sang total provenant d'animaux sous VM libère de grandes quantités de cytokines après stimulation.

Le DV est associé à des niveaux plus faibles de concentrations bactériennes et d'inflammation.

Conclusions:

La VM sensibilise le poumon aux ligands bactériens de TLR2, modifie la clairance bactérienne pulmonaire, favorise les lésions pulmonaires et de l'inflammation. La surexpression de TLR2 induite par l'EC pourrait expliquer ces différences. Le DV pourrait avoir un effet protecteur.

Mots clés

Ventilation mécanique

Etirement

Lésion pulmonaire induite par la ventilation

Pneumonie associée à la ventilation

Toll-Like Receptor 2

Staphylococcus aureus

Décubitus ventral

Enterobacter aerogenes

ABSTRACT

Introduction:

Ventilator-associated pneumonia is common in patients subjected to mechanical ventilation (MV). Cyclic stretch subsequent to MV could prime the lung toward an inflammatory response if exposed to bacteria. Toll-like receptors (TLRs) recognize pathogens thus triggering immunity. MV could modulate TLRs expression and responsiveness to agonists. The prone position (PP) reduces lung stretch.

Methods:

TLR2 levels and response to the TLR2 ligands were measured in human pulmonary cells submitted to cyclic stretch, and either spontaneously breathing (SB) or MV rabbits. Ex vivo stimulation of whole blood taken from SB or MV rabbits was performed.

Enterobacter aerogenes pneumonia was induced in rabbits subjected to MV and kept supine or turned to the PP.

Results:

Cyclic stretch of human cells as well as rabbits' lung increased both TLR2 levels and inflammatory response to its agonist. MV and airways exposure to TLR2 ligands acted synergistically in causing lung injury.

A decrease of lung bacterial clearance and a greater likelihood of bacteremia were observed in MV rabbits with *S. aureus* pneumonia. Circulating cytokines rose significantly only in these animals. MV induced TLR2 spleen overexpression. Whole blood obtained from MV animals released larger amounts of cytokines after stimulation.

PP was associated with lower levels of bacterial concentrations and inflammation.

Conclusions:

MV sensitizes the lung to bacterial TLR2 ligands, alters lung bacterial clearance, promotes lung injury and inflammation. Both pulmonary and peripheral blood stretch-induced TLR2 overexpression could account at least in part for such differences. The PP could be protective.

Key words

Mechanical ventilation

Stretch

Ventilator induced lung injury

Ventilator associated pneumonia

Toll-Like Receptor 2

Staphylococcus aureus

Prone position

Enterobacter aerogenes

TABLE DES MATIERES

RESUME	3
MOTS CLES.....	3
ABSTRACT	4
KEY WORDS	4
TABLE DES MATIERES	6
ABBREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION	13
IMMUNITE INNEE ET TOLL-LIKE RECEPTORS.....	13
<i>Toll-Like Receptor-2</i>	13
<i>Les Ligands du TLR-2</i>	14
<i>Le complexe TLR-2 - molécules accessoires</i>	15
LA VENTILATION MECANIQUE.....	17
<i>Les effets iatrogènes de la ventilation mécanique</i>	17
VENTILATOR-INDUCED LUNG INJURY : DU BAROTRAUMATISME AU BIOTRAUMATISME	18
<i>Déterminants mécaniques du Ventilator-Induced Lung Injury : barotraumatisme et</i>	
<i>volotraumatisme</i>	18
<i>Le biotraumatisme</i>	21
INTERACTIONS ENTRE VENTILATION MECANIQUE ET IMMUNITE INNEE	22
DECUBITUS VENTRAL ET VENTILATOR-INDUCED LUNG INJURY	24
HYPOTHESE DE TRAVAIL ET OBJECTIF DE L'ETUDE.....	26
MATERIELS ET METHODES.....	27
DESIGN EXPERIMENTAL	27
PREMIERE SERIE D'EXPERIMENTATIONS : MODELE CELLULAIRE <i>IN VITRO</i>	28
<i>Cellules et réactifs</i>	28
<i>PCR quantitative en temps réel</i>	29
<i>Cytometrie de flux</i>	29
MODELES ANIMAUX	30
DEUXIEME SERIE D'EXPERIMENTATIONS : LAPINS EN VENTILATION SPONTANEE VS VENTILATION MECANIQUE.	33
TROISIEME SERIE D'EXPERIMENTATIONS: STIMULATION DU POUMON AVEC UN AGONISTE TLR-2.....	34
QUATRIEME SERIE D'EXPERIMENTATIONS: TLR2 ET PNEUMOPATHIE A GRAM + ACQUISE SOUS VENTILATION	
MECANIQUE.....	36
<i>Prélèvements</i>	37
<i>PCR quantitative en temps réel</i>	38
<i>E.L.I.S.A.</i>	40
<i>Analyses histologiques</i>	41
<i>Rapport poids humide/poids sec</i>	42
<i>Immuno-histo-chimie</i>	42
<i>Procédures bactériologiques : préparation de l'inoculum</i>	44
<i>Evaluation microbiologique de la pneumonie</i>	45
CINQUIEME SERIE D'EXPERIMENTATIONS: STIMULATION <i>EX VIVO</i> DU SANG PRELEVE APRES 48 HEURES DE	
VENTILATION MECANIQUE NON PROTECTRICE	46
<i>Préparation des inocula inactivés par la chaleur</i>	46
<i>Stimulation ex vivo du sang entier</i>	46

SIXIEME SERIE D'EXPERIMENTATIONS: IMPACT DU DECUBITUS VENTRAL SUR UN MODELE DE PNEUMONIE SOUS VENTILATION MECANIQUE PROTECTRICE ET AGRESSIVE	48
<i>Mesure de la compliance du système respiratoire</i>	49
<i>Prélèvements de sang</i>	49
<i>Evaluation de la pneumonie unilatérale</i>	49
<i>Evaluation du VILI et de l'inflammation dans le poumon non infecté</i>	50
ANALYSES STATISTIQUES	51
RESULTATS	52
RESULTATS DE LA PREMIERE SERIE D'EXPERIMENTATIONS	52
<i>L'étirement cyclique induit l'expression des TLR dans les cellules épithéliales pulmonaires</i>	52
<i>L'étirement cyclique augmente les niveaux intracellulaires de TLR2 dans les cellules épithéliales pulmonaires</i>	52
<i>L'étirement cyclique augmente la réponse inflammatoire des cellules épithéliales pulmonaires au lipopeptide bactérien</i>	52
<i>L'up-regulation du TLR-2 induite par l'étirement cyclique dépend de la voie de signalisation MAPK p38</i>	53
RESULTATS DE LA DEUXIEME SERIE D'EXPERIMENTATIONS	54
<i>La ventilation mécanique induit une augmentation notable des niveaux pulmonaires de l'ARNm du TLR2 chez le lapin sain</i>	54
RESULTATS DE LA TROISIEME SERIE D'EXPERIMENTATIONS	55
<i>La ventilation mécanique augmente l'inflammation pulmonaire induite par le l'agoniste TLR-2</i> 55	55
RESULTATS DE LA QUATRIEME SERIE D'EXPERIMENTATIONS	56
<i>La ventilation mécanique augmente l'expression pulmonaire ainsi que l'expression systémique du TLR2</i>	56
<i>La ventilation mécanique non protectrice induit de l'inflammation pulmonaire : le bio-trauma</i> ..	56
<i>La ventilation mécanique non protectrice induit des lésions pulmonaires</i>	57
<i>La ventilation mécanique non protectrice augmente inflammation systémique</i>	57
<i>La ventilation mécanique non protectrice réduit la clearance bactérienne pulmonaire</i>	58
RESULTATS DE LA CINQUIEME SERIE D'EXPERIMENTATIONS.....	59
<i>Dosage de l'inflammation dans le sang total de lapin SB ou MV stimulé ex vivo par un agoniste TLR2</i>	59
RESULTATS DE LA SIXIEME SERIE D'EXPERIMENTATIONS	60
<i>Compliance</i>	60
<i>Echanges gazeux et hémodynamique</i>	60
<i>Evaluation de la pneumonie unilatérale</i>	60
<i>Evaluation du VILI et de l'inflammation du poumon non infecté</i>	61
TABLEAUX	63
<i>Tableau 1</i>	63
<i>Tableau 2</i>	64
<i>Tableau 3</i>	64
<i>Tableau 4</i>	65
<i>Tableau 5</i>	66
<i>Tableau 6</i>	67
FIGURES.....	68
FIGURE 1. DESIGN EXPERIMENTAL	68
<i>Figure 1a. Design expérimental des manipulations in vitro</i>	68
<i>Figure 1b. Design expérimental de la 2ème série d'expérimentations</i>	68
<i>Figure 1c. Design expérimental de la 3ème série d'expérimentations</i>	69
<i>Figure 1d. Design expérimental de la 4ème série d'expérimentations</i>	69

<i>Figure 1e. Design expérimental de la 6ème série d'expérimentations.</i>	70
FIGURE 2. EXPRESSION DES RECEPTEURS DE RECONNAISSANCE DE MOTIFS MOLECULAIRES DANS DES CELLULES EXPOSEES A UN ETIREMENT CYCLIQUE OU MAINTENUES EN CONDITION STATIQUE.....	71
<i>Figure 2a.</i>	71
<i>Figure 2b.</i>	72
<i>Figure 2c.</i>	73
FIGURE 3. PRODUCTION DES MEDIEATEURS DE L'INFLAMMATIONS PAR LES CELLULES A549 STIMULEES AVEC PAM3CSK4 EN CONDITIONS STATIQUES ET D'ETIREMENT CYCLIQUE	74
<i>Figure 3a.</i>	74
<i>Figure 3b.</i>	75
FIGURE 4. EXPRESSION DU TOLL-LIKE RECEPTOR 2 DANS DES CELLULES A549 ETIREES EN PRESENCE DE DIFFERENTS INHIBITEURS.....	76
FIGURE 5. EXPRESSION DES « PATHOGEN RECOGNITION RECEPTORS » DANS UN MODELE DE LAPIN EXPOSE A UNE VENTILATION MECANIQUE MODEREMENT AGRESSIVE OU MAINTENU EN VENTILATION SPONTANEE.	77
FIGURE 6. COUPES HISTOLOGIQUES DES POUMONS DE LAPIN DANS DIFFERENTES CONDITIONS.	78
FIGURE 8: LA VENTILATION MECANIQUE AUGMENTE L'EXPRESSION PULMONAIRE ET SYSTEMIQUE DU TLR-2..	80
<i>Figure 8A.</i>	80
<i>Figure 8B.</i>	81
<i>Figure 8C.</i>	82
FIGURE 9: BIO-TRAUMATISME. LA VENTILATION MECANIQUE MODEREMENT AGRESSIVE INDUIT UNE INFLAMMATION AU NIVEAU PULMONAIRE, MAIS NE MODIFIE PAS LA REPONSE INFLAMMATOIRE PULMONAIRE AUX AGONISTES TLR-2 ET AU <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	83
<i>Figure 9A.</i>	83
<i>Figure 9B.</i>	84
<i>Figure 9C.</i>	85
<i>Figure 9D.</i>	86
FIGURE 10 : HISTOLOGIE.....	87
FIGURE 11 : SCORE HISTOLOGIQUE	89
FIGURE 12 : VENTILATION MECANIQUE ET INFLAMMATION SYSTEMIQUE	90
<i>Figure 12A.</i>	91
<i>Figure 12B.</i>	92
<i>Figure 12C.</i>	93
<i>Figure 12D.</i>	94
FIGURE 13 : CLEARANCE BACTERIENNE.....	95
<i>Figure 13A.</i>	95
<i>Figure 13B.</i>	96
<i>Figure 13C.</i>	97
FIGURE 14 : DOSAGE DE L'INFLAMMATION DANS LE SANG TOTAL DE LAPINS SB OU MV STIMULE <i>EX VIVO</i> PAR UN AGONISTE TLR-2 EN PRESENCE OU PAS D'UN ANTICORPS MONOCLONAL BLOQUANT LE TLR2.....	98
FIGURE 15 : CHARGE BACTERIENNE EN FONCTION DU DECUBITUS DORSAL OU VENTRAL DANS UN MODELE DE PNEUMONIE ACQUISE SOUS VENTILATION MECANIQUE A <i>ENTEROBACTER AEROGENES</i>	100
FIGURE 16 : NIVEAU D'INFLAMMATION EN FONCTION DU DECUBITUS DORSAL OU VENTRAL DANS UN MODELE DE PNEUMONIE ACQUISE SOUS VENTILATION MECANIQUE A <i>ENTEROBACTER AEROGENES</i>	101
FIGURE 17 : CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DES CYTOKINES INFLAMMATOIRES	102
FIGURE 18 : ASPECT HISTOLOGIQUE EN FONCTION DU DECUBITUS DORSAL OU VENTRAL DANS UN MODELE DE PNEUMONIE ACQUISE SOUS VENTILATION MECANIQUE A <i>ENTEROBACTER AEROGENES</i>	103
FIGURE 19 : EVALUATION DE L'INFLAMMATION DANS LE POUMON NON INFECTE	105
DISCUSSION	106

LA VENTILATION MECANIQUE « NON PROTECTRICE » REGULE POSITIVEMENT L'EXPRESSION DU TLR2 ET SENSIBILISE LE POUMON AU LIPOPEPTIDE BACTERIEN	106
LA VENTILATION MECANIQUE MODEREMENT AGRESSIVE INFLUENCE L'EVOLUTION D'UNE PNEUMONIE A <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> DANS UN MODELE ANIMAL	108
IMPACT DU DECUBITUS VENTRAL SUR UN MODELE ANIMAL DE PNEUMONIE BACTERIENNE UNILATERALE ACQUISE SOUS VENTILATION MECANIQUE	113
PERSPECTIVES.....	118
CONCLUSIONS.....	120
LISTE DES PUBLICATIONS.....	122
BIBLIOGRAPHIE.....	124

ABBREVIATIONS

ALI : Acute Lung Injury

ARDS : Acute Respiratory Distress Syndrome

ARNm : acide ribonucléique messager

BALF : broncho-alveolar lavage fluid

BHI : brain-heart infusion

BLP : bacterial lipopeptide

BSA : bovine serum albumin

CRF : capacité résiduelle fonctionnelle

CFU : colony-forming unit

DAMP : Damage Associated Molecular Pattern

DD : décubitus dorsal

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DO : densité optique

DV : décubitus ventral

EDTA : acide éthylène-diamine tétra-acétique

ELISA : enzyme-linked immuno-sorbent assay

FACS : fluorescence-activated cell sorting

FCS : foetal calf serum

HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HMGB1 : High-Mobility Group Box 1 protein

HRP : horse raddish peroxydase

IL : interleukine

LBA : lavage broncho-alvéolaire

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MRSA : meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*

PaCO₂ : pression partielle artérielle de CO₂

PaO₂ : pression partielle artérielle d'O₂

PEEP : positive end-expiratory pressure
PRR : pathogen recognition receptor
PBS : phosphate buffered saline
PP : prone position
PVL : Panton Valentine leucocidine
MV : mechanical ventilation
SB : spontaneously breathing
SDRA : Syndrome de Détresse Respiratoire Aigue
SSI : sérum salé isotonique
SP : supine position
UFC : unité formant colonies
VILI : ventilator-induced lung injury
ZEEP : zero end-expiratory pressure

INTRODUCTION

Immunité innée et Toll-Like Receptors

L'immunité innée est la première ligne de défense du système immunitaire, équipée de récepteurs capables de reconnaître des motifs et des configurations spatiales communs à plusieurs pathogènes (Pattern Recognition Receptors, PRR) et de déclencher une réponse rapide envers eux. Les PRR reconnaissent des composantes microbiennes appelées « motifs moléculaires associés aux pathogènes » (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP), qui jouent un rôle crucial dans la réplication, la survie et la pathogénicité des microbes, comme par exemple des composants de la paroi bactérienne, des toxines bactériennes, de l'ADN ou de l'ARN, etc. La reconnaissance d'un PAMP par un PRR déclenche une cascade d'évènements qui active les mécanismes de défense de l'hôte pour prévenir ou lutter contre les infections en initiant et régulant la réponse immune (1).

Parmi les PRR, les Toll-Like Receptors (TLR) sont les récepteurs les mieux connus, découverts dans les années 1990 (2); ils doivent leur nom à leur homologie avec le récepteur Toll, identifié initialement chez la drosophile *Drosophila melanogaster* pour son rôle dans l'embryogenèse, puis dans l'immunité contre les infections fongiques (3). Les TLR constituent une famille de protéines avec un rôle dans les défenses immunitaires innées très ancien sur le plan de la phylogénèse (4), qui sont largement exprimées par des types cellulaires différents, en nombreuses espèces animales (5). A ce jour, 10 différents TLR (TLR-1 à 10) ont été identifiés chez l'homme (6).

Toll-Like Receptor-2

L'identification et la caractérisation moléculaire du Toll-Like Receptor-2 (TLR-2) ont été publiées pour la première fois en 1998 (7). Quinze ans de recherche intensive ont établi l'importance du TLR2 dans l'immunité des vertébrés (8). Le TLR-2 est le seul TLR capable de

former des hétérodimers fonctionnels avec plus de deux autres types de TLR, et il est capable d'interagir avec un grand nombre de molécules non-TLR, ce qui lui permet de reconnaître une grande variété de PAMP d'origine bactérienne, virale, fongique et parasitaire (9). L'expression du TLR-2 a été mise en évidence sur des cellules immunitaires, endothéliales et épithéliales : son ubiquité correspond à la variété de fonctions exercées par le TLR-2 (10).

Les Ligands du TLR-2

Les TLR sont des glycoprotéines transmembranaires intégrales de type I, constituées par un domaine intracellulaire qui présente des homologies avec le récepteur de l'interleukine 1 (11), une hélice transmembranaire et un domaine extracellulaire qui a la fonction de reconnaissance des pathogènes et est composé de 16 à 28 motifs LRR (leucin-rich repeats) (5, 12). Les TLR sont regroupés en six familles principales en fonction du nombre de LRR, et TLR-2 fait partie de la sous-famille TLR-1 (avec TLR-1, TLR-6 et TLR-10) (13).

La reconnaissance des ligands spécifiques du TLR-2 et la signalisation dépendent de la hétéro-dimérisation avec TLR-1 ou TLR-6. Il est probable que des hétéro-dimères TLR-2/TLR-1 et TLR-2/TLR-6 soient préformés au niveau de la surface cellulaire avant le contact avec les ligands. Il a été proposé que TLR-2 puisse former des homo-dimères en l'absence de TLR-1 et TLR-6, mais à ce jour il n'y a pas de preuves formelles (14). La reconnaissance des ligands par TLR-2 en l'absence de TLR-1 ou TLR-6 a été observée en utilisant des souris knock-out pour TLR-1 ou TLR-6, mais il n'y a pas de preuve que le TLR-2 seul soit capable de reconnaître ses ligands aux concentrations retrouvées au cours d'une infection (15).

La structure stérique des domaines extracellulaires des hétéro-dimères constitue un complexe en forme de « M » avec le ligand qui stabilise les deux récepteurs et permet une interaction des domaines intracellulaires et l'activation de la voie de signalisation. Le TLR-2 est activé par une grande variété de ligands (lipoprotéines, lipopeptides et lipopolysaccharides), dont la diversité biochimique a rendu difficile l'identification de ses réelles spécificités, notamment à cause du risque de contamination par des lipoprotéines. Il

a été proposé que seules les lipoprotéines et les lipopeptides sont reconnus aux concentrations physiologiques par les TLR-2 et constituent donc ses vrais ligands (9).

Le TLR-2 est également activé par des ligands endogènes libérés en cas de lésion tissulaire, nécrose ou en présence de cellules tumorales (comme les heat shock proteins, la high mobility group box 1 protein (16), la β -defensine 3 (17), des fragments d'acide hyaluronique (18)) appelés « alarmines » (19). Bien qu'il soit possible que les alarmines contribuent à la réponse de l'hôte en cas d'infections qui induisent un certain type de lésion tissulaire (ex. nécrose), il n'y a pas de preuve à ce jour que les ligands endogènes du TLR-2 puissent moduler l'évolution des infections microbiennes (20).

Les ligands principaux du TLR-2 sont les lipoprotéines, qui sont exprimés par toutes les bactéries, mais en particulier au niveau de la membrane externe des bactéries Gram-positifs. Les lipoprotéines présentent un seul acide aminé NH₃-terminal, la N-acyl-S-dyacyl-glycérol-cystéine, et trois chaînes lipidiques (sauf les lipoprotéines des mycobactéries qui possèdent seulement deux chaînes lipidiques). Les triacyl-lipoprotéines sont reconnues par le complexe TLR-2/TLR-1, et les diacyl-lipoprotéines par le complexe TLR-2/TLR-6 (21).

Le complexe TLR-2 - molécules accessoires

Des études récentes ont mis en évidence l'existence d'un certain nombre de corécepteurs et de molécules accessoires du TLR-2 qui ont la fonction de concentrer les produits microbiens au niveau de la surface cellulaire ou à l'intérieur de phagosomes pour faciliter la réponse du TLR-2.

La molécule accessoire CD14 concentre et transporte les lipopeptides vers le complexe TLR2/TLR1, sans se lier directement au dimère (22), et peut contribuer à la réponse inflammatoire des phagocytes.

Le CD36 (23) peut interagir avec des diacylglycérol-lipopeptides et les transférer vers la molécule accessoire CD14 qui à son tour facilite leur interaction avec les hétéro-dimères TLR-2/TLR-6 (24, 25). Les molécules accessoires CD36 et CD14 ne sont pas indispensables pour l'interaction entre le TLR-2 et son ligand ni pour la signalisation, mais leur rôle est de

stimuler les réponses en baissant le seuil de concentration du ligand nécessaire pour l'activation du récepteur et la signalisation (22, 23).

La phagocytose est une étape fondamentale pour la reconnaissance des bactéries entières par l'immunité innée, qui donne lieu à des phagosomes qui peuvent recruter des TLR de différents complexes réceptoriels.

La molécule soluble MBL (mannose binding lectin) peut interagir avec l'acide lipotéichoïque de la membrane du *Staphylococcus aureus* (ainsi qu'avec le peptidoglycane (26)) et activer de manière synergique le complexe TLR-2/TLR-6 avec internalisation du complexe, ce qui augmente la réponse inflammatoire (27).

Il est possible que le CD36 maintienne son rôle de transport à l'intérieur des phagosomes, sa présence étant indispensable à la phagocytose de *S. aureus* (28).

La seule molécule non-TLR pour laquelle a été prouvée une interaction physique avec le TLR-2 capable d'activer la voie de signalisation est la Dectine-1, récepteur principal pour le β -glucane (molécule retrouvée dans la plus part des levures). La signalisation dépendante de la Dectine-1 a une action synergique à celle du TLR-2 et du TLR-4 dans l'induction de la synthèse de TNF- α dans les monocytes humains circulants, quand ces trois récepteurs sont activés par leurs ligands respectifs (29).

Dernier point, très important du point de vue de la recherche translationnelle, les réponses du TLR-2 membranaire peuvent être modulées par le TLR-2 soluble (30), retrouvé dans le plasma humain, dans le lait ainsi que dans le liquide amniotique (31). Le rôle joué par le TLR-2 soluble dans la réponse immunitaire et dans la défense contre les infections n'est pas clair actuellement, mais il est possible que les variations des niveaux circulants de TLR-2 soluble puissent moduler ces réponses.

La ventilation mécanique

On peut faire remonter la première tentative de ventilation artificielle au 16^{ème} siècle avec Paracelse qui utilisa un soufflet introduit dans la bouche pour réanimer un patient asphyxié. Cette première approche « moderne » à la ventilation artificielle a par la suite été oubliée pour quelques siècles. Du soufflet aux ventilateurs par voie externe (32), le pas fut franchi au tout début du XX siècle par les frères Dräger (dont le savoir faire initial était la fabrication de pompe à bière !), qui en 1907 mirent au point un appareil de ventilation alimenté par une bouteille d'air comprimé, baptisé « Pulmotor » (33). Le Pulmotor est l'ancêtre de tous les ventilateurs à pression positive.

L'âge moderne de la ventilation mécanique et avec elle des soins intensifs commença au début des années 1950 durant l'épidémie de poliomyélite, avec la première utilisation de la ventilation mécanique par Lassen qui permit de réduire d'environ 50% la mortalité des patients avec insuffisance respiratoire aiguë secondaire à la poliomyélite (34, 35). Des milliers de malades furent ainsi pris en charge par ventilation mécanique à pression négative avec des poumons d'acier. En 1954, Engström décrivit l'Engström universal ventilator et son utilisation dans le traitement des malades atteints d'une paralysie respiratoire (36). Cet appareil a marqué le début des temps modernes de la ventilation mécanique à pression positive.

Les effets iatrogènes de la ventilation mécanique

Si l'effet bénéfique de la ventilation mécanique est indéniable et unanimement reconnu, la description et la compréhension des effets indésirables de la ventilation mécanique sont encore actuellement au centre d'un énorme effort de la recherche biomédicale qui dure depuis des décennies. La toxicité de l'O₂ (37) et le « barotraumatisme » (lésions induites par la pression) (38) ont été pendant longtemps les seules complications redoutées, même si le retentissement hémodynamique des hautes pressions endothoraciques a été décrit très précocement (39, 40). Dreyfuss a démontré en 1988 le lien entre les hauts volumes courants et lésions pulmonaires (« volotraumatisme ») (41). Enfin, curieusement, la

complication la plus fréquemment observée, l'infection pulmonaire nosocomiale n'a été rattachée à la durée de la ventilation mécanique qu'en 1998 (42, 43).

Mais ce n'est que depuis la diffusion du concept de « stratégie ventilatoire protectrice » de l'ARDS Network (44) que l'objectif prioritaire de la ventilation mécanique est devenu de ne pas nuire au malade.

Ventilator-Induced Lung Injury : du barotraumatisme au biotraumatisme

Le concept théorique de Ventilator-Induced Lung Injury (VILI) (45, 46) a été développé peu de temps après la première description du Syndrome de Détresse Respiratoire Aigue (47). Mead et coll. ont évoqué l'hypothèse que les forces agissant sur le parenchyme pulmonaire pendant la ventilation mécanique pouvaient être nettement supérieures aux forces appliquées aux voies aériennes (plus facilement mesurables) en se basant sur un modèle d'élasticité pulmonaire (48); d'après leurs calculs, la pression nécessaire pour l'expansion d'une région d'atélectasie entourée par du poumon normalement aéré, pour atteindre une pression trans-pulmonaire de 30 cmH₂O, serait de 140 cmH₂O. C'est Webb qui a prouvé pour la première fois, sur un modèle de rat ventilé, que des pressions de pic à 45 cmH₂O pouvaient induire des lésions à type d'œdème pulmonaire sur des poumons sains (49). Cet œdème n'est pas du seulement à une augmentation de la pression transmurale au niveau des capillaires pulmonaires (50), mais aussi à une augmentation de la perméabilité microvasculaire qui est très importante et apparaît seulement quelques minutes après le début de la ventilation avec des pressions de pic à 45 cmH₂O (51).

Déterminants mécaniques du Ventilator-Induced Lung Injury : barotraumatisme et volotraumatisme

Le barotraumatisme a été initialement décrit (38) comme l'ensemble des complications résultant d'une augmentation de la pression alvéolaire responsable de ruptures de la paroi avéolo-capillaire et du passage de l'air dans l'espace pleural. Ce terme a donc été associé par

les cliniciens à la forme plus commune de lésion pulmonaire induite par la ventilation mécanique avec pressions élevées, c'est à dire le pneumothorax (52). La sédation profonde et souvent la curarisation étaient le moyen de limiter le barotraumatisme en adaptant le malade à sa machine. Historiquement, le volotraumatisme *ante litteram* avait déjà été décrit 150 ans plus tôt par James Leroy d'Etiolles (53), qui avait recommandé l'usage d'un soufflet gradué en fonction de la taille du patient, mettant en garde contre l'usage de trop grands volumes susceptibles de provoquer un pneumothorax (ces premiers effets indésirables de la ventilation mécanique avaient même conduit l'Académie de médecine Française et la Royal Humane Society, au nom du principe de précaution, à condamner l'usage du soufflet dans la réanimation des noyés).

Il est cependant difficile de séparer conceptuellement les rôles respectifs de la pression intra-alvéolaire excessive et de la distension excessive qu'elle génère : c'est la surpression qui est responsable des lésions pulmonaires ou la sur-distension secondaire? Pour répondre à cette question Dreyfuss et coll. ont évalué dans une publication historique les effets de la ventilation mécanique à pressions de pic élevées (45 cmH₂O) dans un modèle murin chez lequel un *strapping* permettait de limiter les excursions thoraco-abdominales, et de comparer donc hauts volumes et bas volumes à pression identique (41). Les animaux exposés à haute pression plus haut volume développaient un œdème pulmonaire, contrairement à ceux exposés à haute pression mais bas volume. Afin d'exclure définitivement la responsabilité des pressions élevées, les mêmes volumes ont été obtenus avec une pression négative par le biais d'un poumon d'acier, avec des résultats concordants. D'autres équipes ont confirmé ces résultats par la suite (54, 55), et ont retrouvé un effet seuil (20 cmH₂O de pression télé-expiratoire, correspondant à un volume courant de 13,7±4,69 mL/kg). L'adjonction d'une pression positive de fin d'expiration (PEEP) réduit la sévérité des lésions pulmonaires avec deux mécanismes principaux, d'un côté en limitant les cycles de recrutement-dérecrutement alvéolaire qui provoquent des lésions épithéliales à cause des forces de cisaillement qui induisent des modifications du surfactant (56) (définies « atelectraumatisme » par l'équipe de Slutsky (57)), et d'un autre côté avec l'augmentation des pressions intra-thoraciques qui réduit la précharge cardiaque et réduit ainsi l'œdème pulmonaire (58).

La ventilation mécanique peut induire des lésions sur le poumon sain en l'absence de toute autre agression; l'hyper distension des voies aériennes et les cycles répétés d'ouverture/fermeture des alvéoles sont les mécanismes principaux responsables de ces lésions qui constituent le VILI (59). De plus, l'étirement pulmonaire peut conduire à la libération de cytokines inflammatoires, notamment l'IL-8 qui provoque des lésions supplémentaires par le biais du recrutement des neutrophiles (60, 61). Enfin, plusieurs études expérimentales suggèrent que les forces mécaniques appliquées au poumon exposé à la ventilation mécanique puissent interférer avec la capacité de l'hôte de contrôler la croissance bactérienne (62-65). Initialement ces aspects du VILI ont été décrits dans des modèles animaux avec des poumons pré-lésés et exposés à une ventilation mécanique très agressive avec des paramètres jamais utilisés chez les patients (notamment des grands volumes courants), mais des données plus récentes semblent indiquer que des lésions plus modérées, mais bien évidentes, ainsi que l'activation de l'inflammation pulmonaire puissent apparaître aussi avec des paramètres de ventilation mécanique habituellement utilisés dans la pratique clinique (66, 67).

La limitation de la tension alvéolaire par la réduction du volume courant, et la prévention du collapsus alvéolaire télé-expiratoire avec l'application d'une PEEP ont prouvé avoir un effet protecteur pour le poumon à la fois dans les modèles animaux (68) et chez les patients avec SDRA (69). Cependant, il a été montré que malgré une ventilation mécanique « protectrice », des lésions histologiques et de l'inflammation peuvent apparaître et sont inégalement distribués dans le poumon (70, 71). Ainsi, pendant que les régions déclives sont hypo-ventilées, les régions non déclives sont hyper-distendues. Les lésions lobaires provoquées par une pneumonie bactérienne peuvent aggraver ces différences régionales (72).

Malgré de nombreuses études expérimentales qui ont montré qu'une stratégie de ventilation mécanique « protectrice » peut améliorer l'évolution des pneumonies comparée à une stratégie de ventilation « non protectrice/agressive » (volumes courants élevés et ZEEP), certaines questions restent en suspens (73-77). En premier lieu, malgré le fait que cette stratégie soit considérée « protectrice », elle n'est pas nécessairement sans danger, car elle peut aggraver les lésions tissulaires et augmenter la croissance bactérienne dans des modèles animaux de pneumonie (62, 63). De plus, le réglage des valeurs optimales de PEEP

reste un sujet débattu: s'il est certain qu'il ne faut pas régler la PEEP à 0, en réalité l'augmentation non justifiée de la PEEP peut conduire à l'hyper distension pulmonaire chez des patients avec un SRDA lobaire (78, 79). Des modèles animaux ont montré que une PEEP élevée est associée avec une hyper distension autour des foyers de pneumonie et dans le poumon controlatéral, qui favorise ainsi l'inflammation et la translocation bactérienne pulmonaire-systémique (80, 81).

Le biotraumatisme

Si le concept de barotraumatisme remonte aux premières tentatives de ventilation au soufflet il y a plus de 2 siècles, le concept de « biotraumatisme » est relativement récent, et il a été introduit pour décrire des lésions indétectables au niveau biochimique, notamment la libération de cytokines et autres médiateurs de l'inflammation, associées à la ventilation mécanique (82). Dans une publication novatrice Tremblay et coll. ont montré dans un modèle *ex vivo* de poumon de rat non perfusé et ventilé (83) que la ventilation mécanique avec des volumes courants élevés et PEEP basse induit la production de niveaux élevés de cytokines proinflammatoires dans l'LBA. Ces résultats ne furent pas confirmés quelques années plus tard par Ricard et coll. (84) qui conclurent que la ventilation mécanique avec volumes courants élevés n'est pas suffisante pour induire une augmentation de la libération de cytokines dans les espaces alvéolaires sans l'association d'un évènement prédisposant comme l'exposition au LPS ou une agression chimique. D'autres modèles animaux ont confirmé par la suite que la ventilation mécanique est capable en elle même d'induire une augmentation de la sécrétion de cytokines non seulement avec des volumes courants élevés, mais aussi avec des bas volumes courants comme ceux utilisés dans la ventilation « protectrice ». Par exemple Vaneker et coll. (85) ont mis en évidence une augmentation du facteur chimiotactique dérivé des keratinocytes, de l'IL-1 α et de l'IL-1 β dans l'homogénat pulmonaire, et de l'IL-6, du facteur chimiotactique dérivé des keratinocytes et du TNF- α dans le plasma dans un modèle de souris ventilées pendant 4 heures à 8mL/kg. Plusieurs études ont montré que la ventilation mécanique prolongée

avec pressions de pic élevées induit une infiltration neutrophile au niveau pulmonaire (86, 87).

Les conséquences principales du biotraumatisme ne sont pas localisées au niveau pulmonaire. La libération de ces médiateurs de l'inflammation dans la circulation systémique peut potentiellement induire des lésions dans des organes à distance (88).

Interactions entre ventilation mécanique et immunité innée

Les voies de signalisation intracellulaires de l'immunité innée interagissent avec d'autres voies de signalisation, comme la voie de transduction mécanique activée par l'étirement cellulaire, mais les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas complètement élucidés à ce jour (89, 90).

L'étirement mécanique stimule la production de cytokines par les macrophages alvéolaires *in vitro* ; l'exposition contemporaine des macrophages au LPS augmente la libération de cytokines (61). Dans un modèle de poumons de rat ventilés *ex vivo*, les volumes courants élevés induisent la production de cytokines pro-inflammatoires, et l'injection au préalable de LPS par voie intraveineuse aux animaux augmente la réponse inflammatoire à tous les niveaux d'étirement (83). Dans un modèle de lapins ventilés pendant 8 heures avec des volumes courants modérément élevés (15 mL/Kg), la combinaison de ventilation mécanique et traitement systémique avec LPS induit une augmentation de la réponse cytokinique et des lésions pulmonaires (91). Des résultats similaires ont été obtenus aussi sur un modèle de lapin ventilé avec des paramètres habituellement utilisés au bloc opératoire, 10 mL/kg et ZEEP (92). Si ces études montrent que le LPS sensibilise les poumons aux effets pro-inflammatoires de la ventilation mécanique, d'autres suggèrent que *a contrario* la ventilation mécanique peut sensibiliser le poumon aux molécules bactériennes en stimulant des voies de l'immunité innée. Les macrophages alvéolaires récupérés à partir de l'LBA de lapins ventilés avec des volumes courants élevés, (20 mL/kg) montrent une augmentation de la réponse à la stimulation avec du LPS *in vitro*. Dans ce

modèle l'expression tissulaire pulmonaire du CD14 (corécepteur qui interagit avec les molécules MD2 et TLR4 pour activer la voie NF- κ B suite à une stimulation par les LPS (93)) est augmentée par la ventilation mécanique (94). Ces résultats suggèrent que la ventilation mécanique peut sensibiliser le poumon à l'endotoxine par une surexpression du CD14.

Une hypothèse sur le rôle joué par les différents TLR dans cette voie de transduction mécanique a été fournie par Vaneker *et coll.* avec un modèle de souris KO pour TLR-2 et pour TLR-4, dans lequel 4 heures de ventilation mécanique avec petit volume courant (8 mL/kg) induisent la libération de moins de cytokines chez la souris KO pour TLR-4 que chez la souris *wild-type* ; par contre les souris KO pour TLR-2 se comportent comme les *wild-type* dans ce modèle (85). Des résultats discordants ont été retrouvés par Chun *et coll.*, qui n'ont pas confirmé de différence dans la libération de cytokines ni d'infiltration neutrophile ni de perméabilité pulmonaire avec un modèle de souris KO pour TLR-4 ventilés à 10 mL/Kg pendant 6 heures (95). Leur modèle avait comme objectif d'évaluer le rôle de la voie de signalisation qui passe par MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88, protéine utilisée par tous les TLRs sauf TLR-3 pour activer le facteur de transcription NF- κ B) ; ils ont donc associé à la ventilation mécanique un agoniste TLR-3, le poli (I:C) (Polyinosinic-polycytidylic acid, un analogue de synthèse de l'ARN viral double brin, reconnu par le TLR-3 avec activation de la voie NF- κ B et production de cytokines), car le TLR-3 est le seul qui n'utilise pas la voie MyD88. Leurs résultats montrent que la présence du MyD88 est indispensable pour l'apparition d'une inflammation et d'une hyperperméabilité induites par la ventilation mécanique. Ils ont donc conclu que la ventilation mécanique puisse générer des ligands endogènes qui sont reconnus par des récepteurs (autres que le TLR-4) dépendants de la voie MyD88.

Les voies de signalisation des TLR qui sont activées par la présence de pathogènes peuvent être modulées par la ventilation mécanique. Dans un modèle de choc septique induit par ligature et ponction caecale chez le rat, 4 heures de ventilation mécanique avec volumes courants élevés (20 mL/kg) influencent les niveaux de TLR-4 et IRAK-M (Interlukin-1 Receptor Associated Kinase M, une serine-thréonine kinase présente seulement dans les monocytes et les macrophages, qui régule négativement les TLRs (96)) , ainsi que les cytokines pulmonaires et systémiques et la mortalité (97).

Le rôle du TLR-2 dans le Ventilator-Induced Lung Injury est débattu. L'expression de l'ARNm du TLR-2 dans le tissu pulmonaire de souris saines est augmentée après 4 heures de ventilation mécanique avec petits volumes courants à 8 mL/kg. Dans une étude plus récente de Villar *et coll.* avec des rats ventilés pendant 4 heures avec des volumes courants élevés (15 mL/kg) a retrouvé des résultats discordants, seulement l'ARNm du TLR-4 est surexprimé, et non l'ARNm du TLR-2 (97).

Les effets décrits jusqu'ici montrent une activation bidirectionnelle, à la fois la ventilation mécanique peut sensibiliser le poumon aux effets de l'endotoxine, et la pré-stimulation avec endotoxine peut aggraver l'inflammation induite par la ventilation mécanique, ce qui laisse envisager que la réduction du stress mécanique par la réduction des volumes courants et l'inhibition des effets du LPS au niveau récepteuriel ou post-récepteuriel constituent deux approches possibles et complémentaires pour protéger les patients des lésions induites par la ventilation mécanique.

Jusqu'à présent quelques études ont évalué le rôle du TLR-2, de ses ligands et ses voies de signalisation, mais plusieurs doutes et incertitudes persistent.

Décubitus ventral et Ventilator-Induced Lung Injury

Le changement de position en décubitus ventral des patients sous ventilation mécanique avec une atteinte pulmonaire responsable d'une hypoxémie sévère (SDRA) est une des techniques utilisées pour améliorer le rapport ventilation/perfusion et améliorer ainsi l'hématose. Depuis la première description en 1976 de l'amélioration spectaculaire de l'oxygénation d'un patient ventilé en SDRA au changement du décubitus dorsal au décubitus ventral (DV) (98), de nombreuses études expérimentales et cliniques ont essayé d'expliquer les mécanismes physiologiques du DV et de valider son utilisation, jusqu'à la publication en 2013 de l'étude PROSEVA (Proning Severe ARDS Patients) (99) qui a montré que l'application du DV permet de réduire la mortalité des patients avec un SDRA sévère.

Les études expérimentales ont fourni des preuves convaincantes que le DV influence non seulement l'oxygénation et le pronostic en cas de SDRA, mais aussi la génération et l'évolution du VILI au niveau du poumon sain (100). Le VILI se développe à partir de

l'application répétée de forces mécaniques élevées qui soit déchirent directement les fragiles parois alvéolaires, soit activent des voies de signalisation qui induisent un état inflammatoire (59, 101). Les régions pulmonaires à l'interface entre les alvéoles aérés et non aérés, qui prédominent dans les zones déclives (102), sont exposées à des tensions plus importantes, à des cycles d'ouverture/fermeture des espaces aériens qui induisent une déplétion du surfactant, et à des forces de cisaillement supérieures par rapport à celles auxquelles sont exposées les régions pulmonaires qui restent constamment ouvertes pendant le cycle respiratoire (48). Les fluides et les sécrétions présentes dans les voies aériennes peuvent influencer la production du surfactant, entraver l'ouverture des espaces aériens et prédisposer à l'infection pulmonaire. Tous ces paramètres, notamment la mécanique régionale et le drainage des fluides sont influencés par le DV (103, 104). Le DV peut augmenter le volume pulmonaire (CRF) (105), mais cette augmentation n'est pas suffisante pour expliquer les améliorations de l'oxygénation ni la réduction de la propension à développer le VILI ; la distribution régionale des forces trans-pulmonaires joue un rôle plus important (106). Le VILI privilégie les régions déclives, et les régions dorsales, qui sont prédisposées à développer des lésions en décubitus dorsal, sont épargnées en DV ; les tensions mécaniques auxquelles les régions dorsales sont exposées sont limitées par la réduction des interfaces entre unités ouvertes et fermées et par la réduction des forces trans-pulmonaires. Dans un modèle expérimental de chien ventilé, le DV limite les lésions qui apparaissent au niveau des régions dorsales (œdème et inflammation) pendant la ventilation mécanique en décubitus dorsal, à la fois dans des poumons sains et des poumons lésés au préalable avec de l'acide oléique ; dans ce modèle les régions non déclives sont relativement épargnées (107, 108).

Les modèles animaux disponibles de lésion pulmonaire diffuse montrent que le DV peut améliorer le recrutement alvéolaire sans risque grâce à une meilleure distribution du volume courant dans le poumon, ce qui permet de retarder l'apparition des lésions typiques du VILI et peut être même de les atténuer (108-111).

Hypothèse de travail et objectif de l'étude

Les objectifs de ce travail sont multiples.

Tout d'abord, afin de tester l'hypothèse que la ventilation mécanique module l'expression du TLR2, nous allons réaliser une série d'expérimentations *in vitro* et *in vivo* pour déterminer si l'étirement cyclique des cellules alvéolaires et la ventilation mécanique « non protectrice/agressive » modifient l'expression du TLR-2.

Nous allons par la suite évaluer si la réponse inflammatoire et les lésions histologiques induites par la ventilation mécanique sont modifiées par l'exposition à un agoniste bactérien du TLR-2, et nous allons mieux appréhender le rôle du TLR-2 dans le Ventilator-Induced Lung Injury grâce à un modèle de pneumopathie acquise sous ventilation mécanique à *Staphylococcus aureus*.

Dans une autre série d'expérimentations, nous allons tester l'hypothèse qu'une meilleure répartition du volume courant dans le poumon ventilé grâce à l'utilisation du décubitus ventral permet de limiter l'étirement cyclique des cellules alvéolaires et de réduire ainsi la sévérité d'une pneumonie unilatérale, mais aussi l'atteinte du poumon controlatéral, dans un modèle de lapin ventilé avec des réglages de ventilation « protectrice » et non. A notre connaissance, ceci n'a jamais été vérifié dans un modèle de lésion lobaire.

Le *fil conducteur* de cette série de travaux sera donc l'impact de la ventilation mécanique sur l'immunité innée et sur la capacité du poumon de répondre à une agression bactérienne.

MATERIELS ET METHODES

Design expérimental

- Dans une première série d'expérimentations nous avons utilisé un modèle *in vitro* de cellules épithéliales alvéolaires humaines exposées à un étirement cyclique qui simule le stress de la ventilation mécanique et évalué l'impact de l'étirement cyclique sur l'expression des récepteurs de l'immunité innée
- Dans une deuxième série d'expérimentations, nous avons travaillé sur un modèle animal de lapin, et nous avons évalué l'impact d'une ventilation non protectrice sur l'expression des récepteurs de l'immunité innée
- Dans une troisième série d'expérimentations, nous avons travaillé sur un modèle animal de lapin ventilé que nous avons exposé à des agonistes du récepteur TLR2 synthétiques (Pam3CSK4).
- Dans une quatrième série d'expérimentations, nous avons travaillé sur un modèle animal de lapin ventilé que nous avons exposé à des agonistes vivants du récepteur TLR2 (*Staphylococcus aureus*).
- Dans une cinquième série d'expérimentations, nous avons stimulé *ex-vivo* avec un agoniste synthétique du TLR-2 (Pam3CSK4) le sang de lapins ventilés avec une pneumonie expérimentale à *Staphylococcus aureus*.
- Dans une sixième série d'expérimentations, nous avons évalué sur un modèle animal de lapin ventilé avec pneumonie à *Enterobacter aerogenes* l'impact du décubitus ventral en fonction du type de ventilation (protectrice/non protectrice).

Première série d'expérimentations : modèle cellulaire *in vitro*

Cellules et réactifs

La lignée cellulaire humaine épithéliale alvéolaire A549 type II-like, achetée chez American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA), a été cultivée dans un milieu de culture composé par 50% de DMEM et 50% d'un milieu nutritionnel F-12 supplémenté avec FCS à 10%, 2 mM L-glutamine, 10 mM de HEPES, 50 U/ml de pénicilline, et 2 µg/ml de gentamicine.

L'inhibiteur du NF-κB Sn50 et l'inhibiteur spécifique SB203580 de la MAPK (mitogen-activated protein kinase) p38 ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO, U.S.A.).

Le lipopeptide Pam₃CSK₄, agoniste spécifique du TLR-2, a été acheté chez InvivoGen (San Diego, CA, U.S.A.).

Les cellules épithéliales A549 ont étéensemencées dans des plaques Bioflex® (Dunn Labortechnik, Asbach, Germany) à une densité de 2 Å, ce qui correspond à environ 10⁵ cellules par puits, et cultivées pendant 48 heures jusqu'à l'obtention d'une confluence de 70 à 80% ([Figure 1a](#)). L'étirement mécanique des cellules a été réalisé pour des périodes de durée différente en utilisant l'appareil FX-3000 Flexercell strain unit (Flexcell International, Hillsborough, N.C., U.S.A.) à l'intérieur d'un incubateur à 37,5°C et 5% de CO₂.

La fréquence d'étirement était de 20 cycles/minute avec un signal carré, un ratio étirement/relaxation 1 :1 et une élongation équi-bi-axiale maximale de 20%, comme décrit précédemment (112). Dans une série de manipulations, l'agoniste TLR-2 Pam₃CSK₄ a été rajouté au milieu de culture (à la concentration finale de 1µg/ml) pour 8 heures supplémentaires. A la fin de chaque manipulation le surnageant était immédiatement recueilli, aliquoté et congelé à -80°C. La concentration de IL-6 et IL-8 a été mesurée par méthode ELISA (Endogen, Woburn, MA, U.S.A.) sur le surnageant décongelé. Les limites de détection étaient 45 pg/ml pour l'IL-6 et 65 pg/ml pour l'IL-8.

PCR quantitative en temps réel

Après l'étirement cyclique, les cellules A549 ont été recueillies et maintenues à -70°C dans du TriZol (Invitrogen, San Diego, CA, USA) jusqu'à l'extraction de l'ARN. L'ADN complémentaire a été obtenu par rétro-transcription en utilisant des primers random, un traitement par RNAsine et ImProm II RT (Promega, Madison, WI, U.S.A.). La PCR quantitative a été réalisée en utilisant un thermocycleur IQ5 (Biorad, Hercules, CA, USA), ainsi que les sondes TaqMan suivantes avec le universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.):

MD-2, Hs00209771_m1;

TLR4, Hs00152939_m1;

TLR2, Hs00610101_m1;

CD14, Hs00169122_g1;

IL-8, Hs00174103_m1;

IL-6, Hs 00174131_m1;

HBD1, Hs00608345_m1;

HBD2, Hs00175474_m1;

HBD3, Hs00218678_m1;

18S, Hs99999901_s1.

Les résultats sont exprimés comme « fold induction » utilisant la méthode du ΔCt ; la condition statique in vitro est considérée comme le niveau basal, et donc sa valeur correspond à 1.

Cytométrie de flux

Les cellules A549 étirées ou maintenues en conditions statiques pendant 24 heures sont retirées des plaques en utilisant du PBS à pH 7,4 additionné d'EDTA à 0,1% et sont immédiatement analysé par FACS. Pour chaque analyse, 10^6 cellules sont lavées trois fois avec 1 ml de PBS contenant du BSA (Sigma-Aldrich) au 0,4% à 4°C.

Les cellules sont incubées dans du PBS/BSA contenant des anticorps monoclonaux murins anti-TLR2 humain (clone T2.5) à la concentration de 5 µg/ml, ou des anticorps de contrôle du même isotype (IgG1 murin; Biosource, Camarillo, CA, U.S.A.), à 4°C pour 30 minutes.

Les cellules sont par la suite lavées trois fois avec du PBS et mises à nouveau en suspension avec du PBS contenant des anticorps de chèvre anti IgG murines marqués à la phycoérythrine à la concentration de 10 µg/ml dans l'obscurité pour 30 minutes.

Pour le marquage intracellulaire, les cellules sont préfixées avec du formaldéhyde à 1% et perméabilisées avec IC Perm Buffer (Biosource) supplémenté avec du BSA à 4%. Le marquage est par la suite réalisé en suivant les mêmes étapes décrites précédemment.

Le FACS est réalisé avec FacScan et les résultats sont analysés avec le logiciel CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Les résultats sont exprimés comme ratio de l'intensité de fluorescence moyenne, défini comme l'intensité de fluorescence moyenne des cellules marquées avec un anticorps spécifique pour un antigène divisé par l'intensité de fluorescence moyenne des cellules incubées avec l'anticorps de contrôle.

Modèles animaux

Des lapins male New Zealand White (poids 3 +/- 0,3 kg) sont achetés auprès de l'Élevage scientifique des Dombes (Romans, France). Ils sont placés en cages individuelles et nourris ad libitum avec eau et nourriture, selon les recommandations actuelles du Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health No. 92-23, revised 1985). Le Comité d'Éthique de la Faculté de Médecine de Dijon a approuvé le protocole expérimental. Les lapins sont équipés préalablement (48 heures avant le début de la manipulation) d'une voie veineuse centrale jugulaire interne gauche insérée chirurgicalement. La pose du cathéter est réalisée sous sédation par injection par voie intramusculaire de kétamine (Panpharma), sans recours à la ventilation mécanique.

Dans la deuxième série de manipulations ([Figure 1b](#)), le protocole de l'étude comprend deux bras; chaque animal est assigné de manière aléatoire à l'un des deux groupes expérimentaux:

- Groupe ventilation spontané « SB » (SB = Spontaneous Breathing), qui constitue le premier groupe de contrôle.
- Groupe ventilation mécanique « MV » (MV = Mechanical Ventilation) avec un volume courant de 12 ml/kg, PEEP=0; les animaux sont ventilés pendant 8 heures

Dans la troisième série de manipulations ([Figure 1c](#)), le protocole de l'étude comprend quatre bras; chaque animal est assigné de manière aléatoire à l'un des quatre groupes expérimentaux:

- Groupe ventilation spontanée « SB » (SB = Spontaneous Breathing), qui constitue le groupe de contrôle.
- Groupe ventilation mécanique « MV » (MV = Mechanical Ventilation) avec un volume courant de 12 ml/kg, PEEP=0; les animaux sont ventilés pendant 24 heures avant l'instillation intra-trachéale de SSI, puis ils sont ventilés 8 heures supplémentaires avant le sacrifice
- Groupe « SB+BLP » (BLP = Bacterial Lipo-Peptide) : administration endobronchique d'un produit bactérien agoniste spécifique de TLR2 (lipopeptide de synthèse Pam3CSK4) ; les animaux sont surveillés et prélevés pendant 8 heures avant le sacrifice.
- Groupe « MV+BLP » sous ventilation mécanique avec un volume courant de 12 ml/kg, PEEP=0 : après 24 heures de ventilation mécanique, administration endobronchique d'un produit bactérien agoniste spécifique de TLR2 (lipopeptide de synthèse Pam3CSK4) ; les animaux sont ensuite ventilés 8 heures supplémentaires avant le sacrifice.

Dans la quatrième série de manipulations ([Figure 1d](#)), le protocole de l'étude comprend quatre bras; chaque animal est assigné de manière aléatoire à l'un des quatre groupes expérimentaux:

- Groupe « SB+ *Staphylococcus aureus* » en ventilation spontanée: administration endobronchique de 10^9 UFC de *Staphylococcus aureus*; les animaux sont surveillés et prélevés pendant 8 heures avant le sacrifice.
- Groupe « MV + *Staphylococcus aureus*» sous ventilation mécanique avec un volume courant de 12 ml/kg, PEEP=0 : après 24 heures de ventilation mécanique, administration endobronchique de 10^9 UFC de *Staphylococcus aureus*; les animaux sont ensuite ventilés 8 heures supplémentaires avant le sacrifice.
- Groupe « SB+ *Staphylococcus aureus* » en ventilation spontanée: administration endobronchique de 10^9 UFC de *Staphylococcus aureus*; les animaux sont surveillés et prélevés pendant 24 heures avant le sacrifice.
- Groupe « MV + *Staphylococcus aureus*» sous ventilation mécanique avec un volume courant de 12 ml/kg, PEEP=0 : après 24 heures de ventilation mécanique, administration endobronchique de 10^9 UFC de *Staphylococcus aureus*; les animaux sont ensuite ventilés 24 heures supplémentaires avant le sacrifice.

Dans la cinquième série de manipulations, tous les lapins sont ventilés avec des paramètres de ventilation non protectrice (volume courant 12 ml/kg, PEEP =0) pendant 48 heures avant le prélèvement.

Dans la sixième série de manipulations (Figure 1^e), le protocole de l'étude comprend quatre bras; chaque animal est assigné de manière aléatoire à l'un des quatre groupes expérimentaux:

- Groupe « DD+ *Enterobacter aerogenes* » sous ventilation mécanique non protectrice avec pression inspiratoire à 30cmH₂O, PEEP=0 : administration endobronchique de 10^{10} UFC de *Enterobacter aerogenes*; les animaux sont surveillés et prélevés pendant 8 heures avant le sacrifice.

- Groupe « DV+ *Enterobacter aerogenes* » sous ventilation mécanique non protectrice avec pression inspiratoire à 30cmH₂O, PEEP=0 : administration endobronchique de 10¹⁰ UFC de *Enterobacter aerogenes* ; les animaux sont surveillés et prélevés pendant 8 heures avant le sacrifice.
- Groupe « DD+ *Enterobacter aerogenes* » sous ventilation mécanique protectrice avec un volume courant de 8 ml/kg, PEEP=5 : administration endobronchique de 10¹⁰ UFC de *Enterobacter aerogenes* ; les animaux sont surveillés et prélevés pendant 8 heures avant le sacrifice.
- Groupe « DV+ *Enterobacter aerogenes* » sous ventilation mécanique protectrice avec un volume courant de 8 ml/kg, PEEP=5 : administration endobronchique de 10¹⁰ UFC de *Enterobacter aerogenes* ; les animaux sont surveillés et prélevés pendant 8 heures avant le sacrifice.

Deuxième série d'expérimentations : lapins en ventilation spontanée vs ventilation mécanique

Dans la deuxième série d'expérimentations (première série d'expérimentations sur l'animal) ([Figure 1b](#)), les animaux sont randomisés dans le groupe contrôle en ventilation spontanée (SB, n=4) ou dans le groupe ventilation mécanique (MV, n=4). Les animaux du premier groupe sont immédiatement sacrifiés par une dose létale de thiopental sodique, alors que ceux du groupe MV sont intubés comme décrit précédemment (63, 64) : après induction anesthésique par injection intraveineuse (IV) de 3,3mg/kg de kétamine (Panpharma, Fougères, France) et de 1mg/kg de xylazine (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Germany), une sonde d'intubation de 3,0 mm de diamètre est introduite par voie oro-trachéale sous contrôle de la vue par laryngoscopie directe ; puis l'animal est maintenu en décubitus dorsal sous sédation et curarisation par perfusion IV continue de midazolam ([0,06 mg.kg⁻¹.hr⁻¹], Panpharma) et de bromure de pancuronium (Pavulon® [0,3 mg.kg⁻¹.hr⁻¹], Organon). Une hydratation par du sérum salé isotonique à 1ml/kg/h est réalisée

afin de maintenir une stabilité hémodynamique dans ce contexte d'anesthésie, de curarisation et de ventilation mécanique. La ventilation mécanique est assurée par un ventilateur (Babylog® ; Dräger, Lübeck, Germany) en mode «pression-contrôlée».

La pression inspiratoire de pic est réglée à 12 cmH₂O, la PEEP à 0, la fréquence respiratoire à 30 cycles/minute et la fraction inspirée d'O₂ à 0,5. Ces réglages permettent d'obtenir, d'après notre expérience, un volume courant d'environ 12ml/kg, ce qui correspond à une VM modérément agressive. Le volume courant est mesuré au début de la ventilation mécanique en plaçant un pneumotachomètre entre la sonde d'intubation trachéale et le circuit du ventilateur, afin de confirmer ces valeurs (12.6 ± 0.8 ml/kg, moyenne ± écart type dans le groupe MV). Les animaux du groupe MV sont exposés à une période de 8 heures de ventilation mécanique avant le sacrifice.

Dans les deux groupes, les animaux sont exanguinés en utilisant la voie veineuse centrale, puis par ponction intra-cardiaque. Les poumons sont prélevés pour l'extraction de l'ARN ; des échantillons supplémentaires d'environ 1 cm³ sont prélevés pour l'examen histologique.

Troisième série d'expérimentations: stimulation du poumon avec un agoniste TLR-2

Dans la troisième série d'expérimentations ([Figure 1c](#)), les lapins sont randomisés en quatre groupes, SB, SB+BLP, MV et MV+BLP, (n=5 dans chaque groupe).

Les lapins mâles New-Zealand (3 +/- 0,3 kg) sont équipés préalablement (48 heures avant le début de la manipulation) d'une voie veineuse centrale jugulaire interne gauche insérée chirurgicalement. La pose du cathéter est réalisée sous sédation par injection voie intramusculaire de kétamine (Panpharma), sans recours à la ventilation mécanique.

Animaux des groupes MV et MV+BLP: après induction anesthésique par injection intraveineuse (IV) de 3,3mg/kg de kétamine (Panpharma, Fougères, France) et de 1mg/kg de xylazine (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Germany), une sonde d'intubation de 3,0 mm est introduite par voie orotrachéale sous contrôle de la vue par laryngoscopie directe ; puis l'animal est maintenu en décubitus dorsal sous sédation et curarisation par perfusion IV continue de midazolam ([0,06 mg.kg-1.hr-1], Panpharma) et de bromure de pancuronium

(Pavulon® [0,3 mg.kg-1.hr-1], Organon). La ventilation mécanique est assurée par un respirateur (Servo ventilator 900C, Siemens) en mode «volume-contrôlé».

Le volume courant est réglé à 12ml/kg, la PEEP à 0, la fréquence respiratoire à 30 cycles/minute et la fraction inspirée d'O₂ à 0,5 ; ces réglages correspondent à une VM modérément agressive.

Une hydratation par du sérum salé isotonique à 1ml/kg/h est réalisée afin de maintenir une stabilité hémodynamique dans ce contexte d'anesthésie, de curarisation et de ventilation mécanique et la pression de plateau est surveillée toutes les heures.

Un cathéter artériel est mis en place par voie d'abord fémorale percutanée avec la méthode de Seldinger pour le monitoring de la pression artérielle et pour le monitoring de la gazométrie artérielle dans le cadre de cette ventilation de durée prolongée. Les gaz du sang sont analysés toutes les 8 heures et la fréquence respiratoire adaptée afin de maintenir une normocapnie.

Après une période de ventilation de 24 heures, ils reçoivent l'instillation intra-trachéale de 2 ml de sérum salé isotonique (dans le groupe MV) ou 500µg du lipopeptide bactérien de synthèse Pam₃CSK₄ dilués dans 2 ml de sérum salé isotonique (dans le groupe MV+BLP), par le biais d'un cathéter introduit par la sonde d'intubation jusqu'à une bronche distale.

Les animaux du groupe SB et SB+BLP reçoivent une induction anesthésique et une intubation orotrachéale comme décrit précédemment, puis 2 ml de sérum salé isotonique (dans le groupe SB) ou 500µg du lipopeptide bactérien de synthèse Pam₃CSK₄ dilués dans 2 ml de sérum salé isotonique (dans le groupe SB+BLP) sont administrés par instillation endotrachéale par le biais d'un cathéter introduit par la sonde d'intubation jusqu'à une bronche distale. Les animaux gardent une ventilation spontanée, ils sont donc surveillés, rapidement extubés puis mis dans leur cage.

Les animaux des quatre groupes sont sacrifiés 8 heures après l'instillation par injection d'une dose létale de thiopental sodique. Les animaux sont exanguinés en utilisant la voie veineuse centrale, puis par ponction intra-cardiaque. Les poumons sont prélevés pour l'extraction de l'ARN et pour la réalisation des ELISA; des échantillons supplémentaires d'environ 1 cm³ sont prélevés pour l'examen histologique.

Quatrième série d'expérimentations: TLR2 et pneumopathie à Gram + acquise sous ventilation mécanique

Dans la quatrième série d'expérimentations ([Figure 1d](#)), les lapins sont randomisés en quatre groupes, SB+S.aureus-8h, MV+S.aureus-8h (n=5 dans chaque groupe), SB+S.aureus-24h, MV+S.aureus-24h, (n=10 dans chaque groupe).

Les lapins mâles New-Zealand (3 +/- 0,3 kg) sont équipés préalablement (48 heures avant le début de la manipulation) d'une voie veineuse centrale jugulaire interne gauche insérée chirurgicalement. La pose du cathéter est réalisée sous sédation par injection voie intramusculaire de kétamine (Panpharma), sans recours à la ventilation mécanique.

Animaux des groupes MV+S.aureus 8h et MV+S.aureus 24h : après induction anesthésique comme décrit précédemment, une sonde d'intubation de 3,0 mm est introduite par voie orotrachéale sous contrôle de la vue par laryngoscopie directe ; puis l'animal est maintenu en décubitus dorsal sous sédation et curarisation par perfusion IV continue de midazolam ([0,06 mg.kg-1.hr-1], Panpharma) et de bromure de pancuronium (Pavulon® [0,3 mg.kg-1.hr-1], Organon). La ventilation mécanique est assurée par un respirateur (Servo ventilator 900C, Siemens) en mode «volume-contrôlé».

Le volume courant est réglé à 12ml/kg, la PEEP à 0, la fréquence respiratoire à 30 cycles/minute et la fraction inspirée d'O₂ à 0,5 ; ces réglages correspondent à une VM modérément agressive.

Une hydratation par du sérum salé isotonique à 1ml/kg/h est réalisée afin de maintenir une stabilité hémodynamique dans ce contexte d'anesthésie, de curarisation et de ventilation mécanique et la pression de plateau est surveillée toutes les heures.

Un cathéter artériel est mis en place par voie d'abord fémorale percutanée avec la méthode de Seldinger pour le monitoring de la pression artérielle et pour le monitoring de la gazométrie artérielle dans le cadre de cette ventilation de durée prolongée. Les gaz du sang

sont analysés toutes les 8 heures et la fréquence respiratoire adaptée afin de maintenir une normocapnie.

Après une période de ventilation de 24 heures, ils reçoivent l'instillation intra-trachéale de $9,5 \log_{10}$ UFC/mL de *S. aureus* diluées dans 0,5 mL de sérum salé isotonique, par le biais d'un cathéter introduit par la sonde d'intubation jusqu'à une bronche distale.

Les animaux du groupe SB+S.aureus-8h et SB+S.aureus-24h reçoivent une induction anesthésique et une intubation orotrachéale comme décrit précédemment, puis ils reçoivent l'instillation intra-trachéale de $9,5 \log_{10}$ UFC/mL de *S. aureus* diluées dans 0,5 mL de sérum salé isotonique par le biais d'un cathéter introduit par la sonde d'intubation jusqu'à une bronche distale. Les animaux gardent une ventilation spontanée, ils sont donc surveillés, rapidement extubés puis mis dans leur cage.

Les animaux des deux groupes « 8h » sont sacrifiés 8 heures après l'instillation, et ceux des deux groupes « 24h » 24 heures après l'instillation, par injection d'une dose létale de thiopental sodique. Les animaux sont exanguinés en utilisant la voie veineuse centrale, puis par ponction intra-cardiaque. Les poumons sont prélevés pour l'extraction de l'ARN, pour la réalisation des ELISA et pour les cultures bactériennes ; des échantillons supplémentaires d'environ 1 cm³ sont prélevés pour l'examen histologique.

Prélèvements

Les échantillons sanguins sont prélevés au niveau du cathéter artériel (au début de la manipulation, après 24 heures de ventilation mécanique, puis 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24 heures après l'instillation intratrachéale) et centrifugés à 1000g pendant 15 minutes à 4°C; le surnageant est aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse de la concentration de cytokines.

A la fin de chaque manipulation, les animaux sont sacrifiés par injection d'une dose létale de thiopental sodique. Les animaux sont exanguinés en utilisant la voie veineuse centrale, puis par ponction intra-cardiaque. Les autopsies sont réalisées stérilement pour le prélèvement des échantillons de poumon et de rate destinés aux cultures quantitatives.

Immédiatement après l'exsanguination, le bloc cœur-poumons est prélevé après sternotomie médiane.

Un lavage broncho-alvéolaire est effectué par canulation sélective de la bronche souche gauche après résection pulmonaire et instillation de 2 mL/kg de sérum salé isotonique selon une technique déjà décrite (113). Le liquide de lavage récupéré est centrifugé à 400g et à 4°C et le surnageant est stocké à -80°C pour le dosage des cytokines.

Des fragments du poumon droit des deux groupes « 8h » sont prélevés pour extraction de l'ARN et conservés à -80°C dans une solution de lyse constituée par 1 mL de Lyse Buffer + 10µL de 2-mercaptoéthanol (nous n'avons pas effectué de PCR dans les groupes « 24 » car nous avons mis en évidence dans une phase de mise à point que le pic de production de l'ARN était plus précoce).

D'autres fragments sont prélevés et fixés dans de la formaline à 5% pour les analyses histologiques : coloration standard et immunohistochimie.

Le tissu pulmonaire restant est homogénéisé en respectant des conditions de stérilité, pour le dosage des cytokines et pour la réalisation des cultures quantitatives.

La rate et le foie sont prélevés pour l'extraction de l'ARN, et le tissu restant est homogénéisé en respectant des conditions de stérilité, pour le dosage des cytokines et pour la réalisation des cultures quantitatives.

PCR quantitative en temps réel

Après sacrifice et exsanguination, la cage thoracique est ouverte et les poumons sont extraits ; des petits fragments de poumon sont donc prélevés. Après broyage des échantillons et filtration, une extraction de l'ARN (kit Genelute Sigma-Aldrich - Alcool absolu) puis un traitement à la désoxyribonucléase (RQ1 DNase) sont réalisés suivis d'une rétro-transcription de l'ARN (Reverse transcriptase ImPromp II) en ADN complémentaire (ADN c). Pour chaque gène (24 puits), les mix sont préparés de la façon suivante: à l'aide de micropipettes, on dépose dans un eppendorf 300 µL d'IQ™ SYBR super mix (un mélange de MgCl₂, de nucléotides, de SYBR green et de iTaq ADN polymérase) puis 156 µL d'eau

stérile puis 60 μ L d'amorces sens (S) et 60 μ L d'amorces anti-sens (AS) du gène à étudier. Après mélange au Vortex, chaque puits de la plaque (Biorad) reçoit 24 μ L de mix et 1 μ L d'ADNc (sauf pour les puits témoins, un pour chaque gène étudié, qui ne contiennent que du mix).

La plaque est ensuite placée dans le thermocycleur (Chromo4, Biorad) qui va soumettre les préparations à une première phase d'incubation à 95 °C pendant une minute trente (afin de dénaturer l'ADNc) puis à 40 cycles, chacun d'entre eux étant constitué d'une phase d'une minute à 60°C (propice à l'hybridation des amorces sur l'ADN simple brin obtenu) puis d'une phase de vingt secondes à 72 °C (permettant la polymérisation du brin complémentaire de l'ADN matrice par l'ADN polymérase) suivie d'une dernière phase à 95°C pendant une minute. Ensuite des courbes de fusion (melting curves) sont réalisées afin de s'assurer de la spécificité de l'amplification. Les séquences des amorces utilisées sont décrites dans le [tableau 1](#), selon Brégeon *et al.* (66) pour les amorces de GAPDH, de TNF α et de l'IL-8 et selon Kajikawa *et al.* (114) pour celles de TLR2, de TLR4 et de MD2. Pour chaque puits, la valeur obtenue est nommée Ct (cycle threshold) et correspond au nombre de cycles nécessaires pour que l'intensité de la fluorescence atteigne un certain seuil; elle est donc inversement proportionnelle à la quantité d'ADN cible présent initialement dans l'échantillon. On réalise ensuite la moyenne de tous les Ct obtenus pour un même gène, un même organe et une même condition expérimentale (par exemple la moyenne de tous les Ct de l'IL-8 dans les échantillons iléaux du groupe VM) et on en utilise la méthode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ décrite par Livak *et al.* (115) : le ΔCt est obtenu, pour chaque organe, en faisant la différence entre la moyenne des Ct du gène et la moyenne des Ct obtenus dans le même échantillon pour le gène domestique GAPDH puis le $\Delta\Delta Ct$ est calculé en faisant la différence entre le ΔCt du groupe à l'étude et le ΔCt correspondant au même organe et au même gène du groupe SB (qui constitue la condition expérimentale de référence, et donc leur valeur correspond à 1). Le résultat obtenu est donc une quantité relative par rapport à la situation de référence choisie.

E.L.I.S.A.

Au début de notre travail il n'existait aucun kit commercial permettant de doser les cytokines par ELISA chez le lapin. Nous avons donc entrepris la mise au point d'une technique ELISA sandwich afin de doser la concentration de TNF-alpha et IL-8 dans des échantillons de sérum et de liquide de lavage broncho-alvéolaire.

La première étape est le *coating* de la plaque à 96 puits avec l'anticorps anti-TNF alpha de capture, une IgG polyclonale [BD Biosciences Pharmingen ref 551214] : nous avons testé des concentrations de 0,25 µg/ml à 2 µg/ml pour trouver le ratio optimal entre anticorps de capture et anticorps de détection. La plaque scellée est mise en incubation une nuit à température ambiante à l'abri de la lumière sur agitateur. Après 5 séries de lavages pour éliminer l'excès d'anticorps non fixé, la plaque est saturée avec 300 µl de la solution de blocage dans chaque puits ; nous avons testé une solution à pH 7,3 filtrée à 0,2 µm de PBS + BSA avec différentes concentrations 1%, 2% et 4% pour obtenir une meilleure saturation et réduire la fixation aspécifique de l'anticorps de détection. Après une incubation d'une heure à température ambiante à l'abri de la lumière sur agitateur et une nouvelle étape de lavage, on dépose dans les puits les contrôles pour constituer la courbe d'étalonnage. Les contrôles sont constitués par du TNF-alpha recombinant de lapin lyophilisé, reconstitué dans du PBS + BSA1% filtré à 22µm [BD Biosciences Pharmingen ref 558135]. Les concentrations de TNF-α retrouvées dans la littérature varient entre 50 et 2000 pg/ml dans le plasma et jusqu'à 5000 dans l'LBA. La limite inférieure de détection doit être à 10 pg/ml. En se basant sur ces données de la littérature nous avons constitué une gamme étalon de 20 pg à 2000 pg/ml, toujours en duplicata. Après deux heures d'incubation à température ambiante à l'abri de la lumière sur agitateur et une nouvelle étape de lavage, on dépose 20µl de l'Ac anti-TNF alpha de détection, une IgG monoclonale conjugué avec la biotine, qui est dirigé vers un autre épitope du TNF-α [BD Biosciences Pharmingen ref 552470] ; nous avons testé des concentrations de 0,25 µg/ml à 2 µg/ml pour trouver le ratio optimal entre anticorps de capture et anticorps de détection. Après une incubation de deux heures à température ambiante à l'abri de la lumière sur agitateur et une nouvelle étape de lavage, on arrive à l'étape de révélation : 50µl du réactif de révélation streptavidine-HRP (*horseradish peroxidase*) [R&D réf DY998] dilué 1 : 200 dans du PBS + BSA 1% sont déposés dans les

puits. Après une incubation de 20 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière et une étape de lavage particulièrement énergique pour éliminer toute excès de streptavidine, 100 µl de la solution substrat TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) /peroxyde d'hydrogène [R&D réf DY999] mélangés immédiatement avant l'utilisation sont déposés dans chaque puits ; cette solution vire vers le bleu après 20 minutes d'incubation quand elle est modifié par la HRP ; le développement de la couleur est proportionnel à la quantité de TNF-α liée.

50 µl d'une solution acide (acide chlorhydrique 1M) sont ajoutés dans les puits pour arrêter le développement de la couleur ; cette solution fait virer la couleur vers le jaune.

La densité optique de la couleur jaune est mesurée avec la longueur d'onde du lecteur réglée à 450 nm.

Les résultats obtenus avec cette technique n'étant pas satisfaisants du point de vue technique, nous avons finalement testé tous nos échantillons de sérum, homogénat pulmonaire et LBA avec un nouveau kit ELISA spécifique pour le lapin (Uscn Life Science Inc., Wuhan, Chine). Les limites de détection du test sont 15.6 pg/mL pour TNF-alpha et IL-8.

Analyses histologiques

Un échantillon de tissu d'environ 1 cm³, ciblé sur une lésion macroscopique de chaque lobe cranial et caudal, est fixé au formol à 4% tamponné pendant au moins 72 heures avant inclusion en paraffine (déshydratation par l'automate Leica TP1020 puis enrobage par la station d'enrobage Leica EG1160). Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées par un microtome (Leica RM2145). Après séchage des lames (Superfrost) en étuve à 37°C pendant une nuit, des colorations manuelles sont réalisées avec l'hématoxyline-éosine (HE) pour tous les prélèvements.

Chaque lame est examinée en aveugle par 2 opérateurs indépendants qui, après avoir regardé 5 champs différents à 2 grossissements (x10 et x40), attribuent un score histologique numérique entre 0 et 3 comme décrit précédemment par Broccard et coll.

(116), basé sur le degré d'infiltration par les neutrophiles, sur l'hémorragie et l'œdème au niveau interstitiel et alvéolaire :

0 (normal) : poumon d'aspect microscopique normal

1 (atteinte minime) : congestion minime, œdème interstitiel, infiltrat neutrophile au niveau interstitiel avec rares hématies et neutrophiles dans les espaces alvéolaires.

2 (atteinte modérée) : congestion modérée, œdème interstitiel, infiltrat neutrophile au niveau interstitiel avec neutrophiles qui occupent partiellement les espaces alvéolaires sans condensation.

3 (atteinte sévère) : congestion et œdème interstitiel marqués, infiltrat neutrophile au niveau interstitiel avec neutrophiles qui occupent quasi complètement les espaces alvéolaires ou franche condensation. Les atélectasies ne sont pas cotées comme anomalies.

Pour chaque critère, lorsque le score attribué par les observateurs était discordant, on a retenu la moyenne des 2 scores.

Le [tableau 2](#) récapitule les caractéristiques de ce score.

Rapport poids humide/poids sec

Le tissu pulmonaire restant a été pesé une première fois, puis déshydraté avec passage à l'étuve à 37°C jusqu'à la dessiccation complète pour mesurer le ratio poids humide/poids sec. Ce ratio est classiquement utilisé pour estimer l'œdème pulmonaire secondaire à l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Précédemment, des lapins sains avec tissu pulmonaire normal avaient été sacrifiés (n=4) et utilisé comme contrôles.

Immuno-histo-chimie

L'expression de la protéine TLR2 au niveau pulmonaire est évaluée par immunohistochimie (IHC), afin de compléter les données apportées par la mesure de l'expression du gène correspondant par RT-qPCR.

Préparation des coupes : après résection, les tissus sont fixés au formol à 4% tamponné pendant au moins 72 heures avant inclusion en paraffine (déshydratation par l'automate Leica TP1020 puis enrobage par la station d'enrobage (Leica EG1160). Des coupes de 5 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées par un microtome (Leica RM2145). Après séchage des lames (Superfrost) en étuve à 37°C pendant une nuit, les coupes peuvent être utilisées pour des coloration manuelles.

Mise au point de la technique: la mise au point a été effectuée sur des coupes de rate d'animaux appartenant au groupe des animaux ventilés et infectés par *S. aureus*, groupe pour lequel l'expression de la protéine TLR2 est la plus susceptible d'être élevée. Ce tissu sera utilisé comme témoin positif lors des immunohisto-marquages sur les poumons.

Les lames ont été déparaffinées et réhydratées par des bains successifs de xylène, d'éthanol 100%, d'éthanol 95%, d'éthanol 70% et d'eau distillée. Les antigènes ont ensuite été démasqués en plongeant les lames dans un bain marie à 95°C de tampon citrate pH 6,0 pendant 20 minutes puis laissées à température ambiante pendant 20 à 30 minutes suivi de trois rinçage au PBS. Les peroxydases endogènes ont été inhibées dans un bain de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pendant 15 minutes 3% en PBS. Après trois bains de PBS, chaque coupe a été cerclée au Dakopen et saturée au PBS-BSA 3% pendant 25 minutes. Les coupes ont ensuite été incubées 60 minutes à température ambiante, en chambre humide, avec un anti-TLR2 de souris fabriqué chez le lapin (Epitomics ref T0337) testé pour trois dilutions dans du PBS-BSA 1% (dilution 1 : 50, dilution 1 : 100, dilution 1 : 200). Après trois rinçages en PBS, un anti-IgG de lapin couplé à une HRP (Southern Biotech) a été incubé sur chaque coupe pendant 60 minutes à température ambiante en chambre humide, dilué 1:200 dans du PBS-BSA 1%. Trois rinçages au PBS sont suivis de la révélation au Novared (Vector, Burlington Canada) puis le changement de couleur est suivi par observation des lames sous microscope optique et stoppé par deux bains de 2 minutes d'eau distillée. La contre-coloration à l'hématoxyline est suivie de la déshydratation des lames dans deux bains d'éthanol 100% xylène. Le montage a été effectué en milieu organique avec la colle Eukitt (Electron Microscopy Sciences, Hatfield).

Procédures bactériologiques : préparation de l'inoculum

- Choix de la souche

La souche retenue est le *Staphylococcus aureus* USA300 résistant à la méticilline et non productrice de toxine de Panton-Valentine (aimablement fournie par G. Lina, Lyon).

La raison du choix est la diffusion actuelle de cette souche (notamment aux Etats-Unis), l'habitude et l'expérience de l'équipe dans la manipulation de cette souche, la méticillino-résistance qui est un caractère important dans un modèle animal de pneumopathie associée aux soins acquise sous ventilation mécanique.

- Conservation de la souche

Les stocks de *S. aureus* sont maintenus à -80 °C dans du BHI (BioMérieux Laboratories, Marcy-l'Etoile, France) supplémenté par du glycérol à 15%; ils sont changés mensuellement en utilisant des colonies isolées à partir de cultures de rates de lapins infectés afin de préserver la virulence bactérienne.

- Etape d'isolement de la souche

A J-2, un écouvillon est imprégné d'une suspension de la souche USA 300 PVL(-) de *S. aureus* et ensemencé sur une gélose MRSA2 (Biomérieux) selon la technique des cadrans. La boîte est ensuite placée à l'étuve à 37°C. Après 24 heures, des colonies jaunes isolées sont observées dans les derniers secteurs ensemencés.

- Etape d'enrichissement

Un bouillon enrichi en *S. aureus* est ensuite préparé à partir du prélèvement d'une colonie mise en milieu BHI et incubée sous agitation pendant 6 heures à 37°C. Des clones de la colonie sont ensuite obtenus après inondation du bouillon de *S. aureus* sur gélose MRSA2 incubée une nuit à 37°C.

- Etape de préparation de l'inoculum

Tous les clones sont prélevés avec un écouvillon et dilués dans une fiole de 10 ml de sérum salé isotonique (SSI) additionné de quelques billes de verre, permettant une meilleure homogénéisation des bactéries dans le milieu. Grâce à un lecteur de densité optique (DO),

un ajustement de la concentration en *S. aureus* est réalisée par ajout de SSI pour obtenir une DO comprise entre 0,150 et 0,200 correspondant sur une courbe d'étalonnage à environ 9-9,5 Log₁₀ d'unités formant une colonie. Cette concentration a été déterminée dans une phase de mise au point qui a montré que les pneumonies obtenues avec des inocula de taille inférieure était d'intensité modérée et transitoires. Le volume final inoculé par instillation intra-trachéale est de 0,5 ml.

- Etape de numération des bactéries dans l'inoculum

La concentration de l'inoculum est systématiquement vérifiée par des cultures quantitatives en ensemençant des plaques avec des dilutions successives 1:10. Trois dilutions (10⁻⁶, 10⁻⁷ et 10⁻⁸) de l'inoculum sont réalisées, puis 100µl de chaque dilution sont déposés et étalés sur des géloses MRSA2. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les colonies des trois boîtes sont comptées et le résultat de la plus petite dilution comptable est choisi et exprimé en log UFC de *S. aureus*.

Evaluation microbiologique de la pneumonie

Chaque lobe pulmonaire est isolé et homogénéisé dans de l'eau stérile, et ensemenché avec des dilutions 1:10 en série pour des cultures quantitatives. Pour chaque lobe, la charge bactérienne est normalisée au poids du lobe. La concentration de 3Log₁₀ UFC/g de tissu pulmonaire a été retenue comme *cut-off* pour discriminer une simple colonisation d'une vraie infection, basé sur les données des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique chez l'homme(117). La concentration bactérienne pulmonaire moyenne a été calculée comme la moyenne des concentrations de chaque lobe normalisées aux poids de chaque lobe.

Les rates ont été aussi prélevées dans des conditions stériles, homogénéisées et mises en cultures quantitatives comme décrit pour le poumon. Les cultures spléniques positives à *S.aureus* ont été considérées comme un marqueur de bactériémie.

Cinquième série d'expérimentations: stimulation *ex vivo* du sang prélevé après 48 heures de ventilation mécanique non protectrice

Dans cette série d'expérimentations animales, tous les lapins sont ventilés avec des paramètres de ventilation non protectrice (volume courant 12 ml/kg, PEEP =0) pendant 48 heures avant le prélèvement.

Préparation des inocula inactivés par la chaleur

La souche de *Staphylococcus aureus* Meticilline-Résistant USA300 a été utilisée pour préparer les inocula, en utilisant la technique décrite plus haut dans le texte.

Pour cette manipulation nous avons utilisé des inocula à 10log10 UFC/mL. Les bactéries de ces inocula ont été inactivées avec la chaleur (2 heures à 100°C) et dilués dans 60µL.

Stimulation *ex vivo* du sang entier

Le sang frais prélevé par ponction veineuse aux lapins est hépariné et dilué avec un ratio 1:2 avec le milieu de culture classique pour leucocytes humains RPMI1640 (Sigma-Aldrich)(118). Ce mélange est ensuite déposé dans des plaques à 96 puits (120µl par puits) et incubé à 37°C pendant 15 minutes.

Le sang est ensuite stimulé avec plusieurs agonistes avec et sans pré-incubation pendant une heure à température ambiante avec l'anticorps monoclonal anti-TLR2 humain T2.5 (IgG1 κ murine, aimablement mis à disposition par Novimmune, dilué dans du RPMI pour obtenir un volume final de 60µl ; un anticorps isotype IgG1 κ de contrôle (BD Biosciences) a été utilisé).

Les agonistes utilisés sont les staphylocoques inactivés par la chaleur, le lipopolysaccharide (LPS) extrait de l'*Escherichia coli* K12 (Invivogen) (4ng/mL) et le Pam3CSK4 (Invivogen) (100ng/mL) . Les concentrations choisies correspondent à la réponse maximale observée avec ces agonistes dans une phase de mise au point. Après adjonction de l'un de ces agonistes dans chaque puits, le sang est incubé à 37°C pendant 24 heures. Après

centrifugation, la concentration de IL-8 and TNF-alpha est mesurée dans le surnageant par ELISA (USNK Life Science).

Sixième série d'expérimentations: impact du décubitus ventral sur un modèle de pneumonie sous ventilation mécanique protectrice et agressive

Les animaux sont intubés comme décrit précédemment (63). Pendant toute la durée de l'expérimentation ils reçoivent une sédation par perfusion continue à la seringue électrique de kétamine ($1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) et une curarisation par bromure de pancuronium ($0,3\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$). L'animal est positionné en décubitus dorsal et mis sous ventilation mécanique avec un respirateur en mode pression contrôlée. Pendant les 30 premières minutes le volume courant est réglé à 8 ml/kg avec zero end-expiratory pressure, la fréquence respiratoire à 30/minute et la fraction inspirée d'oxygène à 0,5. La pneumonie expérimentale à *Enterobacter aerogenes* est induite comme précédemment décrit (63, 80). En synthèse, un inoculum de $10 \log_{10}$ UFC d'une souche d' *Enterobacter aerogenes* est instillée dans la bronche souche gauche. D'après des données précédentes de notre équipe, avec un inoculum de cette taille on peut observer des signes histologiques de pneumonie déjà 3 heures après l'instillation.

Dans une première série d'animaux ([Figure 1e](#)), l'impact du décubitus ventral est évalué sur des animaux ventilés avec des paramètres de ventilation agressive. Une heure après l'instillation des bactéries, la pression de pic est réglée à 30 cm H₂O et les animaux sont randomisés dans le bras décubitus dorsal (n=4) ou dans le bras décubitus ventral (n=5). Les animaux sont ensuite ventilés pendant 8 heures avant d'être sacrifiés par injection d'une dose létale de thiopental sodique.

Dans une deuxième série d'animaux les réglages su respirateur ont été modifiés afin de les adapter a la pratique clinique et aux recommandations de ventilation mécanique « protectrice » (volume courant 5 ml/kg, PEEP 5 cmH₂O) ; comme dans la première série d'animaux, une heure après l'instillation des bactéries ils ont été randomisés dans le bras décubitus dorsal (n=5) ou dans le bras décubitus ventral (n=5).

Mesure de la compliance du système respiratoire

Des courbes pression inspiratoire/volume ont été réalisées *post-mortem* avec la méthode de la super-seringue (119). La compliance du système respiratoire a été calculée à partir de la pente de la portion linéaire de la courbe pression/volume.

Prélèvements de sang

Un cathéter artériel a été mis en place dans le groupe ventilation agressive afin de monitorer la pression artérielle sanglante pour évaluer le retentissement hémodynamique et pour effectuer des prélèvements répétés des gaz du sang artériels et du lactate artériel (à la randomisation et avant le sacrifice). Les variations de PaO₂, PaCO₂ entre H0 (au moment de la randomisation en DV ou en DD) et H8 (avant le sacrifice) ont été utilisées comme indicateur indirect du recrutement alvéolaire. Le taux de lactate artériel a été mesuré pour vérifier la sécurité de notre ventilation mécanique agressive. Il est à noter qu'aucun des animaux du groupe ventilation mécanique « protective » n'a été monitoré, car dans les travaux précédents de notre équipe la sécurité de ces réglages ainsi que l'absence d'hypoxémie et d'hyperlactatémie avaient été vérifiées sur ce modèle de pneumonie (63, 80).

Evaluation de la pneumonie unilatérale

Les animaux ont été exsanguinés par ponction veineuse. Des autopsies ont été réalisées avec un prélèvement dans des conditions aseptiques des poumons et de la rate.

Chaque lobe pulmonaire a été isolé et homogénéisé dans de l'eau stérile ; des cultures quantitatives ont été ensuite réalisées. La concentration bactérienne moyenne du poumon infecté a été calculée par rapport au poids de l'organe. Les rates ont été aussi prélevées dans des conditions stériles, homogénéisées et mises en cultures quantitatives comme décrit pour le poumon. Les cultures spléniques positives à *Enterobacter aerogenes* ont été considérées comme un marqueur de bactériémie.

Le tissu pulmonaire et splénique restant a été stocké à -80°C jusqu'au dosage des concentrations de cytokines ; IL-8 et TNF- α ont été dosées avec un kit ELISA spécifique pour

le lapin (Uscn Life Science Inc., Wuhan, Chine). Les limites de détection du test sont 15.6 pg/mL pour TNF-alpha et IL-8.

Dans la deuxième série d'animaux (ventilation mécanique « protectrice »), des échantillons de sang ont été prélevés avant l'instillation intra-trachéale des bactéries (H0), à H1 et à H8, pour vérifier l'inflammation systémique en fonction du décubitus dorsal ou ventral ; IL-8 et TNF- α ont été ainsi dosés en utilisant le kit commercial déjà cité plus haut dans le texte.

Evaluation du VILI et de l'inflammation dans le poumon non infecté

Pour les analyses histologiques approximativement 1 cm³ de tissu pulmonaire a été fixé dans du formol à 4% tamponné pendant au moins 72 heures avant inclusion en paraffine.

Un autre échantillon de tissu de pulmonaire est prélevé pour l'extraction de l'ARN avec la technique déjà décrite plus haut dans le texte.

Le tissu pulmonaire restant a été pesé pour 'évaluation du rapport poids humide/poids sec comme décrit plus haut dans le texte.

Analyses statistiques

Le logiciel GraphPad Prism a été utilisé pour les calculs statistiques (GraphPad Software, San Diego California, USA). Toutes les données sont exprimées comme moyenne \pm écart type. La distribution normale des séries de données a été vérifiée avec le test D'Agostino-Pearson normality omnibus K2, ou avec le test de Kolmogorov-Smirnov quand le n était trop petit. Les différences de valeurs entre les deux conditions principales à l'étude ont été évaluées par un t-test lorsque les données avaient une distribution normale et par un test U de Mann-Whitney lorsque les données n'avaient pas une distribution normale.

Les différences de valeurs parmi trois groupes ou plus à l'étude ont été analysées avec une analyse de la variance lorsque la distribution des données était normale. Si le test détectait une différence parmi les groupes, le ou les groupes qui différaient des autres étaient identifiés avec le test post-hoc de Bonferroni ; lorsque la distribution des données n'était pas normale, les médianes ont été comparées avec le test de Kruskal-Wallis. Si le test détectait une différence parmi les groupes, le ou les groupes qui différaient des autres étaient identifiés avec le test post-hoc de Dunn. Pour les données répétées dans le temps (par exemple les concentrations sériques de cytokines), les modifications dans chaque groupe ont été recherchées avec une analyse de la variance.

RESULTATS

Résultats de la première série d'expérimentations

L'étirement cyclique induit l'expression des TLR dans les cellules épithéliales pulmonaires.

Une augmentation de six fois du contenu des cellules épithéliales d'ARNm de TLR2 a été détectée par PCR quantitative dans les cellules A549 étirées par rapport aux cellules maintenues en conditions statiques ([Figure 2a](#)). L'ARNm de TLR4 était augmenté dans la même proportion dans les cellules étirées, mais les niveaux d'ARNm de MD-2 et CD-14 n'étaient pas modifiés.

L'étirement cyclique augmente les niveaux intracellulaires de TLR2 dans les cellules épithéliales pulmonaires.

Les cellules ont été prélevées après 24 heures d'étirement cyclique pour l'analyse FACS. Dans les cellules A549 en conditions statiques nous n'avons pas détecté de TLR2, ni avant ni après perméabilisation. Après 24 heures d'étirement cyclique le TLR2 devenait détectable dans les cellules épithéliales perméabilisées, et aussi en moindre mesure dans les cellules non perméabilisées ([Figure 2b](#), [Figure 2c](#)). TLR4 et MD-2 restaient indétectables dans les cellules intactes ou perméabilisées, indépendamment du stress mécanique. Et pour finir, l'étirement cyclique n'influçait pas l'expression de CD-14. Les cellules promonocytaires humaines THP1, qui expriment habituellement TLR2, TLR4, CD14 et MD-2, ont été utilisées comme contrôle positif pour les anticorps monoclonaux choisis pour les manipulations (données non présentées).

L'étirement cyclique augmente la réponse inflammatoire des cellules épithéliales pulmonaires au lipopeptide bactérien.

Les cellules A549 soumises à 24 heures d'étirement cyclique produisaient plus d'IL-6 et d'IL-8 en réponse à une stimulation secondaire de 8 heures avec le lipopeptide bactérien

synthétique Pam3CSK4 que les cellules non soumises à l'étirement cyclique ([Figure 3a](#)). Un effet synergique entre étirement cyclique et Pam3CSK4 a été observé aussi au niveau de la production d'ARNm d'IL-6 et IL-8 ([Figure 3b](#)).

L'up-regulation du TLR-2 induite par l'étirement cyclique dépend de la voie de signalisation MAPK p38.

Pour étudier la question de la voie de signalisation par le biais de laquelle l'étirement cyclique augmente les niveaux d'ARNm du TLR2, nous avons testé les effets de l'inhibiteur d'NF- κ B (Sn50, 18 μ M) et de l'inhibiteur spécifique de la MAPK p38 (SB203580, 1 μ M) sur l'expression de l'IL-8 induite par l'étirement cyclique.

L'expression de TLR2 dans les cellules A549 était réduite de façon importante par l'inhibiteur de la MAPK p38, alors que l'inhibiteur d'NF- κ B n'affectait pas la production d'IL-8 induite par l'étirement cyclique ([Figure 4](#)).

Nous avons vérifié que SB203580 n'altère pas la viabilité cellulaire avec un test au bromure de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) (données non présentées).

Résultats de la deuxième série d'expérimentations

La ventilation mécanique induit une augmentation notable des niveaux pulmonaires de l'ARNm du TLR2 chez le lapin sain.

La ventilation mécanique induit une augmentation plus importante des niveaux de l'ARNm de TLR2 par rapport à celle observée avec TLR4, MD-2, et CD14 ([Figure 5](#)).

L'examen anatomopathologique macroscopique des poumons de ces lapins sains ventilés n'a montré aucune anomalie ; par contre, l'analyse microscopique a mis en évidence des signes d'une lésion pulmonaire modérée, comportant un épaissement des septa et un infiltrat inflammatoire, associé à une légère augmentation des niveaux de l'ARNm de l'IL-8 ([Figure 6](#), [Figure 7](#)) ; ces anomalies étaient bien entendu absentes au niveau des contrôles en ventilation spontanée (SB).

Résultats de la troisième série d'expérimentations

Malgré la ventilation mécanique et l'agression constituée par l'instillation pulmonaire de Pam3CSK4, nous avons réussi à maintenir une stabilité hémodynamique ainsi qu'une bonne hématoxémie dans notre modèle animal ([Tableau 3](#)).

La ventilation mécanique augmente l'inflammation pulmonaire induite par le l'agoniste TLR-2

L'instillation endo-bronchique du lipopeptide bactérien Pam3CSK4 génère plus de lésions pulmonaires chez les lapins ventilés pendant 24 heures avant l'instillation que chez les lapins du groupe contrôle en ventilation spontanée ([Figure 6](#)). Les anomalies microscopiques comportent un infiltrat inflammatoire plus important et un épaississement des septa alvéolaires plus marqué.

Si l'instillation seule de Pam3CSK4 chez les lapins non ventilés n'a pas modifié l'expression de l'ARNm de l'IL-8, nous avons observé un effet synergique évident entre ventilation mécanique et lipopeptide bactérien sur l'expression génique pulmonaire de l'IL-8 ([Figure7](#)).

Résultats de la quatrième série d'expérimentations

La ventilation mécanique augmente l'expression pulmonaire ainsi que l'expression systémique du TLR2.

Les niveaux d'ARNm du TLR2 dans le parenchyme pulmonaire étaient supérieurs chez les animaux sous ventilation mécanique par rapport à leurs contrôles en ventilation spontanée ($p=0.015$), ainsi qu'après instillation intra-trachéale du lipopeptide bactérien de synthèse Pam₃CSK₄ ($p=0.038$) ; cette différence entre animaux ventilés et non ventilés était très évidente ($p=0.008$) 8 heures après instillation intra-trachéale de 10^9 UFC de *S. aureus*. ([Figure 8A](#)).

Nous avons testé l'hypothèse que ce stimulus pouvait induire une augmentation de l'expression du TLR2 au niveau systémique en mesurant les niveaux d'ARNm dans l'homogénat de rate et de foie ; au niveau de la rate la ventilation mécanique induit une augmentation significative de l'expression du TLR-2 ($p= 0.031$) ; cette augmentation de l'expression du TLR-2 chez les animaux ventilés est observée aussi après instillation intra-trachéale du lipopeptide bactérien de synthèse Pam₃CSK₄ ($p=ns$) ; par contre il n'y avait pas d'augmentation 8 heures après challenge bactérien. ([Figure 8B](#), [Figure 8C](#)).

Au niveau hépatique nous n'avons retrouvé qu'une augmentation minime et non significative de l'expression du TLR-2 sous ventilation mécanique.

La ventilation mécanique non protectrice induit de l'inflammation pulmonaire : le bio-trauma

Les niveaux de cytokines inflammatoires IL-8 et TNF- α étaient significativement augmentés dans l'homogénat pulmonaire des animaux sous ventilation mécanique par rapport aux contrôles non ventilés ($p\leq 0.01$), mais cette différence n'était pas significative ni après instillation du BLP, ni après challenge bactérien ([Figure 9A](#))

Par contre le dosage des mêmes cytokines dans le LBA retrouvait toujours une augmentation de l'IL-8 (mais pas du TNF- α) chez les animaux ventilés; le challenge bactérien par *S. aureus* augmentait les niveaux d'IL-8 dans le LBA 8 heures après l'instillation intra-trachéale dans le groupe en ventilation spontanée et encore plus dans le

groupe ventilé ($p \leq 0.05$). Cette différence n'était pas retrouvée 24 heures après l'instillation intra-trachéale. ([Figure 9B](#)).

Nous avons vérifié si ces modifications des niveaux de cytokines détectés par ELISA dans le parenchyme pulmonaire correspondaient bien à une hyperproduction locale avec une augmentation de l'expression génique de IL-8 et TNF- α . En ce qui concerne l'IL-8, l'expression génique était augmentée dans tous les groupes d'animaux sous ventilation mécanique, notamment après challenge bactérien, mais sans rejoindre la significativité. Par contre l'expression génique du TNF- α n'était augmentée par la ventilation mécanique que dans le groupe contrôle, l'instillation de BLP ou de *S. aureus* ne modifiait pas les niveaux d'ARNm à 8 heures. ([Figure 9C](#), [Figure 9D](#).)

La ventilation mécanique non protectrice induit des lésions pulmonaires

De façon concomitante à ces marqueurs biologiques d'une inflammation induite par la ventilation mécanique non protectrice, nous avons observé des lésions histologiques, avec un épaissement des septal inter-alvéolaires par un infiltrat cellulaire ainsi qu'un collapsus alvéolaire, prédominant dans les groupes sous ventilation mécanique ([Figure 10](#)). Afin de quantifier ces lésions histologiques nous avons utilisé un score ([Figure 11](#)) qui montre une augmentation significative des lésions histologiques sous ventilation mécanique par rapport aux contrôles non ventilés, encore plus évidente 8 heures après (mais non 24 heures après) instillation intra-trachéale de *S. aureus* ($p \leq 0.01$).

La ventilation mécanique non protectrice augmente inflammation systémique

Le dosage des taux sériques de cytokines pendant l'expérimentation a montré que la concentration de TNF- α augmente significativement chez les animaux sous ventilation mécanique non protectrice par rapport aux animaux en ventilation spontanée; l'instillation du Pam3CSK4 et de *S. aureus* ne modifie pas cette différence de réponse entre animaux en ventilation spontanée et animaux ventilés, mais de façon prévisible les taux circulants sont bien plus élevés (d'un facteur 10 environ) après instillation de *S. aureus*. Une réponse

similaire a été retrouvée avec l'IL-8, mais avec une augmentation plus tardive qui n'atteint pas la significativité 24 heures après l'instillation de *S. aureus* (Figure 12A).

Afin de vérifier si ces cytokines étaient produites par des cellules de l'inflammation au niveau pulmonaire ou à niveau systémique, nous avons dosé la concentration de cytokines (Figure 12B) ainsi que l'expression génique des mêmes cytokines (Figure 12C, Figure 12D) dans l'homogénat splénique. La concentration de TNF- α était significativement supérieure dans le groupe contrôle sous ventilation mécanique. La différence après l'instillation de Pam3CSK4 et de *S. aureus* était toujours présente, mais non statistiquement significative. A cause de difficultés techniques au niveau de l'extraction de l'ARN nous n'avons pas pu confirmer que l'origine du TNF- α était bien extra-pulmonaire.

La ventilation mécanique non protectrice réduit la clearance bactérienne pulmonaire

La clearance bactérienne pulmonaire, exprimée comme pourcentage de réduction du nombre d'UFC/gramme de tissu pulmonaire dans le temps après inoculation, était significativement réduite dans le groupe en ventilation spontanée (3.33 ± 0.34 vs 4.74 ± 0.68 delta Log UFC/g ; $p=0.038$) (Figure 13A). La charge bactérienne pulmonaire totale (Figure 13B) était significativement supérieure dans le groupe sous ventilation mécanique à la fois à la 8^{ème} heure (5.00 ± 1.02 vs. 5.87 ± 0.38 UFC/g, $p=0.028$) et à la 24^{ème} heure de ventilation mécanique (5.23 ± 1.38 vs. 6.13 ± 0.62 UFC/g, $p=0.034$).

La dissémination hémotogène à partir de l'instillation pulmonaire, évaluée par le biais du nombre d'UFC par gramme de tissu splénique (Figure 13C), était totalement absente à la huitième heure dans le groupe en ventilation spontanée et présente chez les animaux du groupe sous ventilation mécanique, par contre cette différence disparaissait à la 24^{ème} heure (1.48 ± 0.66 vs. 1.47 ± 0.82 UFC/g, $p=0.44$).

Résultats de la cinquième série d'expérimentations

Dosage de l'inflammation dans le sang total de lapin SB ou MV stimulé *ex vivo* par un agoniste TLR2

Nous avons évalué la production de cytokines inflammatoires par le sang entier de lapins, exposés ou pas au préalable à 24 heures de ventilation mécanique « non protectrice », stimulé *ex vivo* avec le lipopeptide bactérien de synthèse Pam3CSK4 (+BLP) agoniste TLR-2. Les niveaux d'IL-8 sont supérieurs comme attendu dans le groupe pré-exposé à la ventilation mécanique ($p= 0.048$) même en l'absence de l'agoniste TLR-2, mais après la stimulation avec le Pam3CSK4 nous avons observé une néo-production d'IL-8 par le sang nettement plus importante dans le groupe pré-exposé à la ventilation mécanique « non protectrice » ($p= 0.016$) ([Figure 14A](#)). Nous avons évalué aussi la production de TNF- α dans les mêmes conditions expérimentales ([Figure 14B](#)), mais nous n'avons pas retrouvé de différence significative (respectivement $p= 0.175$ et $p= 0.095$).

Résultats de la sixième série d'expérimentations

Compliance

La compliance statique du système respiratoire a été mesurée *post mortem* dans tous les lapins avec pneumonie ([tableau 4](#)). La compliance était supérieure chez les animaux exposés à une ventilation mécanique protectrice par rapport à ceux exposés à une ventilation agressive. Dans le groupe ventilation protectrice il n'y avait pas de différence entre DV et DD, par contre dans le groupe ventilation non protectrice/agressive le DV augmentait la compliance (2.8 [\pm 1.4] vs. 5.2 [\pm 1.1]ml/cm H₂O; P= 0.001).

Echanges gazeux et hémodynamique

Nous avons également observé des différences dans l'hématose dans le groupe ventilation « agressive », dans lequel nous avons prélevé des gaz du sang artériels. Dans le groupe en DV il y avait une augmentation de 235 (\pm 244) mmHg du rapport PaO₂/FIO₂ entre H0 et H8, alors que dans le groupe DD il y avait une réduction de 69 (\pm 77) mmHg (p = 0.04). Aucune différence n'a été observée dans la pression artérielle moyenne et la fréquence cardiaque mesurées avant le sacrifice. Par contre le taux de lactate a augmenté pendant l'expérimentation dans le groupe en DD alors qu'il est resté dans les valeurs normales dans le groupe DV (Δ [lactate]= 2.1 [\pm 3.1] vs. -0.4 [\pm 0.7] mmol/l; P = 0.034) ([tableaux 4](#)).

Evaluation de la pneumonie unilatérale

Tous les animaux sauf un du groupe DD ont survécu jusqu'au sacrifice.

Les cultures quantitatives pulmonaires ([Figure 15](#)) ont mis en évidence une charge bactérienne plus importante dans le groupe ventilation agressive que dans le groupe ventilation protectrice, quelle que soit la position. A l'intérieur de chaque groupe, nous avons observé une réduction de la charge bactérienne en DV par rapport au DD (respectivement 8.38 [\pm 0.91] vs. 9.81 [\pm 0.52] log₁₀ UFC/g de tissu; P = 0.002 dans le groupe ventilation agressive et 5.93 [\pm 0.34] vs. 6.66 [\pm 0.86] log₁₀ UFC/g de tissu; P = 0.008 dans le groupe ventilation protectrice).

En ce qui concerne la réponse inflammatoire pulmonaire, le DV était associé à la production de moins d'IL-8 par rapport au DD, indépendamment de la stratégie de ventilation ([Figure 16](#)). Par contre, même si dans le groupe ventilation « protectrice » il y avait une réduction statistiquement significative des concentrations pulmonaires de TNF- α indépendamment de la position (2155 [\pm 830] vs. 3955 [\pm 1412] pg/g de tissu; P = 0.014), le DV n'était pas associé à une ultérieure réduction du taux de TNF- α .

Nous avons évalué aussi l'impact extra-pulmonaire de la pneumonie. Comme dans le poumon, les cultures spléniques ont montré une réduction de la charge bactérienne en DV dans le groupe ventilation mécanique « agressive » (3.62 [\pm 1.74] vs. 6.55 [\pm 3.67] log₁₀ UFC/g ; P = 0.038). Par contre, la translocation pulmonaire-systémique de l'*E. aerogenes* n'était pas modifiée par le DV dans le groupe ventilation « protectrice » (2.93 [\pm 1.59] vs. 3.24 [\pm 1.51] log₁₀ UF/g; P = 0.684).

La réponse inflammatoire systémique a été évaluée par la mesure de deux des médiateurs clé dans le compartiment sanguin et dans la rate ([Figure 16](#)). Même si les concentrations de TNF- α dans la rate étaient similaires dans les deux groupes indépendamment de la stratégie ventilatoire, nous avons observé une réduction du taux d'IL-8 en DV dans le groupe ventilation « agressive » (1910 [\pm 784] vs. 3005 [\pm 1290] pg/g de tissu; P = 0.038). Dans le groupe ventilation « protectrice » nous avons observé aussi une réduction de la concentration d'IL-8 en DV, mais non statistiquement significative (1561 [\pm 274] vs. 1930 [\pm 1022] pg/g de tissu; P = 0.124).

De façon similaire, les concentrations plasmatiques d'IL-8 augmentaient plus lentement en DV par rapport au DD dans le groupe ventilation « protectrice » ([Figure 17](#)).

Evaluation du VILI et de l'inflammation du poumon non infecté

L'analyse histologique a mis en évidence des lésions pulmonaires dans le poumon non infecté dépendantes à la fois de la stratégie de ventilation et de la position du corps ([Figure 18](#)). Comme attendu, la ventilation « protectrice » était associée à moins de lésions pulmonaires. Le score histologique était supérieur en DD par rapport au DV, indépendamment de la stratégie de ventilation ([tableau 5](#)).

Comme attendu, nous avons observé une perte d'aération des lobes inférieurs chez les animaux en DD, avec un élargissement des espaces aériens au niveau des lobes supérieurs, notamment dans le groupe ventilation « agressive ». Par contre, l'aération des lobes supérieurs et inférieurs était similaire chez les animaux en DV. De plus, des aspects de membranes hyalines et lésions de type emphysémateux ont été observés presque exclusivement chez les animaux en DD.

En ce qui concerne l'œdème pulmonaire, nous n'avons pas retrouvé de différences dans le rapport poids humide/poids sec en fonction de la position du corps dans le groupe ventilation « agressive » ; ces résultats suggèrent que la formation d'œdème lésionnel dans les deux groupes était similaire, bien plus importante par rapport au contrôles sains. Par contre, le rapport poids humide/poids sec était réduit de façon statistiquement significative en DV dans le groupe ventilation « protectrice ».

L'évaluation de l'inflammation pulmonaire dans le poumon non infecté s'est basée sur l'expression du gène de l'IL-8. Nous avons observé une forte induction du gène de l'IL-8 en DD par rapport au DV indépendamment de la stratégie de ventilation ([Figure 19](#)).

TABLEAUX

GAPDH Sens	5'ATG TTT GTG ATG GGC GTG AAC C3'
GAPDH Anti sens	5'CCC AGC ATC GAA GGT AGA GGA3'
TNF α Sens	5'CAA GCC TCT AGC CCA CGT A3'
TNF α Anti sens	5'GGC AAT GAT CCC AAA GTA G3'
IL-8 Sens	5'AAC CTT CCT GTC TCT GA3'
IL-8 Anti sens	5'TCT GCA CCC ACT TTT TCC TTG3'
TLR2 Sens	5'TGT CTG TCA CCG AAC CGA ATC CAC3'
TLR2 Anti sens	5'TCA GGT TTT TCA GCG TCA GCA GGG3'
Md-2 Sens	5' -GGG AAC CCA AGG TTT ATT GC-3'
Md-2 Anti Sens	5' -CGT ATG CCC TTG AAG GAA AA-3'
CD14 Sens	5' -TCT CTG TCC CCA CAA GTT CC-3'
CD14 Anti Sens	5' -CAC CTG CTG CAG TCC AGT AA-3'
TLR4 Sens	5'GAG CAC CTG GAC CTT TCA AAT AAC3'
TLR4 Anti sens	5'GAA CTT CTA AAC CAC TCA GCC CTT G3'

Tableau 1.
Séquences des amorces utilisées

Score	Niveau
0	Atteinte histologique légère
1	Atteinte histologique moyenne
2	Atteinte histologique modérée
3	Atteinte histologique sévère

Tableau 2.

Score histologique. Tableau récapitulatif des correspondances entre score numérique et niveaux d'atteinte histologique pulmonaire.

Experimental time	MAP (mmHg)	HR (/minute)	pH	PaO ₂ (mmHg)	PaCO ₂ (mmHg)
T1	89 (12.7)	202 (30.4)	7.40 (0.07)	213 (44)	22 (14)
T2	87 (13.1)	276 (29.7)	7.43 (0.10)	210 (42)	21 (10)

Tableau 3.

Paramètres physiologiques observés chez les lapins après 24 heures de VM modérément agressive (T1) et 8 heures après l'instillation intra-trachéale du lipopeptide bactérien (T2). HR, heart rate; MAP, mean arterial pressure.

	C_{RS} , ml/cm H ₂ O	$\Delta P_{aO_2}/F_{iO_2}$, mmHg	ΔP_{aCO_2} , mmHg	MAP, mmHg	Heart Rate, beat/min	Δ (Lactate), mmol/l
Adverse MV						
SP (n = 3)	2.8 (1.4)	-69 (77)	-11 (4)	79.0 (12.7)	276 (30)	2.1 (3.1)
PP (n = 4)	5.2 (1.1)*	235 (244)*	-11 (2)	75.3 (4.7)	262 (24)	-0.4 (0.7)*
Protective MV						
SP (n = 5)	13.5 (0.9)					
PP (n = 5)	11.4 (3.8)					

Tableau 4.

Paramètres physiologiques enregistrés dans le modèle de pneumonie unilatérale à *Enterobacter aerogenes* exposés à une ventilation mécanique agressive en DD ou DV.

Les résultats sont présentés comme médiane \pm IQR. Les valeurs exprimées comme delta correspondent à la variation entre H0 (randomisation dans le groupe SP ou PP) et H8 (sacrifice). * P < 0.05 entre SP et PP.

CRS = respiratory system compliance; FIO₂ = inspired fraction of oxygen; IQR = interquartile range; MAP = mean arterial pressure; MV = mechanical ventilation; PP = prone position; SP = supine position.

	Histologic Score	Hyaline Membranes	Emphysema-like Lesions	WW/DW
Control (n = 4)	—	—	—	1.7 (0.4)*
Adverse MV				
SP (n = 4)	4.0 (3.5)	3/4	2/4	5.3 (1.4)
PP (n = 5)	1.5 (2.7)	0/5	1/5	5.2 (1.4)
Protective MV				
SP (n = 5)	2.2 (1.0)	4/5	3/5	3.8 (1.3)
PP (n = 5)	1.1 (0.45)	1/5	0/5	2.7 (0.8)†

Tableau 5.

Evaluation du VILI des poumons non infectés des lapins avec pneumonie unilatérale à *Enterobacter aerogenes* exposés à une ventilation mécanique “protectrice” ou “agressive” en décubitus dorsal ou ventral.

Les résultats sont présentés comme médiane ± IQR. Des animaux sains en ventilation spontanée ont été utilisés comme contrôles.

* P < 0.05 entre Control et PP ou SP. † P < 0.05 entre SP et PP.

DW = dry weight; IQR = interquartile range; MV = mechanical ventilation; PP = prone position; SP = supine position; WW = wet weight

Tableau 6
Modulation du TLR-2.

Molécule	Origine	Modèle expérimental	Réf. bibliographique
MAb anti-TLR2 OPN-301	Opsona Therapeutics Ltd	souris – 10mg/kg IV 5 min avant reperfusion	Arslan F, <i>Circulation</i> 2010
MAB anti-TLR2	R&D System	souris – 2µg IV 1 jour avant injection de bleomycine	Yang HZ, <i>J Immunol</i> 2009
MAB anti-TLR2 T2.5	produit par les auteurs	souris – 1 mg IP 1 h avant PAM3CSK4	Meng G, <i>JCI</i> 2004
PAb anti goat anti-rat TLR2	Santa Cruz Biotechnology sc16237	souris - IP – 0,84µg/g 3 h avant indomethacine	Silva MA, <i>Inflamm Bowel Dis</i> 2008
Human recombinant sTLR2	produit par les auteurs	souris -100ng IP au meme temps que l'injection du surnageant d'une culture de <i>S. epidermidis</i>	Raby AC, <i>J Immunol</i> 2009
AntiSenseOligoNucleotide	-	souris - 4 nmol/j IP pendant 4 jours	Caricilli AM, <i>J Endocrinol</i> 2008
Glucan phosphate	-	souris - 50mg/kg IP 1 h avant CPL	Williams DL, <i>Crit Care Med</i> 2003
Aptamer oligonucleotide AP 177	-	-	Chang YC, <i>FASEB J</i> 2009

FIGURES

Figure 1. Design expérimental.

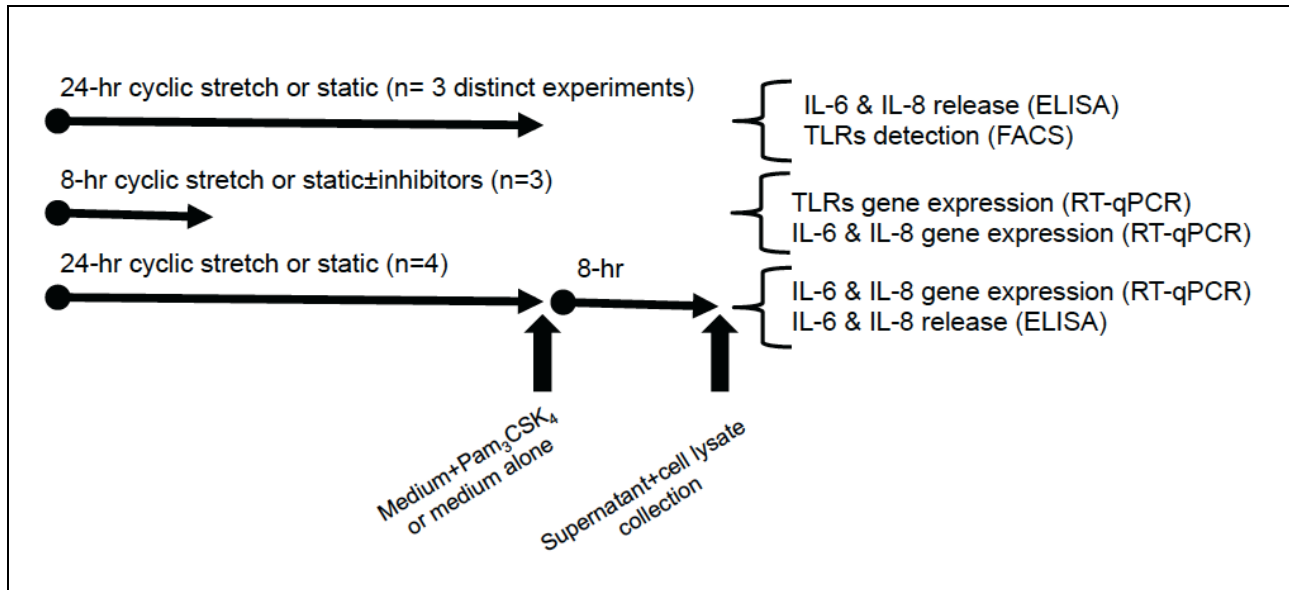


Figure 1a. Design expérimental des manipulations *in vitro*.

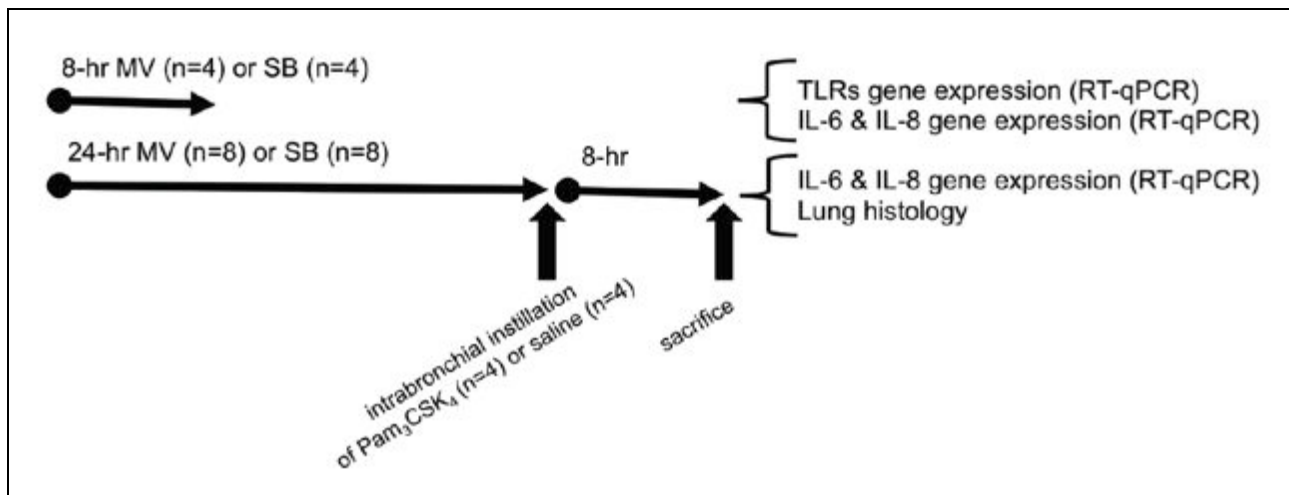


Figure 1b. Design expérimental de la 2ème série d'expérimentations.

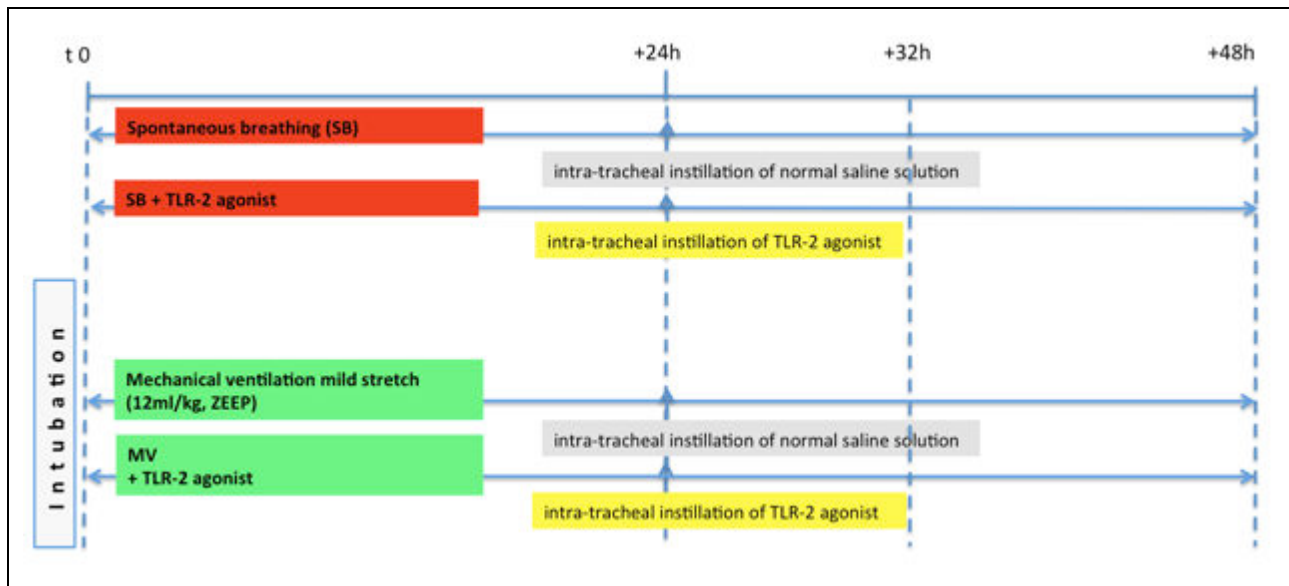


Figure 1c. Design expérimental de la 3ème série d'expérimentations.

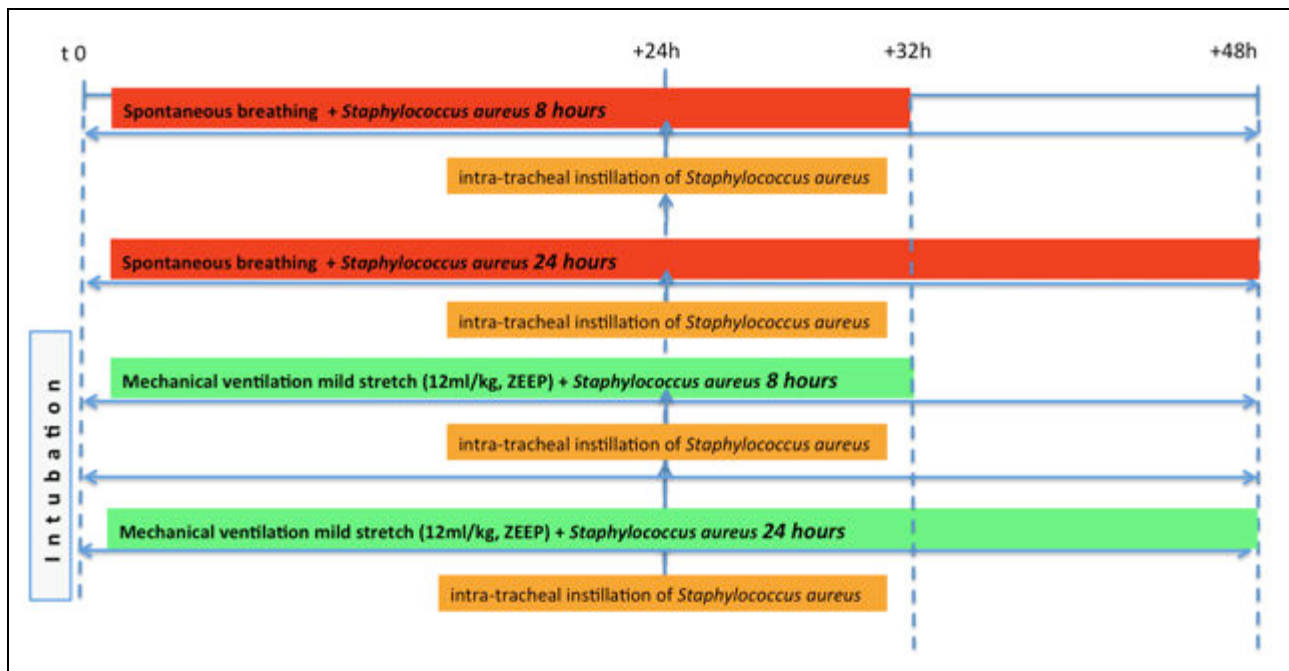


Figure 1d. Design expérimental de la 4ème série d'expérimentations.

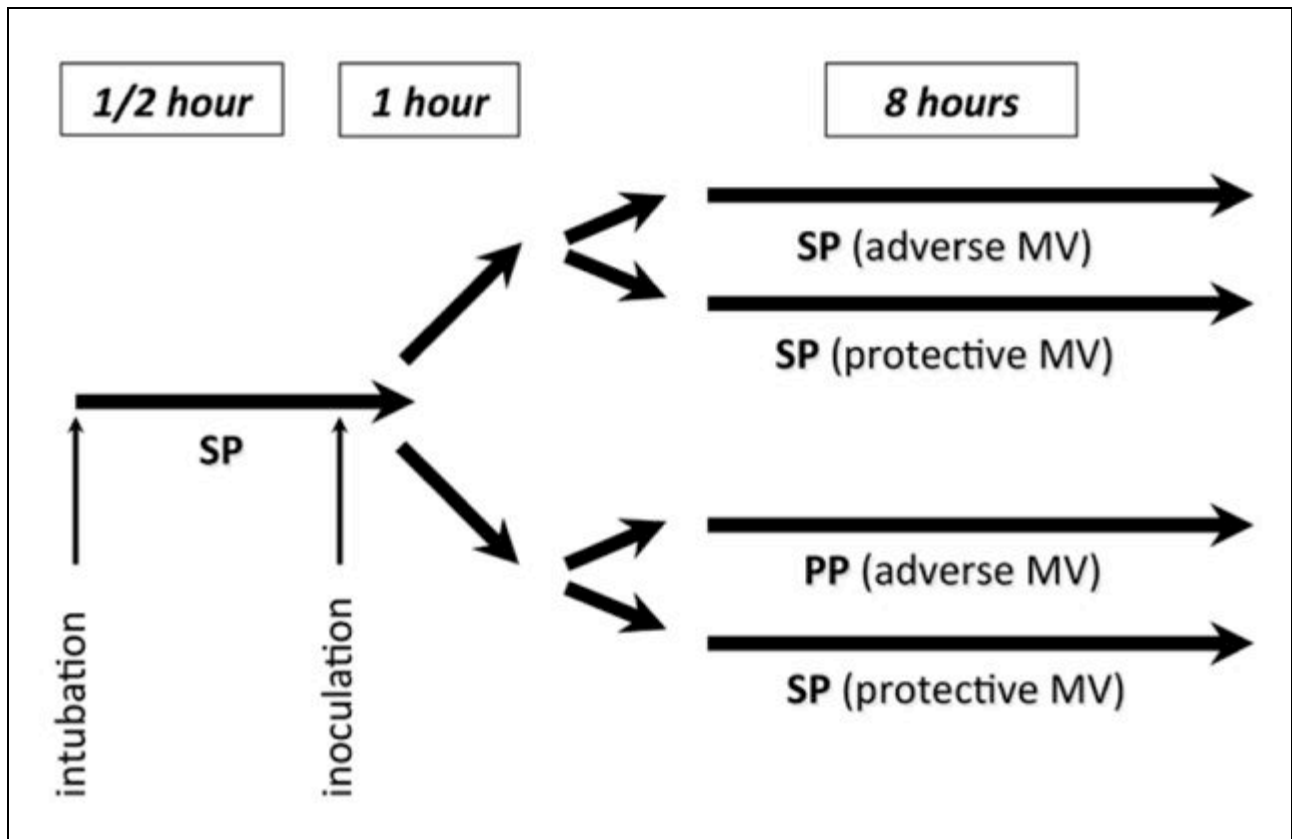


Figure 1e. Design expérimental de la 6ème série d'expérimentations.

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

Figure 2. Expression des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires dans des cellules exposées à un étirement cyclique ou maintenues en condition statique.

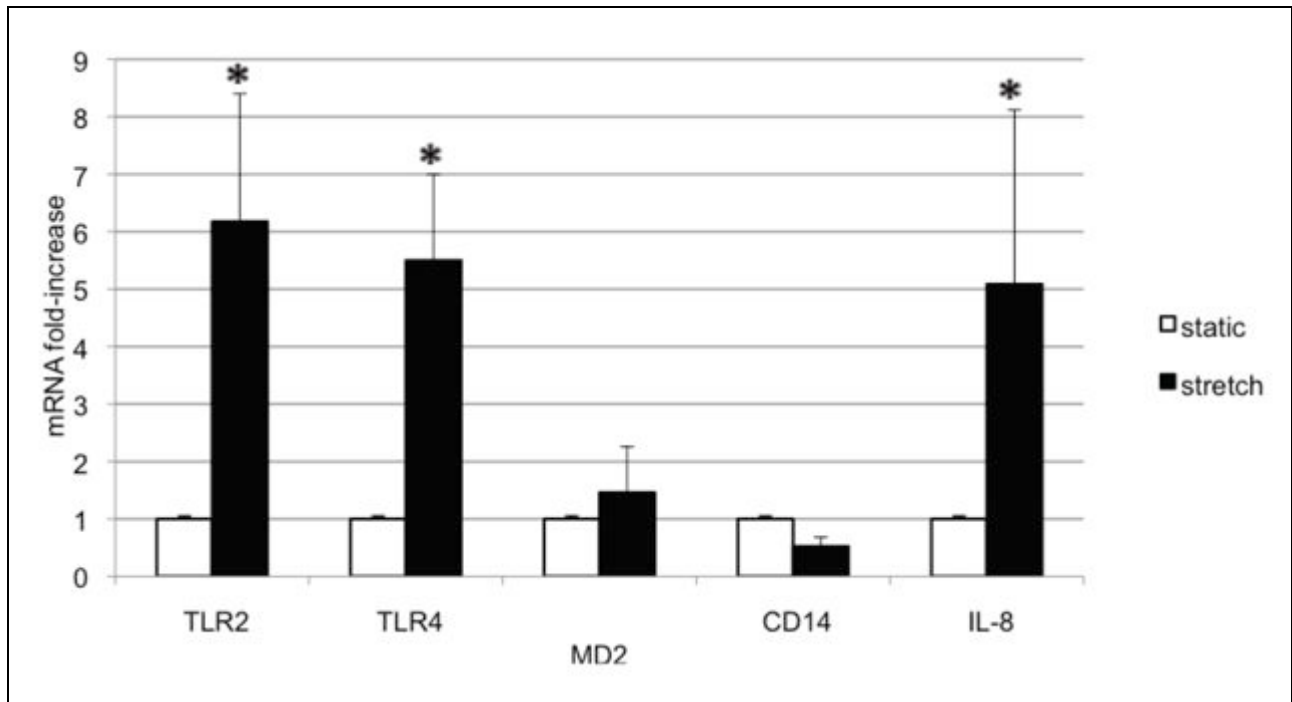


Figure 2a.

Expression des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires dans des cellules exposées à un étirement cyclique ou maintenues en condition statique.

ARNm dans des cellules A549 étirées pendant 8 heures ou maintenues en condition statique. Toutes les valeurs sont exprimées comme fold-induction (valeurs relatives par rapport à la valeur des cellules statiques de contrôle qui est normalisée à 1).

Les valeurs de l'ARNm de l'IL8 induits par l'étirement servent comme contrôle positif. Les niveaux de l'expression génique de TLR2 et TLR4 était augmentés de façon statistiquement significative par l'étirement cyclique. Les niveaux d'ARNm de MD-2 et CD14 n'étaient pas modifiés significativement par l'étirement. Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm écart type.

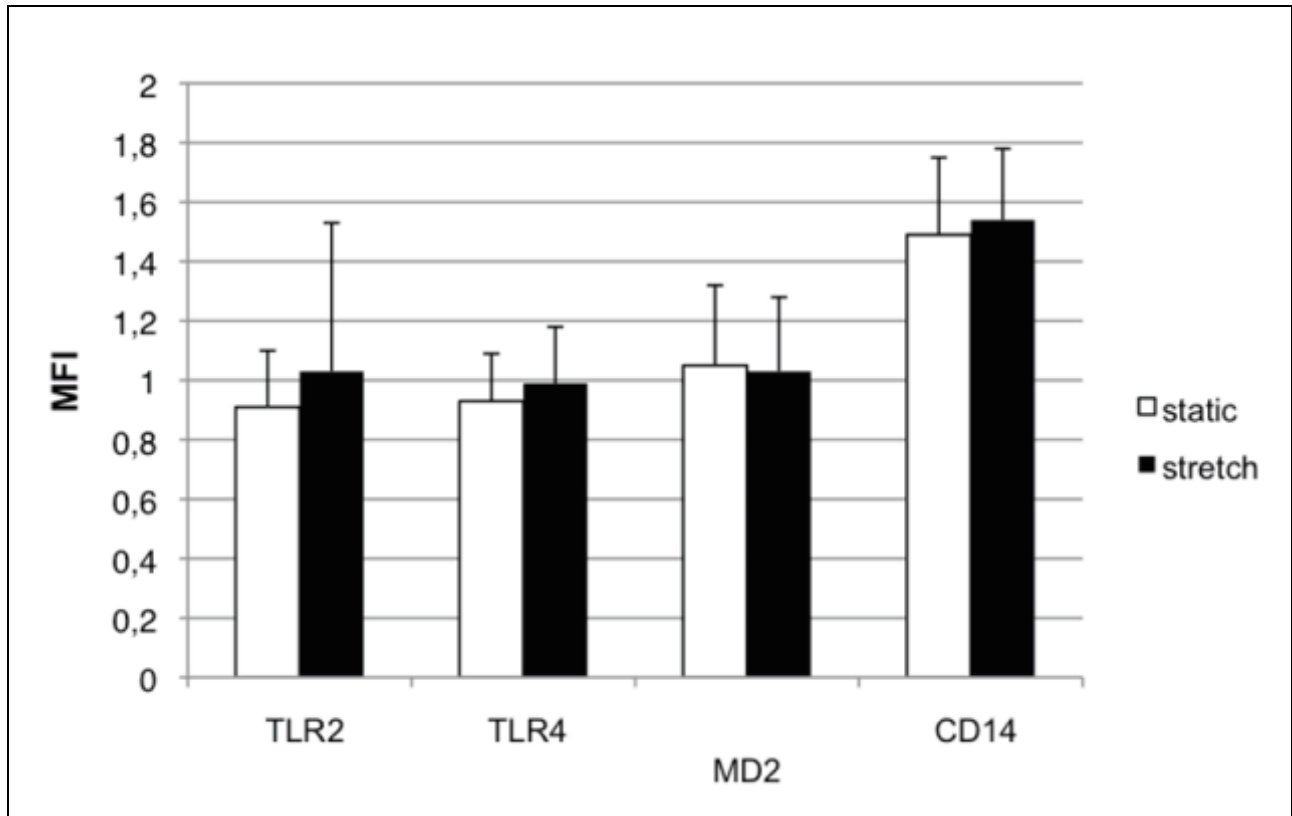


Figure 2b.

Expression des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires dans des cellules exposées à un étirement cyclique ou maintenues en condition statique.

Expression de TLR2, TLR4, MD-2 et CD14 mesurée par FACS à la surface cellulaire de cellules A549 exposées à 24 heures d'étirement cyclique ou maintenues en condition statique. A l'exception du CD14, aucun de ces récepteurs n'était exprimé à la surface cellulaire.

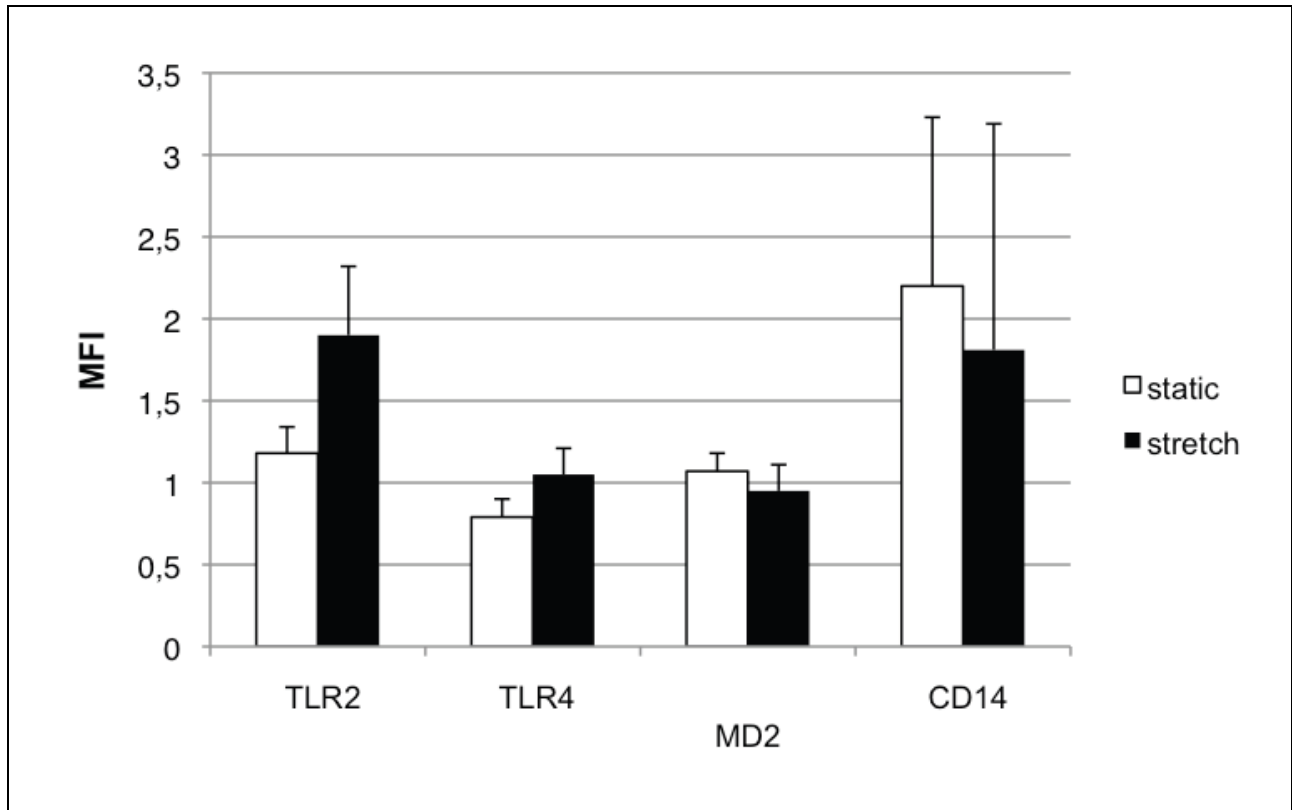


Figure 2c.

Expression des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires dans des cellules exposées à un étirement cyclique ou maintenues en condition statique.

Expression intracellulaire de TLR2, TLR4, MD-2 and CD14 mesurée par FACS dans des cellules A549 perméabilisées exposées à 24 heures d'étirement cyclique ou maintenues en condition statique. TLR2 a été détecté après 24 heures d'étirement cyclique. CD14 a été détecté mais il n'était pas augmenté par l'étirement cyclique. Ni le TLR4 ni la protéine MD-2 ont été détectés par le FACS dans les cellules perméabilisées, indépendamment des conditions expérimentales.

Les résultats sont exprimés comme index de fluorescence moyen (MFI) ± écart type.

*P < 0.05 entre cellules statiques et cellules étirées

Figure 3. Production des médiateurs de l'inflammation par les cellules A549 stimulées avec Pam3CSK4 en conditions statiques et d'étirement cyclique

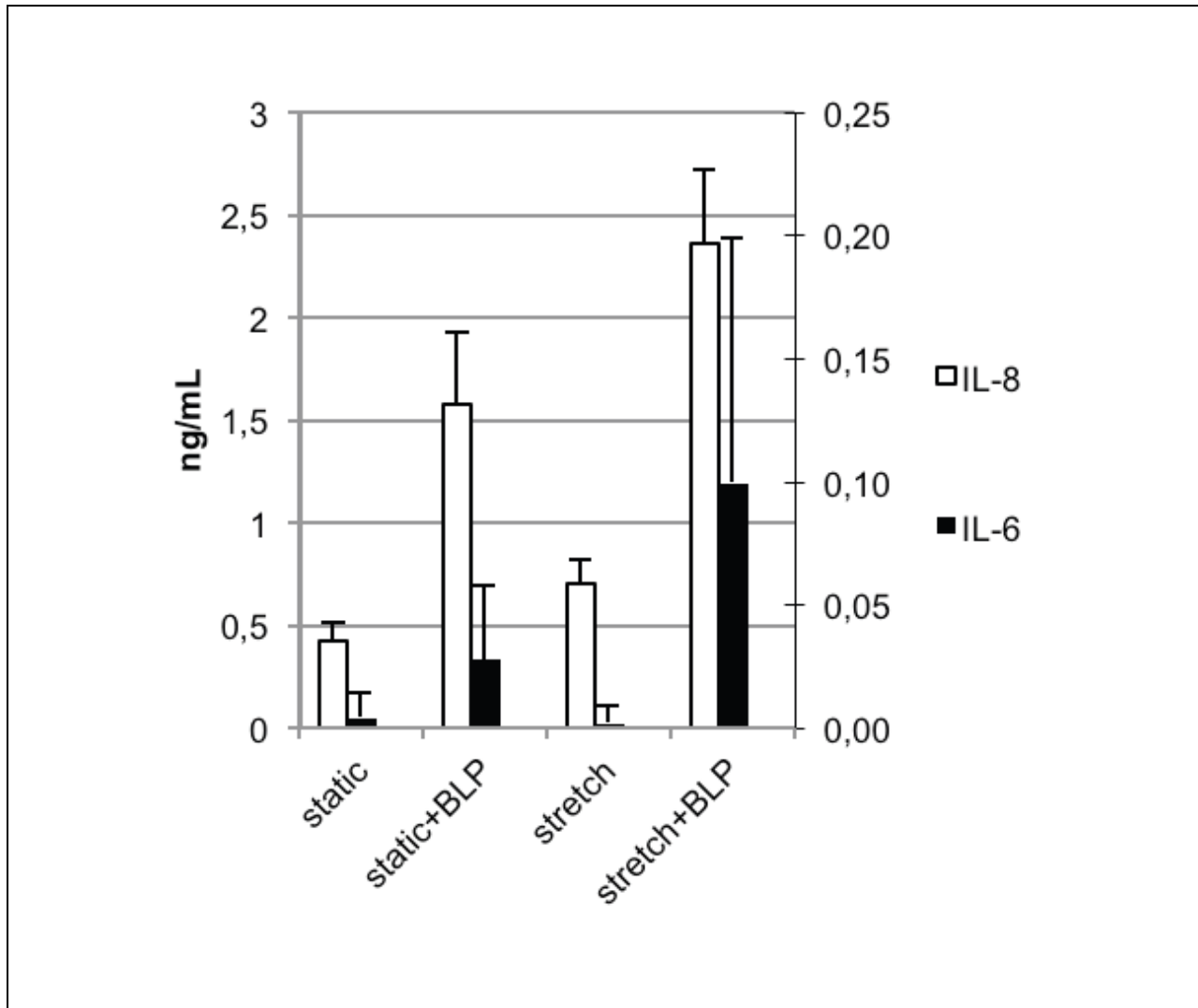


Figure 3a.

Concentrations d'IL-6 et IL-8 dans le surnageant de cellules exposées à 24 heures d'étirement cyclique ou maintenues en condition statique, puis stimulées pendant 8 heures avec un lipopeptide bactérien de synthèse (BLP). L'étirement cyclique augmente la réponse inflammatoire des cellules A549 stimulées par le BLP.

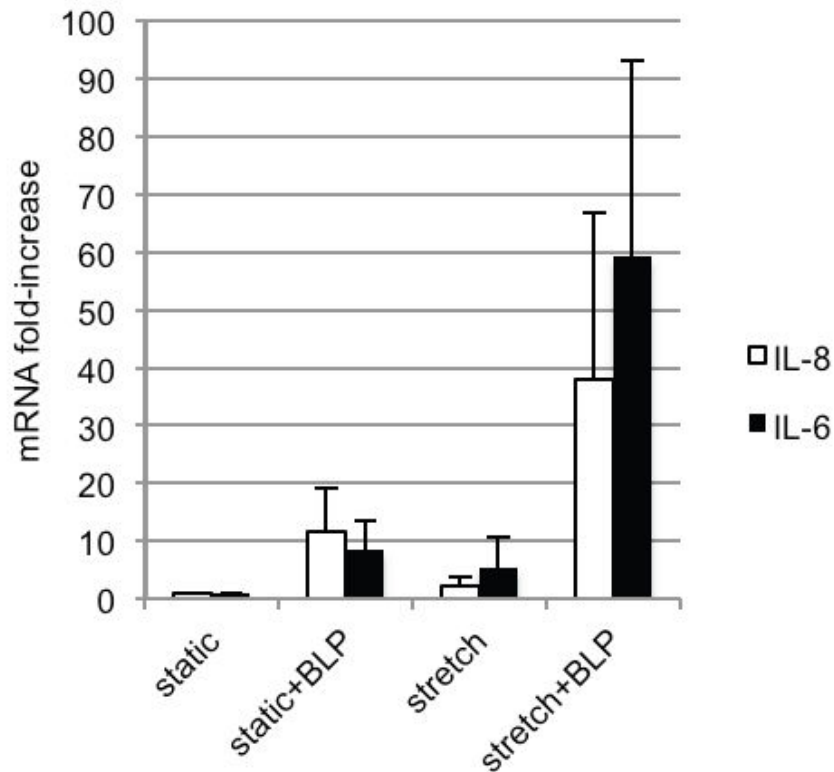
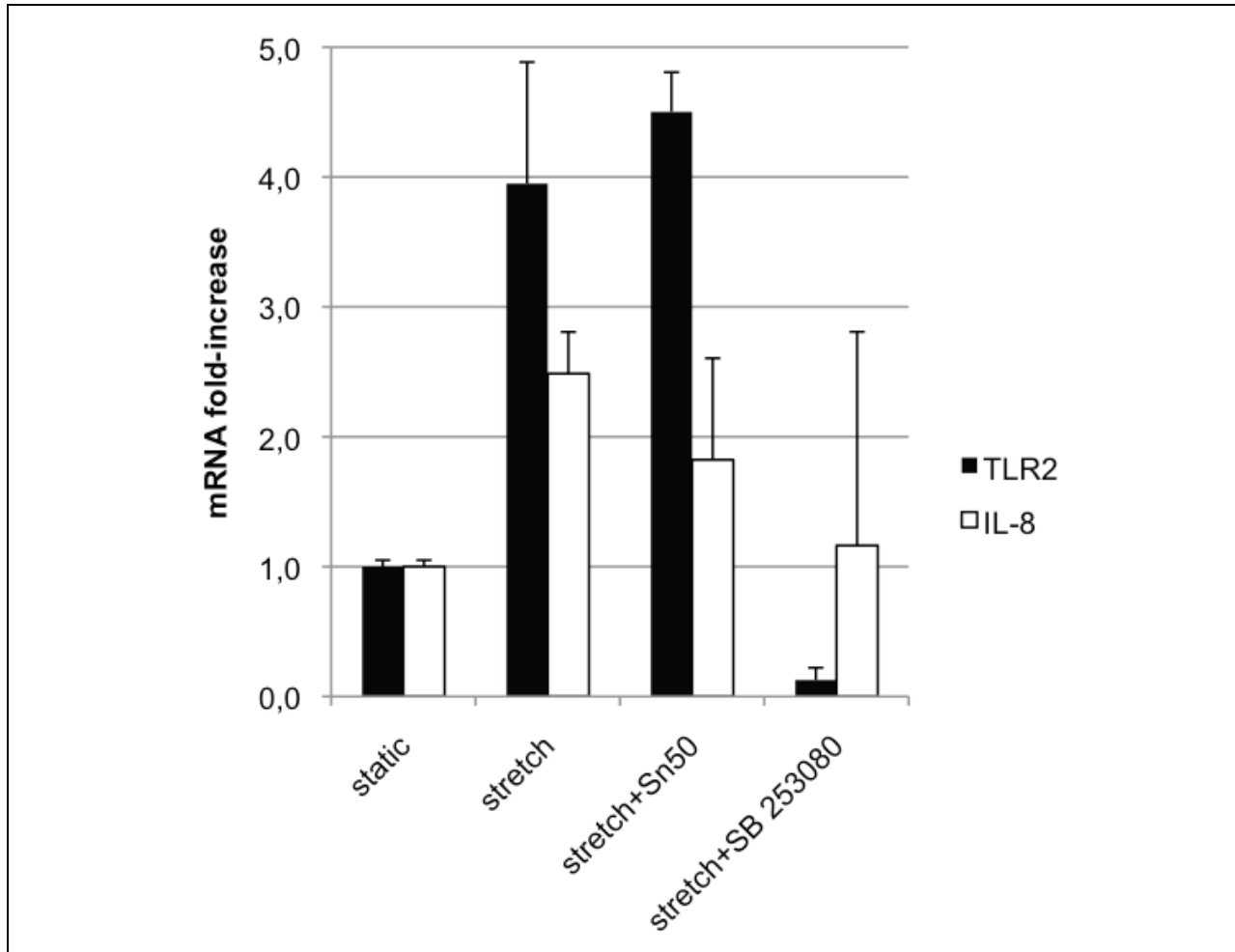


Figure 3b.

Niveaux de l'ARNm de l'IL-6 et de l'IL-8 dans des cellules A549 exposées à 24 heures d'étirement cyclique ou maintenues en condition statique, puis stimulées pendant 8 heures avec un lipopeptide bactérien de synthèse (BLP). Les niveaux d'ARNm ont été normalisés avec l'expression de l'ARNm du GAPDH. Toutes les valeurs sont exprimées comme fold-induction (valeurs relatives par rapport à la valeur des cellules statiques de contrôle qui est normalisée à 1). Nous avons observé un effet synergique entre étirement cyclique et BLP pour les deux cytokines. Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm écart type.

*P < 0.05 entre cellules statiques et cellules étirées stimulées par le BLP.

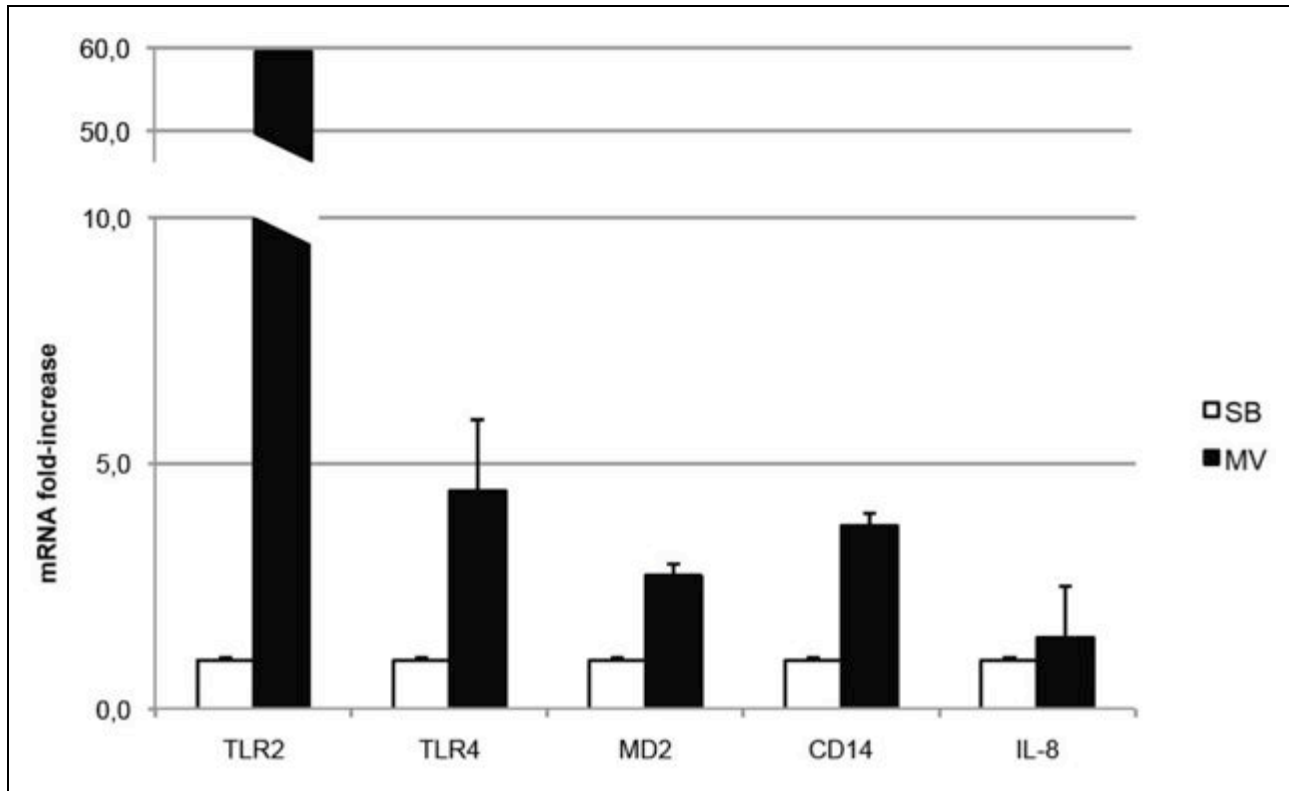
Figure 4. Expression du Toll-like receptor 2 dans des cellules A549 étirées en présence de différents inhibiteurs.



Les niveaux de l'ARNm de l'IL-8 ont été mesurés comme contrôle positif de l'activation des cellules par l'étirement cyclique. Les niveaux d'ARNm ont été normalisés avec l'expression de l'ARNm du GAPDH. Toutes les valeurs sont exprimées comme fold-induction (valeurs relatives par rapport à la valeur des cellules statiques de contrôle qui est normalisée à 1). L'inhibiteur SB203580 a réduit de façon significative les niveaux d'ARNm du TLR-2 induits par l'étirement, alors que l'inhibiteur Sn50 n'a eu aucun effet. Les deux inhibiteurs ont influencé de manière opposée l'expression de l'IL-8. Induite par l'étirement cyclique. Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm écart type.

*P < 0.05 entre les cellules étirées avec ou sans le SB 203580.

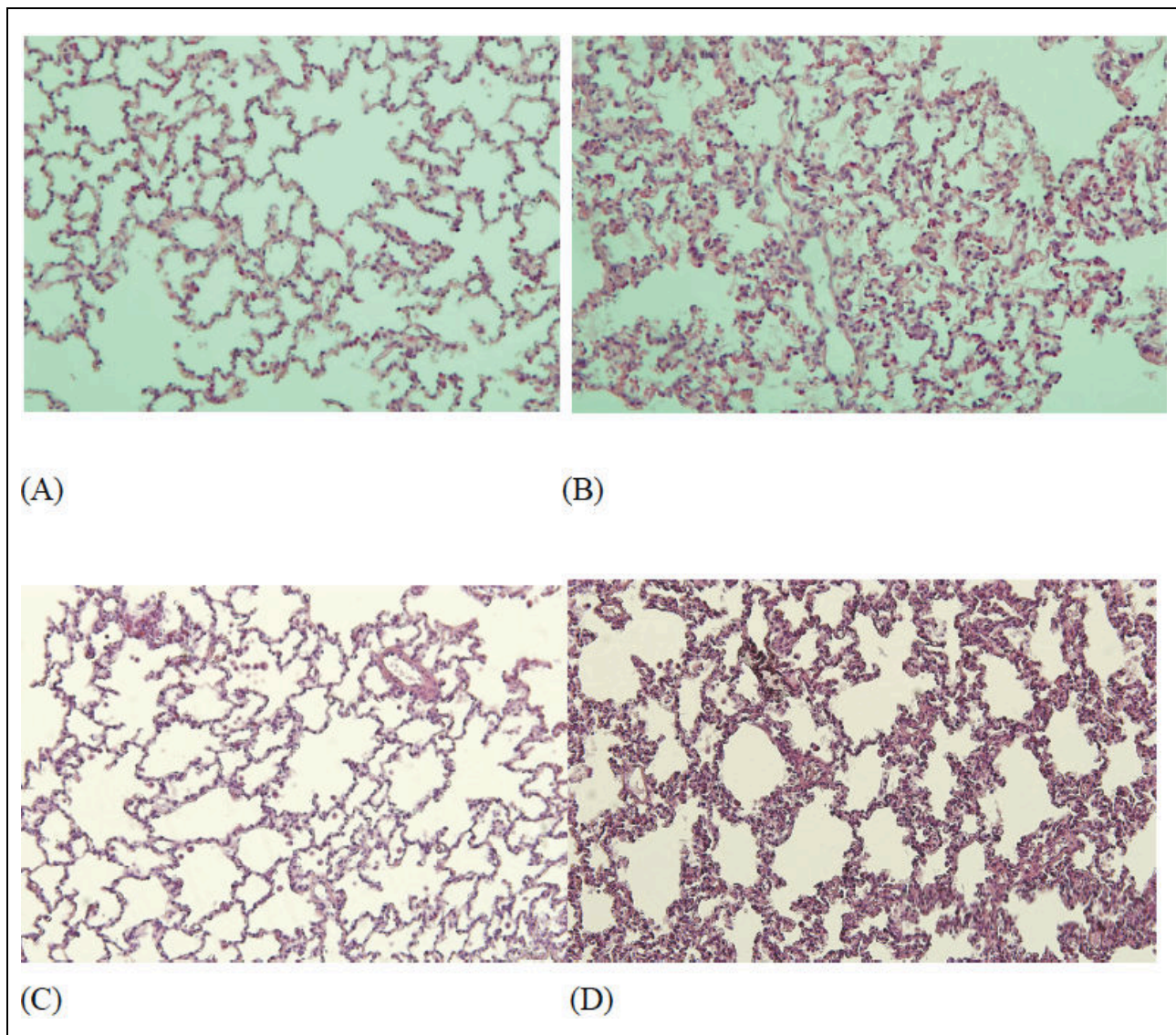
Figure 5. Expression des « Pathogen Recognition Receptors » dans un modèle de lapin exposé à une ventilation mécanique modérément agressive ou maintenu en ventilation spontanée.



La ventilation mécanique induit une forte augmentation des niveaux de l'ARNm du TLR-2, supérieure à celle du TLR-4, MD-2 et CD14.

Les niveaux pulmonaires d'ARNm de l'IL-8 ont été mesurés comme contrôle positif de l'inflammation pulmonaire induite par la ventilation mécanique. Les niveaux d'ARNm ont été normalisés avec l'expression de l'ARNm du GAPDH. Toutes les valeurs sont exprimées comme fold-induction (valeurs relatives par rapport à la valeur des animaux en ventilation spontanée qui est normalisée à 1). Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm écart type. SB=spontaneously breathing; MV = mechanically ventilated: *P < 0.05 entre les lapins SB et MV.

Figure 6. Coupes histologiques des poumons de lapin dans différentes conditions.



Coupes histologiques représentatives des poumons des lapins dans différentes conditions, fixées à la même pression transpulmonaire. Coloration : hématoxyline - éosine. Grossissement original : x10.

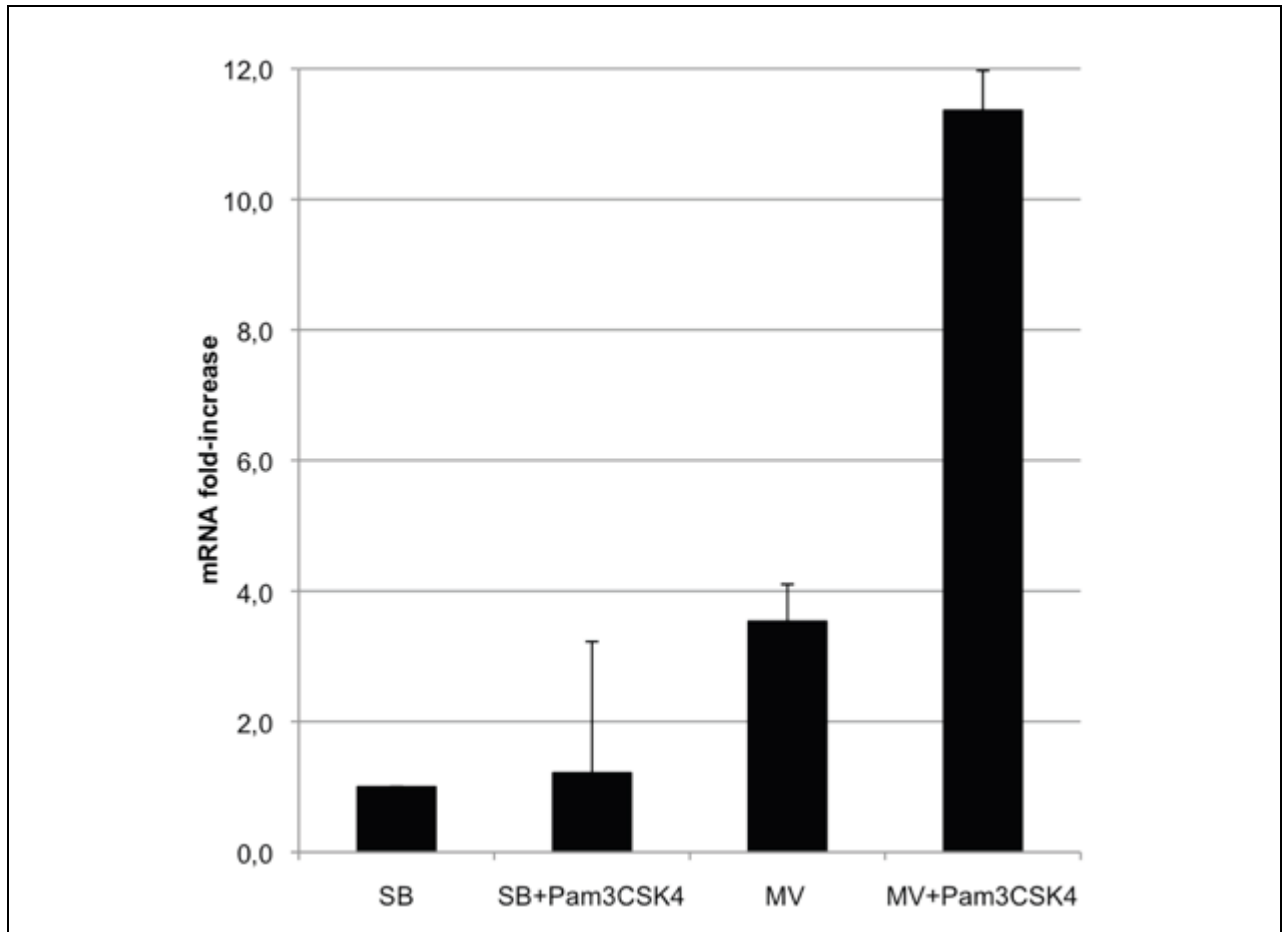
(A) Poumons des animaux en ventilation spontanée.

(B) Poumons de lapins exposés à 32 heures de ventilation mécanique modérément agressive

(C) Poumons des animaux en ventilation spontanée 8 heures après l'instillation intra-trachéale du lipopeptide bactérien de synthèse Pam3CSK4

(D) Poumons des animaux exposés à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive avant l'instillation intra-trachéale du lipopeptide bactérien de synthèse Pam3CSK4 et sacrifiés 8 heures après.

Figure 7. Expression pulmonaire de l'IL-8 après instillation intra-trachéale de l'agoniste TLR-2 Pam3CSK4 chez des lapins exposés ou pas préalablement à la ventilation mécanique.



La réponse pulmonaire au lipopeptide bactérien Pam3CSK4 était significativement augmentée par l'exposition préalable à la ventilation mécanique (< 0.05). Les niveaux d'ARNm de l'IL-8 dans l'homogénat pulmonaire ont été normalisés avec l'expression de l'ARNm du GAPDH. Toutes les valeurs sont exprimées comme fold-induction (valeurs relatives par rapport à la valeur des animaux en ventilation spontanée qui est normalisée à 1). Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm écart type. SB=spontaneously breathing; MV = mechanically ventilated. (n = 4 dans chaque groupe).

Figure 8: La ventilation mécanique augmente l'expression pulmonaire et systémique du TLR-2.

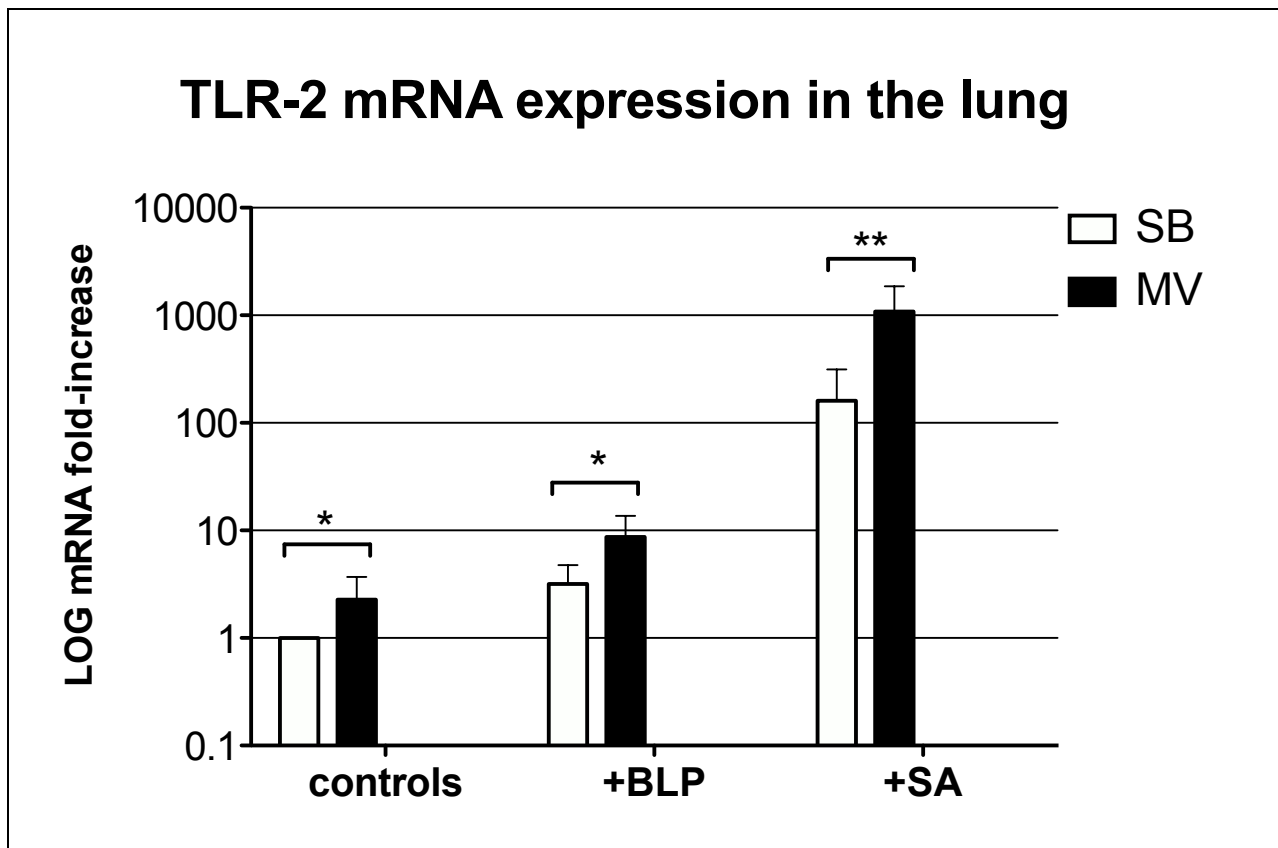


Figure 8A.

Expression génique du TLR-2 dans l'homogénat pulmonaire après instillation intratrachéale de solution salé isotonique (controls), du lipopeptide bactérien de synthèse Pam₃CSK₄ (+BLP), ou de 10⁹ UFC de *S. aureus* (+SA) chez des animaux en ventilation spontanée (SB) ou exposés préalablement à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive (MV) ($n = 5$ dans chaque groupe).

L'expression du TLR-2 était significativement augmentée sous ventilation mécanique dans le groupe contrôle ($p=0.015$), après l'instillation de l'agoniste TLR-2 et après l'instillation du *S. aureus*.

Les niveaux d'ARNm du TLR-2 dans l'homogénat pulmonaire ont été normalisés avec l'expression de l'ARNm du GAPDH. Toutes les valeurs sont exprimées comme fold-induction (valeurs relatives par rapport à la valeur des animaux en ventilation spontanée qui est normalisée à 1). Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm écart type.

(* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$).

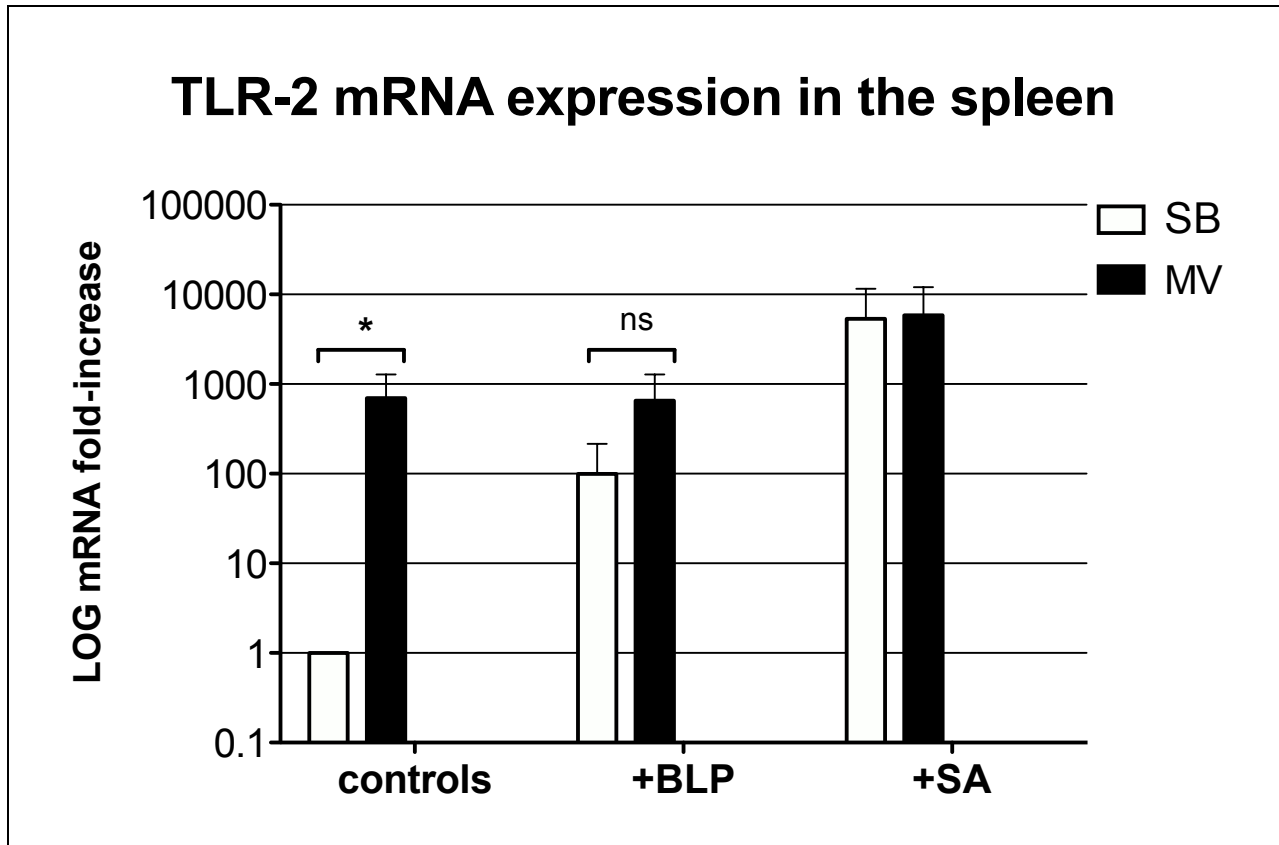


Figure 8B.

Expression génique du TLR-2 dans l'homogénat de rate après instillation intra-trachéale de solution salé isotonique (controls), du lipopeptide bactérien de synthèse Pam₃CSK₄ (+BLP), ou de 10⁹ UFC de *S. aureus* (+SA) chez des animaux en ventilation spontanée (SB) ou exposés préalablement à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive (MV) (*n* = 5 dans chaque groupe).

L'expression du TLR-2 était augmentée par la ventilation mécanique dans les groupes contrôle (*p*=0.031) et après instillation de l'agoniste TLR-2 (ns), mais pas après l'instillation du *S. aureus*.

Les niveaux d'ARNm du TLR-2 dans l'homogénat splénique ont été normalisés avec l'expression de l'ARNm du GAPDH. Toutes les valeurs sont exprimées comme fold-induction (valeurs relatives par rapport à la valeur des animaux en ventilation spontanée qui est normalisée à 1). Les résultats sont exprimés comme moyenne ± écart type.

(**p* ≤ 0.05).

TLR-2 mRNA expression in the liver

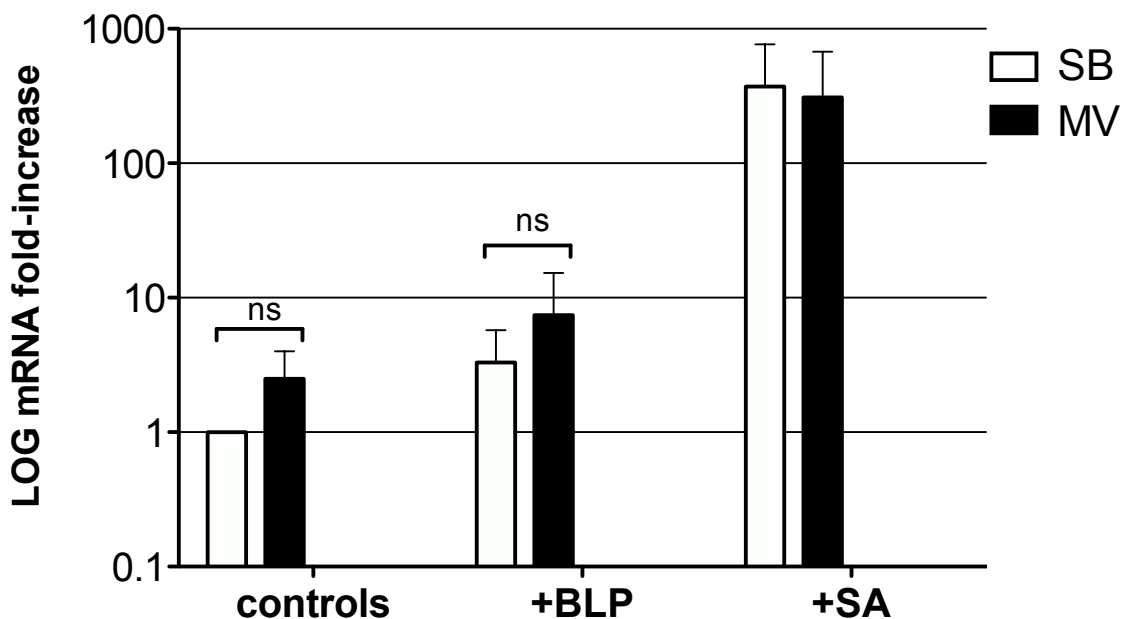


Figure 8C.

Expression génique du TLR-2 dans l'homogénat hépatique après instillation intra-trachéale de solution salé isotonique (controls), du lipopeptide bactérien de synthèse Pam₃CSK₄ (+BLP), ou de 10⁹ UFC de *S. aureus* (+SA) chez des animaux en ventilation spontanée (SB) ou exposés préalablement à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive (MV) ($n = 5$ dans chaque groupe).

L'expression du TLR-2 était augmentée non significativement par la ventilation mécanique dans les groupes contrôle et après instillation de l'agoniste TLR-2 (ns), et non modifiée après l'instillation du *S. aureus*.

Les niveaux d'ARNm du TLR-2 dans l'homogénat hépatique ont été normalisés avec l'expression de l'ARNm du GAPDH. Toutes les valeurs sont exprimées comme fold-induction (valeurs relatives par rapport à la valeur des animaux en ventilation spontanée qui est normalisée à 1). Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm écart type.

Figure 9: Bio-traumatisme. La ventilation mécanique modérément agressive induit une inflammation au niveau pulmonaire, mais ne modifie pas la réponse inflammatoire pulmonaire aux agonistes TLR-2 et au *Staphylococcus aureus*.

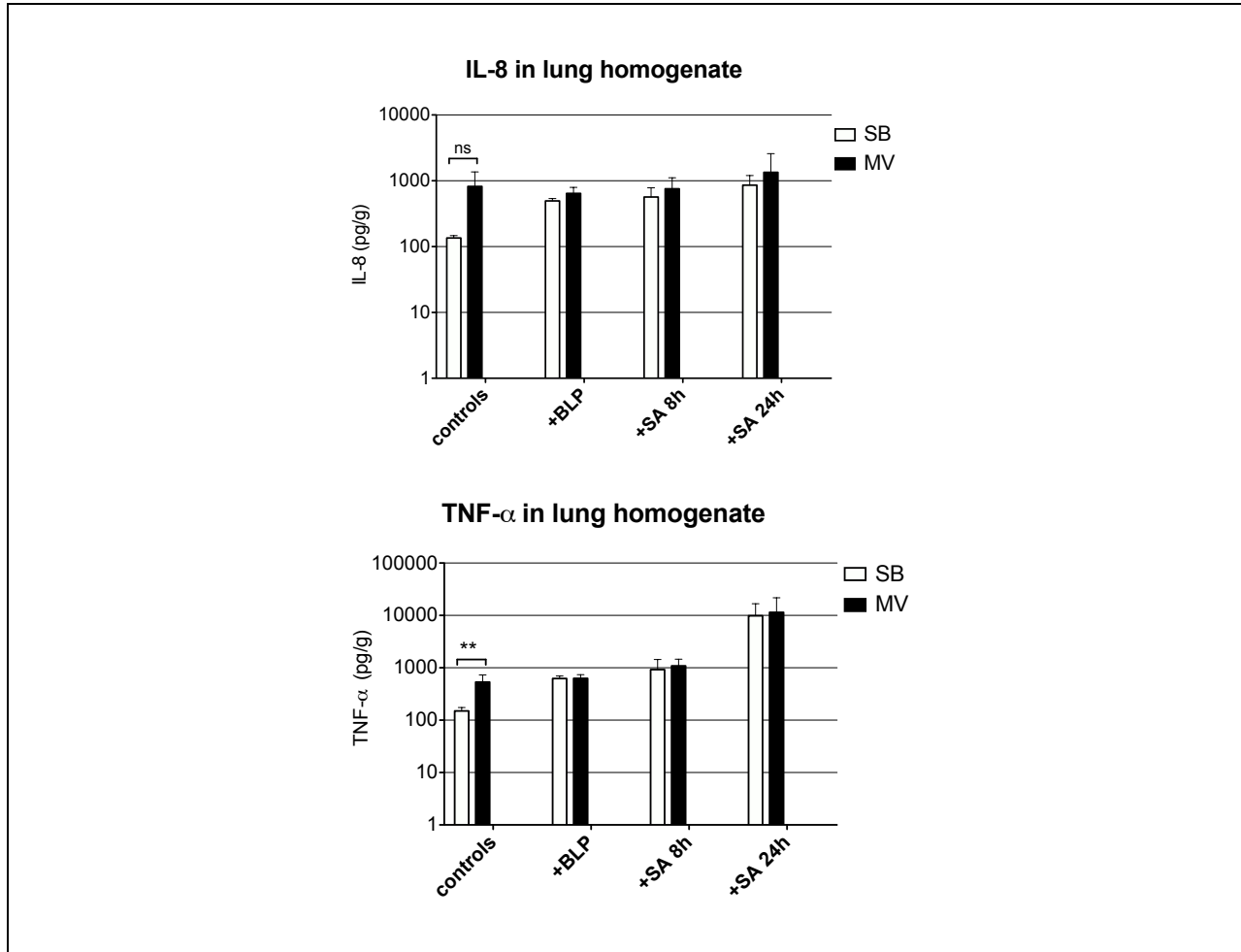


Figure 9A.

Evaluation par ELISA des niveaux de cytokines inflammatoires (IL-8 et TNF- α) dans l'homogénat pulmonaire 8 heures après instillation intra-trachéale de solution salé isotonique (controls), du lipopeptide bactérien de synthèse Pam₃CSK₄ (+BLP), et 8 ou 24 heures après l'instillation de 10⁹ UFC de *S. aureus* (+SA) chez des animaux en ventilation spontanée (SB) ou exposés préalablement à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive (MV) ($n = 5$ dans chaque groupe).

Les concentrations de cytokines augmentent sous ventilation mécanique dans les groupes contrôle (IL-8 : SB 135.5±11.3 pg/g vs MV 823.6±544.1 pg/g, $p=ns$; TNF- α : 150.5±24.3 vs 533.1±198.8, $p=0.001$), mais pas après l'instillation de l'agoniste TLR-2 ou du *S. aureus*.

** $p \leq 0.01$.

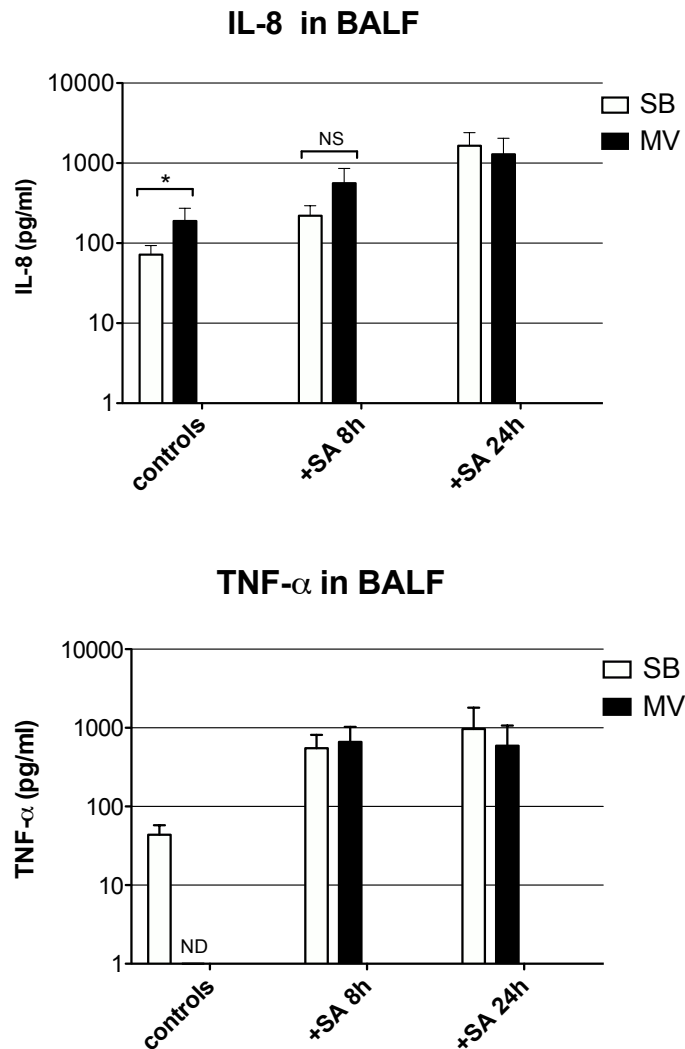


Figure 9B.

Evaluation par ELISA des niveaux de cytokines inflammatoires (IL-8 et TNF- α) dans l'LBA 8 heures après instillation intra-trachéale de solution salé isotonique (controls), et 8 ou 24 heures après l'instillation de 10^9 UFC de *S. aureus* (+SA) chez des animaux en ventilation spontanée (SB) ou exposés préalablement à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive (MV) ($n = 5$ dans chaque groupe). Les concentrations d'IL-8 dans l'LBA augmentent sous ventilation mécanique dans les groupes contrôle (71.82 ± 21.80 vs 189.22 ± 83.92 pg/ml, $p=0.012$); 8 heures après instillation du *S.aureus* on observe une augmentation non significative de l'IL-8 sous ventilation mécanique (220.76 ± 72.59 vs 561.48 ± 295.21 pg/ml, $p=0.057$), qui ne se confirme pas à la 24ème heure.

Aucune différence entre les groupes SB et MV n'a été observée concernant les concentrations dans l'LBA du TNF- α .

* $p < 0.05$; ND concentration des cytokines en dessous du seuil de détection.

IL-8 mRNA expression in the lung

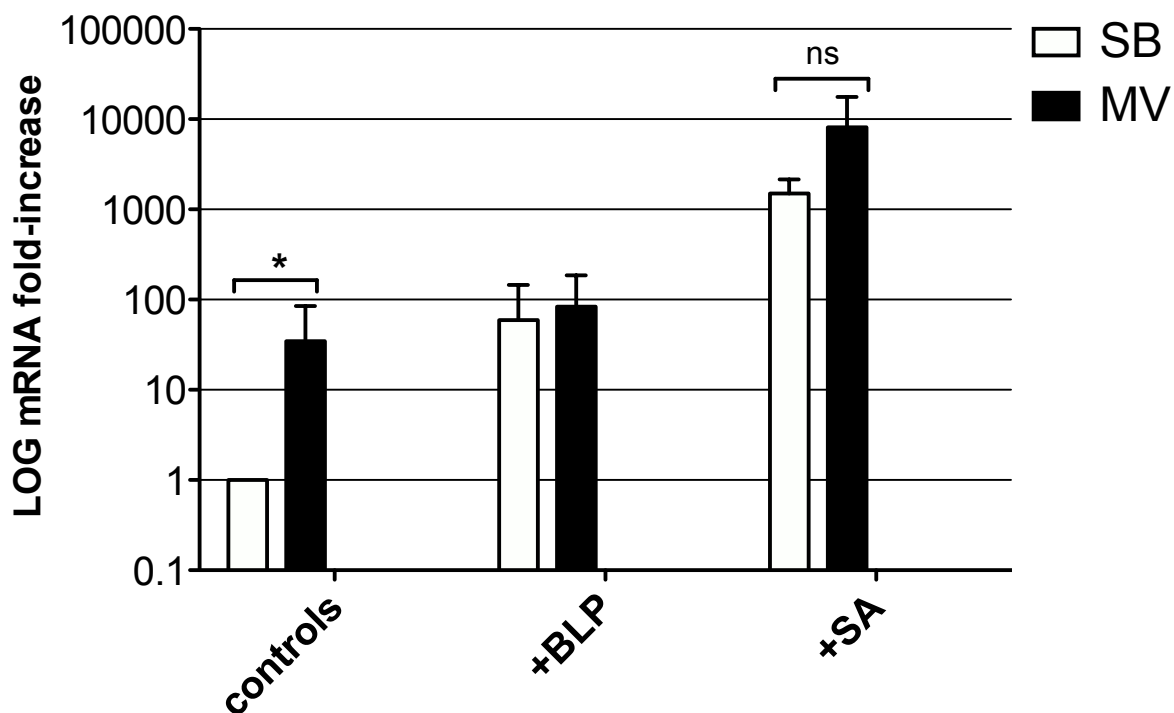


Figure 9C.

Expression génique de la cytokine inflammatoire IL-8 dans l'homogénat pulmonaire après instillation intra-trachéale de solution salé isotonique (controls), du lipopeptide bactérien de synthèse Pam₃CSK₄ (+BLP), ou de 10⁹ UFC de *S. aureus* (+SA) chez des animaux en ventilation spontanée (SB) ou exposés préalablement à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive (MV) ($n = 5$ dans chaque groupe).

Les niveaux d'ARNm de l'IL-8 dans l'homogénat pulmonaire ont été normalisés avec l'expression de l'ARNm du GAPDH. Toutes les valeurs sont exprimées comme fold-induction (valeurs relatives par rapport à la valeur des animaux en ventilation spontanée qui est normalisée à 1). Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm écart type.

L'expression du gène de l'IL-8 est augmentée par la VM dans le groupe contrôle ($p=0.031$); on observe aussi une augmentation sous VM après instillation de l'agoniste TLR2 et du *S. aureus*, mais non significative.

TNF- α mRNA expression in the lung

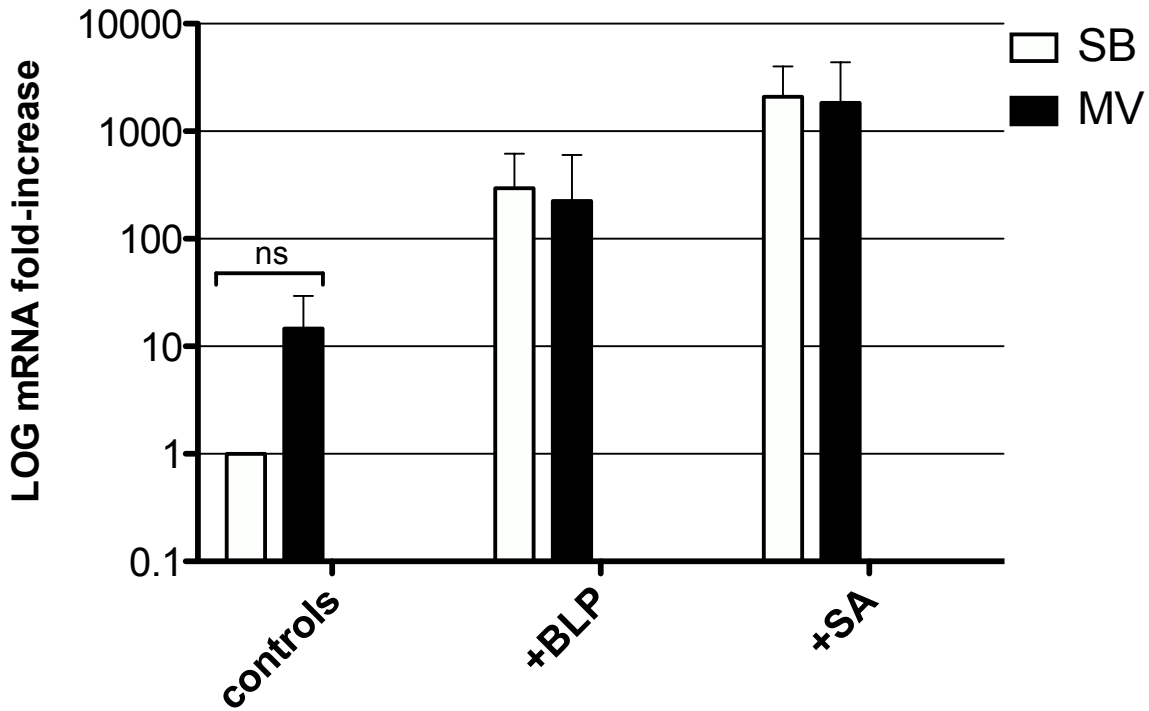


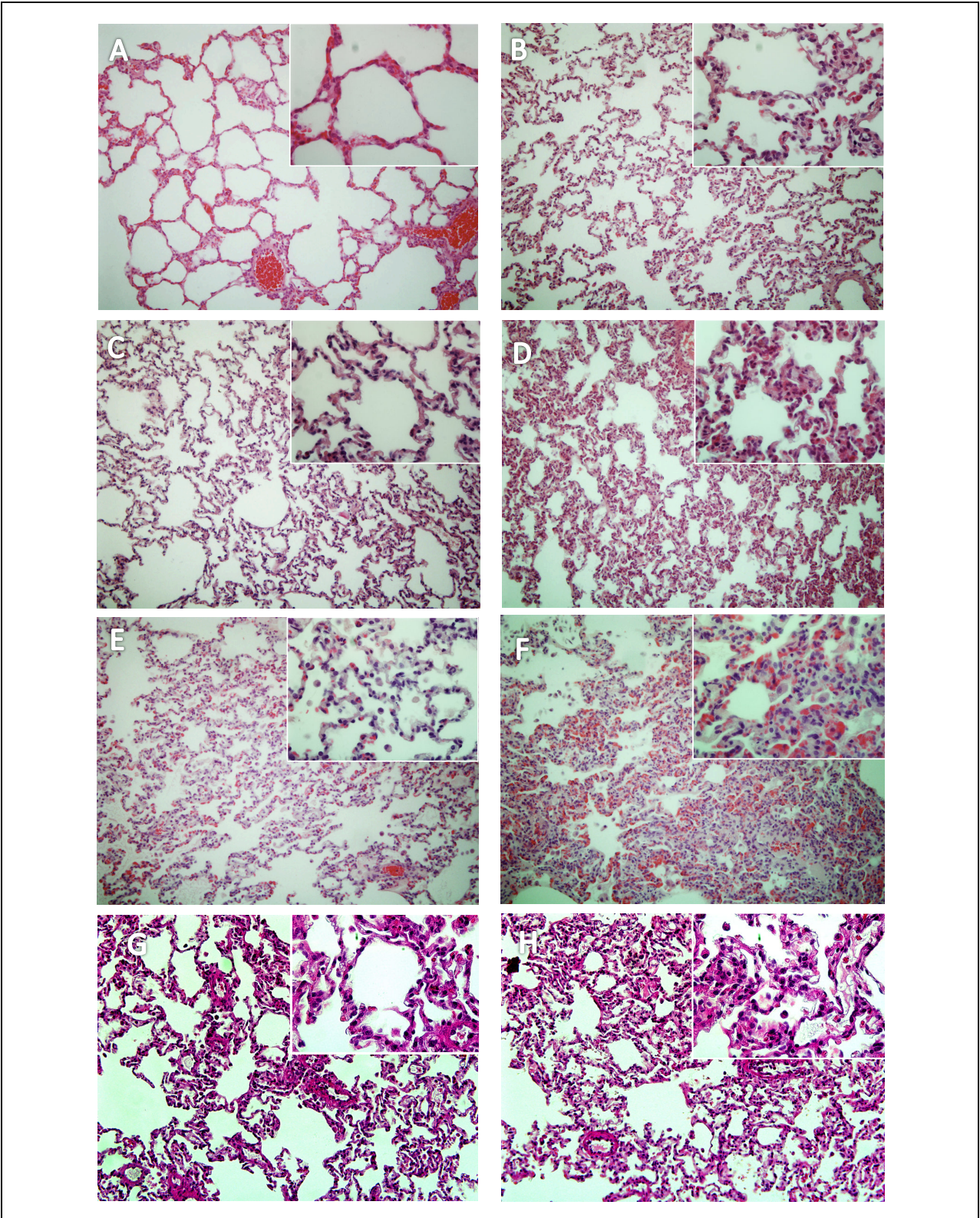
Figure 9D.

Expression génique de la cytokine inflammatoire TNF- α dans l'homogénat pulmonaire après instillation intra-trachéale de solution salé isotonique (controls), du lipopeptide bactérien de synthèse Pam₃CSK₄ (+BLP), ou de 10⁹ UFC de *S. aureus* (+SA) chez des animaux en ventilation spontanée (SB) ou exposés préalablement à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive (MV) ($n = 5$ dans chaque groupe).

Les niveaux d'ARNm du TNF- α dans l'homogénat pulmonaire ont été normalisés avec l'expression de l'ARNm du GAPDH. Toutes les valeurs sont exprimées comme fold-induction (valeurs relatives par rapport à la valeur des animaux en ventilation spontanée qui est normalisée à 1). Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm écart type.

L'expression du gène du TNF- α est augmentée non significativement par la VM dans le groupe contrôle ; on n'observe aucune différence entre SB et VM après instillation de l'agoniste TLR2 et du *S. aureus*.

Figure 10 : Histologie



Coupes histologiques représentatives des poumons des lapins dans différentes conditions, fixées à la même pression transpulmonaire. Coloration : hématoxyline - éosine. Grossissement original : x100 (x400 dans l'insert).

(A) Poumons des animaux en ventilation spontanée.

(B) Poumons de lapins exposés à 32 heures de ventilation mécanique modérément agressive

(C) Poumons des animaux en ventilation spontanée 8 heures après l'instillation intra-trachéale du lipopeptide bactérien de synthèse Pam3CSK4

(D) Poumons des animaux exposés à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive avant l'instillation intra-trachéale du lipopeptide bactérien de synthèse Pam3CSK4 et sacrifiés 8 heures après.

(E) Poumons des animaux en ventilation spontanée 8 heures après l'instillation intra-trachéale de 10^9 UFC de *Staphylococcus aureus*.

(F) Poumons des animaux exposés à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive avant l'instillation intra-trachéale de 10^9 UFC de *Staphylococcus aureus* et sacrifiés après 8 heures ultérieures de ventilation.

(G) Poumons des animaux en ventilation spontanée 24 heures après l'instillation intra-trachéale de 10^9 UFC de *Staphylococcus aureus*

(H) Poumons des animaux exposés à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive avant l'instillation intra-trachéale de 10^9 UFC de *Staphylococcus aureus* et sacrifiés après 24 heures ultérieures de ventilation.

On observe un épaississement des septa inter alvéolaires, un infiltrat cellulaire interstitiel et un collapsus alvéolaire qui prédominent dans les groupes sous ventilation mécanique (B, D, F, H).

Figure 11 : Score histologique

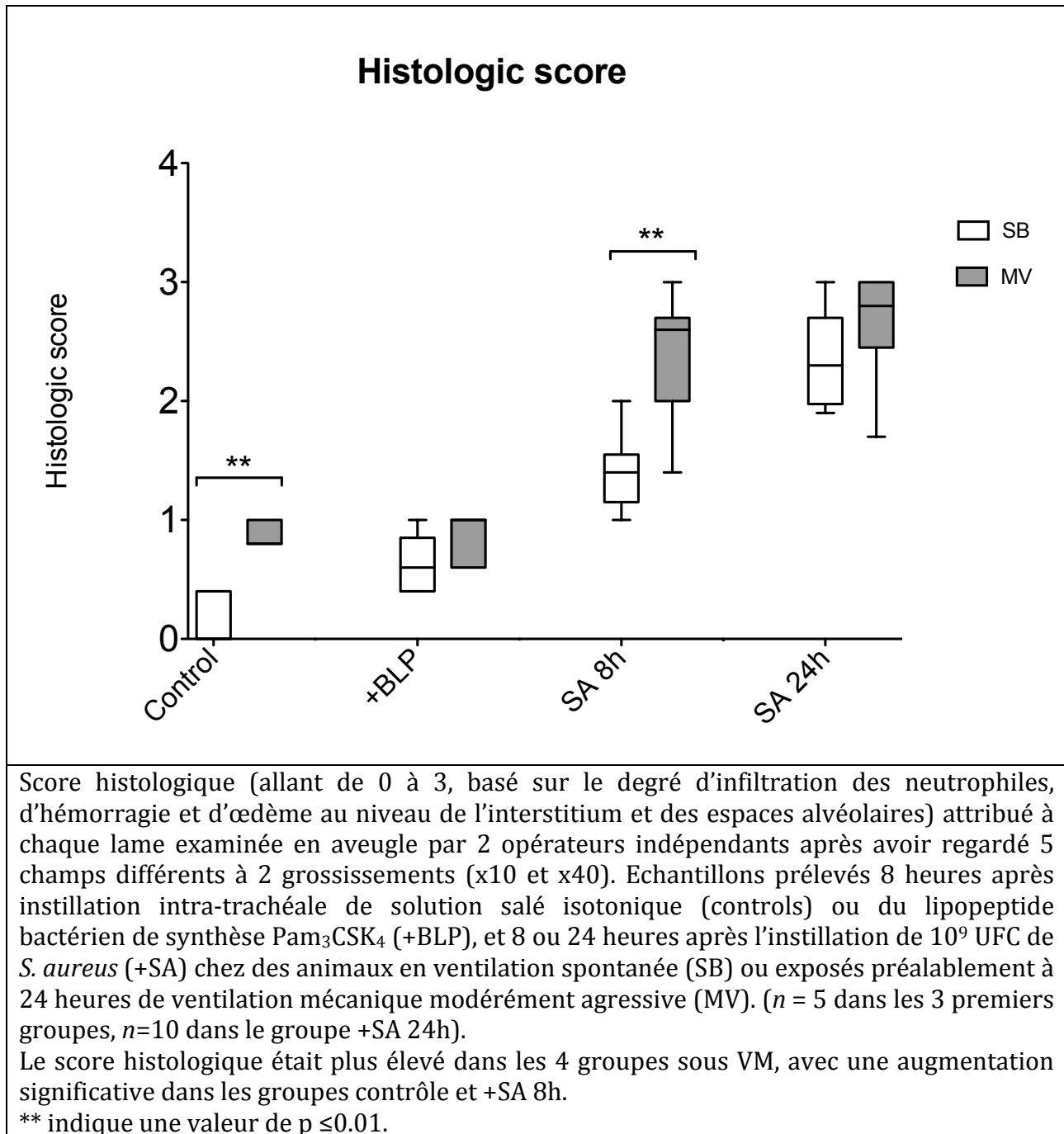


Figure 12 : Ventilation mécanique et inflammation systémique

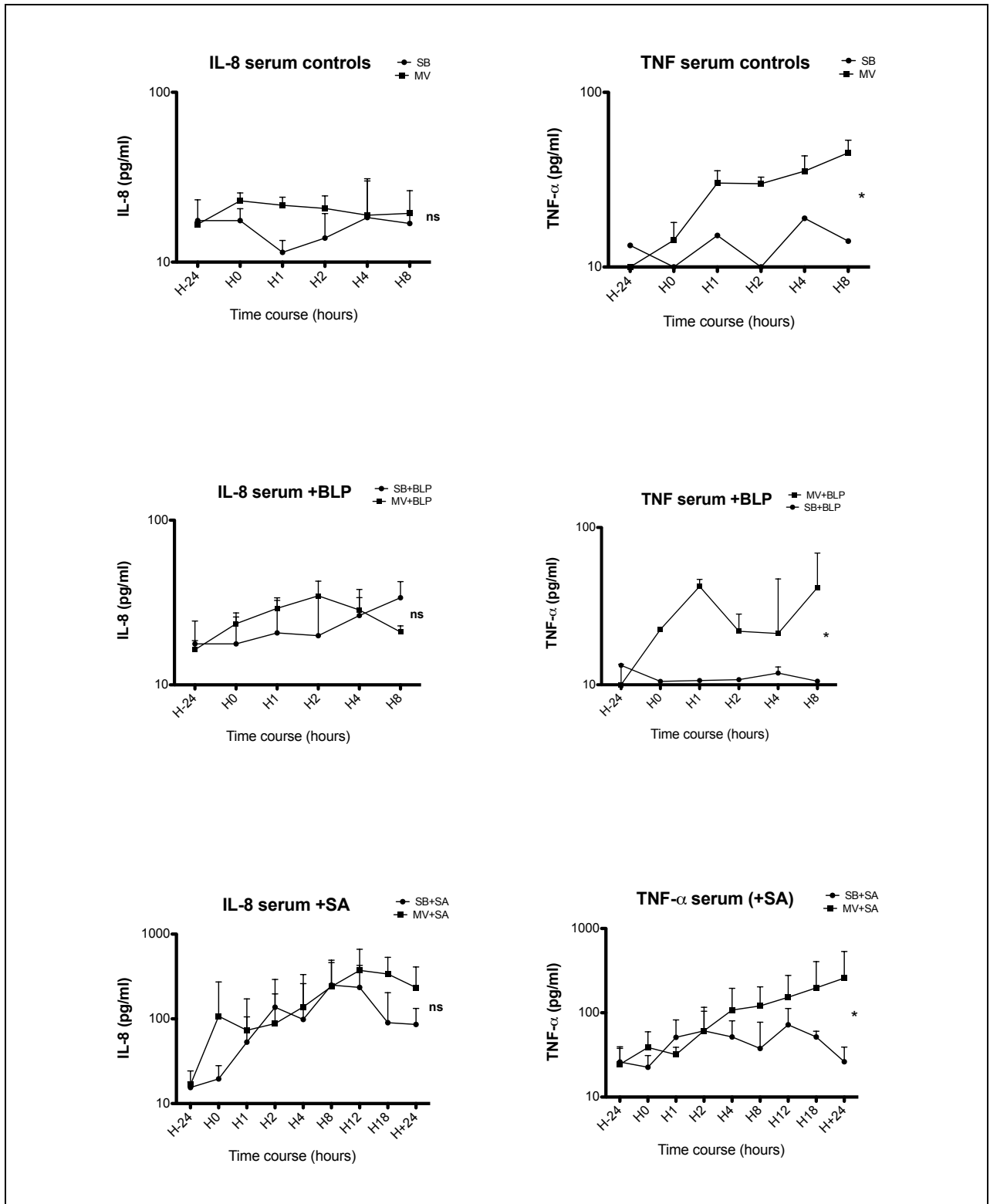


Figure 12A.

Evolution dans le temps des concentrations plasmatiques moyennes des cytokines pendant l'expérimentation. La concentration d'IL-8 et de TNF- α a été mesurée par ELISA dans le plasma des animaux à T=0, puis 24 heures après, juste avant l'instillation intra-trachéale de sérum salé isotonique (controls) ou de Pam₃CSK₄ (+BLP) ou de 10⁹ UFC de *S. aureus* (+SA), et puis 1, 2, 4, 8, 12, 18 et 24 heures après l'instillation, et ce dans les groupes en ventilation spontanée (SB) et dans les groupes sous ventilation mécanique (MV). (*n*=6 pour SB, MV, SB+BLP, MV+BLP; *n*=15 pour SB+SA et MV+SA). Les changements significatifs dans le temps ont été évalués avec une analyse de variance sur mesures répétées, suivie d'un test de comparaisons multiples de Bonferroni lorsqu'il existait une différence significative. * indique une différence significative entre SB et MV au même moment (*p* ≤ 0.01).

IL-8

Control SB vs MV: ns

SB+BLP vs MV+BLP: ns

SB+SA vs MV+SA: ns

TNF-alpha

Control SB vs MV: *p* ≤ 0.01 (95% CI of diff -29.41 to -5.562)

SB+BLP vs MV+BLP: *p* ≤ 0.01 (95% CI of diff -27.19 to -3.346)

SB+SA vs MV+SA: *p* ≤ 0.01 (95% CI of diff -104.7 to -7.547)

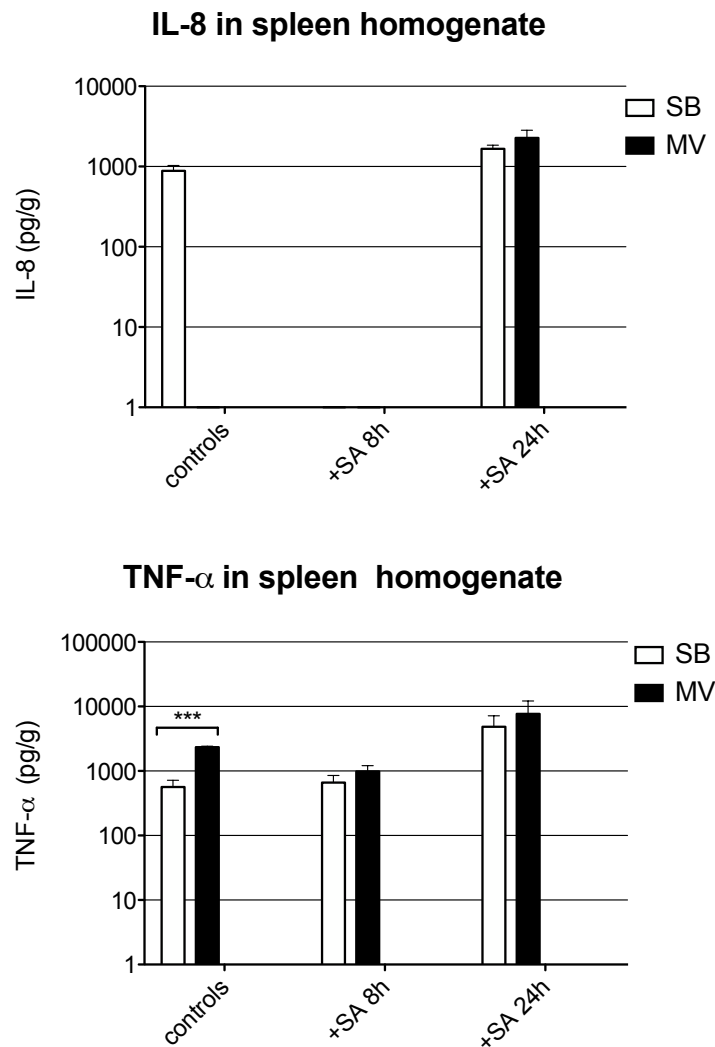


Figure 12B.

Evaluation par ELISA des niveaux de cytokines inflammatoires (IL-8 et TNF- α) dans l'homogénat de rate 8 heures après instillation intra-trachéale de solution salé isotonique (controls), et 8 ou 24 heures après l'instillation de 10^9 UFC de *S. aureus* (+SA) chez des animaux en ventilation spontanée (SB) ou exposés préalablement à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive (MV) ($n = 5$ dans le groupe contrôle et SA+8h et $n = 10$ dans le groupe SA+24h). La concentration de TNF- α est significativement augmentée dans le groupe contrôle sous ventilation mécanique (563.23 ± 344.2 vs 2347 ± 190.1 pg/g, $p < 0.001$) mais la réponse inflammatoire au niveau splénique après instillation de *S.aureus* n'est pas différente entre SB et MV ni à la 8^{ème} ni à la 24^{ème} heure. Les nombreuses données manquantes ne rendent pas possible l'interprétation des concentrations d'IL-8 au niveau splénique.

*** indique une valeur de $p \leq 0.001$.

IL-8 mRNA expression in the spleen

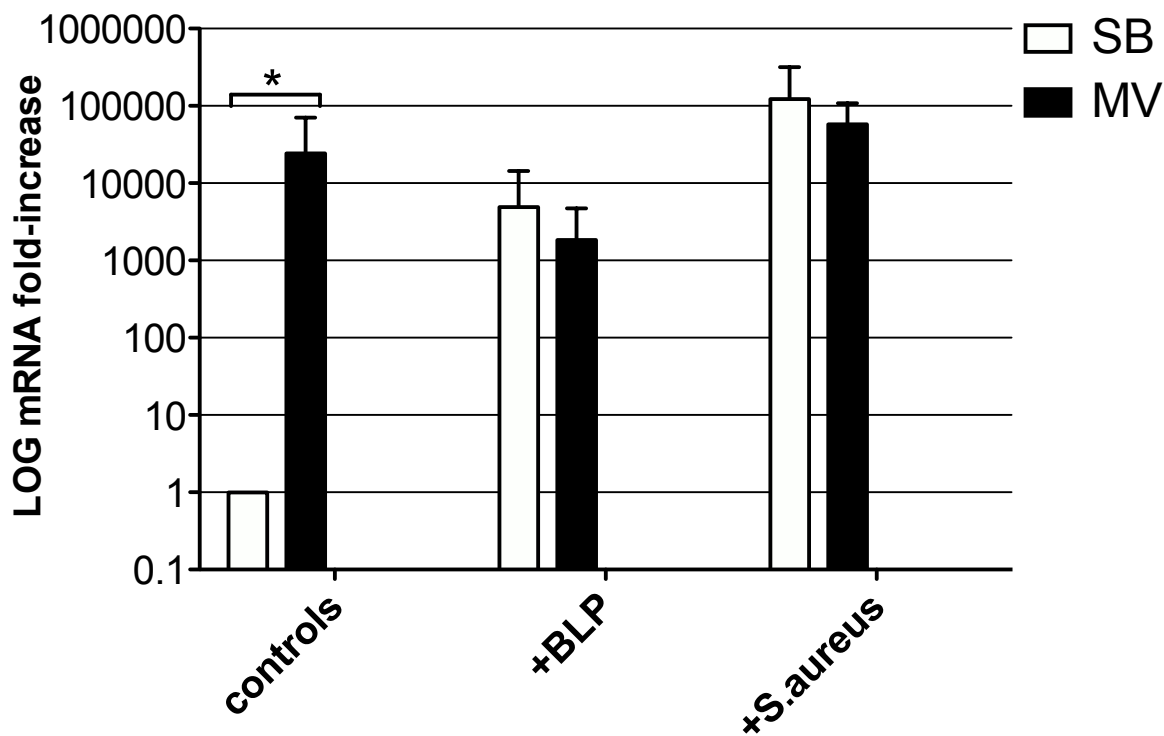


Figure 12C.

Expression génique de la cytokine inflammatoire IL-8 dans l'homogénat splénique après instillation intra-trachéale de solution salé isotonique (controls), du lipopeptide bactérien de synthèse Pam₃CSK₄ (+BLP), ou de 10⁹ UFC de *S. aureus* (+SA) chez des animaux en ventilation spontanée (SB) ou exposés préalablement à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive (MV) ($n = 5$ dans chaque groupe).

Les niveaux d'ARNm de l'IL-8 dans l'homogénat splénique ont été normalisés avec l'expression de l'ARNm du GAPDH. Toutes les valeurs sont exprimées comme fold-induction (valeurs relatives par rapport à la valeur des animaux en ventilation spontanée qui est normalisée à 1). Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm écart type.

L'expression du gène de l'IL-8 est augmentée significativement par la VM dans le groupe contrôle ($p=0.031$); on n'observe pas d'augmentation sous VM après instillation de l'agoniste TLR2 et du *S. aureus*. * indique une valeur de $p \leq 0.05$.

TNF- α mRNA expression in the spleen

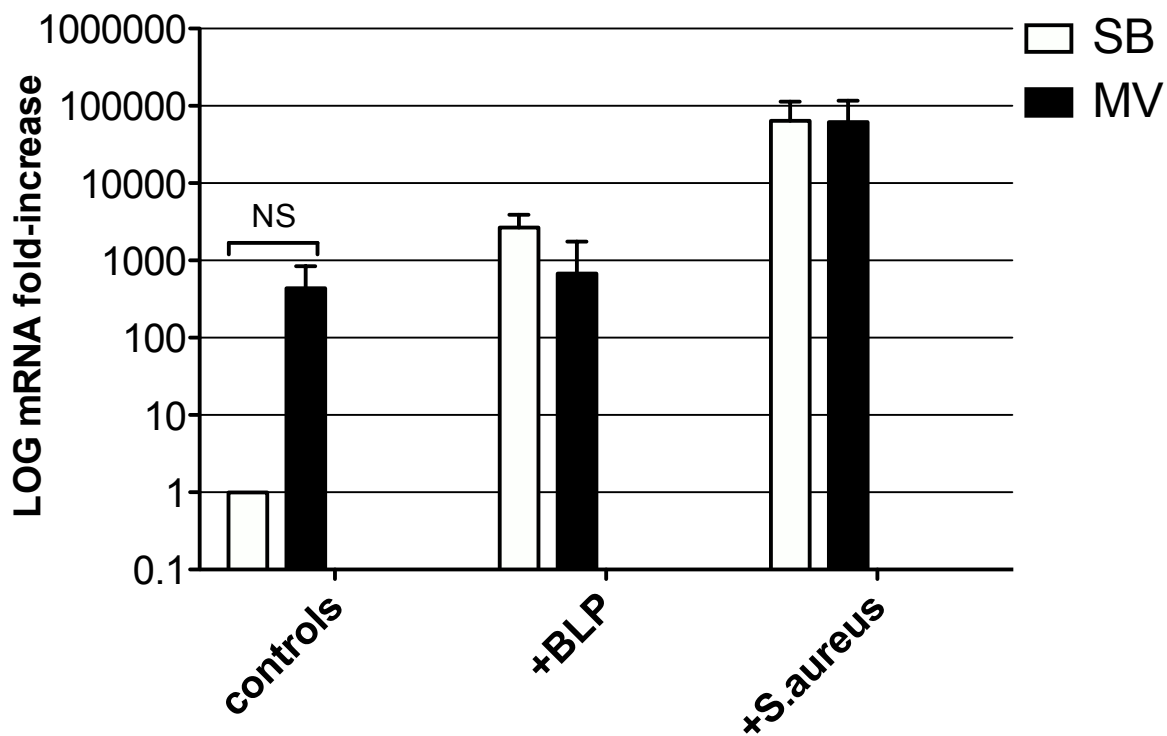


Figure 12D.

Expression génique de la cytokine inflammatoire TNF- α dans l'homogénat splénique après instillation intra-trachéale de solution salé isotonique (controls), du lipopeptide bactérien de synthèse Pam₃CSK₄ (+BLP), ou de 10⁹ UFC de *S. aureus* (+SA) chez des animaux en ventilation spontanée (SB) ou exposés préalablement à 24 heures de ventilation mécanique modérément agressive (MV) ($n = 3$ dans chaque groupe).

Les niveaux d'ARNm du TNF- α dans l'homogénat splénique ont été normalisés avec l'expression de l'ARNm du GAPDH. Toutes les valeurs sont exprimées comme fold-induction (valeurs relatives par rapport à la valeur des animaux en ventilation spontanée qui est normalisée à 1). Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm écart type.

L'expression du gène du TNF- α est augmentée non significativement par la VM dans le groupe contrôle ; on n'observe aucune différence entre SB et VM après instillation de l'agoniste TLR2 et du *S. aureus*.

Figure 13 : Clearance bactérienne

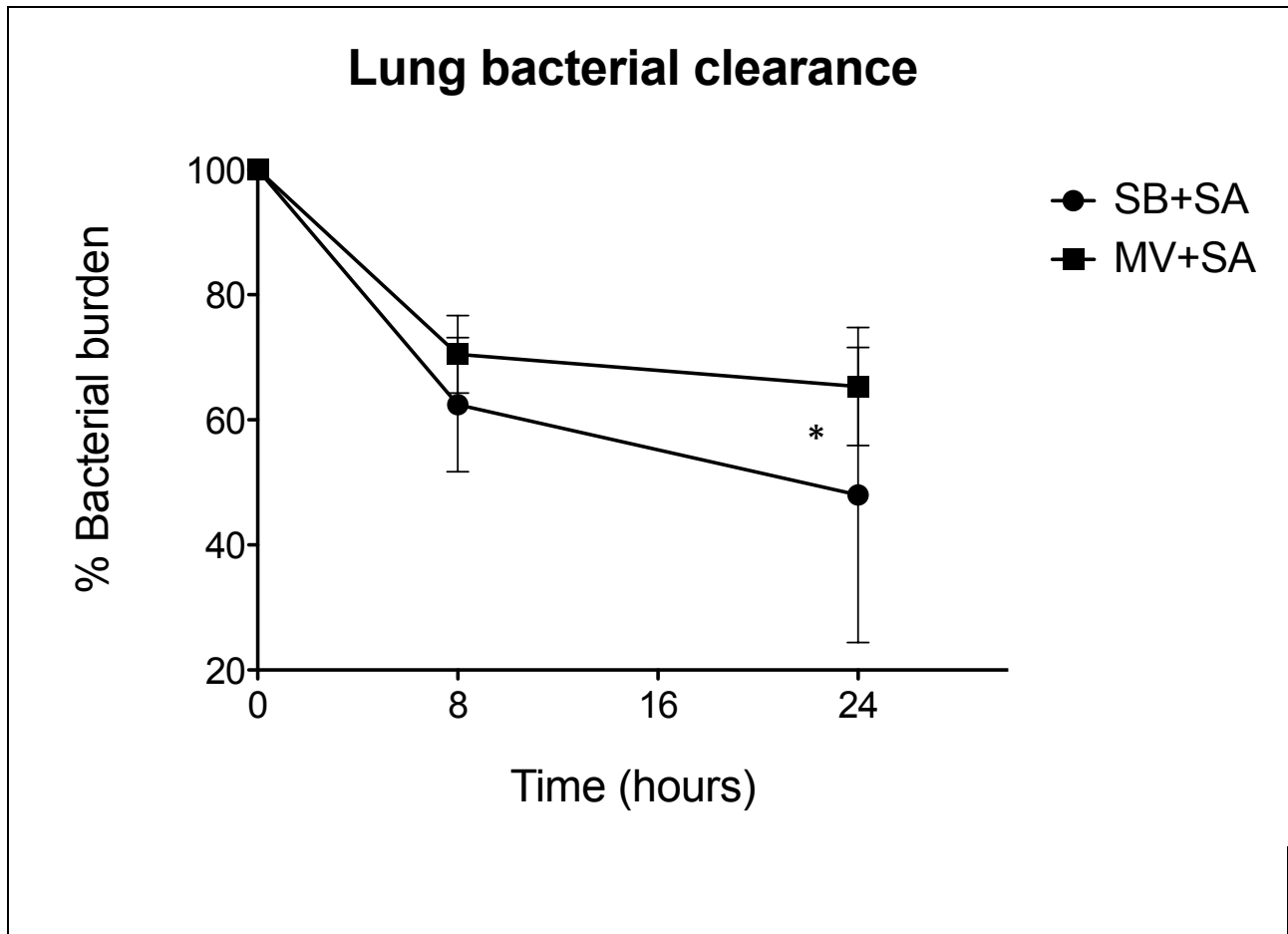


Figure 13A.

Clearance bactérienne pulmonaire exprimée comme pourcentage de réduction du Log UFC chez des lapins avec pneumonie à *S.aureus* en ventilation spontanée (SB+SA) ou sous ventilation mécanique (MV+SA) (n=15 dans chaque groupe).

La clairance bactérienne est significativement plus importante dans le groupe en ventilation spontanée (4.74 ± 0.68 vs 3.33 ± 0.34 delta Log UFC/g ; $p=0.038$)

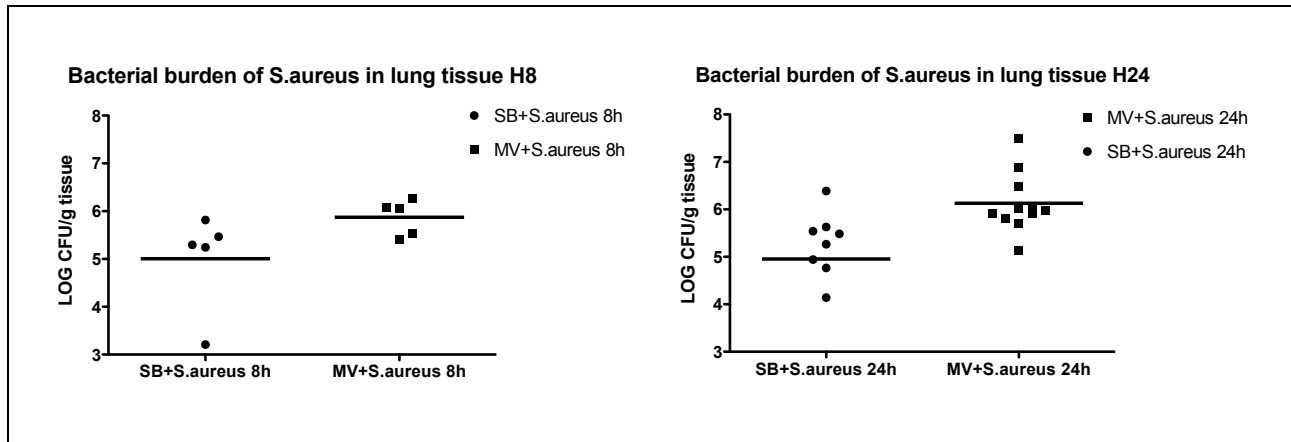


Figure 13B.

Charge bactérienne pulmonaire chez des lapins avec pneumonie à *S.aureus* en ventilation spontanée ou sous ventilation mécanique, évaluée 8 heures ($n = 5$ dans chaque groupe) et 24 heures ($n = 10$ dans chaque groupe) après l'instillation de 10^9 UFC de *S.aureus*.

La charge bactérienne était plus élevée dans les groupes sous ventilation mécanique à la fois à la 8^{ème} heure (5.00 ± 1.02 vs. 5.87 ± 0.38 UFC/g, $p=0.028$) et à la 24^{ème} heure (5.23 ± 1.38 vs. 6.13 ± 0.62 UFC/g, $p=0.034$).

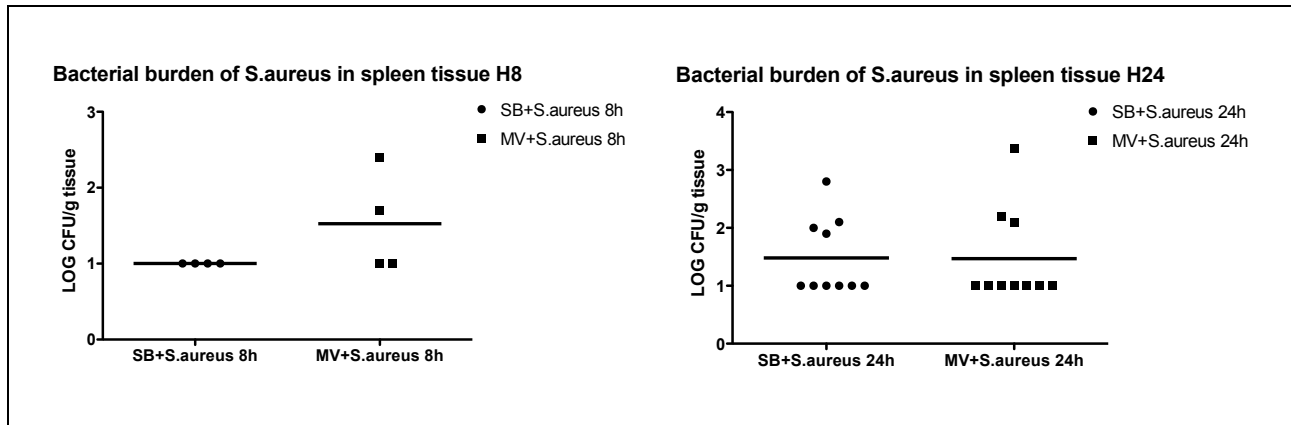
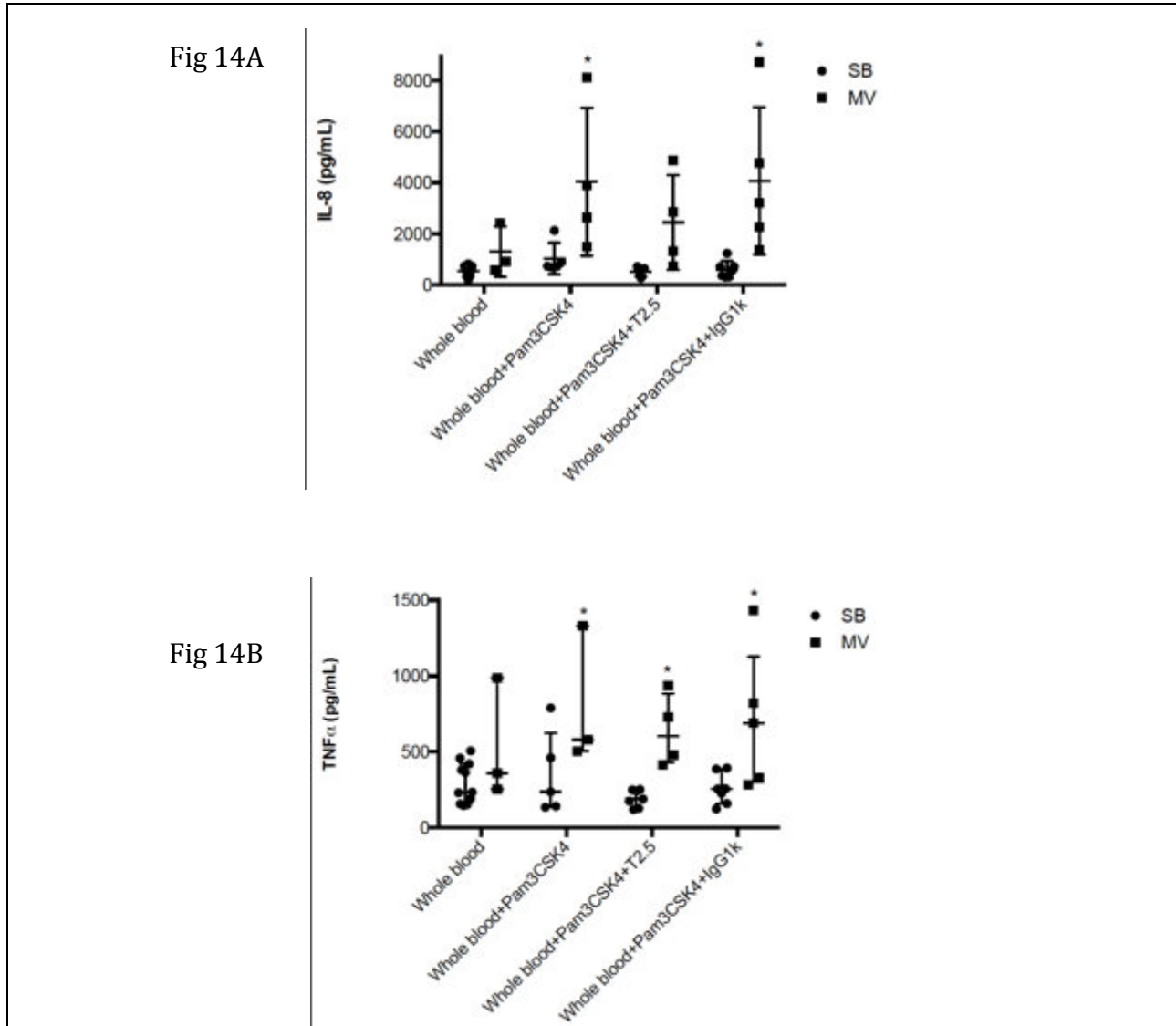


Figure 13C.

Charge bactérienne splénique chez des lapins avec pneumonie à *S.aureus* en ventilation spontanée ou sous ventilation mécanique, évaluée 8 heures et 24 heures après l'instillation de 10^9 UFC de *S.aureus*. Les cultures quantitatives splénique sont considérées un marqueur indirect de bactériémie et donc de dissémination bactérienne.

Il est intéressant de noter que la ventilation mécanique semblerait favoriser une translocation pulmonaire-systémique plus précoce, comme indiqué par les cultures de rate qui sont positives à la 8^{ème} heure seulement chez les animaux sous VM, même si à la 24^{ème} heure les différences entre les deux groupes disparaissent (1.48 ± 0.66 vs. 1.47 ± 0.82 UFC/g, $p=0.44$).

Figure 14 : Dosage de l'inflammation dans le sang total de lapins SB ou MV stimulé *ex vivo* par un agoniste TLR-2 en présence ou pas d'un anticorps monoclonal bloquant le TLR2



Cytokines inflammatoires IL-8 (Fig. 14A) et TNF- α (Fig. 14B) dans du sang entier (prélevé à des lapins en ventilation spontanée [SB] ou exposés à une ventilation mécanique modérément agressive [MV]), stimulé *ex vivo* par le lipopeptide bactérien de synthèse Pam3CSK4 en présence ou pas d'un anticorps monoclonal bloquant le TLR-2 (le T2.5; le test a été complété par un contrôle isotypique avec une IgG1k)

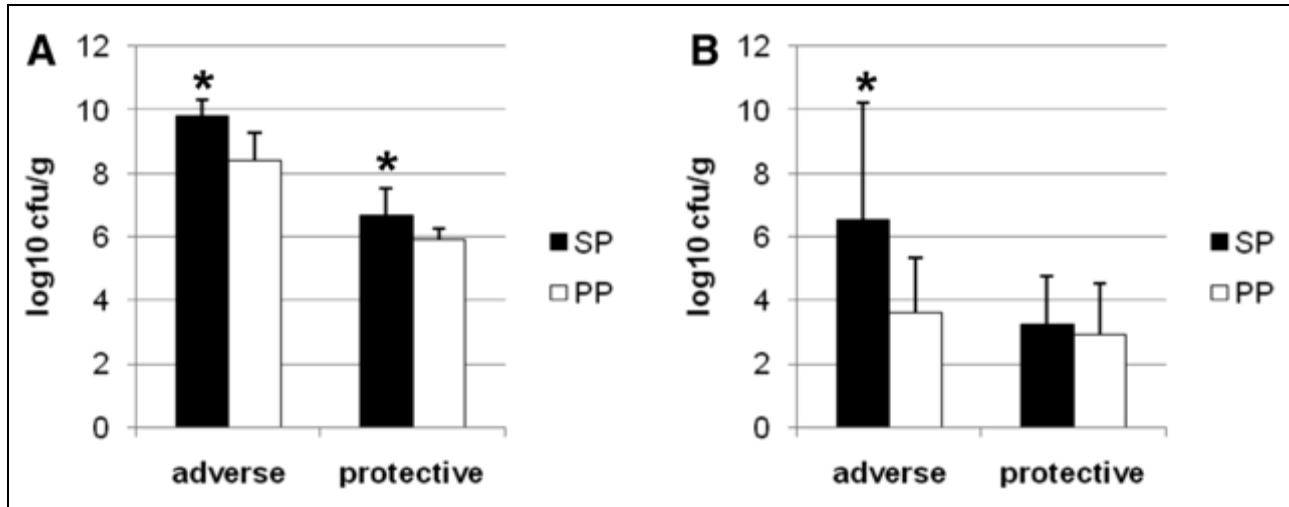
Figure 14A : la concentration d'IL-8 est augmentée non significativement dans le sang prélevé aux animaux sous ventilation mécanique, mais elle augmente significativement après stimulation par Pam3CSK4 ($p= 0.002$).

Figure 14B : la concentration de TNF- α est augmentée non significativement dans le sang prélevé aux animaux sous ventilation mécanique, mais elle augmente significativement

après stimulation par Pam3CSK4 ($p=0.019$).

Bien que le blocage du TLR2 par l'anticorps monoclonal T2.5 aie complètement aboli la libération de médiateurs de l'inflammation par le sang entier obtenu à partir des animaux en ventilation spontanée, il n'a pas pu modifier la réponse à la stimulation par Pam3CSK4 dans le groupe sous VM.

Figure 15 : Charge bactérienne en fonction du décubitus dorsal ou ventral dans un modèle de pneumonie acquise sous ventilation mécanique à *Enterobacter aerogenes*



Charge bactérienne (poumon infecté, [A]; rate, [B]) chez des animaux avec pneumonie à *Enterobacter aerogenes* exposés à une ventilation mécanique agressive (n = 9) ou protectrice (n = 10) en décubitus dorsal (SP), ou tournés du décubitus dorsal au décubitus ventral (PP). On observe une croissance bactérienne plus importante dans les poumons des animaux du groupe SP, que la ventilation mécanique soit protectrice ou pas. La translocation pulmonaire-systémique, évaluée par le biais des cultures splénique, est augmentée par le décubitus dorsal seulement chez les animaux exposés à une stratégie de ventilation agressive. Les résultats sont exprimés comme médianes ± IQR.

*P < 0.05 entre SP et PP. IQR = interquartile range.

Figure 16 : Niveau d'inflammation en fonction du décubitus dorsal ou ventral dans un modèle de pneumonie acquise sous ventilation mécanique à *Enterobacter aerogenes*

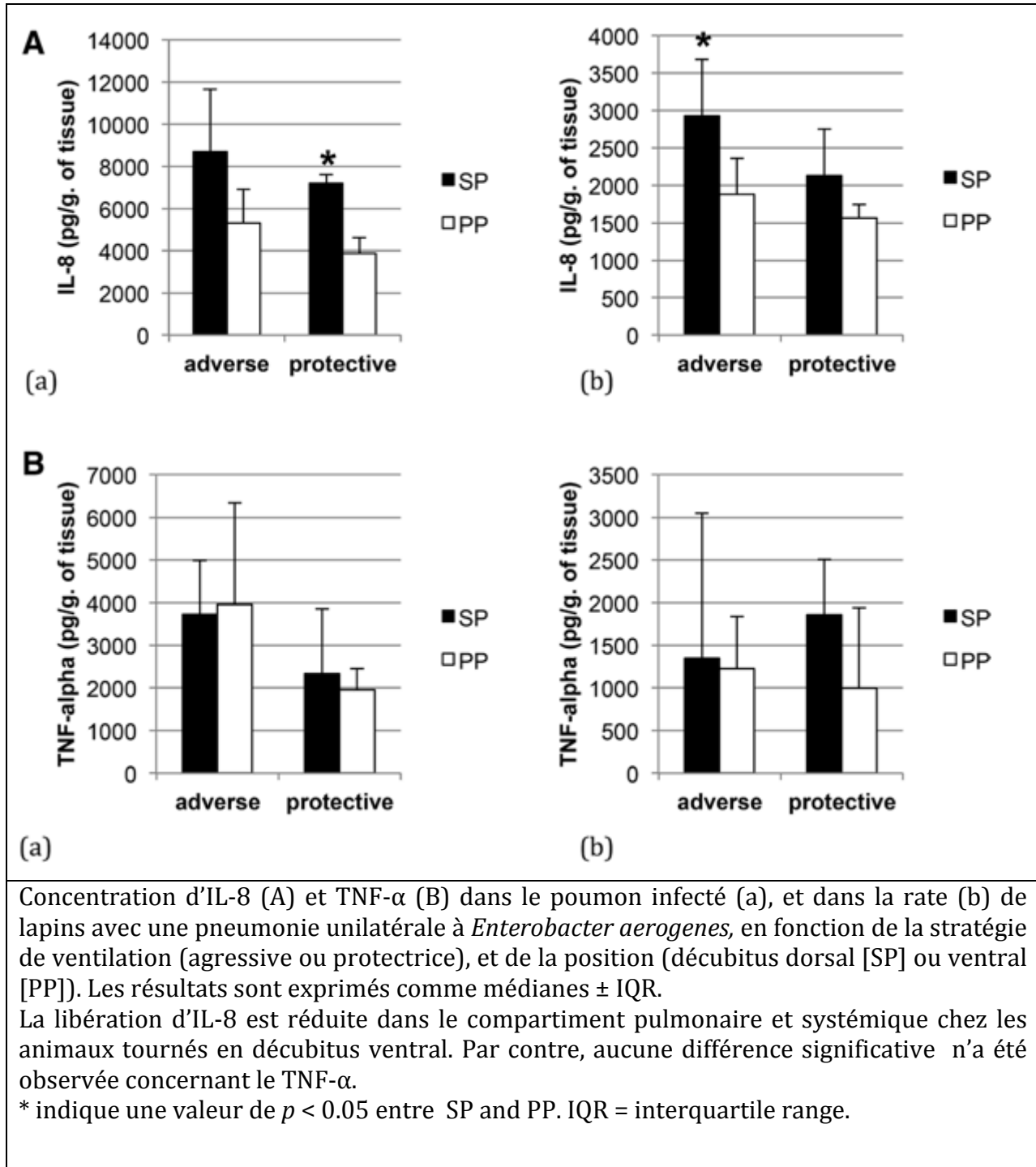
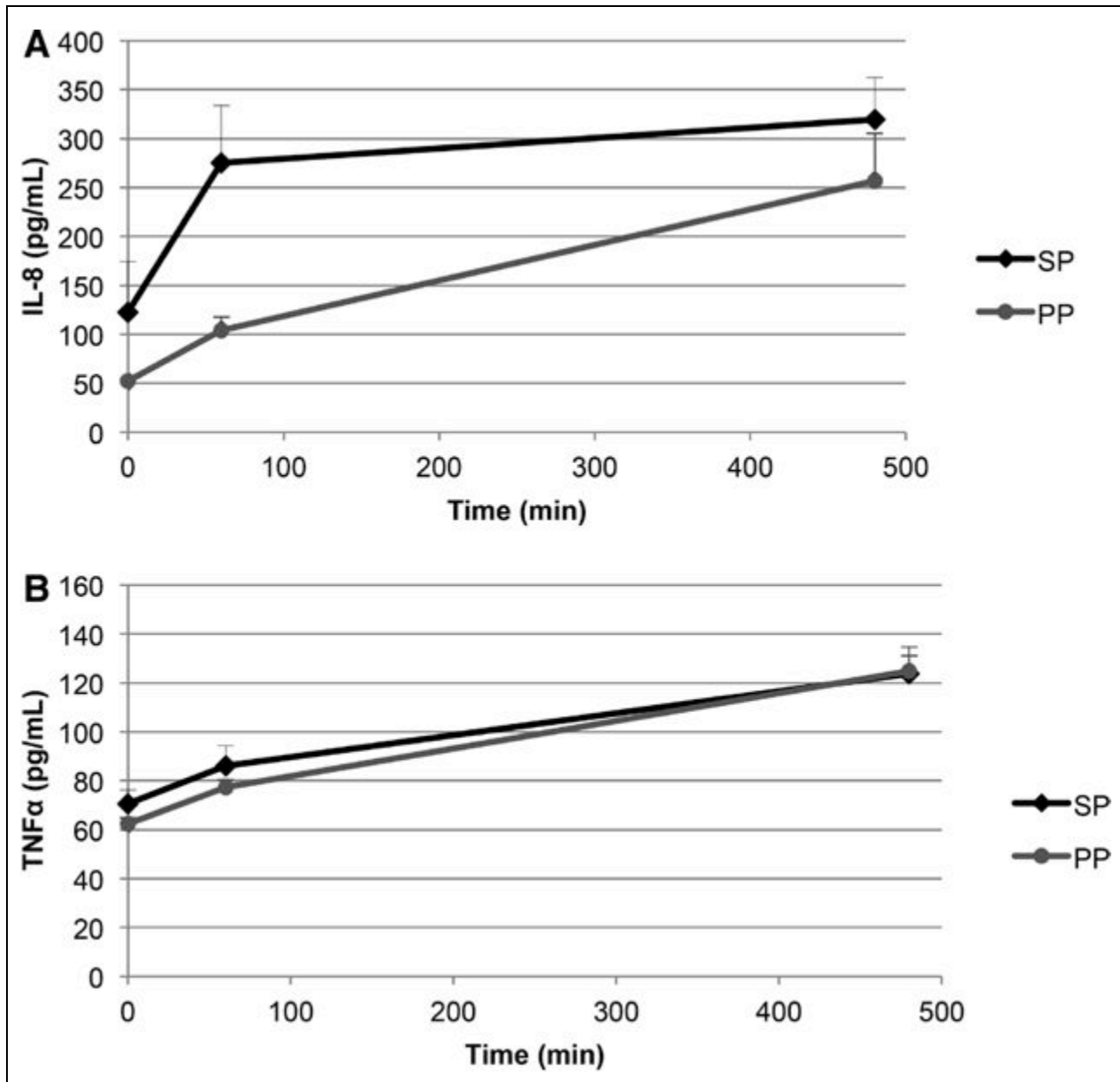
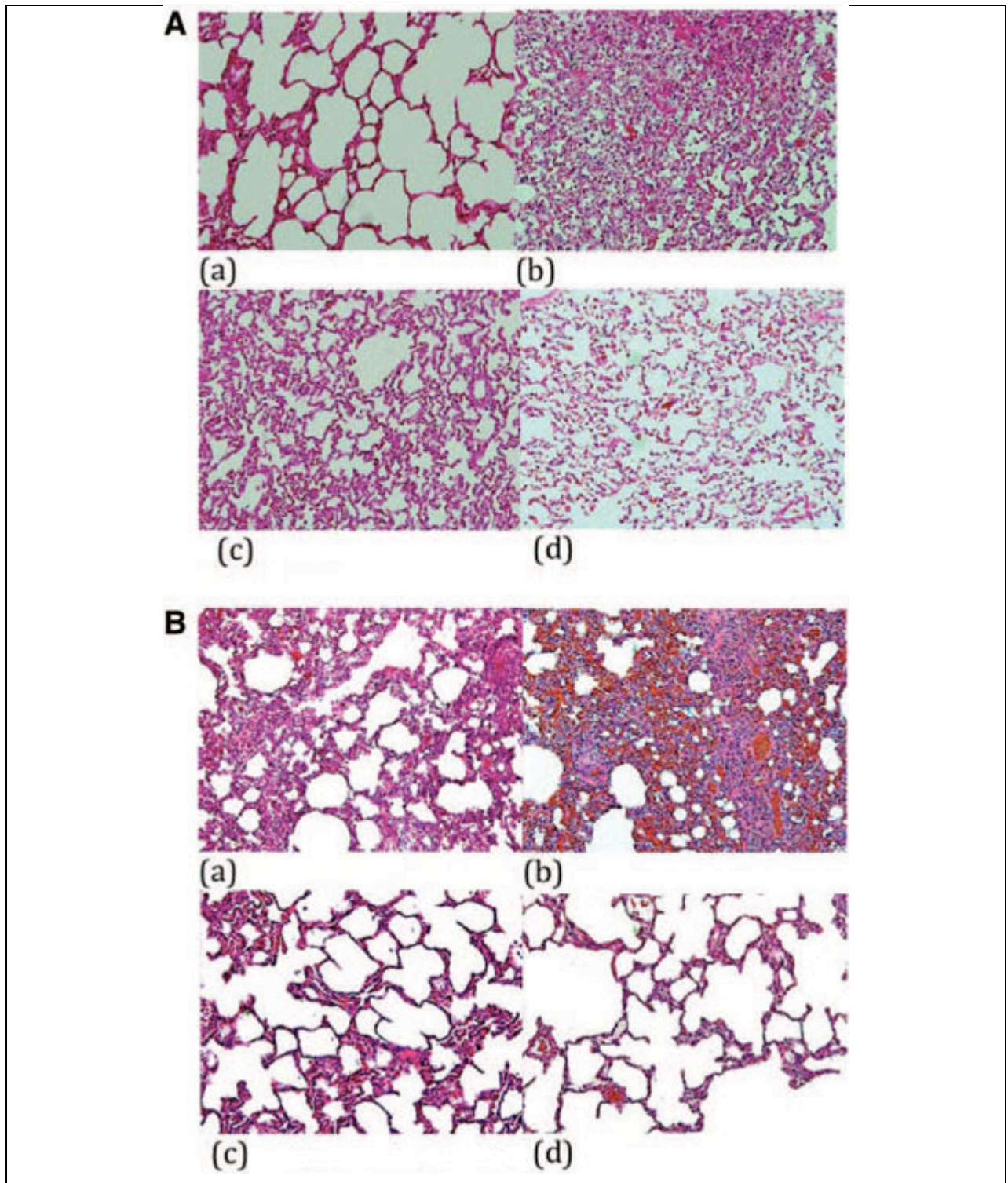


Figure 17 : Concentrations plasmatiques des cytokines inflammatoires



Concentration sériques d'IL-8 (A) et TNF- α (B) chez des lapins avec une pneumonie unilatérale à *Enterobacter aerogenes*, en fonction de la stratégie de ventilation (agressive ou protectrice), et de la position (décubitus dorsal [SP] ou ventral [PP]). Les résultats sont exprimés comme médianes \pm IQR. On observe une augmentation non significative des niveaux d'IL-8 dans le compartiment sanguin chez les animaux en DV par rapport à ceux en décubitus dorsal. IQR = interquartile range.

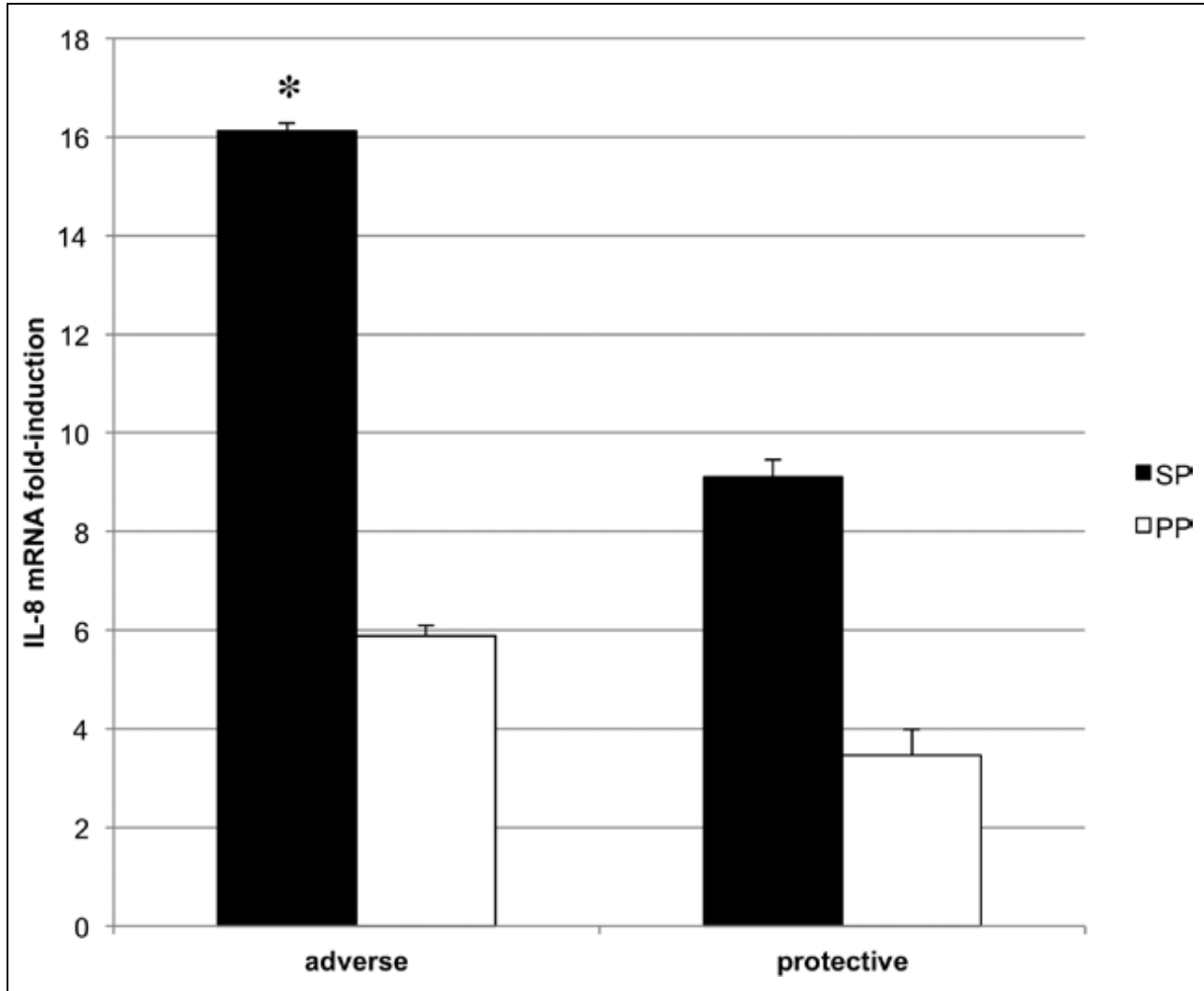
Figure 18 : Aspect histologique en fonction du décubitus dorsal ou ventral dans un modèle de pneumonie acquise sous ventilation mécanique à *Enterobacter aerogenes*



Coupes histologiques des poumons non infectés des animaux avec pneumonie unilatérale à *Enterobacter aerogenes* exposés à une ventilation mécanique agressive (A) ou protectrice (B) en décubitus dorsal (a, lobe supérieur ; b, lobe inférieur) ou en décubitus ventral (c, lobe supérieur, d, lobe inférieur). (Grossissement original : x10 ; coloration : hématoxyline-éosine)

L'infiltration neutrophile était plus importante chez les animaux exposés à une ventilation agressive, surtout si associée au décubitus dorsal. De plus, le décubitus dorsal conduit à une perte d'aération significative des lobes inférieurs, alors que le volume courant paraît uniformément distribué chez les animaux tournés en décubitus ventral, indépendamment de la stratégie de ventilation.

Figure 19 : Evaluation de l'inflammation dans le poumon non infecté



Niveaux de l'ARNm de l'IL-8 dans les poumons non infectés des lapins avec pneumonie unilatérale à *Enterobacter aerogenes* en fonction de la stratégie de ventilation mécanique (agressive ou protectrice) et de la position (décubitus dorsal [SP] ou décubitus ventral [PP]). Toutes les valeurs sont présentées comme fold increase (augmentation relative par rapport aux contrôles sains en ventilation spontané normalisés à 1). Les résultats sont exprimés comme moyenne \pm ET. On observe une réduction de l'expression du gène de l'IL-8 dans les poumons non infectés des animaux tournés en décubitus ventral, indépendamment de la stratégie de ventilation.

* indique une valeur de $p < 0.05$ entre SP et PP.

DISCUSSION

La ventilation mécanique « non protectrice » régule positivement l'expression du TLR2 et sensibilise le poumon au lipopeptide bactérien

Nous avons montré que l'étirement cyclique des cellules pulmonaires et la ventilation mécanique chez les lapins augmentent l'expression de TLR2. L'up-regulation du TLR2 induite par la ventilation mécanique était associée à une augmentation marquée de l'activation des cellules pulmonaires et des lésions pulmonaires après l'inoculation du Pam3CSK4, un classique agoniste TLR2. Ces résultats sont cohérents avec l'augmentation de la réactivité aux agonistes bactériens TLR2 des cellules pulmonaires exposées à un étirement cyclique.

L'étirement cyclique préalable des cellules A549 (cellules humaines alvéolaires type II-like) augmente la réponse inflammatoire par IL-6 et IL-8 induite par le lipopeptide bactérien ; un effet synergique a été observé entre ventilation mécanique et Pam3csk4 dans l'activation du TLR2. Nous ne pouvons quand même pas exclure que l'augmentation de l'expression du TLR2 par les cellules A549 soit due simplement à l'étirement cyclique. En réalité, la libération de médiateurs de l'inflammation par les cellules étirées peut expliquer au moins en partie les résultats que nous rapportons ici (120).

Nous n'avons pas détecté TLR2 à la surface des cellules épithéliales par FACS. En fonction du type de cellules, les TLRs peuvent être exprimés à la surface ou à niveau intracellulaire.

TLR4 par exemple est exprimé à la surface des cellules myéloïdes, mais dans des compartiments intracellulaires dans des cellules épithéliales (comme les clones A549 et BEAS-2B ou les cellules intestinales) ainsi que dans les cellules endothéliales (121, 122).

De la même façon, TLR2 qui est exprimé au niveau de la membrane des cellules myéloïdes, a été retrouvé au niveau intracellulaire dans les cellules épithéliales cornéennes (123).

En utilisant un protocole de perméabilisation nous avons montré que l'étirement cyclique induit l'up-regulation de TLR2 dans les cellules A549. L'ARNm du TLR2 était aussi augmenté par l'étirement cyclique dans les cellules A549.

Il a été montré que l'étirement cyclique induit la transcription de gènes proinflammatoires par le biais des voies de signalisation NF- κ B ou MAPK (112). Nous avons donc testé l'effet des inhibiteurs pharmacologiques des voies de signalisation NF- κ B et MAPK p38 sur

l'induction du TLR2 dépendante de l'étirement cyclique. L'inhibiteur de la MAPK p38 a supprimé l'expression génique du TLR2 induite par l'étirement cyclique, alors que l'inhibiteur du NF- κ B n'a pas eu d'effet. Ces résultats sont cohérents avec le fait que la voie de signalisation MAPK est critique dans l'activation cellulaire induite par l'étirement cyclique. Ces données indiquent aussi que la régulation du TLR2 n'est pas entièrement dépendante de la voie NF- κ B, en fonction du stimulus (124). L'implication de la voie MAPK p38 dans la régulation du TLR2 par l'étirement cyclique est suggestive d'une stabilisation de l'ARNm du TLR2 post-transcriptionnelle plutôt que d'une transcription *de novo* du TLR2, mais ceci reste à vérifier avec des tests qui explorent la phase de transcription du TLR2.

Nous avons par la suite testé si ces résultats *in vitro* pouvaient être reproduits dans un modèle animal. Nous avons montré qu'une ventilation mécanique « non protectrice/agressive » induit une up-regulation marquée du TLR2 pulmonaire. De plus, le traitement avec lipopeptide bactérien des lapins ventilés pendant 24 heures induit une expression marquée de l'IL-8 dans le poumon, ainsi qu'une lésion pulmonaire histologiquement significative par rapport aux lapins en ventilation spontanée.

A notre connaissance notre travail est le premier à mettre en évidence une up-regulation du TLR2 induite par la ventilation mécanique, ainsi qu'un effet synergique entre ventilation mécanique et lipopeptide bactérien.

Nos résultats rappellent ceux retrouvés avec la voie LPS/CD14/TLR4(61, 92, 94, 125, 126), et soulignent l'augmentation de la réactivité des cellules pulmonaires aux produits bactériens Gram-positifs induite par la ventilation mécanique par le biais de la voie TLR2 (97, 127).

De plus, en contraste avec les publications précédentes, nous avons observé que l'étirement cyclique régule positivement TLR2 et TLR4 de façon différente : l'upregulation du TLR2 était beaucoup plus intense, notamment dans le modèle *in vivo*. Il est intéressant de noter que des résultats superposables ont été obtenus dans un modèle *in vitro* de cellules endothéliales humaines exposée soit à un flux laminaire, soit à un flux turbulent (128).

Ces données suggèrent qu'il existe bien une différence réelle entre les TLRs par rapport à la régulation de leur expression induite par des sollicitations mécaniques anormales.

Notre travail rajoute des nouveaux éléments à la masse croissante de connaissances sur le rôle de l'immunité innée dans le développement du VILI. Hillman et coll. ont montré que les

gros volumes courants augmentent l'expression pulmonaire du TLR2 et TLR4 dans un modèle animal d'agneaux prématurés, mais l'effet des agonistes respectifs n'a pas été évalué (129). Villar et coll. ont démontré que l'hyperinflation pulmonaire augmente l'expression du TLR4 dans un modèle de rat avec sepsis abdominal (97) et Hu et coll. ont prouvé que les souris knockout pour le TLR4 sont protégées vis-à-vis du VILI induit par l'hyperinflation pulmonaire (130). Il est intéressant de noter que même une ventilation mécanique « protectrice » avec des petits volumes courants appliquée à des poumons sains de souris peut modifier l'expression du TLR (85).

Il faut cependant rester prudent avant de transposer ces résultats à la clinique, car les réglages du respirateur utilisés ne correspondent pas aux recommandations actuelles sur les petits volumes courants. Le but était de provoquer une hyperdistension dans des poumons sains, objectif difficile à obtenir avec les réglages recommandés (c'est à dire 6 à 8 ml/kg de poids idéal et une pression positive de fin d'expiration). Cependant, même des tels réglages de ventilation « protectrice » peuvent induire une distension excessive régionale lorsqu'ils sont appliqués sur des poumons déjà lésés (72, 78).

Une autre limite importante de notre travail est que nous n'avons pas étudié la relation entre l'importance de l'étirement et l'expression du TLR2, car nous avons utilisé un seul degré d'étirement pour les cellules et un seul volume courant dans le modèle animal. Nous ne pouvons donc conclure de façon définitive que l'expression du TLR2 dépend de l'étirement.

La ventilation mécanique modérément agressive influence l'évolution d'une pneumonie à *Staphylococcus aureus* dans un modèle animal

L'objectif de cette phase d'expérimentation était de déterminer si dans un modèle de pneumonie à *Staphylococcus aureus* la ventilation mécanique altère la réponse immunitaire et la réponse inflammatoire par le biais d'une voie qui implique TLR-2. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une ventilation mécanique « non protectrice » qui induit un étirement modéré des alvéoles puisse amorcer le poumon avec une hyper-expression de TLR-2, qui à

sont tout d'abord augmentées la réponse inflammatoire et les lésions pulmonaires induites par la ventilation mécanique dans un contexte de pneumonie à *Staphylococcus aureus*. Les résultats principaux sont les suivants :

- La ventilation mécanique « non protectrice/agressive » est probablement en mesure de réduire la clairance bactérienne et promouvoir la translocation pulmonaire-systémique dans un modèle animal de pneumonie à *Staphylococcus aureus*.
- La ventilation mécanique aggrave les lésions pulmonaires, y compris l'infiltration des neutrophiles, sans augmenter la libération locale des médiateurs de l'inflammation comme l'IL-8 ; ce n'est pas clair si la régulation positive du TLR-2 induite par l'étirement cyclique des alvéoles peut expliquer ce phénomène ; il est possible que d'autres médiateurs chémo-attractants soient impliqués.
- L'inflammation systémique est fortement induite par la ventilation mécanique, ce qui reflète probablement une augmentation de la réactivité aux produits bactériens au niveau du compartiment sanguin comme suggéré par les expérimentations *ex vivo* ; le mécanisme sous-jacent reste à éclaircir, mais l'augmentation de l'expression du TLR-2 peut avoir contribué à cette hyperréactivité.

Comme dans la première phase de nos expérimentations, nous avons observé des lésions histologiques pulmonaires induites par la VM (Figure 1B). Dans notre modèle de pneumonie induite par l'administration intra-trachéale d'un inoculum de *Staphylococcus aureus* de taille considérable (10^9 UFC), nous avons observé des lésions plus importantes (mesurées par la sévérité du score histologique), chez les animaux sous VM, notamment en termes d'infiltration neutrophile (Fig. 1D, 1F). Nous avons donc documenté que la ventilation mécanique aggrave les lésions d'une pneumonie bactérienne, comme des travaux précédents de notre équipe avaient déjà documenté dans notre modèle de lapin ventilé, mais avec d'autres bactéries (63, 64). On dirait qu'il existe une réelle synergie entre les deux agressions pour le parenchyme pulmonaire, constituées par la VM et l'infection bactérienne.

Compte tenu de notre hypothèse de travail initiale, c'est à dire que l'étirement cyclique provoqué par la ventilation mécanique modifie l'expression des récepteurs de l'immunité innée avec un impact sur la réponse pulmonaire aux infections bactériennes, il est licite de s'interroger sur l'étiologie des lésions pulmonaires observées chez les animaux ventilés :

sont-elles secondaires à une hyper-expression du TLR-2 avec augmentation de la réponse inflammatoire devant la même charge bactérienne, ou alors plutôt à une réduction de la clearance bactérienne qui exposerait les cellules alvéolaires à plus de micro-organismes ?

Les charge bactériennes pulmonaires étaient comparables entre animaux ventilés et non ventilés à la 8^{ème} heure après l'instillation intra-trachéale, cependant la réduction de la charge bactérienne était minime entre l'évaluation précoce et l'évaluation à la 24^{ème} heure dans le groupe ventilé, contrairement à ce qui a été observé chez les animaux en ventilation spontanée. Nous pouvons en conclure donc que s'il existe une différence de clairance bactérienne entre les deux groupes, il est possible de la mettre en évidence seulement avec une évaluation « tardive ». Cette interprétation confirme des observations effectuées précédemment par notre équipe, et met en avant l'intérêt de notre modèle de lapin ventilé pendant 48 heures. Effectivement, Dhanirredy et coll. (131) n'avaient trouvé aucune différence dans leur modèle murin de pneumonie à *Staphylococcus aureus* ventilé pour seulement 12 heures. Comme dans le travail que nous venons de citer, dans notre modèle la dissémination bactérienne extra-pulmonaire documentée par des cultures de rate était limitée. Il est intéressant de remarquer que dans le groupe ventilé nous avons documenté une dissémination plus précoce, à la 8^{ème} heure, alors que à la 24^{ème} heure les différences entre les deux groupes disparaissent, mais les effectifs sont trop limités pour pouvoir spéculer sur ce résultat. Nous en concluons que dans notre modèle l'aggravation des lésions histologiques n'augmente pas la translocation bactérienne systémique du *S. aureus*.

Lorsque nous avons évalué la réponse inflammatoire, nous n'avons pas mis en évidence clairement une augmentation de la réponse inflammatoire induite par la VM, ni en termes d'expression génique ni en termes de concentration de cytokines dosées dans l'homogénat pulmonaire et dans l'LBA. Nos choix techniques peuvent être partiellement responsables de ces résultats, car nous n'avons pas utilisé des inhibiteurs des protéases dans les échantillons pour l'ELISA, et nous n'avons mesuré les niveaux d'ARNm qu'à la 8^{ème} heure (mais ce choix était basé sur des pics de production d'ARNm documentés dans les travaux précédents de notre équipe). Une autre possible explication est l'hétérogénéité des souches de *S. aureus* (132), qui ont une capacité différente de stimuler le TLR-2 en fonction de l'expression de surface des lipoprotéines reconnues par TLR-2 : la down-regulation de l'activité TLR-2, c'est à dire de la capacité de le stimuler, est associée à une réduction de la

stimulation du système immunitaire et de la production de cytokines. Cet aspect reflète la complexité des phénomènes inflammatoires pendant une pneumonie bactérienne, et même si TLR-2 joue un rôle prépondérant dans la reconnaissance du *S. aureus* par les cellules de l'immunité innée, d'autres voies et médiateurs peuvent être impliqués.

Contrairement à nos hypothèses, même si l'exposition du poumon à un agoniste recombinant du TLR-2 (Pam3CSK4) provoque une réaction inflammatoire significative en elle-même (surtout IL-8), l'association de ce stimulus avec la ventilation mécanique n'a pas augmenté l'inflammation.

En revanche, nous avons observé une augmentation de la réponse inflammatoire systémique (c'est-à-dire des niveaux plasmatiques d'IL-8 et de TNF- α) chez les animaux sous ventilation mécanique.

Nous avons par la suite essayé de répondre à la question du rôle joué par TLR-2 dans la réponse inflammatoire en cas de pneumonie acquise sous ventilation mécanique à *S. aureus*. Nos résultats suggèrent que la réponse inflammatoire systémique observée dans ce modèle de PAVM dépend, au moins en partie, de la voie du TLR-2 dans les globules blancs circulants. Avec l'objectif de mieux comprendre les différences entre réponse inflammatoire pulmonaire et systémique, nous avons essayé d'identifier les différences dans l'expression du TLR-2. Nous avons en effet montré une hyper-expression du TLR-2 dans l'homogénat pulmonaire chez les animaux ventilés, et des valeurs encore plus élevées chez les animaux infectés sous ventilation mécanique, qui semble avoir un effet synergique. Nous avons évalué aussi les niveaux d'ARNm au niveau de la rate, comme indicateur indirect de l'expression du TLR-2 dans les cellules immunes circulantes (133), et nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression du gène du TLR-2 sous ventilation mécanique, mais sans l'effet synergique observé au niveau pulmonaire. Une explication possible de nos résultats pourrait être que les médiateurs de l'inflammation et/ou les perturbations physico-chimiques induites par la VM et par la PAVM à *S. aureus* puissent amorcer les neutrophiles qui transitent par la circulation pulmonaire. Il a déjà été montré que l'amorçage est un prérequis indispensable pour les lésions tissulaires induites par les neutrophiles ; en effet, il existe des arguments solides pour penser que le recrutement pulmonaire d'un grand nombre de neutrophiles amorcés et donc « hyper-réactifs » puisse jouer un rôle clé dans la genèse du SDRA (134) . Récemment Summers et coll. (135) ont

montré que les neutrophiles amorcés sont normalement « désamorcés » et libérés dans la circulation systémique par les poumons, mais ce mécanisme physiologique de « désamorçage » peut être défaillant chez les patients en SDRA, ce qui conduit à une augmentation du nombre de neutrophiles amorcés dans la circulation systémique.

Plusieurs points doivent être pris en compte lors de l'interprétation des résultats de notre étude. En premier lieu, la force de cette étude est constituée par les 48 heures de ventilation mécanique, qui sont rarement atteintes dans les modèles expérimentaux, et qui sont plus proches de la réalité clinique, ce qui nous autorise à généraliser plus facilement et à transposer nos résultats. Ce modèle de lapin constitue un système expérimental réellement pertinent sur le plan clinique pour explorer les mécanismes avec lesquels la VM contribue à la progression d'une infection bactérienne pulmonaire vers l'ALI et l'inflammation systémique. Avec ce modèle nous avons montré que la ventilation mécanique « non protectrice » aggrave les lésions pulmonaires en cas d'infection bactérienne en réduisant la clairance bactérienne. En outre, l'association de VM et infection bactérienne conduit à une augmentation de la réponse inflammatoire systémique sans promouvoir la dissémination bactérienne. L'hyper-expression du TLR-2 induite par la VM pourrait contribuer à cette augmentation de l'inflammation.

Notre étude a plusieurs limitations. La définition de ventilation « non protectrice » est arbitraire, même si confortée par la littérature dans les blocs opératoires (136), et le volume courant utilisé correspond aux stratégies traditionnelles chez les patients sans et avec ALI (69, 137). La PEEP est habituellement utilisée chez les patients sous ventilation mécanique pour améliorer l'oxygénation, probablement par le biais du recrutement alvéolaire (138). Dans notre design expérimental nous n'avons pas prévu la réalisation d'un bras de contrôle avec PEEP, et donc nous ne pouvons pas attribuer avec certitude les lésions induites par la ventilation mécanique au volume courant plutôt que à l'absence de la PEEP. L'évaluation du TLR-2 est limitée à l'expression génique, et par conséquent nous ne connaissons pas la localisation exacte de l'hyperexpression du TLR-2, qui peut être située au niveau des cellules alvéolaires mais aussi au niveau d'autres cellules qui expriment ce récepteur, comme les neutrophiles. Tous nos efforts de mettre en évidence la topographie de la distribution du TLR-2 avec une technique d'immunohistochimie se sont malheureusement soldés par un échec ; une possible explication a déjà été évoquée plus

haut, c'est à dire qu'en fonction du type de cellules, les TLRs peuvent être exprimés à la surface ou à niveau intracellulaire ; notamment le TLR-2 qui est exprimé au niveau de la membrane des cellules myéloïdes, a été retrouvé au niveau intracellulaire dans des cellules épithéliales.

Même si les premières preuves expérimentales de l'existence du VILI ont été publiées il y a trente ans (49), l'utilisation des paramètres de ventilation « protectrice » est devenue courante seulement au début des années 2000 après la publication de l'ARDS network (69), et limitée au patients avec ARDS. Les études pré-cliniques ont montré presque sans exception que la ventilation avec des volumes courants plus bas limite les effets délétères de la ventilation sur les poumons « sains » des animaux (139). En réalité, il existe de plus en plus de preuves que l'utilisation de petits volumes courants peut être utile aussi aux patients qui n'ont pas de lung injury au début de la VM : dans une récente méta-analyse, Neto et coll. ont montré une réduction significative de l'incidence des infections pulmonaires acquises sous VM avec l'utilisation d'une stratégie de ventilation « protectrice » avec petits volumes courants dans une population de réanimation chirurgicale (140) ; Futier et coll. ont montré une réduction des complications pulmonaires principales nécessitant une VM (pneumonies) avec une stratégie de ventilation « protectrice » dans une population de patients opérés pour une chirurgie abdominale majeure (141). Malgré l'évolution des connaissances dans ce domaine, jusqu'à 16% des patients continue à recevoir une ventilation « non protectrice » au bloc opératoire (136).

Notre travail, même s'il ne fournit pas une explication complète, peut aider à la compréhension du rôle de l'immunité innée dans l'augmentation des infections pulmonaires après ventilation mécanique « non protectrice ».

Impact du décubitus ventral sur un modèle animal de pneumonie bactérienne unilatérale acquise sous ventilation mécanique

Dans cette dernière série d'expérimentations, nous avons focalisé notre attention sur le décubitus ventral, une « simple » méthode mécanique qui permet de réduire l'étirement auquel sont exposées les cellules alvéolaires pendant la ventilation mécanique.

Nous avons montré que le changement de la position en DD à la position en DV permet de limiter les lésions induites par une pneumonie unilatérale acquise sous ventilation mécanique à *E. aerogenes*, et ce indépendamment de la stratégie de ventilation mécanique utilisée (« protectrice » ou « non protectrice/agressive »). Nous avons notamment mis en évidence que les charges bactériennes sont réduites chez les lapins en DV par rapport aux lapins en DD, à la fois dans le poumon infecté et à distance au niveau splénique.

De plus, les concentrations d'IL-8, un puissant chémo-attractant pour les polymorphonucléaires, étaient plus élevées dans le poumon infecté des animaux en décubitus dorsal, mais aussi dans un organe extra-pulmonaire, la rate, ce qui suggère que le DV peut éteindre à la fois l'inflammation pulmonaire et systémique.

En synthèse, nos résultats suggèrent que, dans notre modèle, le décubitus ventral améliore la clairance bactérienne pulmonaire, réduit la translocation bactérienne pulmonaire-systémique, et limite la réponse inflammatoire systémique.

En outre, nous avons montré que, dans ce modèle de lésion pulmonaire lobaire, le DV était en mesure de réduire les lésions induites par la VM au poumon non infecté ainsi que de moduler l'inflammation. De plus, nos résultats confirment l'hypothèse que, bien que la pneumonie soit moins sévère en utilisant une ventilation mécanique « protectrice », on peut obtenir une ultérieure amélioration avec le DV.

La meilleure façon de ventiler les patients avec une lésion pulmonaire reste un problème ouvert, et l'amélioration des échanges gazeux et l'optimisation du recrutement alvéolaire en sont probablement les points clés. Cependant, des modèles animaux de pneumonie associée à la ventilation mécanique similaires au nôtre ont montré que la ventilation mécanique en cas de pneumonie pourrait induire une hyper distension des voies aériennes non seulement dans le poumon infecté mais aussi dans le poumon « sain » (72, 142). Cet effet délétère de la VM a été attribué à la perte d'aération à l'intérieur de la zone pulmonaire infectée, qui ne peut pas être facilement recrutée par pression positive, à cause d'une baisse de la compliance pulmonaire dépendante de l'importance de la réponse inflammatoire locale (143). La conséquence est que l'effet protecteur de la PEEP à des niveaux de pression modérés peut devenir dangereux si l'on augmente les niveaux de pression car on peut générer une hyperdistension pulmonaire du poumon non infecté (81, 144). Le DV a été proposée principalement comme un moyen efficace pour améliorer les échanges gazeux

chez les patients atteints des formes les plus graves de ALI (145). Plus récemment, il a été démontré que le DV permet une meilleure répartition de l'inflation du poumon le long de l'axe cranio-caudale grâce à l'amélioration du recrutement alvéolaire et de la compliance du système respiratoire (101, 146). Fait intéressant, certains auteurs ont montré que les patients chez lesquels le passage en DV améliorait la compliance du système respiratoire présentaient plus fréquemment une atteinte pulmonaire lobaire, y compris des pneumonies (101). En outre, si les études cliniques du début des années 2000 ont montré que le DV peut soit prévenir l'apparition de pneumonies associées à la ventilation mécanique (147) soit améliorer l'outcome de pneumonies associées à la ventilation mécanique déjà constituées (148), plus récemment il a été prouvé qu'en cas d'ARDS sévère le DV réduit la mortalité des patients (99). Nos résultats fournissent des indications supplémentaires qui sont susceptibles d'améliorer notre compréhension sur le fonctionnement du DV, car ils établissent un lien entre les effets bénéfiques bien connus du DV sur la mécanique respiratoire, et une possible amélioration de la réponse de l'hôte contre les infections bactériennes.

Cependant nous n'avons pas été en mesure à cette étape de l'expérimentation de déterminer la nature des mécanismes sous-jacents, dans la mesure où l'immunité innée de l'hôte est possiblement concernée. D'autres études sont nécessaires, car comme le montrent les données des expérimentations précédentes la voie des récepteurs Toll-like pourrait être modifiée par l'étirement mécanique inhabituel auquel sont exposés les poumons soumis à VM. On ne peut que spéculer que le DV atténue la distension du poumon, ce qui entraîne à son tour une réduction de la libération d'IL-8, protégeant ainsi l'hôte contre les effets nuisibles d'une réponse inflammatoire plus importante.

En plus de ces effets bénéfiques du DV sur les poumons infectés liés à la clairance bactérienne et à la réponse inflammatoire, nous avons montré que le DV était probablement en mesure de réduire les lésions pulmonaires dans les poumons non infectés. La diminution de la pCO_2 secondaire à l'augmentation du volume courant était la même quelle que soit la position du corps, ce qui indique que le DV n'augmente pas nécessairement le volume télé-expiratoire, tel que rapporté précédemment chez des patients en ARDS (145, 149). De façon surprenante, la distribution de l'aération était différente en DD et en DV. Dans le groupe en DD, nous avons observé une réduction importante de l'aération des lobes

inférieurs, alors que les espaces alvéolaires des lobes supérieurs étaient élargis, avec apparition de lésions de type emphysémateux. En outre, la présence de membranes hyalines, un des signes histologiques typiques du VILI, a été retrouvée exclusivement chez les animaux de DD. Des résultats similaires ont été obtenus avec des réglages de ventilation « protectrice », même si les lésions tissulaires étaient moins sévères.

Il est intéressant de noter que l'expression du gène de l'IL-8 était nettement plus importante dans les poumons non infectés des lapins en DD par rapport à ceux des lapins en DV, indépendamment de la stratégie de ventilation. Ceci pourrait être considéré un équivalent de biotrauma, qui indiquerait ainsi un niveau de distension des espaces alvéolaires plus importante dans le groupe en DD (112). De façon surprenante, il n'y avait pas de différence entre les animaux en DD et ceux en DV exposés à une ventilation « non protectrice/agressive » en ce qui concerne la formation d'œdème pulmonaire d'hyperperméabilité mesurée par le rapport poids humide/poids sec au niveau des poumons non infectés. Nous pouvons seulement émettre l'hypothèse qu'il existait bien une différence entre les groupes, avec une distribution différente de l'œdème entre lobes supérieurs et inférieurs, qui n'a pas pu être mise en évidence par notre méthode de mesure qui évaluait le poumon dans sa globalité. Cependant, comme attendu, la ventilation « protectrice » avec réduction du volume courant et utilisation d'une PEEP, a permis de réduire le rapport poids humide/poids sec, et le passage en DV a permis d'obtenir une ultérieure amélioration.

Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent que le DV améliore la distribution du volume courant, réduisant ainsi l'hyper-distension des espaces alvéolaires et donc le risque de développement du VILI, comme déjà démontré dans des modèles animaux de lésion pulmonaire diffuse (109, 110, 116).

Cette partie de notre travail a plusieurs limitations. En premier lieu, il faut être très prudent avant d'extrapoler nos résultats à l'homme, car il est bien connu que les petits animaux sont plus susceptibles de développer un VILI que les plus grands ; de plus, les réglages de ventilation mécanique utilisés dans le groupe ventilation « non protectrice/agressive » sont très différents de la pratique clinique et des recommandations actuelles. La modalité d'induction de la pneumonie ainsi que la courte durée de la ventilation mécanique sont spécifiques à notre modèle, et d'autres études expérimentales sont nécessaires avant de

pouvoir généraliser ses résultats. Deuxièmement, on pourrait nous opposer que la croissance bactérienne était mieux contrôlée en DV tout simplement grâce à un meilleur drainage des sécrétions bronchiques et donc indépendante des modifications de l'étirement du poumon (150); cependant le drainage expliquerait difficilement l'aggravation des lésions du poumon controlatéral. En troisième lieu, l'évaluation hémodynamique n'a pas été effectuée de façon systématique; en conséquence, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la réduction dans la translocation pulmonaire-systémique soit secondaire à une baisse du débit cardiaque dans le groupe en DV. Cependant, plusieurs études cliniques et expérimentales n'ont trouvé aucune différence sur ce point (110, 146, 151, 152). Et pour terminer, nous devons reconnaître que l'absence de calcul des effectifs à priori et la petite taille de nos groupes expérimentaux rendent l'interprétation des statistiques de notre étude difficile par manque de puissance.

Perspectives

Il est souvent le cas qu'une enquête scientifique livre plus de questions que de réponses. Notre travail avait des objectifs très ambitieux au départ et, s'il n'a pas pu répondre avec certitude à toutes les questions posées, il ouvre des perspectives intéressantes pour des travaux ultérieurs, qui permettront de passer de la recherche fondamentale à la recherche translationnelle et peut être de trouver un jour des applications cliniques.

Parmi les questions supplémentaires intéressantes qui se posent, une de première importance est la modulation du TLR-2, à la fois au niveau pulmonaire et au niveau des cellules circulantes qui jouent un rôle dans l'immunité innée, qui pourrait peut être limiter la réaction inflammatoire systémique et les lésions parenchymateuses pulmonaires et réduire ainsi la gravité des pneumonies bactériennes acquises sous ventilation mécanique. De nombreuses équipes s'intéressent déjà à la modulation du TLR-2 dans d'autres domaines, comme par exemple son rôle au niveau endothélial dans le syndrome ischémie réperfusion. Une liste non exhaustive des modalités de modulation du TLR-2 déjà à l'étude et présentée dans le tableau 6 avec, entre autres, des anticorps anti-TLR2 ou du TLR2 soluble recombinant. L'utilisation d'anticorps monoclonaux bloquants le récepteur n'est probablement pas la bonne solution dans ce modèle de pathologie infectieuse, car un blocage excessif de la voie des TLR risquerait de réduire la clearance bactérienne ; un modèle intéressant à développer comporterait une association d'une antibiothérapie au traitement immunomodulateur.

Une autre piste intéressante à explorer est celle des alarmines, des molécules endogènes associées aux lésions cellulaires (Damage Associated Molecular Pattern ou DAMP). Ces molécules sont exprimées et excrétées lors de la mort cellulaire non programmée et par certaines cellules immunitaires lors d'une inflammation, deux conditions constamment retrouvées dans les lésions épithéliales pulmonaires. Les alarmines, notamment High-Mobility Group Box 1 protein (HMGB1) (153), ont ainsi longtemps été considérées comme des marqueurs de l'atteinte tissulaire. Cependant, plusieurs études ont démontré qu'elles participent activement à la constitution des lésions cellulaires, et qu'elles interagissent avec les TLR (154). Il a été par exemple montré que

l'inhibition de HMGB1 par un anticorps monoclonal améliore la clairance bactérienne et protège contre la pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* dans un modèle animal de mucoviscidose (155). Une suite logique de notre travail serait ainsi l'évaluation de la production d'alarmines suite à un étirement cyclique et l'identification des voies de signalisations liées aux alarmines, notamment celles qui passent par TLR-2, dans différents modèles de lésions pulmonaires et de ventilation mécanique.

Une dernière question qui se pose à la suite logique de nos travaux est si les modifications dans la réponse inflammatoire et la clairance bactérienne que nous avons observées avec le décubitus ventral sont associées à des modifications de l'expression des TLR, notamment TLR-4 dans notre modèle de pneumonie à bacille gram négatif, et si dans notre modèle il existe une différence entre le poumon lésé et le poumon controlatéral. A notre connaissance il n'existe à ce jour aucune publication qui explore ces aspects de la physiopathologie du décubitus ventral.

CONCLUSIONS

L'étirement cyclique des cellules *in vitro*, qui reproduit le stress mécanique généré par la ventilation mécanique, induit l'expression du TLR2 et augmente la réactivité des cellules épithéliales humaines au lipopeptide bactérien agoniste du TLR2, probablement par le biais de la voie de signalisation MAPK p38. Ces résultats ont été en partie reproduits dans un modèle animal de lapin, dans lequel une ventilation mécanique « non protectrice/agressive » augmente les lésions en réponse à l'instillation intratrachéale d'un lipopeptide bactérien agoniste TLR2.

Transposés dans le contexte clinique, nos résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression du TLR2 dans l'épithélium pulmonaire provoquée par la ventilation mécanique pourrait amorcer la réponse inflammatoire du poumon, qui hyper-réagirait par la suite à la présence dans les voies aériennes d'une colonisation ou d'une infection par des bactéries Gram-positives en aggravant ainsi les lésions pulmonaires. L'impact potentiel sur la clairance bactérienne pulmonaire mérite ultérieures explorations.

La ventilation mécanique « non protectrice/agressive » est probablement en mesure de réduire la clairance bactérienne et promouvoir la translocation pulmonaire-systémique dans un modèle animal de pneumonie à *Staphylococcus aureus*.

La ventilation mécanique « non protectrice/agressive » aggrave les lésions pulmonaires, y compris l'infiltration des neutrophiles, sans augmenter la libération locale des médiateurs de l'inflammation comme l'IL-8 ; ce n'est pas clair si la régulation positive du TLR-2 induite par l'étirement cyclique des alvéoles peut expliquer ce phénomène ; il est possible que d'autres médiateurs chémo-attractants soient impliqués.

L'inflammation systémique est fortement induite par la ventilation mécanique « non protectrice/agressive », ce qui reflète probablement une augmentation de la réactivité aux produits bactériens au niveau du compartiment sanguin comme suggéré par les expérimentations *ex vivo* ; le mécanisme sous-jacent reste à éclaircir, mais l'augmentation de l'expression du TLR-2 peut avoir contribué à cette hyperréactivité.

Dans un modèle animal exposé à une ventilation mécanique « non protectrice » avec une atteinte pulmonaire lobaire d'origine bactérienne, le décubitus ventral (comparé au décubitus dorsal) peut non seulement améliorer la mécanique respiratoire et les échanges gazeux, mais aussi améliorer les défenses antibactériennes avec une réduction de la charge bactérienne et mitiger l'inflammation pulmonaire et systémique en limitant l'apparition du ventilator-induced lung injury dans le poumon controlatéral.

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles dans des revues internationales à comité de lecture répertoriées dans des bases de données internationales

1. **Barbar SD**, Pauchard LA, Bruyère R, Bruillard C, Hayez D, Croisier-Bertin D, Pugin J, Charles PE.
« *Impact of mild-stretch mechanical ventilation on the development of Staphylococcus aureus pneumonia in rabbit* ».

Soumis

2. Ladoire S, Pauchard LA, **Barbar SD**, Tissières P, Croisier-Bertin D, Charles PE.
« *Impact of the prone position in an animal model of unilateral bacterial pneumonia undergoing mechanical ventilation.*»

Anesthesiology. 2013 May;118(5):1150-9

3. Charles PE, Tissières P, **Barbar SD**, Croisier D, Dufour J, Dunn-Siegrist I, Chavanet P, Pugin J.
« *Mild-stretch mechanical ventilation up-regulates toll-like receptor 2 and sensitizes the lung to bacterial lipopeptide* ».

Crit Care. 2011 Jul 27;15(4):R181.

4. P.E. Charles, **S. Barbar**

« *Toll-like receptors: a link between mechanical ventilation, innate immunity and lung injury?*»

Intensive Care Med. 2010 Jun;36(6):909-11. Epub 2010 Apr 16. Editorial.

Communications par affiche dans un congrès national ou international

1. **S.D. Barbar**, P.E. Charles, P. Tissières, D. Croisier, J. Dufour, P. Chavanet, J. Pugin

« Mechanical ventilation up regulates Toll-like receptor 2 and activation of the lung by bacterial lipopeptide ».

Communication affichée n.84 - Actes du 21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases – Milan – Italie, 7-10 mai 2011

2. R. Bruyère, L.A. Pauchard, **S.D. Barbar**, F. Dalle, P.E. Charles

« Impact de la ventilation mécanique sur la réponse inflammatoire pulmonaire et systémique de l'hôte médiée par TLR2 dans un modèle animal de PAVM à SARM ».

Réanimation 2013; - Actes du 41^{ème} Congrès de la Société de Réanimation de Langue Française – Paris - France, 16-18 janvier 2013

Bibliographie

1. West AP, Koblansky AA, Ghosh S. Recognition and signaling by toll-like receptors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:409-437.
2. Gay NJ, Gangloff M. Structure and function of Toll receptors and their ligands. *Annu Rev Biochem* 2007;76:141-165.
3. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86(6):973-983.
4. Leulier F, Lemaitre B. Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet* 2008;9(3):165-178.
5. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124(4):783-801.
6. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood* 2009;113(7):1399-1407.
7. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, et al. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(2):588-593.
8. Oliveira-Nascimento L, Massari P, Wetzler LM. The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol* 2012;3:79.
9. Zahringer U, Lindner B, Inamura S, et al. TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology* 2008;213(3-4):205-224.
10. Flo TH, Halaas O, Torp S, et al. Differential expression of Toll-like receptor 2 in human cells. *J Leukoc Biol* 2001;69(3):474-481.
11. Gay NJ, Keith FJ. *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991;351(6325):355-356.
12. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;388(4):621-625.
13. Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, et al. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* 2007;8:124.
14. Jin MS, Kim SE, Heo JY, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 2007;130(6):1071-1082.
15. Buwitt-Beckmann U, Heine H, Wiesmuller KH, et al. TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides. *J Biol Chem* 2006;281(14):9049-9057.
16. Curtin JF, Liu N, Candolfi M, et al. HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression. *PLoS Med* 2009;6(1):e10.
17. Funderburg N, Lederman MM, Feng Z, et al. Human α -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(47):18631-18635.

18. Scheibner KA, Lutz MA, Boodoo S, et al. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J Immunol* 2006;177(2):1272-1281.
19. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 2005;17(4):359-365.
20. Erridge C. Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol* 2010;87(6):989-999.
21. Beutler B, Jiang Z, Georgel P, et al. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* 2006;24:353-389.
22. Nakata T, Yasuda M, Fujita M, et al. CD14 directly binds to triacylated lipopeptides and facilitates recognition of the lipopeptides by the receptor complex of Toll-like receptors 2 and 1 without binding to the complex. *Cell Microbiol* 2006;8(12):1899-1909.
23. Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, et al. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 2005;433(7025):523-527.
24. Drage MG, Pecora ND, Hise AG, et al. TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Immunol* 2009;258(1):29-37.
25. Jimenez-Dalmaroni MJ, Xiao N, Corper AL, et al. Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a co-receptor for TLR2. *PLoS One* 2009;4(10):e7411.
26. Ip WK, Takahashi K, Ezekowitz RA, et al. Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev* 2009;230(1):9-21.
27. Ip WK, Takahashi K, Moore KJ, et al. Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. *J Exp Med* 2008;205(1):169-181.
28. Stuart LM, Deng J, Silver JM, et al. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 2005;170(3):477-485.
29. Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, et al. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol* 2008;10(10):2058-2066.
30. Raby AC, Le Boudier E, Colmont C, et al. Soluble TLR2 reduces inflammation without compromising bacterial clearance by disrupting TLR2 triggering. *J Immunol* 2009;183(1):506-517.
31. Dulay AT, Buhimschi CS, Zhao G, et al. Soluble TLR2 is present in human amniotic fluid and modulates the intraamniotic inflammatory response to infection. *J Immunol* 2009;182(11):7244-7253.
32. Chopin C. L'histoire de la ventilation mécanique : des machines et des hommes. *Réanimation* 2007.
33. Alluaume R. [Pulmotor; apparatus for assisted or controlled respiration]. *Anesth Anal* 1951;8(1):42-46.

34. Lassen HC. A preliminary report on the 1952 epidemic of poliomyelitis in Copenhagen with special reference to the treatment of acute respiratory insufficiency. *Lancet* 1953;1(6749):37-41.
35. Ibsen B. The anaesthetist's viewpoint on the treatment of respiratory complications in poliomyelitis during the epidemic in Copenhagen, 1952. *Proc R Soc Med* 1954;47(1):72-74.
36. Engstrom CG. Treatment of severe cases of respiratory paralysis by the Engstrom universal respirator. *Br Med J* 1954;2(4889):666-669.
37. Nash G, Blennerhassett JB, Pontoppidan H. Pulmonary lesions associated with oxygen therapy and artificial ventilation. *N Engl J Med* 1967;276(7):368-374.
38. Kumar A, Pontoppidan H, Falke KJ, et al. Pulmonary barotrauma during mechanical ventilation. *Crit Care Med* 1973;1(4):181-186.
39. Motley HL, Cournand A, et al. Intermittent positive pressure breathing; a means of administering artificial respiration in man. *J Am Med Assoc* 1948;137(4):370-382.
40. Cournand A, Motley HL, et al. Physiological studies of the effects of intermittent positive pressure breathing on cardiac output in man. *Am J Physiol* 1948;152(1):162-174.
41. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, et al. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *The American review of respiratory disease* 1988;137(5):1159-1164.
42. Cook DJ, Kollef MH. Risk factors for ICU-acquired pneumonia. *Jama* 1998;279(20):1605-1606.
43. Cook DJ, Walter SD, Cook RJ, et al. Incidence of and risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Ann Intern Med* 1998;129(6):433-440.
44. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 1998;338(6):347-354.
45. Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury: from barotrauma to biotrauma. *Respir Care* 2005;50(5):646-659.
46. de Prost N, Ricard JD, Saumon G, et al. Ventilator-induced lung injury: historical perspectives and clinical implications. *Ann Intensive Care* 2011;1(1):28.
47. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, et al. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967;2(7511):319-323.
48. Mead J, Takishima T, Leith D. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J Appl Physiol* 1970;28(5):596-608.
49. Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *The American review of respiratory disease* 1974;110(5):556-565.
50. Parker JC, Townsley MI, Rippe B, et al. Increased microvascular permeability in dog lungs due to high peak airway pressures. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 1984;57(6):1809-1816.

51. Dreyfuss D, Basset G, Soler P, et al. Intermittent positive-pressure hyperventilation with high inflation pressures produces pulmonary microvascular injury in rats. *The American review of respiratory disease* 1985;132(4):880-884.
52. Pingleton SK. Complications of acute respiratory failure. *The American review of respiratory disease* 1988;137(6):1463-1493.
53. Leroy d'Etiolles J. Second mémoire sur l'asphyxie. *J Physiol Exper Path* 1828;8(97-135).
54. Hernandez LA, Peevy KJ, Moise AA, et al. Chest wall restriction limits high airway pressure-induced lung injury in young rabbits. *J Appl Physiol* 1989;66(5):2364-2368.
55. Carlton DP, Cummings JJ, Scheerer RG, et al. Lung overexpansion increases pulmonary microvascular protein permeability in young lambs. *J Appl Physiol* 1990;69(2):577-583.
56. Bilek AM, Dee KC, Gaver DP, 3rd. Mechanisms of surface-tension-induced epithelial cell damage in a model of pulmonary airway reopening. *J Appl Physiol* 2003;94(2):770-783.
57. Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside. *Intensive Care Med* 2006;32(1):24-33.
58. Dreyfuss D, Saumon G. Role of tidal volume, FRC, and end-inspiratory volume in the development of pulmonary edema following mechanical ventilation. *The American review of respiratory disease* 1993;148(5):1194-1203.
59. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(1):294-323.
60. Kawano T, Mori S, Cybulsky M, et al. Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *J Appl Physiol* 1987;62(1):27-33.
61. Pugin J, Dunn I, Jolliet P, et al. Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *Am J Physiol* 1998;275(6 Pt 1):L1040-1050.
62. Marquette CH, Wermert D, Wallet F, et al. Characterization of an animal model of ventilator-acquired pneumonia. *Chest* 1999;115(1):200-209.
63. Charles PE, Piroth L, Desbiolles N, et al. New model of ventilator-associated pneumonia in immunocompetent rabbits. *Crit Care Med* 2002;30(10):2278-2283.
64. Charles PE, Etienne M, Croisier D, et al. The impact of mechanical ventilation on the moxifloxacin treatment of experimental pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Crit Care Med* 2005;33(5):1029-1035.
65. Pugin J, Dunn-Siegrist I, Dufour J, et al. Cyclic stretch of human lung cells induces an acidification and promotes bacterial growth. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;38(3):362-370.
66. Brégeon. Conventional mechanical ventilation of healthy lungs induced pro-inflammatory cytokine gene transcription. *Resp Physiol Neurobiol* 2002.

67. Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, et al. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care* 2009;13(1):R1.
68. Villar J. Low vs high positive end-expiratory pressure in the ventilatory management of acute lung injury. *Minerva Anestesiol* 2006;72(6):357-362.
69. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* 2000;342(18):1301-1308.
70. Otto CM, Markstaller K, Kajikawa O, et al. Spatial and temporal heterogeneity of ventilator-associated lung injury after surfactant depletion. *J Appl Physiol* 2008;104(5):1485-1494.
71. Pavone L, Albert S, DiRocco J, et al. Alveolar instability caused by mechanical ventilation initially damages the nondependent normal lung. *Crit Care* 2007;11(5):R104.
72. Sartorius A, Lu Q, Vieira S, et al. Mechanical ventilation and lung infection in the genesis of air-space enlargement. *Crit Care* 2007;11(1):R14.
73. Nahum A, Hoyt J, Schmitz L, et al. Effect of mechanical ventilation strategy on dissemination of intratracheally instilled *Escherichia coli* in dogs. *Crit Care Med* 1997;25(10):1733-1743.
74. Cakar N, Akinci O, Tugrul S, et al. Recruitment maneuver: does it promote bacterial translocation? *Crit Care Med* 2002;30(9):2103-2106.
75. Bouadma L, Schortgen F, Ricard JD, et al. Ventilation strategy affects cytokine release after mesenteric ischemia-reperfusion in rats. *Crit Care Med* 2004;32(7):1563-1569.
76. Schortgen F, Bouadma L, Joly-Guillou ML, et al. Infectious and inflammatory dissemination are affected by ventilation strategy in rats with unilateral pneumonia. *Intensive Care Med* 2004;30(4):693-701.
77. Savel RH, Yao EC, Gropper MA. Protective effects of low tidal volume ventilation in a rabbit model of *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 2001;29(2):392-398.
78. Terragni PP, Rosboch G, Tealdi A, et al. Tidal hyperinflation during low tidal volume ventilation in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175(2):160-166.
79. Constantin JM, Grasso S, Chanques G, et al. Lung morphology predicts response to recruitment maneuver in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2010;38(4):1108-1117.
80. Charles PE, Martin L, Etienne M, et al. Influence of positive end-expiratory pressure (PEEP) on histopathological and bacteriological aspects of pneumonia during low tidal volume mechanical ventilation. *Intensive Care Med* 2004;30(12):2263-2270.

81. Kurahashi K, Ota S, Nakamura K, et al. Effect of lung-protective ventilation on severe *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia and sepsis in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287(2):L402-410.
82. Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator-induced injury: from barotrauma to biotrauma. *Proc Assoc Am Physicians* 1998;110(6):482-488.
83. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, et al. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997;99(5):944-952.
84. Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G. Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(5):1176-1180.
85. Vaneker M. Low-tidal-volume Mechanical Ventilation Induces a Toll-like Receptor 4-dependent Inflammatory Response in Healthy Mice. *Anesthesiology* 2008.
86. Tsuno K, Miura K, Takeya M, et al. Histopathologic pulmonary changes from mechanical ventilation at high peak airway pressures. *The American review of respiratory disease* 1991;143(5 Pt 1):1115-1120.
87. Markos J, Doerschuk CM, English D, et al. Effect of positive end-expiratory pressure on leukocyte transit in rabbit lungs. *J Appl Physiol* 1993;74(6):2627-2633.
88. Slutsky AS, Tremblay LN. Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor? *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(6 Pt 1):1721-1725.
89. Martin TR, Frevert CW. Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(5):403-411.
90. Kuipers MT, van der Poll T, Schultz MJ, et al. Bench-to-bedside review: Damage-associated molecular patterns in the onset of ventilator-induced lung injury. *Crit Care* 2011;15(6):235.
91. Altemeier WA, Matute-Bello G, Frevert CW, et al. Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287(3):L533-542.
92. Bregeon F, Delpierre S, Chetaille B, et al. Mechanical ventilation affects lung function and cytokine production in an experimental model of endotoxemia. *Anesthesiology* 2005;102(2):331-339.
93. Takeuchi O, Akira S. Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. *Microbes Infect* 2002;4(9):887-895.
94. Moriyama K, Ishizaka A, Nakamura M, et al. Enhancement of the endotoxin recognition pathway by ventilation with a large tidal volume in rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286(6):L1114-1121.
95. Chun CD, Liles WC, Frevert CW, et al. Mechanical ventilation modulates Toll-like receptor-3-induced lung inflammation via a MyD88-dependent, TLR4-independent pathway: a controlled animal study. *BMC Pulm Med* 2010;10:57.

96. Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002;110(2):191-202.
97. Villar J. Mechanical ventilation modulates Toll-like receptor signaling pathway in a sepsis-induced lung injury model. *Intensive Care Med* 2010.
98. Piehl MA, Brown RS. Use of extreme position changes in acute respiratory failure. *Crit Care Med* 1976;4(1):13-14.
99. Guerin C, Reignier J, Richard JC, et al. Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2013;368(23):2159-2168.
100. Gattinoni L, Taccone P, Carlesso E, et al. Prone position in acute respiratory distress syndrome. Rationale, indications, and limits. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188(11):1286-1293.
101. Galiatsou E, Kostanti E, Svarna E, et al. Prone position augments recruitment and prevents alveolar overinflation in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(2):187-197.
102. Richter T, Bellani G, Scott Harris R, et al. Effect of prone position on regional shunt, aeration, and perfusion in experimental acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(4):480-487.
103. Lewis JF, Jobe AH. Surfactant and the adult respiratory distress syndrome. *The American review of respiratory disease* 1993;147(1):218-233.
104. Marini JJ, Gattinoni L. Propagation prevention: a complementary mechanism for "lung protective" ventilation in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2008;36(12):3252-3258.
105. Edgcombe H, Carter K, Yarrow S. Anaesthesia in the prone position. *Br J Anaesth* 2008;100(2):165-183.
106. Gattinoni L, D'Andrea L, Pelosi P, et al. Regional effects and mechanism of positive end-expiratory pressure in early adult respiratory distress syndrome. *Jama* 1993;269(16):2122-2127.
107. Broccard AF, Shapiro RS, Schmitz LL, et al. Influence of prone position on the extent and distribution of lung injury in a high tidal volume oleic acid model of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1997;25(1):16-27.
108. Broccard A, Shapiro RS, Schmitz LL, et al. Prone positioning attenuates and redistributes ventilator-induced lung injury in dogs. *Crit Care Med* 2000;28(2):295-303.
109. Valenza F, Guglielmi M, Maffioletti M, et al. Prone position delays the progression of ventilator-induced lung injury in rats: does lung strain distribution play a role? *Crit Care Med* 2005;33(2):361-367.
110. Nakos G, Batistatou A, Galiatsou E, et al. Lung and 'end organ' injury due to mechanical ventilation in animals: comparison between the prone and supine positions. *Crit Care* 2006;10(1):R38.

111. Richard JC, Bregeon F, Costes N, et al. Effects of prone position and positive end-expiratory pressure on lung perfusion and ventilation. *Crit Care Med* 2008;36(8):2373-2380.
112. Oudin S, Pugin J. Role of MAP kinase activation in interleukin-8 production by human BEAS-2B bronchial epithelial cells submitted to cyclic stretch. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27(1):107-114.
113. Narimanbekov IO, Rozycki HJ. Effect of IL-1 blockade on inflammatory manifestations of acute ventilator-induced lung injury in a rabbit model. *Exp Lung Res* 1995;21(2):239-254.
114. Kajikawa O, Frevert CW, Lin SM, et al. Gene expression of Toll-like receptor-2, Toll-like receptor-4, and MD2 is differentially regulated in rabbits with *Escherichia coli* pneumonia. *Gene* 2005;344:193-202.
115. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001;25(4):402-408.
116. Broccard AM, Shapiro RSM, Schmitz LLM, et al. Prone positioning attenuates and redistributes ventilator-induced lung injury in dogs *Crit Care Med* 2000;28(2):295-303.
117. Rouby J, E MdL, Poete P ea. Nosocomial broncho-pneumonia in the critically ill. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:1059 –1066.
118. Moore GE, Gerner RE, Franklin HA. Culture of normal human leukocytes. *Jama* 1967;199(8):519-524.
119. Harris RS. Pressure-volume curves of the respiratory system. *Respir Care* 2005;50(1):78-98; discussion 98-79.
120. Regueiro V, Moranta D, Campos MA, et al. *Klebsiella pneumoniae* increases the levels of Toll-like receptors 2 and 4 in human airway epithelial cells. *Infect Immun* 2009;77(2):714-724.
121. Guillot L, Medjane S, Le-Barillec K, et al. Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. *J Biol Chem* 2004;279(4):2712-2718.
122. Dunzendorfer S, Lee HK, Soldau K, et al. Toll-like receptor 4 functions intracellularly in human coronary artery endothelial cells: roles of LBP and sCD14 in mediating LPS responses. *Faseb J* 2004;18(10):1117-1119.
123. Ueta M, Nochi T, Jang MH, et al. Intracellularly expressed TLR2s and TLR4s contribution to an immunosilent environment at the ocular mucosal epithelium. *J Immunol* 2004;173(5):3337-3347.
124. Haehnel V, Schwarzfischer L, Fenton MJ, et al. Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages. *J Immunol* 2002;168(11):5629-5637.

125. Murphy DB, Cregg N, Tremblay L, et al. Adverse ventilatory strategy causes pulmonary-to-systemic translocation of endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(1):27-33.
126. O'Mahony DS, Liles WC, Altemeier WA, et al. Mechanical ventilation interacts with endotoxemia to induce extrapulmonary organ dysfunction. *Crit Care* 2006;10(5):R136.
127. Charles PE, Barbar SD. Toll-like receptors: a link between mechanical ventilation, innate immunity and lung injury? *Intensive Care Med* 2010;36(6):909-911.
128. Dunzendorfer S, Lee HK, Tobias PS. Flow-dependent regulation of endothelial Toll-like receptor 2 expression through inhibition of SP1 activity. *Circ Res* 2004;95(7):684-691.
129. Hillman NH, Moss TJM, Kallapur SG, et al. Brief, Large Tidal Volume Ventilation Initiates Lung Injury and a Systemic Response in Fetal Sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176(6):575-581.
130. Hu G, Malik AB, Minshall RD. Toll-like receptor 4 mediates neutrophil sequestration and lung injury induced by endotoxin and hyperinflation. *Crit Care Med* 2010;38(1):194-201.
131. Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, et al. Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Invest* 2006;86(8):790-799.
132. Hilmi D, Parcina M, Stollewerk D, et al. Heterogeneity of Host TLR2 Stimulation by *Staphylococcus aureus* Isolates. *PLoS One* 2014;9(5):e96416.
133. Boomer JS, To K, Chang KC, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *Jama* 2011;306(23):2594-2605.
134. Zimmerman GA, Renzetti AD, Hill HR. Functional and metabolic activity of granulocytes from patients with adult respiratory distress syndrome. Evidence for activated neutrophils in the pulmonary circulation. *The American review of respiratory disease* 1983;127(3):290-300.
135. Summers C, Singh NR, White JF, et al. Pulmonary retention of primed neutrophils: a novel protective host response, which is impaired in the acute respiratory distress syndrome. *Thorax* 2014;69(7):623-629.
136. Hess DR, Kondili D, Burns E, et al. A 5-year observational study of lung-protective ventilation in the operating room: a single-center experience. *J Crit Care* 2013;28(4):533 e539-515.
137. Marini JJ. Evolving concepts in the ventilatory management of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1996;17(3):555-575.
138. Falke KJ, Pontoppidan H, Kumar A, et al. Ventilation with end-expiratory pressure in acute lung disease. *J Clin Invest* 1972;51(9):2315-2323.
139. Serpa Neto A, Nagtzaam L, Schultz MJ. Ventilation with lower tidal volumes for critically ill patients without the acute respiratory distress syndrome: a systematic translational review and meta-analysis. *Curr Opin Crit Care* 2014;20(1):25-32.

140. Serpa Neto A, Cardoso SO, Manetta JA, et al. Association between use of lung-protective ventilation with lower tidal volumes and clinical outcomes among patients without acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis. *Jama* 2012;308(16):1651-1659.
141. Futier E, Constantin JM, Paugam-Burtz C, et al. A trial of intraoperative low-tidal-volume ventilation in abdominal surgery. *N Engl J Med* 2013;369(5):428-437.
142. Goldstein I, Bughalo MT, Marquette CH, et al. Mechanical ventilation-induced air-space enlargement during experimental pneumonia in piglets. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163(4):958-964.
143. Brackenbury AM, McCaig LA, Yao LJ, et al. Host response to intratracheally instilled bacteria in ventilated and nonventilated rats. *Crit Care Med* 2004;32(12):2502-2507.
144. Croisier D, Etienne M, Bergoin E, et al. Mutant selection window in levofloxacin and moxifloxacin treatments of experimental pneumococcal pneumonia in a rabbit model of human therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(5):1699-1707.
145. Gattinoni L, Pelosi P, Vitale G, et al. Body position changes redistribute lung computed-tomographic density in patients with acute respiratory failure. *Anesthesiology* 1991;74(1):15-23.
146. Pelosi P, Bottino N, Chiumello D, et al. Sigh in supine and prone position during acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167(4):521-527.
147. Guerin C, Gaillard S, Lemasson S, et al. Effects of systematic prone positioning in hypoxemic acute respiratory failure: a randomized controlled trial. *Jama* 2004;292(19):2379-2387.
148. Beuret P, Carton MJ, Nourdine K, et al. Prone position as prevention of lung injury in comatose patients: a prospective, randomized, controlled study. *Intensive Care Med* 2002;28(5):564-569.
149. Pelosi P, Tubiolo D, Mascheroni D, et al. Effects of the prone position on respiratory mechanics and gas exchange during acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(2):387-393.
150. Panigada M, Berra L, Greco G, et al. Bacterial colonization of the respiratory tract following tracheal intubation-effect of gravity: an experimental study. *Crit Care Med* 2003;31(3):729-737.
151. Blanch L, Mancebo J, Perez M, et al. Short-term effects of prone position in critically ill patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1997;23(10):1033-1039.
152. Jolliet P, Bulpa P, Chevrolet JC. Effects of the prone position on gas exchange and hemodynamics in severe acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1998;26(12):1977-1985.
153. Huang W, Tang Y, Li L. HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis. *Cytokine* 2010;51(2):119-126.

154. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290(3):C917-924.
155. Entezari M, Weiss DJ, Sitapara R, et al. Inhibition of high-mobility group box 1 protein (HMGB1) enhances bacterial clearance and protects against *Pseudomonas Aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis. *Mol Med* 2012;18:477-485.