



Effets de l'application d'un stretch cyclique sur un modèle isolé de bronche humaine : étude fonctionnelle, pharmacologique et immuno-génétique

Morgan Le Guen

► To cite this version:

Morgan Le Guen. Effets de l'application d'un stretch cyclique sur un modèle isolé de bronche humaine : étude fonctionnelle, pharmacologique et immuno-génétique. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 2014. Français. NNT : 2014VERS0060 . tel-01213047

HAL Id: tel-01213047

<https://theses.hal.science/tel-01213047>

Submitted on 7 Oct 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Versailles-Saint Quentin en Yvelines – Simone de Beauvoir

Ecole doctorale des Génomes aux Organismes (GAO)

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Versailles
Laboratoire UPRES EA220
Spécialité: Physiologie

soutenue publiquement par
Morgan LE GUEN

**« Effets de l'application d'un stretch cyclique sur un modèle isolé de
bronche humaine : étude fonctionnelle, pharmacologique, et immuno-
génétique »**

**"Cyclic stretch applied on a model of human bronchic airway : fonctionnal,
pharmacological and genetic response."**

2014

Jury

Pr Philippe Devillier	– Laboratoire UPRES EA 220, UVSQ
Pr Alexandre Duguet	– Paris VI Université Pierre Marie-Curie
Pr Christophe Faisy	– Paris V Université René Descartes
Pr Nelly Frossart	– Université de Strasbourg

Table des matières

Remerciements	p. 3
Abstract et résumé	p. 5
Table des figures	p. 7
Liste des tableaux	p. 8
Abbréviations	p. 9
Introduction	p. 10
Chapitre 1: état des connaissances	p. 12
1.1. Relation structure/fonction – implication sur l’arbre trachéobronchique	p. 13
1.2. Concepts de stiffness et fluidification	p. 20
1.3. Concept de Deep Inspiration	p. 29
1.4. Ventilation spontanée (notion de chaos ventilatoire)	p. 35
1.5. Actualités sur la ventilation mécanique	p. 36
Chapitre 2: Vers un modèle de stretch cyclique	p. 40
2.1. Contrainte appliquée	p. 41
2.2. Interaction épithélium et muscle lisse squelettique	p. 47
2.3. Vers un modèle intégratif Modèle unique (article 1)	p. 57
Chapitre 3: étude du stretch bronchique sur bronche humaine	p. 76
3.1. Modèle motorisé cyclique	p. 77
○ 3.1.2 Motorisation et technique (article 2)	p. 78
○ 3.1.5 Stretch cyclique et bronche humaine (article 3)	p.115
3.2. Modèle comparé dans la littérature	p.139
3.3. Synthèse comparée des modèles de stretch cyclique	p.142
3.4. Forces et limites des modèles	p.146
Chapitre 4: Autres moyens de mesure de la réactivité bronchique in-vivo	p.147
4.1. Mécanique respiratoire globale	p.148
4.2. Technique d’oscillations forcées	p.152
4.3. Mécanique bronchique et Hypertension pulmonaire sur un modèle de lapin (Travail initié en collaboration avec les Hôpitaux Universitaires de Genève)	p.154
Conclusions	p.168
Références	p.171

Remerciements

Christophe, je t'ai connu docteur mais comme le temps a passé depuis mes débuts dans le laboratoire, tu es devenu professeur !! Encore toutes mes félicitations et je suis heureux d'avoir pu assister à ton HDR brillante. J'ai eu beaucoup de plaisir au cours de ces années dans le laboratoire avec toi comme mentor. Nous avons pu échanger nos point de vue tant en pratique clinique qu'en expérimental et je salue ton enthousiasme et tes idées. Par ailleurs, évidemment un grand merci pour ton soutien précieux lors des dernières étapes de cette thèse... J'espère que nous poursuivrons cette aventure expérimentale dans les prochaines années.

Philippe, un grand merci de m'avoir accueilli au sein de votre équipe pour ces quelques années !! Je suis encore très loin de maîtriser les voies intra et extra-cellulaires comme vous et de la capacité de synthèse face à nombre de données ! J'espère que ces articles expérimentaux sont le début d'une collaboration expérimentale entre nous. En tous les cas, j'ai encore des pistes à explorer ! J'ai apprécié l'ambiance du laboratoire mêlant studieux et moments plus détendus entre tous. Enfin, je tiens évidemment à souligner le soutien indéfectible dont vous avez fait preuve malgré une situation parfois complexe dans la fin de cette période

Emmanuel, sans toi – le néant... Tu as été la cheville de ce travail et je te remercie de ton aide énorme. Je ne peux saluer ici toutes tes qualités et la personne indispensable au laboratoire que tu représentes que ce soit dans la vie de collectivité (et ces dégustations œnologiques d'anthologie ou ces voyages aéroportés mémorables), que du point de vue scientifique en pointant chaque fois avec justesse les limites de telle ou telle hypothèse et aidant en la construction de schéma expérimentaux satisfaisant. Mes journées au laboratoire ont chaque fois été un plaisir de travailler dans un univers autre que le service clinique ou j'exerce. 1000 fois merci et j'espère plein de projets futurs concrétisés

Stan, une mention spéciale à toi. Le laboratoire a créé entre nous des liens particuliers. Si professionnellement, j'ai indéniablement bénéficié de tes lumières scientifiques et de tes relectures bardées de corrections ! Pour le reste, je salue Camille, Maxime et évidemment

Marion, Charlotte, Amparo, la féminin'touch du laboratoire !! Heureusement que la machine à café existe... Merci de votre aide dans les parties techniques pour lesquelles j'étais totalement novice : ELISA, RT-PCR... J'espère que nous pourrons poursuivre nos échanges et notre collaboration dans l'avenir.

Nelly, c'est évidemment un honneur que vous me faites d'accepter de participer à ce jury de thèse. Vous avez pu connaître les débuts de l'expérimentation et je suis heureux de vous livrer en partie la réflexion que celle-ci a généré. Il reste évidemment des zones à parcourir et j'espère pouvoir vous apporter des éléments de réponse.

Alexandre, nous avons eu l'occasion de travailler un peu ensemble lors de mon séjour à la Pitié-Salpêtrière notamment dans l'enseignement des étudiants en médecine. Aujourd'hui ton rôle est tout autre et il s'agit de juger d'un étudiant un peu particulier puisque c'est moi. Je n'attends aucune complaisance et je te remercie d'avoir accepté ce rôle en tant que spécialiste du poumon et de son hyperréactivité.

Walid, merci de m'avoir accueilli à Genève au sein de la CMU ! pour valoriser cette année à l'étranger. Au-delà de la vieille ville et de son fameux jet d'eau, j'ai eu la chance de découvrir l'expérimentation animale sur le petit mais surtout le gros animal au sein d'une équipe dynamique et qui a largement contribué à la réalisation de mon projet. Par ailleurs, ce fut un vrai plaisir que de travailler au sein des HUG.

A Marc Fischler et à mes collègues de Foch qui m'ont soutenu régulièrement au cours de ces années de cumul d'activité. J'espère avoir plus de temps dorénavant pour m'impliquer au sein du service tout en conduisant des étudiants sur les pas de la science expérimentale.

Résumé et Abstract:**- Résumé:**

L'arbre bronchique constitue une large interface avec le milieu extérieur ce qui en fait notamment une sentinelle immunologique de l'organisme. Par ailleurs, il est soumis à de multiples contraintes physiques (variation de pressions lors du cycle ventilatoire) avec le développement de pathologies lorsque la réponse à ces contraintes est inadaptée : cas de l'hyperréactivité bronchique. Or les études expérimentales sont peu nombreuses concernant cet organe. Nous avons donc essayé de caractériser la réponse bronchique des voies aériennes distales à partir d'un modèle isolé de bronche humaine qui était soumis à l'application d'un stretch unique ou cyclique tel qu'il est généré lors de la ventilation mécanique. D'un point de vue fonctionnel, le stretch unique ou cyclique s'accompagne d'une modification significative du tonus basal de la bronche avec deux étapes : l'une précoce apparaît au cours de l'exposition même des variations de tension pariétale, l'autre est tardive et apparaît à l'arrêt de l'étirement. Concernant l'étape précoce, elle se révèle robuste car aucun pré-traitement et particulièrement l'abrasion de l'épithélium ne la supprime totalement. La caractérisation de cette réponse implique notamment la voie des NO synthases et des Rho-A kinase. La réponse tardive fait quant à elle intervenir l'épithélium ainsi que la voie des NO-synthase suggérant un rôle prépondérant du NO. Par contre, ces modifications de force au repos sont indépendantes de la sécrétion de médiateurs inflammatoires. Enfin, l'affinité à l'acétylcholine est stable au cours du temps de la bronche quelle que soient les conditions. L'approche génétique renforce par contre le rôle du tissu de soutien bronchique puisque l'application d'un stretch active la synthèse de molécules intervenant dans la production ou la qualité du collagène : MMP-9... Au total, l'application d'une contrainte cyclique renforce la bronchoconstriction par inhibition principale de la voie des NO synthases et mécanotransduction. L'étude in-vivo de cette réponse est requise pour établir sa force et envisager des thérapeutiques adaptées.

- Abstract

The tracheo-bronchial tree is a true immunologic sentinel related to the huge interface with the external environment. Moreover, it is submitted to variable physical strains (tidal ventilation and variation in pressure) and an excessive response leads to the genesis of some pathology as bronchial hyper-responsiveness. Experimental studies about bronchial organ are scarce and the aim of this work on an isolated organ model was to characterize the human bronchial response to a single or repetitive and physiological stretch as observed during mechanical ventilation. From a functional perspective, a single strain or a cyclic stretch significantly increased the basal tone of the human bronchus with a two-step response: the early response appears during cycling and the delayed after the stretch has ceased. The early response is robust then no pre-treatment and especially epithelial removal totally inhibits it. This response implies NO synthase and Rho-A kinase pathway with a reduction of the developed basal tone with these inhibitors. As it concerns the late response, it involved epithelium and NO synthase suggesting a prominent action of NO. Inflammatory mediators are not directly involved in the rise of basal tone because stretch-induced secretion as detected with ELISA is very low. At last, affinity for acetylcholine does not change during this physiological experiment. Genomic approach was quite disappointed

because applying stretch only transiently activates transcription genes for MMP-9, involved in the collagen production and consequently in the support tissue of the bronchial. As a conclusion, cyclic stretch enhances bronchoconstriction by inhibition of the NO-synthase pathway and probable thermodynamic interaction. Further in-vivo analysis are required to confirm its powerful and test some therapeutics.

Tables des figures

Figure 1: Perspectives de recherche sur le stretch appliqué à la bronche humaine.

Figure 1.1: Images obtenue par imagerie rayons X micro focale avec injection de Tantalum d'un arbre bronchique au-delà de la 8^{ème} division de rat ventilé mécaniquement.

Figure 1.2: Effets de la matrice extracellulaire sur le comportement cellulaire.

Figure 1.3: Coupe axiale d'une bronche à la 8-10^{ème} division.

Figure 1.4: Equilibre entre rigidité et souplesse ou élasticité et rôle du complexe actine-myosine.

Figure 1.5: Représentation au cours du temps de la polarisation de la cellule en haut et de l'orientation des fibres musculaires en bas.

Figure 1.6: Facteurs en balance dans l'état des fibres lisses de la paroi bronchique (normale ou statufiée).

Figure 1.7: Réponse à une inspiration profonde (DI) physiologique et pathologique

Figure 1.8: Mesure au cours du temps par fibroscopie de la surface de segments de bronches porcines soumises à une inspiration profonde (Deep Inspiration ou DI) d'intensité variable

Figure 1.9: Facteurs influençant la qualité de réponse en « inspiration profonde »

Figure 2.1: Cycle de fixation actine myosine conduisant au raccourcissement de la fibre lisse squelettique.

Figure 2.2: Représentation schématique des interactions actine-myosine et des possibilités de recrutement d'unités.

Figure 2.3: Réponse de la cellule musculaire lisse à l'activation des récepteur PAR

Figure 2.4: Rôle des intégrines en tant que médiateur intercellulaire permettant la migration et la déformation cellulaire

Figure 3.1: Modélisation des cascades intracellulaires à l'origine de la contraction et de son maintien dans la cellule musculaire lisse avec une phase rapide et lente.

Figure 3.2: Effets des différent prétraitements sur le tonus basal et l'amplitude de réponse à une gamme d'acétylcholine (ΔE_{max}) de bronches humaines suivant soit une période contrôle soit une période avec un stretch cyclique de 60 minutes.

Figure 4.1 : impédance du système respiratoire (Zrs) et ses deux subdivisions

Figure 4.2: Graphique de l'impédance respiratoire (ZRS) en fonction de la fréquence (J), sur un spectre de 0 à 50 Hz.

Liste des tableaux

Tableau 2.1: Comparaison des principales caractéristiques d'une fibre musculaire lisse et striée.

Tableau 3.1: Valeurs brutes du tonus basal au décours de la période de contrôle ou de stretch cyclique de 60 min. Les bronches sont pairées pour l'étude

Tableau 3.2: Valeurs brutes de l'amplitude de réponse à une gamme d'acétylcholine ($1.10E^{-8}$ à $3.10E^{-3}$ M) au décours de la période de contrôle ou de stretch cyclique de 60 min.

Tableau 3.3: Table synoptique de stretch cyclique bronchique décrit dans la littérature depuis 2004

Tableau 3.3: Comparaison Stretch unique à 2.5x le tonus basal et stretch multiple pendant 60 min

Abbréviations :

Ach: Acétylcholine

AMP/ADP/ATP: Adénosine MonoPhosphate, Adénosine DiPhosphate, Adénosine TriPhosphate

ASM : Airway Smooth Muscle (Muscle Lisse Bronchique)

DI : Deep Inspiration (Inspiration Profonde)

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assays

ET : EndoThéline

FAM: Tétrachlorofluorescéine

FOT : Technique d'Oscillation Forcée

HTAP: Hypertension Artérielle Pulmonaire

IP2/IP3 : Inositol DiPhosphate, Inositol TriPhosphate

LT: Leucotriènes

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MLC: Myosin Light Chain (Chaîne légère de Myosine)

NANC: Non Adrénergique Non Cholinergique

NO: Oxyde Nitrique

Pa: unite Pascal

PEEP: Positive End Expiratory Pressure (Pression Expiratoire Positive)

PG: Prostaglandines

ROCK: Rho-kinase

RT-qPCR: reverse transcriptase -quantitative polymerase chain reaction

SAR: Stretch Activated Receptor

TAMRA: Dihydrocyclopyrroloindole tripeptide.

TRPV1: Vanilloid Transient Receptor Potential 1

TV : Tidal Volume (Volume Courant)

WNT: Wingless-Type Mousse Mammary tumor

Introduction :

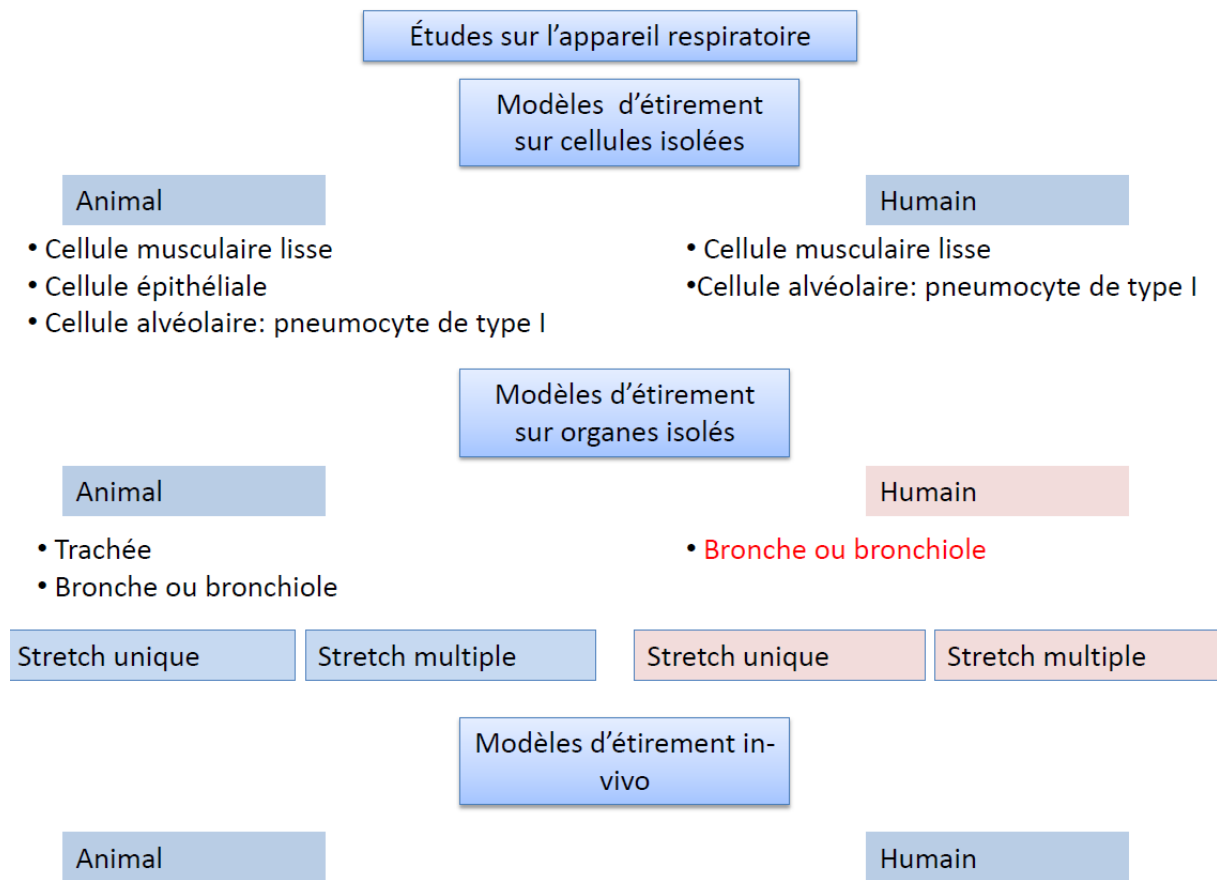
Aujourd'hui encore, la physiologie de l'appareil respiratoire conserve une part mal connue de part la complexité des interactions existant entre les différents types cellulaires qui le composent et qui participent à sa fonction mais qui rendent mal aisées son étude. Ainsi nombre d'études se sont intéressées à l'épithélium alvéolaire ou à la musculature lisse, lesquelles ne représentent qu'un "compartiment" de cet appareil qui peut dysfonctionner en pathologie. D'un autre côté, l'exploration physiologique in-vivo en ventilation spontanée chez l'homme reste limitée du fait des difficultés d'approche (souvent invasives pour ce qui concerne l'examen vidéo sous fibroscopie) et du fait du caractère dynamique de la respiration (alternance inspiration/expiration).

Par ailleurs, en clinique, le recours à la ventilation mécanique est largement employé pour quelques heures en cas d'anesthésie générale ou de façon plus prolongée en cas de support ventilatoire d'une défaillance respiratoire en réanimation. Cette ventilation en pression positive va induire une modification du régime de pression appliqué tout au long de l'arbre respiratoire jusqu'aux alvéoles dont les conséquences à l'étage bronchique ont été peu étudiées. Des travaux récents montrent que l'arbre bronchique est largement influencé par cette modification de régime. De la même façon, si les phénomènes de laryngospasme ou de bronchospasme observés notamment en pédiatrie sont bien connus de l'anesthésiste, leur physiopathologie l'est probablement moins. Enfin, la susceptibilité individuelle va modifier considérablement la réponse à la ventilation mécanique entre un individu sain et un sujet présentant une hyperréactivité bronchique observée dans le cadre de pathologies inflammatoires ou allergique (asthme). Cette réponse différente peut ainsi appeler des cibles thérapeutiques potentielles distinctes.

L'objectif de ce travail expérimental illustré sur la figure ci-dessous (**Figure 1**) vise à s'intéresser particulièrement au comportement de la bronche humaine soumise à une contrainte calibrée et unique ou répétée comme celle imposée en cas de ventilation

mécanique. Ainsi après un bref rappel des connaissances des interactions entre épithélium et cellules musculaires lisses, nous aborderons les effets d'un étirement calibré unique puis répété sur un modèle d'organe isolé afin d'établir la réponse globale et les médiateurs impliqués dans celle-ci.

Figure 1: Perspectives de recherche sur le stretch appliqué à la bronche humaine (en rouge sont les domaines explorés par le présent travail).



Partie 1

Etat des connaissances.

1.1. Relation structure /fonction – implication sur l'arbre trachéobronchique.

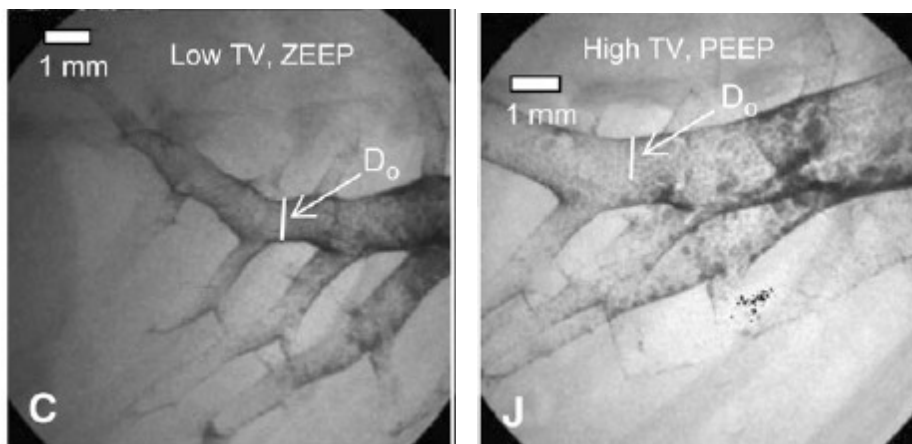
Le poumon tout comme le muscle cardiaque possède comme caractéristique physiologique principale et unique d'être un organe constamment en mouvement lors du cycle respiratoire (alternance de phases inspiratoire et expiratoire) sans aucune période de repos, excepté par un contrôle conscient. Par conséquent, une relation entre structure et fonction sous-tend l'architecture de l'arbre trachéo-bronchique.

1.1.1 Compartiment bronchique

Pendant des années, cette structure composée de conduits aux ramifications successives n'a été considérée que comme un unique élément de conduction du flux ventilatoire excessivement performant avec éventuellement un rôle associé d'ascenseur des sécrétions distales vers l'oropharynx par la présence des cellules ciliées et du mucus. Encore récemment Mitzner comparait de façon provocatrice le système bronchique à l'appendice du poumon [1](Mitzner, 2004 AJRCCM) En réalité, la structure des bronches notamment varie entre la partie proximale de l'arbre respiratoire et sa partie la plus distale. Si la structure cartilagineuse s'amointrit, pour ne plus représenter que des îlots fragmentés structurels puis disparaître totalement, la disposition des fibres musculaires se modifie également. D'une orientation céphalo-caudale qui maintient entre elles les structures cartilagineuses notamment dans la partie postérieure de la trachée et des bronches proximales, on observe une organisation progressive de la musculature en anneau avec d'abord une architecture spiralée puis concentrique à la bronche (muscle de Reissessen) conférant ainsi une plus grande souplesse tridimensionnelle. D'autre part, des travaux récents font mention d'une structure plissée en distalité (au niveau bronchiolaire) laquelle peut gagner en longueur ou en diamètre [2](Sinclair, 2007 AJRCCM) ce qui lui confère une forte adaptabilité par rapport à des contraintes extérieures et qui remettent définitivement en question la notion de simple tube convectif ! Ainsi, récemment, Noble *et al.* ont mis en évidence que la muqueuse bronchique se déplissait pour des pressions ventilatoires de l'ordre de 10 cmH₂O et que pour des pressions supérieures, la muqueuse subissait une force d'étirement (strain) [3](Noble, 2005 JAP). De fait, les plis de la paroi bronchique et son

élasticité augmentent les possibilités de répartitions des forces mécaniques au niveau de l'épithélium. Ainsi, de belles études d'imagerie fonctionnelle de l'arbre respiratoire (imagerie micro focale par rayons X) in vivo ont bien montré l'impact sur le diamètre des bronches provoqué par une ventilation en pression positive. Ainsi, Sinclair *et al.* sur l'arbre bronchique de rat ventilé ont montré la prédominance de la modification du calibre des bronches notamment dans les territoires de petits calibres (diamètre inférieur à 800 μm) par rapport à l'élongation de ces mêmes territoires. De plus, l'application d'une pression expiratoire positive (PEEP) joue un rôle prépondérant par rapport au réglage du volume courant sur ces mêmes territoires (**Figure 1.1**) [2] (Sinclair 2007 AJRCCM).

Figure 1.1 : Images obtenue par imagerie à rayons X micro focale avec injection de Tantalum d'un arbre bronchique au-delà de la 8^{ème} division de rat ventilé mécaniquement. La référence du diamètre obtenu en ventilation spontanée est appliquée sous différents régimes ventilatoires (bas volume courant sans PEEP – 'Low TV, ZEEP' ; ou en haut volume courant avec PEEP à 10 cmH₂O – 'High TV, PEEP') ; on note l'augmentation significative du diamètre dans cet exemple sans allongement axial notable (reproduit avec autorisation [2] Sinclair, 2007 AJRCCM)



Cette distension de l'arbre bronchique a été également montré récemment par Nickles *et al.* chez la souris par scanner flat-panel. Ce prototype d'imagerie combine l'avantage d'un scanner avec une haute résolution temporo-spatiale à la détection digitale du flat-panel aboutissant à des images de haute résolution malgré des temps d'acquisition bref. Une distension rapide et réversible des bronches au-delà de la trachée est démontrée pour des volumes courants de 6 ml/kg et est maximale pour 10 ml/kg [4] (Nickles 2014 AJP). Ce

mécanisme pourrait absorber une certaine tension et protéger ainsi le compartiment alvéolaire d'une distension excessive.

1.1.2 Compartiment musculaire

D'un point de vue morphologique, la cellule musculaire lisse comprend un noyau unique, central, autour duquel sont présents des organites divers, tels que des mitochondries, des lysosomes et un appareil de Golgi. Le réticulum sarcoplasmique comme dans toute cellule musculaire lisse est peu développé mais joue un rôle fonctionnel important en tant que réserve calcique et voie alternative de contraction musculaire. Le cytosol est caractérisé par la présence de filaments fins d'actine de 4 à 7 nm de diamètre, de myosine composée de 2 chaînes lourdes et deux chaînes légères (12 à 20 nm de diamètre), et de filaments intermédiaires de 8 à 12 nm. Les protéines qui les régulent sont également présentes, caldesmone et calponine principalement [5] ([Hackett 2011 PLoSOne](#)). Les filaments contractiles sont arrimés à la membrane plasmique ou plasmalemma au niveau de régions denses aux électrons (hémi-desmosomes). Certains de ces filaments se terminent au niveau de la membrane cellulaire pour s'arrimer via des protéines transmembranaires (intégrines) à la matrice extra-cellulaire ou aux cellules de contigüité (desmosomes ou jonctions intermédiaires intercellulaires). La tunique musculaire reste peu épaisse constituée d'une ou deux assises de fibres musculaires et comporte une activation neurogène via le système parasympathique mais également myogène avec possibilité de contraction « autonome » ou par d'autres événements déclenchants (étirement, pression...). L'activation de cette cellule musculaire lisse bronchique peut aussi être médiée par un système découvert plus récemment : le système non adrénérergique et non cholinergique (NANC). Il existe deux composantes : inhibitrice -système NANC inhibiteur aboutissant en une bronchodilatation et excitateur - système NANC excitateur à l'origine d'une contraction musculaire. Chez l'homme, où l'innervation adrénérergique joue un rôle relaxant mineur, le NANCi est considéré comme la seule commande nerveuse bronchodilatatrice [6] ([Linden, 1992 Br J Pharmacol](#)). L'importance de ce compartiment musculaire est notamment révélée par la pathologie. En effet, l'hyperréactivité bronchique observée dans la maladie asthmatique ou la bronchite chronique obstructive semble corrélée à une augmentation de la masse musculaire avec une perte de souplesse de l'ensemble de la bronche [7, 8] ([Mendonca, 2011 Resp Res – Bosse, 2010 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol](#)).

1.1.3 Compartiment extra-cellulaire

16

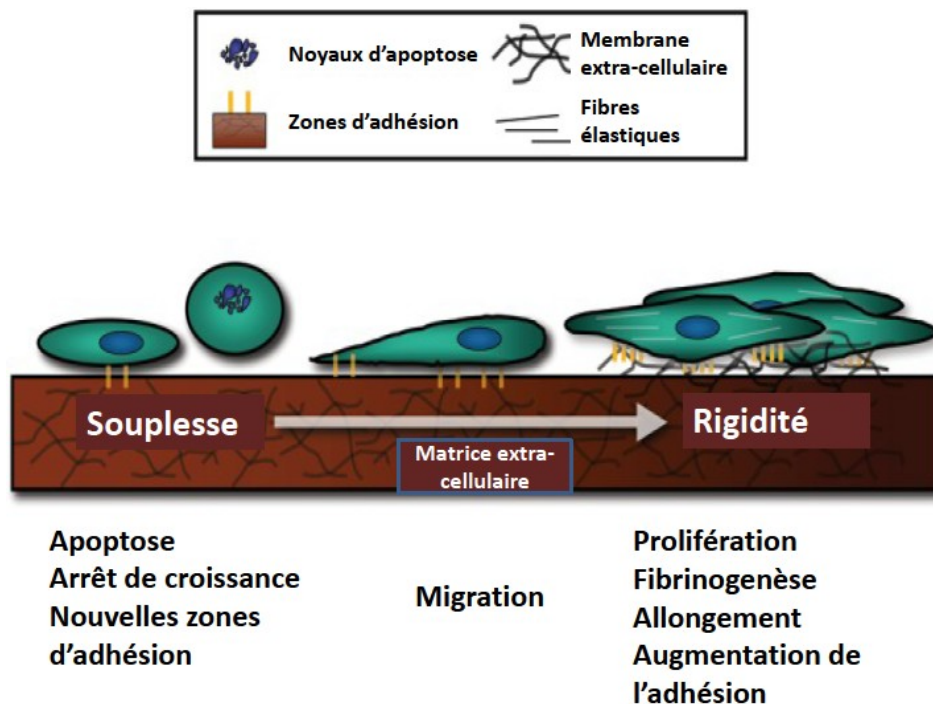
Concernant le tissu conjonctif qui constitue un des principaux éléments de structure et de maintien de l'arbre trachéo-bronchique, son rôle devient prépondérant au niveau des divisions bronchiques et au-delà lorsque la proportion de tissu cartilagineux diminue. En effet, en l'absence de ce tissu de soutien, les bronches dépourvues de cartilage et logées au sein du parenchyme pulmonaire, seraient plus sensibles aux « forces de rétraction élastiques » ce qui modifierait amplement leur calibre au cours du cycle respiratoire, aboutissant à une respiration paradoxale avec stockage de l'air dans les voies aériennes distales lors de l'inspiration (augmentation du volume anatomique mort) et trapping aérien avec fermeture bronchique passive au moment de l'expiration. La matrice extra-cellulaire dans ce cas va limiter la collapsibilité bronchique et par conséquent limiter grandement cet effet de mouvement paradoxal. Récemment, la notion d'équilibre statique au cours de la ventilation a été totalement remise en question. Ainsi l'équilibre qui on le pensait intervenait entre un tonus musculaire du tissu bronchique plutôt bronchoconstricteur et un tonus externe depuis la matrice extra-cellulaire plutôt bronchodilatateur ne peut s'appliquer en physiologie car le temps nécessaire à déterminer cet équilibre ne peut être atteint dans le cadre de la ventilation spontanée et cette fluctuation au cours du cycle produite par le volume courant perturberait profondément l'action propre du muscle [9] ([Fredberg, 1999 AJRCCM](#)). D'autre part, la variation en longueur appliquée sur la cellule musculaire lisse bronchique va modifier considérablement sa réponse contractile. Ainsi une variation de 4% de la longueur du muscle jusque 12% au cours du soupir est suffisante pour diminuer de 50% la force générée par un muscle activé, c'est-à-dire un muscle déjà pré-contracté [10, 11] ([Gump, 2001 JAP – Fredberg, 1997 AJRCMM](#)). Dès lors, les théories d'homéostasie et d'équilibre respiratoire sont remplacées par des notions de comportement et de fluctuation faisant intervenir de nombreux effecteurs détaillés par la suite [12] ([Raboudi, 1998 AJRCCM](#)).

Par ailleurs, au-delà d'un aspect support nutritif, la matrice extra-cellulaire est également un lieu permettant de nombreux échanges entre les cellules constitutives (cellules épithéliales – cellules musculaires lisses) via des médiateurs comme l'endothéline, des échanges ioniques (eau, sodium...) voire avec des cellules autres (infiltrats monocytaire, myofibroblastes...) tels que décrit dans les chapitres suivants. Pourtant de nombreux modèles expérimentaux négligent cette composante. Or un des rôles majeur de la matrice extra-cellulaire est de déterminer en partie la forme ou la polarisation des cellules à son

contact (**Figure 1.2**). A ce titre, la qualité de cette matrice en termes de souplesse ou à l'inverse rigidité est déterminante. Ainsi une expérience intéressante montre que des cellules musculaires de type cardiomyocytes disposées sur une matrice extracellulaire rigide ou immobile vont confluer au-delà des limites de cette matrice, tandis qu'en cas de matrice souple ou « mobile », les cellules restent présentes sur la seule surface mobile au cours du temps [13]([Yeung, 2005 Cell Motil Cytoskeleton](#)). Dans le premier cas, les contacts cellules-matrice sont privilégiés tandis que dans la deuxième situation ce sont les contacts intercellulaires qui priment [14]([McDaniel, 2007 Biophys J](#)). De la même façon, au sein d'une matrice gélatineuse, les cellules sont généralement peu adhérentes avec une prolifération faible à l'inverse d'un support plus rigide (foie). On retrouve cette distinction au sein de l'arbre respiratoire avec une monocouche cellulaire au sein des alvéoles pulmonaires soumis à des mouvements réguliers et la trachée (tube rigide et convectif).

Figure 1.2 : Effets de la matrice extracellulaire sur le comportement cellulaire.

Ce schéma montre la relation existant entre les caractéristiques mécaniques de la matrice extra-cellulaire (souple, gélatineuse ou rigide) sur les populations cellulaires au contact. En général, les cellules au sein d'une matrice souple sont peu nombreuses et peu adhérentes au contraire d'une matrice solide qui voit des cellules en nombre et aisément prolifératives. (d'après [Wells, Hepatology 2008 \[15\]](#))



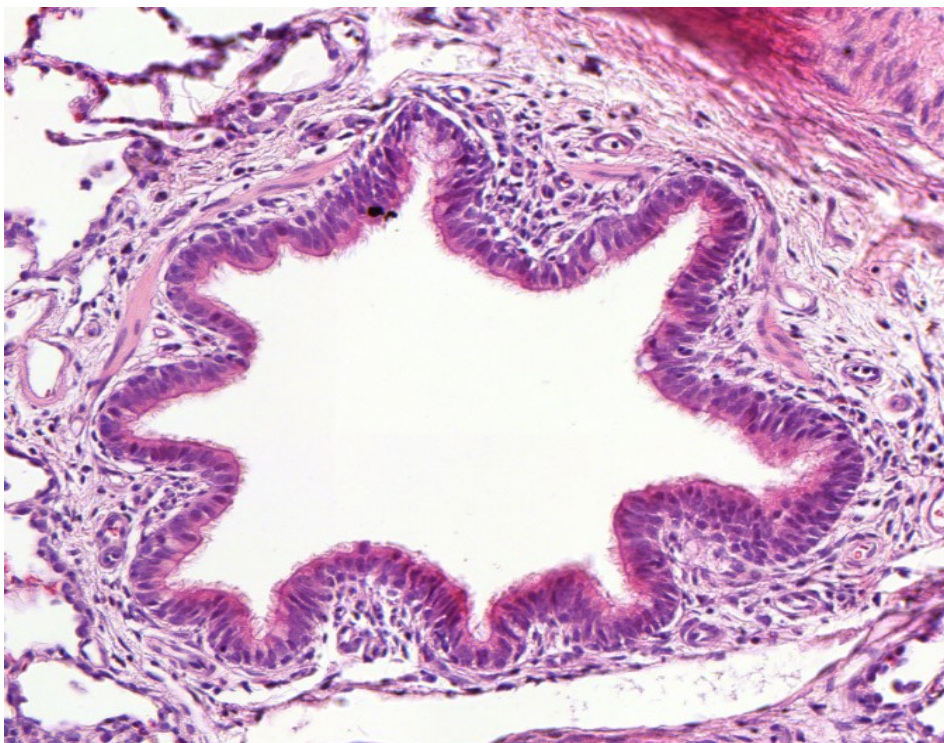
1.1.4 Compartiment épithélial

Enfin, l'autre constituant majeur de ce système bronchique est évidemment l'épithélium respiratoire pseudo-stratifié incluant l'épithélium de surface (cellules ciliées) et l'épithélium glandulaire. L'épithélium bronchique possède diverses spécificités. Tout d'abord, il s'agit de cellules pourvues à l'extrémité apicale de cils. Ceux-ci d'une hauteur d'environ 6µm voient leur densité diminuer au fur et à mesure des divisions de l'arbre respiratoire. Leur structure interne est particulière composée de filaments d'actine et leur mouvement phasique permet la circulation du mucus et de ces débris vers l'oropharynx. D'autre part, l'épithélium respiratoire constitue la principale barrière physique avec l'environnement extérieur et c'est pour cette raison que ces cellules disposent sur leur face latérale de zones de jonction imperméables (jonctions serrées) mais aussi de différents types de contact limitant les contacts directs entre milieu externe et tissu de soutien. La dernière particularité de ces cellules est qu'elles sont capables de modifications morphologiques grâce à un cytosquelette composé de filaments d'actine amarré aux zones de jonction baso-latérales. Au niveau bronchiolaire, seuls deux types cellulaires cylindriques persistent en une seule couche : les cellules ciliées et les cellules sécrétoires (cellules de Clara). La particularité de cet épithélium respiratoire est d'être en contact avec le milieu extérieur via une couche de mucus stratifié (phase liquide profonde au contact des cils et phase gel supérieure permettant l'ascenseur) avec deux conséquences particulières. La première, que nous ne développerons pas, est celle de barrière immunologique par un contact précoce face à des antigènes et une première réponse défensive laquelle est médiée notamment par les macrophages alvéolaires ou la destruction de particules étrangères par l'action d'enzymes. La seconde est d'être directement stimulée par des contraintes mécaniques externes, en premier lieu la pression exercée par la ventilation cyclique ou par la pression transmurale. Ainsi, à chaque cycle, une pression cyclique modérée s'exerce sur l'épithélium et des modifications dans l'intensité de cette stimulation vont conduire à une réponse globale de la bronche par mécanotransduction détaillée ultérieurement. Typiquement la cellule de Clara (cellule de type glandulaire) démontre cette poly-fonction. En effet il s'agit d'une cellule prismatique, sans cils ni microvillosités, présente dans la partie distale de l'arbre bronchique qui est aisément repérable par son pôle apical en forme de dôme saillant sur l'épithélium cubique. Cette cellule de transition entre les cellules des voies de conduction et celle de la

zone d'échange assure ainsi un rôle de cellule épithéliale des voies de conduction, de sécrétion des composants protéiques du surfactant alvéolaire et de renouvellement cellulaire au besoin (les cellules basales étant absentes à ce niveau).

Ainsi, la structure paraît s'adapter aux mouvements du poumon lors des cycles respiratoires pour préserver la béance des voies aériennes tout au long du cycle. La pathologie verra cette adaptation mise en défaut par différents phénomènes tels que l'hyperréactivité bronchique, la destruction de la matrice extracellulaire....

Figure 1.3 : Coupe axiale d'une bronche à la 8-10^{ème} division. On remarquera son aspect en étoile caractéristique à ce niveau, son épithélium cilié en couche simple avec des cellules glandulaires disséminées. Sous-jacent, les cellules musculaires lisses sont disposées en longitudinal. Enfin, le cartilage est partiel sur cette coupe (données personnelles).



A retenir :

- La modification de l'orientation du muscle strié de l'arbre proximal à l'arbre distal
- L'importance du tissu de soutien des bronches qui limite la variation du diamètre bronchique au cours du cycle ventilatoire et limite par le même biais la survenue

de mouvements paradoxaux. Il s'agit également d'un riche milieu d'échange intercellulaire

- L'abandon du concept de tube convectif au profit de structure adaptée au cycle ventilatoire distensible en proximal et avec une structure plissée distale
- L'épithélium est effecteur principal de la mécano-transduction

1.2. Concepts d'élasticité-rigidité (stiffness), de renforcement (reinforcement), de phase fluide (fluidification) et polarisation cellulaire

1.2.1 Elasticité-rigidité

Dans la mesure où les cellules bronchiques subissent des contraintes appliquées à leur surface au cours du cycle ventilatoire, cela induit des spécificités dans leur état cellulaire. Ces modifications d'état font intervenir à la fois les systèmes de jonction basale des cellules épithéliales (hémi-desmosomes) et les complexes actine-myosine du cytosquelette tant ceux impliqués dans la forme de la cellule par leur amarrage à la membrane plasmique par les corps denses des hémi-desmosomes ou des jonctions intermédiaires que ceux dédiés à la contraction musculaire. Certains concepts ont été développés depuis le début des années 2000, et il convient de les définir pour la suite de la présentation. On retrouve en effet dans la littérature récente les termes de « stiffness », de « reinforcement » et de « fluidization ».

Le « stiffness » ou rigidité en traduction littérale correspond à la mesure des capacités de résistance à l'étirement d'un tissu ou d'une cellule et fait donc intervenir la notion physique d'élasticité. Cette grandeur est très variable d'un tissu à l'autre et représente généralement une caractéristique du tissu à l'état de base. Elle a été définie par Young en tant que fonction des capacités élastiques ou E dont l'unité s'exprime en Pascal (Pa ou Newtons/m^2) et s'étend de quelques Pascal pour le cerveau à des MégaPa pour du tissu osseux ou tendineux [16](Levental, 2007 Soft Matter). Toutefois, cette valeur n'est pas statique mais varie au cours du temps notamment (embryogenèse, adulte, vieillissement) et constitue plus généralement une réponse à un environnement standard. Or au sein d'un tissu biologique comme le poumon, les cellules sont soumises à une variation exogène des contraintes sur une durée brève (de l'ordre de la seconde) et une interaction entre tissu et environnement

se crée. Des mécanismes de mécanotransduction qui convertissent une énergie mécanique (stimulation exogène) en un signal biochimique (réponse endogène) interviennent dans cette variation d'élasticité [17, 18](Ingber, 2006 FASEB J – Matthew, 2006 J Cell Scie). Dans cette relation, la famille protéique des intégrines a émergé depuis la fin des années 90 comme transducteur principal d'une variation de force mécanique [19](Tamkun, 1986 Cell). Il s'agit de glycoprotéines transmembranaires composées de deux sous-unités (18alpha et 18 bêta) qui relient le cytosquelette via l'actine à la matrice extracellulaire via le collagène, la fibronectine ou la lamiline [20, 21](Hynes, 2002 Cell– Hynes, 2009 Science) et qui participent à la transformation du stimulus initial.

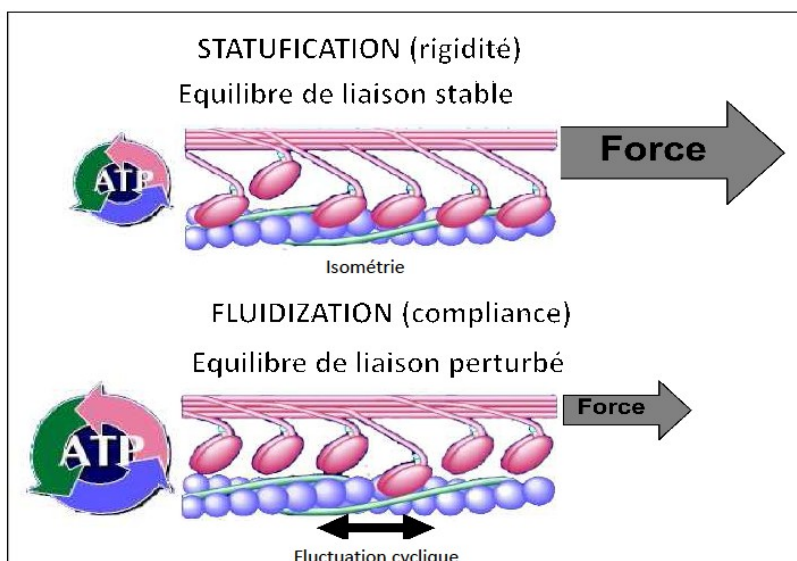
Les différentes cellules bronchiques, et particulièrement les cellules musculaires lisses, ont la capacité de détecter un stress physique externe tels que des variations brutales de contrainte (compression ou tension) appliquées sur la membrane externe ou encore des modifications de l'enveloppe des cellules contiguës. En réponse à ces contraintes, l'effecteur principal demeure le cytosquelette qui par ses propriétés de transégrité (structure stabilisée par l'équilibre des forces de compression et de tension) forme un continuum avec la matrice extra-cellulaire, les protéines transmembranaires et le noyau [22] (Ingber, 1994 Int Rev Cytol). Dès lors, l'application d'un étirement de la cellule notamment, peut entraîner deux types de réponses opposées et osciller entre deux équilibres: le renforcement par polymérisation rapide des filaments d'actine ou la fluidification décrite plus récemment permettant l'obtention d'une souplesse architecturale et qui intervient comme étape entre deux états d'activation par exemple [23](Krishnan, 2009 PLoS One). Ce passage d'un état à un autre fait intervenir principalement les complexes actines-myosine mais également des phénomènes de thermodynamique dont l'ATP est l'effecteur majeur [24] (Deng, 2009 Pulm Pharmacol Therap).

1.2.2 Renforcement

Le premier phénomène décrit dans la littérature est le renforcement. Il correspond à une augmentation des zones d'attaches intercellulaires associée à une augmentation de la polymérisation de filaments d'actine intracellulaire et de l'interaction entre actine-myosine avec un plus grand nombre de ponts activés entre les filaments et un raccourcissement de la longueur totale des filaments. En conséquence, un nouvel équilibre (en « contraction ») du tissu est atteint avec une souplesse amoindrie ce qui élève les résistances de l'arbre trachéo-bronchique en distalité lesquelles sont parfois difficile à contrer en pathologie. Cette notion

est décrite depuis le milieu des années 90 avec la démonstration par un certains nombres d'auteurs qu'une situation où la masse musculaire est trop importante ou bien les forces appliquées aux cellules trop faibles aboutissait en une structure rigidifiée avec établissement d'un cercle vicieux jusqu'à un nouvel équilibre ou bien jusqu'à la destruction des cellules par apoptose [25, 26] (Mjailovich. 2000 *Biophys J*; Wang. 2002 *Am J Physiol Cell Physiol*) (Figure 1.4). L'hyperréactivité bronchique observée dans la pathologie asthmatique fait appel selon certains auteurs à cette notion de « rigidification » de la structure de l'arbre bronchique [27] (Oliver 2007 *Am J Respir*). Toutefois dans les conditions physiologiques on n'observe pas de rigidification complète des systèmes comme les voies aériennes qui sont soumises à une stimulation cyclique et qui aboutirait à leur « statufication ». Ceci suggère une parfaite homéostasie définie par Walter B Cannon de la façon suivante : *“when a factor is known which can shift a homeostatic state in one direction it is reasonable to look for a factor or factors having an opposing effect.”* [28] (Abboud, 2010 *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*) Par conséquent, un mécanisme compensatoire opposé est nécessaire.

Figure 1.4 : équilibre entre rigidité et souplesse ou élasticité et rôle du complexe actine-myosine. A/ en cas de contraction isométrique maintenue, un équilibre statique s'installe avec des ponts actine-myosine largement activés et fixés. Dans cet état, le muscle est figé et présente une rigidité élevée avec peu de renouvellement des ponts actine-myosine. B/ A l'inverse, au cours de fluctuations d'amplitude modérée (ventilation spontanée), l'équilibre de fixation actine-myosine est modifié de telle sorte qu'une faible fraction des ponts actine-myosine est attachée. Le muscle se révèle beaucoup plus compliant mais requiert davantage d'énergie pour maintenir cet état ([25] D'après Fredberg 2000 *JAP*)



1.2.3 Fluidification

Ainsi plus étrange est le phénomène de fluidification du cytosol qui a été décrit plus récemment soit en l'absence de stimulation externe soit au contraire face à une stimulation de forte amplitude telle qu'une inspiration profonde (Deep Inspiration - DI) [29-31] (Sollich, 2003 et 2012 *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* - Krishnan, 2012 *Am J Physiol Cell Physiol*). A l'arrêt de ces contraintes extérieures marquées par un étirement, les cellules retrouvent leur état antérieur d'équilibre par une prompte réduction de la rigidité cellulaire. L'alternance de contraction/relaxation crée finalement une perturbation du cycle habituel de ponts entre l'actine et les filaments de myosine aboutissant à une modification du trafic intracellulaire et à une réorganisation de l'orientation des fibres de façon perpendiculaire au vecteur de force exprimé [23, 32](Krishnan 2011 *Am J Physiol Cell Mol*). Par ailleurs, la force du stretch semble être plus importante que la fréquence [33, 34](Moriaka, 2011 *PLoS One* – Trepap, 2007 *Nature*). Ce mécanisme de balance entre fluidification et resolidification ou renforcement semble être universel entre les différents types cellulaires et les différentes espèces. Ainsi la balance entre renforcement et fluidification du cytosol permet l'obtention d'un équilibre et protège les voies aériennes de réponse excessive à l'application d'une élongation. En condition de charge, le renforcement est atténué voire supprimé en faveur de la fluidification. Ce phénomène est superposable à celui observé pour certains matériaux avec des propriétés biomécaniques, particulières qu'on peut retrouver par exemple dans le verre, les suspensions colloïdales, les pâtes (pâte à dentifrice) et certains savons: il s'agit de « matériaux à la souplesse du verre » ou '**Soft Glassy Materials**'. En effet, leur élasticité de base peut se modifier de telle sorte qu'on obtient une structure souple sans modification des constituants. A l'arrêt de la « stimulation », ces matériaux retrouvent spontanément une structure solidifiée. Ainsi le comportement des cellules musculaires lisses respiratoires évoquent celui de ces substances avec trois caractéristiques physiques. D'abord, ces matériaux se présentent « au repos » comme élastiques ou gélatineux avec des constantes de Young basses (1 Pa à 1 kPa), inférieures aux polymères synthétiques les plus souples. Ensuite, la possibilité de fluidification semble indépendante de la fréquence de stimulation ou du temps de relaxation de la structure et de la matrice extra-cellulaire [30](Sollich, 2003 *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*). Enfin, le troisième critère définissant ce 'soft glossy material' est que la contrainte de frottement aboutissant à la fluidification est

proportionnelle à la contrainte élastique du tissu et n'est pas fonction de l'état de viscosité initiale. La cellule musculaire lisse comporte ces différentes caractéristiques et différentes études l'ont démontré [35]([Fabry, 2003 Respir Physiol Neurobiol](#)), insistant notamment sur ses propriétés malléables en fonction de l'environnement. En particulier, l'absence de stretch aboutit en une structure cellulaire rigide qui pour un stretch, unique et transitoire peut basculer immédiatement en structure souple. Cette fluidification s'accompagne d'une vitesse de réarrangement élevée au sein du cytosquelette qui augmente considérablement (x10) par rapport à l'état basal [34]([Trépat 2007 Nature](#)). A l'inverse, à l'arrêt du stretch, la cellule se resolidifie et le nombre de ponts actine-myosine actif diminue rapidement. Il convient de noter la différence de cinétique de ces deux phénomènes puisque la fluidification est d'installation très rapide tandis que le retour à un état stable ou un renforcement prend davantage de temps provoquant un phénomène d'hystérésis. Par ailleurs, ce phénomène de fluidification s'observe aussi bien en cas de stretch mono ou biaxial homogène qu'en cas de stretch non homogène, soulignant la robustesse de cette réponse. Par contre le retour à la phase d'équilibre est influencé par le type de contrainte appliquée et en cas de stretch non homogène la force de retour peut largement dépasser le tonus basal suggérant un renforcement de la réponse tandis que le retour au tonus basal est observé pour un stretch homogène. Un des médiateurs de cette réponse excessive est la tyrosine kinase dont l'inhibition supprime ce renforcement [33] ([Krishnan, 2008 Respir Physiol Neurobiol](#)). Cette réponse physiologique en « fluidization » est très robuste puisque des prétraitements agissant sur le cytosquelette tels que des inhibiteurs des kinases des chaînes légères de la myosine (ML7) ou des inhibiteurs de la dépolymérisation des filaments F d'actine vont diminuer l'amplitude de la réponse mais non l'éliminer [32]([Morioka PlosOne 2011](#)). Ceci laisse supposer d'autres cibles que le simple appareil actine-myosine. Entre autre cible, on retrouve les inhibiteurs des RhoA kinases qui limitent partiellement cette réponse. En effet, Di Paolo a montré sur un modèle de cultures cellulaires (épithélium alvéolaire en monocouche) qu'il existait une diminution de l'activité RhoA kinase temps dépendante et élongation dépendante. Ainsi une élongation faible (<25%) n'entraînait pas de modification de l'activité RhoA-kinase tandis que des élongations plus importantes (25% et 37%) diminuaient significativement cette activité ainsi que la phosphorylation de la MLCP. Cette diminution de cette réponse était observée dès la 10^{ème} minute pour les élongations les plus importantes (> 37%) et à la 60^{ème} minute pour le cas des élongations moindres à 25% [36]

(DiPaolo 2012 *Am J Physiol Lung Mol Physiol*). Dans ce modèle cellulaire de stretch, les filaments de myosine de type II interagissent avec les filaments F d'actine tandis qu'on observe une migration de l'activité de la MLC2 au centre de la cellule [36, 37] (DiPaolo 2012 *Am J Physiol Cell* – Mizuno 2003 *Am J Physiol*) En pathologie, ces résultats sont intéressants car il a été montré que l'activité RhoA kinase est augmentée dans les cellules alvéolaires de type II notamment en cas d'exposition à des hauts volumes d'insufflation sans pour autant d'augmentation de la perméabilité inter-épithéliale [38](Desai, 2007 *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*). D'autres circuits de régulation peuvent intervenir tels que les voies de signalisation Ras and ERK qui permettent d'optimiser l'activité de la RhoA kinase [39](Sahai, 2001 *EMBO J*) tandis que l'augmentation de la rigidité cellulaire résulte notamment de la stabilisation des sites d'adhésion focale (desmosome, intégrine) avec la matrice extracellulaire ou les cellules contiguës par une élévation de la phosphorylation des tyrosines présentes dans ces zones d'adhésion (Focal Adhesion Kinase et paxilline) [40, 41](Merrien 2010 *Rev Mal Respir* - Schaafsma 2004 *BJP*).

Enfin cette réponse en fluidification est particulièrement sollicitée lorsque la cellule ou l'organe est soumis à une contrainte externe. En effet, il a été montré que l'application d'une contrainte de forme « variable » ou encore d'intensité « variable » modifiait l'axe des composants du cytosquelette ou des cellules. Ainsi, l'application d'une contrainte répétée à moyenne intensité produit rapidement (en moins d'une heure) un réarrangement du cytosquelette tel qu'il prend un axe perpendiculaire à la contrainte, axe dans lequel la contrainte exercée sur la cellule est moindre [32](Morioka *Plos One* 2011). Par contre, une stimulation plus faible ou plus espacée dans le temps ne modifie pas l'orientation de la cellule (**photo 2**). Cette réorientation est précédée d'une phase de transition avec fluidification du cytosol rapide suivie d'une phase de resolidification qui permet la réorganisation du cytosquelette et qui fait notamment intervenir les microtubules [31, 32](Krishnan 2012 *Am J Physiol Cell Physiol* - Morioka 2011 *Plos One*). L'application ponctiforme mais homogène d'une contrainte conduit à une réorganisation radiaire des cellules soumises tandis qu'une exposition asymétrique ou encore axial voit le cytosquelette des cellules s'organiser perpendiculairement au vecteur force dominant. Enfin, l'application d'un étirement faible monoaxial sur une cellule musculaire lisse en monocouche modifie la forme globale de la cellule, laquelle tend à s'arrondir, tout en modifiant l'orientation globale du cytosquelette (**Figure 1.5**) [32] (Morioka 2011 *PLOSone*).

Photo 2: Microscopie électronique montrant la réorganisation du cytosquelette suite à l'application d'un étirement répétitif (flèche). D'après [Morioka PlosOne 2011 \[32\]](#)

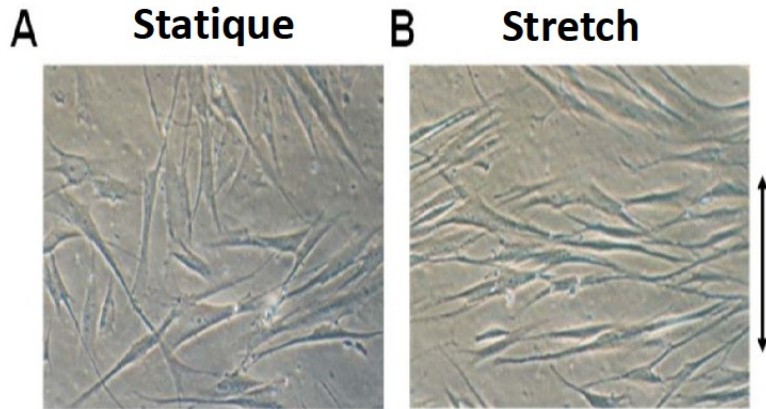
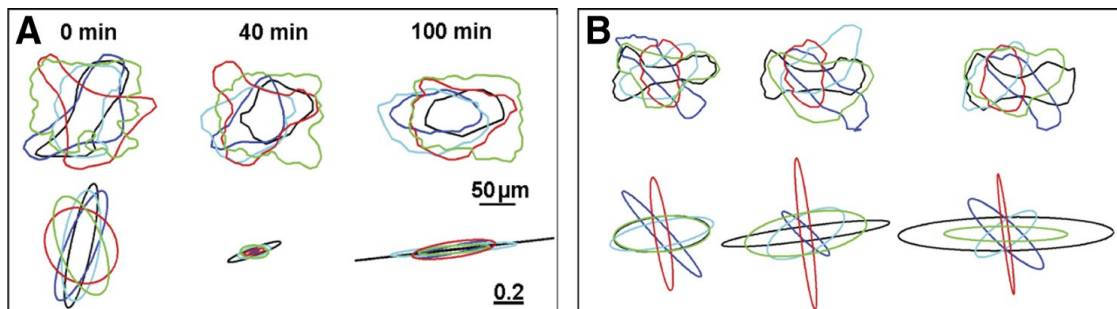


Figure 1.5: Représentation au cours du temps de la polarisation de la cellule en haut et de l'orientation des fibres musculaires en bas. A/ on observe au cours du temps une polarisation de la cellule avec une similitude dans les formes colorées et une organisation spatiale des fibres qui s'orientent perpendiculairement au vecteur d'étirement (flèche). B/ cellules contrôles avec absence de polarisation et absence d'organisation du cytosquelette. (D'après [Oliver 2007\[27\]](#))



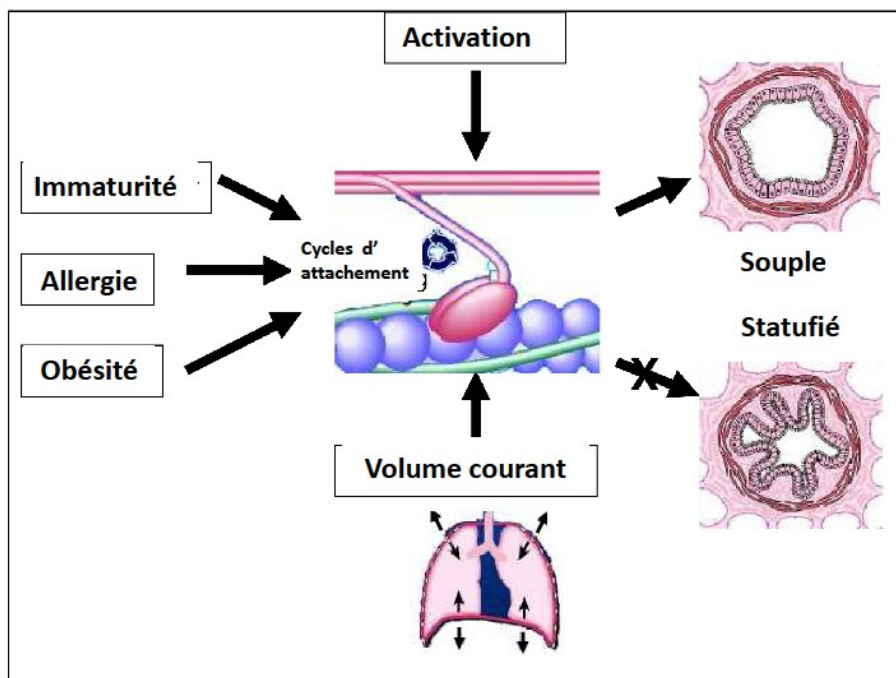
L'autre grand effecteur de cette réorganisation du cytosquelette est le microtubule. Ainsi, Morioka et al. ont étudié des cultures de cellules musculaires lisse bronchiques humaines montées sur une matrice de collagène elle-même sur un support extensible. L'application d'un étirement modéré associé à l'exposition à des agents comme la colchicine (inhibiteur de la polymérisation des microtubules) ou le plaxitel (stabilisateur des microtubules) inhibait cette réorganisation du cytosquelette et limitait significativement le transit intracellulaire [32] ([Morioka PlosOne 2011](#)).

Si la balance renforcement/ fluidification permet d'expliquer un certain nombre de propriétés de la bronche, elle ne tient pas compte d'un élément majeur permettant cette performance (**Figure 1.6**). Il s'agit en effet de l'énergie nécessaire. A ce titre l'ATP représente le vecteur principal. En reprenant la comparaison avec les matériels « glassy » comme le verre, une variation d'énergie est le facteur de déclenchement du changement d'état solide - souple [34] (**Trepat 2007 Nature**). Toutefois, cette voie énergétique ne peut expliquer l'ensemble des forces développées et semble prédominer principalement sur la phase de resolidification [42](**Bacallao, 1994 J Cell Sci**). En effet, la déplétion complète en ATP conduit en une réorganisation complète du cytosquelette actinique qui d'une structure maillée de soutien dans l'axe de la cellule perd cette fonction de support avec une polymérisation non organisée faisant perdre par ailleurs en élasticité sans que la structure microtubulaire soit affectée par ailleurs [42](**Bacallao 1994 J Cell Sci**). Dans ce contexte de remaniement du cytosquelette, d'autres hypothèses doivent être suggérées. Et la principale reste l'hypothèse thermodynamique. En effet, parmi les énigmes qui persistent en biophysique, sont celles du changement d'état (solide vers liquide) observé après agitation de certains matériaux : verre, pâte de dentifrice... Or, dans les cellules vivantes aussi, une source d'énergie ATP-indépendante proviendrait de cette contrainte brutale aboutissant à la modification d'état « fluidization » par transfert d'énergie consécutif à une contrainte extrême. Il a été noté que plus le système est proche d'un état solide, plus il était susceptible à la fluidification ([43, 44](**Bursac P, 2005 Nat Mater – Bursac 2007 Biochem Biophys Res Commun**)) dépassant dans ce cadre un certain seuil énergétique. Ainsi, des signaux physiques cellulaires permettent de transmettre une activation moléculaire. L'autre caractéristique de ce stimulus est d'être non spécifique d'un type cellulaire et de ne dépendre que de l'état pré-contrainte. La ventilation par elle-même serait un puissant moteur énergétique permettant de conserver une certaine élasticité du système [34](**Trepat, 2007 Nature**) Bien que les systèmes inertes et vivants diffèrent, les situations de déséquilibre existent, restent parfois non encore élucidées mais avec probablement des explications proches [35](**Fabry, 2003 Respir Physiol Neurobiol**).

Au total, le cytosquelette par sa robustesse, la rapidité de fluidification appartient à cette classe de matériaux remarquables à la fois fragile et souple et les déterminants de cette modification d'états sont soit l'application d'une contrainte élevée soit des éléments

de thermodynamie. Dans le cas de la cellule musculaire lisse, ce sont des modifications des vitesses de réarrangement au sein du cytosquelette qui suggèrent des phases de transition [34](Trepap 2007 Nature). Plus largement, ce phénomène de changement d'état est désormais démontré à l'étage tissulaire, cellulaire et même moléculaire [44, 45](Bursac, 2005 Nat Mater - Lenormand, 2006 Biorheology). L'ensemble de ces phénomènes participent finalement à une polarisation de la cellule. Enfin le facteur temporel est intéressant puisqu'il suffit d'une stimulation très brève pour induire ces changements d'état. Ainsi, dans l'étude princeps de Trepap et al., il s'agissait d'un étirement axial sur cellule musculaire lisse isolée pendant 4 secondes.

Figure 1.6: Facteurs en balance dans l'état des fibres lisses de la paroi bronchique (normale ou statufiée). La ventilation avec volume courant maintient un état de souplesse normal. Par contre, des facteurs environnementaux tels que l'obésité, l'allergie et l'immaturité cellulaire peut induire une activation pathologique avec perte de compliance de la structure bronchique.



A retenir :

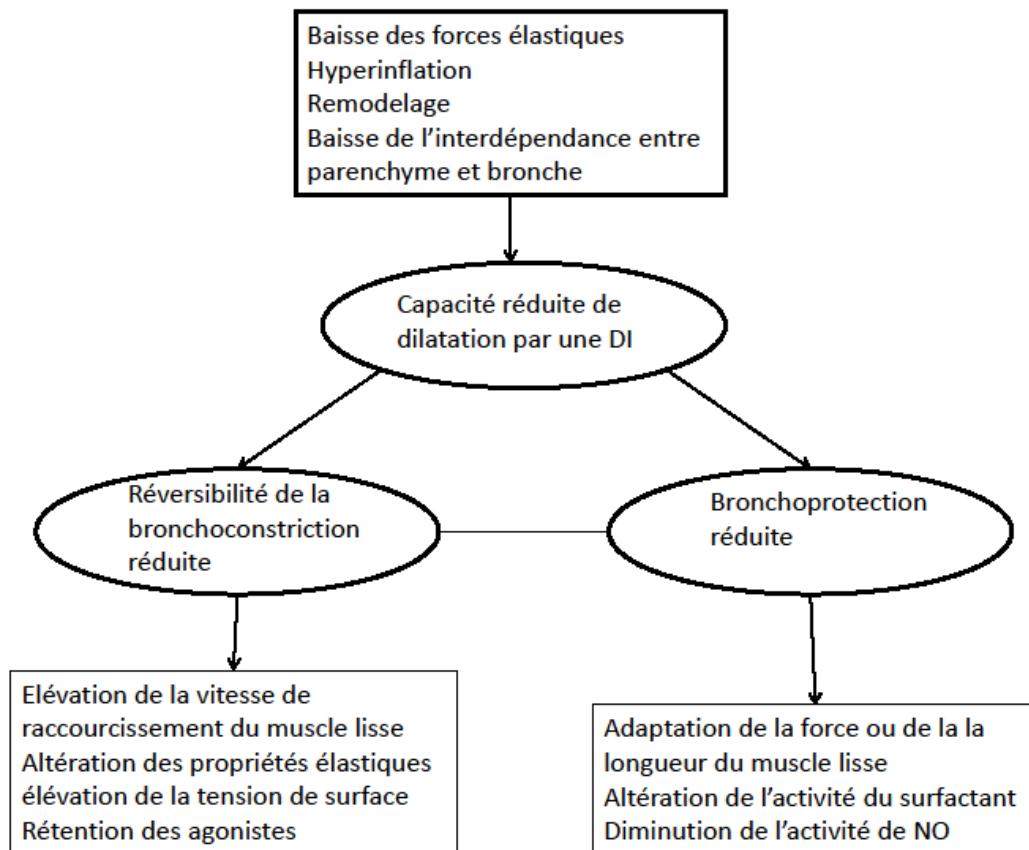
- Le cycle respiratoire génère un mécanisme de réponse épithélial appelé mécanotransduction

- Une balance entre renforcement de la structure cellulaire et fluidification permet de donner une grande souplesse aux structures des bronches en ciblant notamment les cellules musculaires lisses bronchiques
- Une réorganisation de l'ensemble du tissu en polarité est possible in vitro
- Le cytosquelette et notamment l'interaction actine myosine est au cœur de ce phénomène
- Des concepts thermodynamiques peuvent s'appliquer au niveau cellulaire

3. Deep inspiration - réflexe d'inspiration profonde.

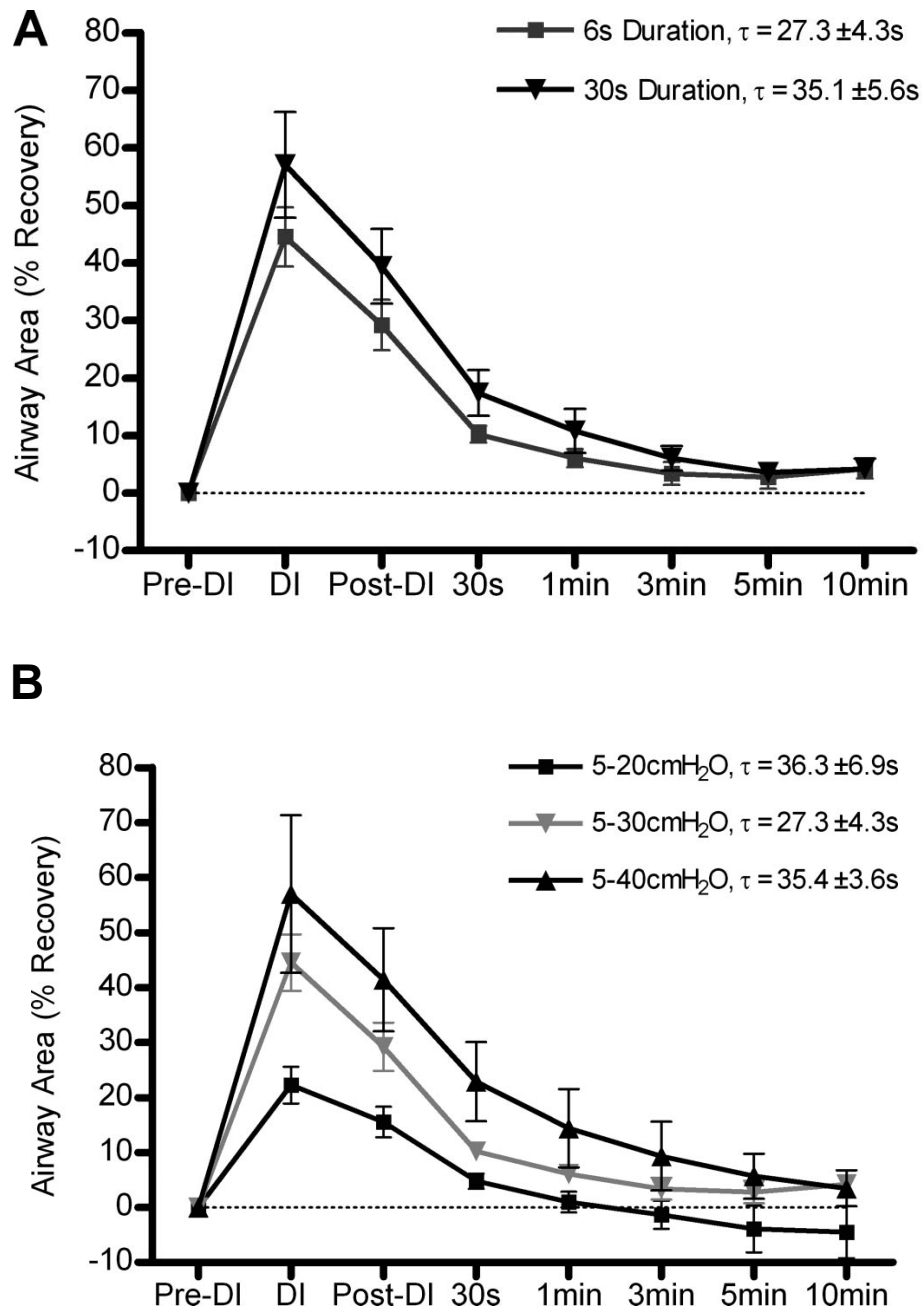
Ce phénomène physiologique particulier provoqué par une inspiration profonde, décrit à la fin des années 80, est un mécanisme puissant capable de réverser transitoirement une bronchoconstriction induite par différents stimuli: changement brutal de température, exercice physique, urticaire cholinergique... Il semble être à la fois un mécanisme de bronchodilatation (réversion d'une bronchoconstriction) mais aussi dans certains cas de bronchoprotection (atténuation d'une bronchoconstriction) lorsqu'il précède une exposition ou une situation provoquant une bronchoconstriction. Par ailleurs, il a été montré sur des sujets sains que l'absence d'inspiration profonde par une inhibition consciente volontaire au cours d'une inhalation de métacholine induisait finalement une réponse obstructive pulmonaire semblable à celle observée chez le sujet asthmatique ou présentant une hyperréactivité bronchique. De façon similaire, des sujets présentant une hyperréactivité bronchique montre une réponse en inspiration profonde significativement diminuée [44, 46](Skloot, 1995 J Clin Investig - Jensen, 2001 JAP). Ce mécanisme se révèle donc défaillant notamment en cas de pathologie asthmatique ou d'hyperréactivité bronchique (**Figure 1.7**).

Figure 1.7: Réponse à une inspiration profonde (DI) physiologique et pathologique. Une réponse normale conduit à conserver une rigidité musculaire modérée par un nombre relativement peu important de ponts actine-myosine actifs. Le muscle reste ainsi dans un état activé et réactif à toute modification de charge. Par contre, en cas de réponse diminuée, l'interaction actine-myosine est plus forte et le muscle est dans un état de rigidité plus marqué qui va s'accroître dans un cercle vicieux avec réduction de la lumière bronchique pouvant aller jusqu'à un collapsus bronchique. Les signes « + » et « - » indiquent les phénomènes interagissant avec cette boucle de réponse. Adapted from Oliver et al. (2007).



La description de cette réponse montre qu'une modification brutale de la pression inspiratoire (jusque $-30 \text{ cmH}_2\text{O}$) sur une bronche sensibilisée (exposition à de faibles concentration d'acétylcholine $10\text{E}^{-7}\text{M}$ ou d'histamine) induit une bronchodilatation transitoire qui s'estompe en une minute [47] (West, 2012 *Eur Respir J*). Cette réponse se révèle inversement proportionnelle à l'élasticité du tissu et proportionnelle à l'amplitude du stretch appliqué (**Figure 1.8**). Toutefois, les explorations plus récentes semblent évoqués une réponse en U avec une relaxation maximale obtenue pour une réduction préalable du calibre des voies aériennes de 30 à 40% mais une réponse moindre pour une réduction plus marquée du calibre ou au contraire en l'absence de constriction préalable: "tissu naif" [48] (LaPrad, 2008 *JAP*). Le mécanisme responsable n'est pas parfaitement élucidé, toutefois au-delà du rôle de probables afférences neurales, de neuromédiateurs dont le NO) [49] (Brown, 2001 *Am J Respir Crit Care*), la cellule musculaire lisse bronchique semble en être l'effecteur principal. En effet, des études sur des cultures cellulaires ou sur des cellules musculaires lisses isolées ont pu montrer des modifications significatives des tensions exercées suite à l'application d'une élongation prononcée et brève.

Figure 1.8: Mesure au cours du temps par fibroscopie de la surface de segments de bronches porcines soumises à une inspiration profonde (Deep Inspiration ou DI) d'intensité variable: entre 20 et 40 cmH₂O. Plus l'intensité de l'étirement est importante ; plus la réponse en dilatation à la phase initiale est majorée (A). Par contre, le temps de la manoeuvre ne modifie pas significativement la réponse observée (D'après LaPrad 2008 [50] (B). Il convient de noter une diminution du calibre à partir de la 3ème minute en cas de stimulus peu important. (A)



Il existe par ailleurs une relation entre la durée de la contrainte exercée sur la cellule et la durée de la relaxation ainsi que sur l'état de tension initiale et la réponse (**Figure 1.8**) ([51,

52] (Brown, 2001 JAP) [53]Brown RH, 2003 *J Asthma* - Noble, 2007 JAP). Ainsi sur un modèle de chiens ventilés mécaniquement et dont les bronches sont sensibilisées par une infusion continue de métacholine (67µg/min), la relaxation induite et mesurée par acquisition scanner dure environ 30 secondes et peut se prolonger jusqu'à 60 secondes en fonction de l'intensité de la DI (45 cmH₂O) [51](Brown, 2001 JAP). Les auteurs rapportent également que de façon plus surprenante pour les intensités les plus basses, cette DI génère une bronchoconstriction qui apparaît dans la minute suivante. L'état de tension préalable des bronches qui peut varier en pathologie humaine entre un sujet sain et un patient asthmatique présentant un état basal constricté conduit à une réponse différente en cas d'inspiration profonde comme détaillé notamment par Noble *et al.* sur un modèle de bronche porcine [52] (Noble PB, 2007 JAP). Dans leur étude, des segments de bronches porcines fermés aux deux extrémités et montés horizontalement dans une cuve à organe étaient ou non sensibilisés par l'exposition à des posologies croissantes d'acétylcholine. Une oscillation des pressions intraluminales entre 5 et 10 cmH₂O reproduisait une contrainte proche de celle exercée au cours de la ventilation spontanée à laquelle s'ajoutait une modification importante des pressions exercées (Deep inspiration) jusqu'à 30 cmH₂O pendant 5 secondes. Au décours immédiat de cette manœuvre, une relaxation des segments (estimée par une baisse de la pression interne pour un même volume) était observée même pour des niveaux de tension préalable élevée (prétraitement à l'acétylcholine) toutefois l'amplitude de la réponse se révélait moindre en cas de pré-contraction marquée tandis que le délai de retour à l'équilibre était par contre allongé suggérant l'importance de l'élasticité du tissu de soutien. À l'opposé dans le cas de bronche humaine isolée provenant de pièce opératoire, la pré-contraction n'avait pas d'influence sur la relaxation suivant une inspiration profonde [54](Noble JAP 2011). L'équipe de LaPrad à Boston a également beaucoup travaillé sur ce sujet de «deep inspiration» et a suggéré comme hypothèse la «suppression» transitoire de toute force contractile au décours immédiat avec réapparition progressive d'une tension par remise en route de complexes actine-myosine activés. Cette hypothèse rejoint finalement le concept de phase cytosol « fluide » décrit dans certaines matières telles que le verre ou les pâtes colloïdes [34](Trepât 2007 Nature). Il est à noter qu'on n'observe pas de dilatation sur une bronche préalablement relâchée, il faut une « sensibilisation » partielle de la bronche pour pouvoir déclencher cette dilatation transitoire. Mais une activation trop importante a deux conséquences directes: elle limite la

réponse observée car l'amplitude de l'étirement au moment de la manœuvre d'inspiration profonde se trouve considérablement restreint et elle risque de majorer la bronchoconstriction lors de la phase de « retour à l'équilibre » comme observé lors de stimulus de faible amplitude [48](LaPrad 2008 JAP). Un élément pertinent qui rejoint l'observation clinique est que ce phénomène n'est pas décrit uniquement sur un modèle de cellules isolées: cellule musculaire lisse [55] (An S 2007 Eur Respir J) mais sur tissu isolé tel que des fragments de bronches ce qui implique par conséquent le tissu de soutien dans cette réponse. L'amplitude de la bronchodilatation suivant une inspiration profonde est principalement dépendante de la contrainte appliquée sur les parois de l'arbre bronchique et de la tension résultante sur la fibre musculaire lisse, gouvernée par les propriétés viscoélastiques intrinsèques et par l'élasticité propre à un moment donné de la cellule musculaire lisse. Ainsi pour des tensions développées et répétées plus importantes, l'ensemble de la bronche est probablement déjà plus élastique et la bronchodilatation est moins puissante. D'un autre côté la réponse est quasiment maximale dès la première contrainte appliquée et le gain est pauvre en cas de répétition de celle-ci [34](Trepap 2007 Nature). Dans ce contexte, l'application d'une oscillation proche de la ventilation spontanée chez le porc fait disparaître cette réponse en bronchoconstriction tandis que chez l'humain la ventilation spontanée ne modifie par l'hyperréactivité bronchique. L'oscillation en pression n'est probablement pas l'unique facteur déclenchant du phénomène de relaxation ou bronchodilatation sous inspiration profonde.

Au final, en utilisant un modèle mathématique pour approcher ce phénomène, la dynamique de retour à l'équilibre suit une relation force-volume de forme exponentielle selon l'équation suivante :

$$V = dr/dt = K \times (F_0 - F_a)$$

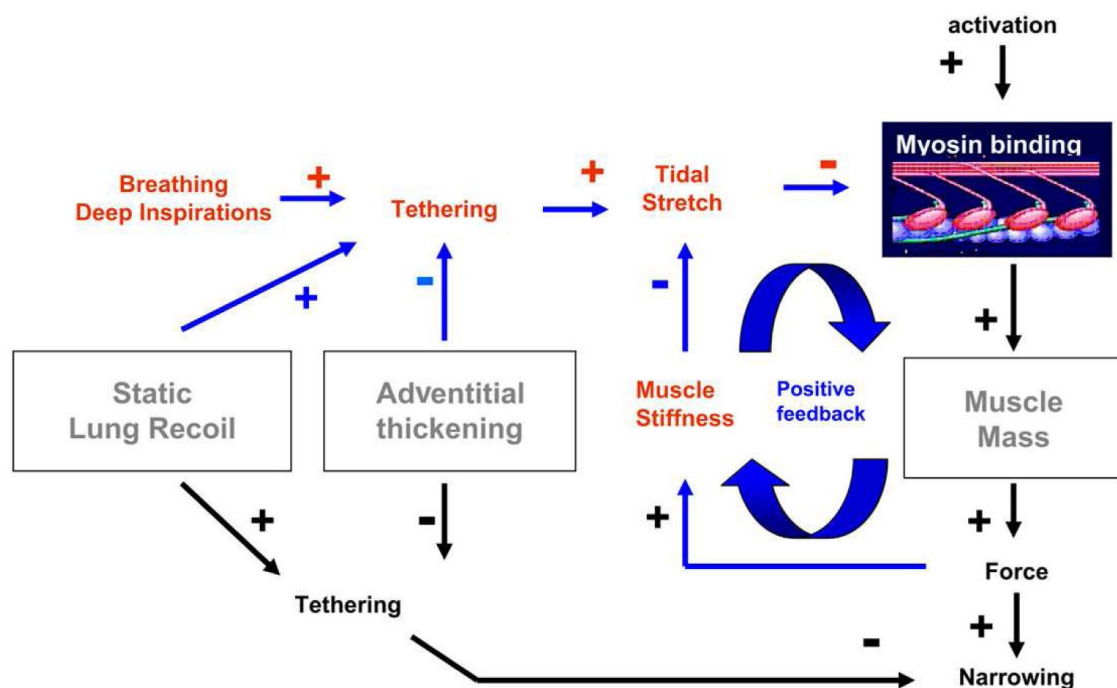
Où r (en cm) est le diamètre de la bronche, K [en (cmH₂O/s)] est une constante, F_0 (en cm/cmH₂O) est la force maximale que la fibre musculaire lisse peut générer sous les conditions de charge prescrites et F_a (en cm/cmH₂O) est calculée comme la force totale opposée à celle développée par la fibre musculaire lisse.

Toutefois, des études plus récentes tendent à montrer que l'application sur une cellule activée d'une contrainte modérée va conduire à une réponse excessive avec relaxation limitée et surtout constriction secondaire marquée [56]. (LaPrad, 2010 JAP) Ce

profil de réponse est observé chez le patient asthmatique et suggère l'implication de phénomènes myogéniques au sein de la cellule.

Une balance entre renforcement de la structure et fluidification permet finalement de donner une grande souplesse aux structures des bronches en particulier les cellules musculaires (**Figure 1.9**)

Figure 1.9 : Facteurs influençant la qualité de réponse en « inspiration profonde » (d'après Chapman, 2011 JAP [57]). L'altération de ce mécanisme par perte d'élasticité ou par remodelage conduit en un cercle vicieux qui s'installe rapidement et qui atteint les différentes voies de contre-régulation.



A retenir :

- L'inspiration profonde ou Deep Inspiratory est un mécanisme physiologique de bronchoprotection
- Le DI est suivi d'un phénomène décomposé de deux temps : une broncho-relaxation brève mais puissante et un retour à l'équilibre
- Une sensibilisation cellulaire ou tissulaire avec constriction préalable perturbe la réponse à ce phénomène en amplitude et en réponse constrictive renforcée

- Il est d'emblée maximal
- La réponse dépend de l'état "activé" ou non de la bronche et de l'amplitude de la contrainte mais est indépendante de la durée de celle-ci

4. Ventilation spontanée : concept de chaos

Chez l'être vivant, la respiration s'effectue en conditions physiologiques de manière spontanée et son rôle n'est probablement pas simplement le renouvellement de la composition des gaz au sein de l'alvéole pulmonaire. Ainsi Gump et al. a souligné il y a déjà quelques années le fait que la ventilation spontanée représentait le stimulus le plus puissant qui permettait le maintien actif de l'ouverture des bronches au fil du temps. [11](Gump 2001 JAP) En effet, la mobilisation d'un volume de l'ordre de 500 ml par inspiration modifie les pressions appliquées sur la surface épithéliale tout le long de l'arbre respiratoire. Différentes études ont montré que la variation de pression générée était de l'ordre de 1 à 10 cmH₂O tandis que la pression transmurale exercée au sein du poumon périphérique reste du même ordre. Finalement la variation de pression au cours du cycle est de 5-15 cmH₂O [40] (Merrien, 2011 Rev Mal Resp). De façon similaire à la fréquence cardiaque, l'alternance inspiration-expiration du cycle ventilatoire spontané paraît suivre une organisation régulière. Or l'analyse mathématique des architectures ou spectres de ces phénomènes montre en fait une très grande complexité appelée encore chaos qui rend impossible la prédiction du cycle suivant [58](Wysocki 2006 Respir Physiol Neurobiol). Ce comportement chaotique n'est pas causé par le système respiratoire périphérique puisqu'il est atténué en cas de contrôle cortical (attention portée à la respiration) et au contraire majoré en cas de stimulation du cortex sous-cortical. Finalement, ce constat s'oppose à la pratique de la ventilation mécanique telle qu'elle est réalisée en cas de défaillance de l'échangeur pulmonaire ou en cas d'anesthésie générale et s'oppose aux schémas expérimentaux examinant notamment la répétition d'une contrainte appliquée à l'arbre respiratoire. D'ailleurs, un certain nombre de pathologies respiratoires ou cardiaques vont éliminer cette structure chaotique : insuffisance cardiaque terminale, ventilation mécanique assistée tandis que la charge résistive appliquée lors d'une ventilation spontanée ne modifie pas cette variabilité [59]. (Samara, 2009 Respir Physiol Neurobiol). Il n'est donc pas illogique que les résultats obtenus diffèrent de la réalité

et ces nouveaux concepts doivent donc interroger pour tenter de mieux comprendre la physiologie.

D'un autre côté, une littérature récente concerne le soupir. En effet, cette profonde inspiration, parfois accompagnée d'un bâillement, mobilise au moins deux fois le volume courant et génère par conséquent brutalement une contrainte sur l'arbre respiratoire. La deuxième caractéristique est un déclenchement aléatoire de ce phénomène. Finalement il se rapproche fortement du concept de « Deep Inspiration » et est décrit aujourd'hui comme un mécanisme de bronchoprotection [60](Fredberg, 2001 *Respir Res*). Désormais, un certain nombre de ventilateurs proposent cette option qui intervient régulièrement lors du maintien de la ventilation mécanique.

A retenir :

- Chez le sujet sain l'architecture de la ventilation spontanée ne répond à aucune structuration: on parle de chaos ventilatoire
- Le soupir est un élément clé de la physiologie respiratoire dont les rôles sont encore controversés mais qui participe entre autre à la levée d'atélectasie et à une bronchodilatation transitoire.

5. Ventilation mécanique dite protectrice :

La mise en œuvre d'une ventilation mécanique par poumon d'acier lors de la pandémie de Poliomyélite en 1954 a permis de sauver des vies et cette technique de suppléance respiratoire s'est rapidement diffusée au sein des services de réanimation. A la suite, la pathologie respiratoire qui s'est révélée la plus complexe à traiter était le Syndrome de Détresse Respiratoire de l'Adulte dont la mortalité a longtemps été proche de 90% pour représenter encore environ 50% malgré les progrès de la réanimation et malgré ses différentes définitions (1994 et Berlin 2012) [61, 62](Ware, 2000 *NEJM* - Fanelli, 2013 *J Thorac Dis*). Dans ce contexte de nombreuses recherches ont été menées notamment sur le compartiment alvéolaire. Elles ont progressivement conduit à une modification des prescriptions des paramètres de ventilation devant l'apparition de lésions induites propres à la ventilation mécanique ou à l'inflammation et à l'œdème alvéolaire qu'elle entraînait (VILI

ou Ventilator Induced Lung Injury). Ainsi ont été décrits les volotraumatismes avec des lésions anatomiques modifiant jusqu'à l'architecture du poumon comme décrit initialement par Dreyfuss et al. et provoquant un œdème alvéolaire d'origine lésionnel et non cardiogénique comme supposé auparavant [63] (Dreyfuss, 1992 *Int Care Med*). Ainsi, en explorant différentes modalités de ventilation mécanique chez le rat (hauts volumes, hautes pressions positives ou ventilation à pression négative), Dreyfuss et al. ont pu montrer qu'une ventilation minute avec un volume courant de l'ordre de 20 ml/kg associée à une pression élevée des voies aériennes générerait rapidement des lésions parenchymateuses et particulièrement alvéolaires avec surdistension et ruptures alvéolaires par rapport à des volumes moindres : barotraumatisme ou volotraumatisme [64, 65] (Dreyfuss D, 1988 *Am Rev Respir Dis* – Dreyfuss, 1998 *AJRCCM*). Ces études animales ont conduit dans un premier temps à la réduction des volumes insufflés en clinique humaine malgré la crainte alors de majoration du risque d'atélectasies et donc du risque d'hypoxémie par la création d'un shunt pulmonaire. Les études chez l'humain ont montré qu'un passage progressif du volume courant de 12 à 15 ml/kg à environ 9 ml/kg était associé à une franche réduction de la morbidité et de la mortalité [66] (Brower, 2004 *NEJM*). Un peu plus tard, de nouvelles études ont suggéré l'intérêt d'un volume courant aux alentours de 6 ml/kg associé à une pression expiratoire positive (PEP) afin de maintenir les alvéoles ouvertes : c'est le concept de « l'open lung » [67] (Briel, 2008 *JAMA*). D'un autre côté, des barotraumatismes ont été décrits et ont par conséquent abouti logiquement à la réduction des pressions intra-thoraciques et au monitoring des pressions d'insufflations et de plateau pour rester en deçà d'une limite fixée à 30 mmHg [67] (Briel, 2008 *JAMA*). Associée à ces complications ventilatoires d'ordre « mécanique », on observait en parallèle une réponse inflammatoire locale (alvéolaire) très importante qui pouvait induire une immunodépression locale avec le risque de surinfection [68] (Pugin, 2008 *Am J Respir Cell Mol Biol*). Le concept de biotrauma s'est alors associé aux atteintes spécifiques de la ventilation mécanique. L'application d'un stress cyclique au cours du cycle ventilatoire génère une modification de la morphologie cellulaire notamment au niveau des surfaces de contact (extrémités apicales de l'épithélium alvéolaire) et entraîne en conséquence une activation de messagers intracellulaires à l'origine de la sécrétion de médiateurs pro et anti-inflammatoires : c'est le principe précédemment décrit de mécanotransduction. Ainsi, la production d'IL-8 par les cellules humaines épithéliales bronchiques, alvéolaires ou encore macrophagiques soumises à un étirement cyclique

prolongé était fortement augmentée dans le lavage broncho-alvéolaire [69] (Krane 2009 JAP). D'autres auteurs ont montré ex vivo le rôle de la stratégie ventilatoire sur la production intrapulmonaire de cytokines pro-inflammatoires : TNF alpha, MIP2 (chimiochine). Ainsi, le TNF α augmentait jusqu'à 56 fois dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire lorsque le VT de « physiologique » (7 ml/kg) devenait excessif (40 ml/kg). Ces découvertes ont permis de tester de nouvelles hypothèses comme l'absence d'inflammation « cliniquement » significative induite par la ventilation mécanique seule, utilisant des VT « raisonnables. La situation est très différente en cas de lésion pulmonaire préexistante ou concomitante, notamment si le poumon est infecté. Dans ce dernier cas une synergie est observée aussi bien in vitro qu'in vivo entre les effets de la VM et ceux d'un stimulus pro-inflammatoire. [70] (Pugin, 1998 Am J Physiol) Ces situations peuvent pérenniser un syndrome inflammatoire ou être à l'origine de complications infectieuses directes (pneumopathie) ou indirectes en cas de défaillances d'organe multiples [71](Villar 2011 PLoS One).

Malgré cette inflammation locale et alvéolaire, le maintien de l'alvéole ouvert (concept de « l'Open Lung ») a été introduit progressivement pour limiter le shunt ou les contraintes de cisaillement liées à des cycles d'ouverture-fermeture alvéolaires. Ce concept a abouti à différentes stratégies afin de limiter notamment la constitution d'atélectasies: majoration de la pression expiratoire positive (PEEP) pour déterminer la PEEP optimale, les manœuvres de recrutement alvéolaire et le soupir. Enfin, la diminution des contraintes exercées au sein de l'alvéole a permis également de réduire le risque infectieux initialement décrit. Au total, des modifications majeures sont intervenues ces 20 dernières années et atteignent aujourd'hui autant la réanimation que le bloc opératoire. Toutefois, les travaux expérimentaux tout comme cliniques ont été menés sur l'alvéole (cultures cellulaires, lavage bronchioalvéolaire) mais le compartiment bronchique a été largement méconnu. Deux études conduites récemment chez le petit animal s'intéressent aux conséquences de la ventilation sur les bronches proximales et distales. Ainsi, une première étude chez le rat ventilé a exploré les conséquences de hauts volumes inspiratoires ou de PEEP sur la paroi bronchique de l'arbre respiratoire. Pour ce faire, un bronchogramme via l'inhalation de Tantalum à l'inspiration a été obtenu sous différentes conditions expérimentales (6, 12 ou 25 ml/kg en ZEEP ou PEEP=10) pour un même animal. Les principaux résultats rapportent que la contrainte appliquée lors de la ventilation est anisotropique (différence entre les forces développées sur la circonférence et la longueur des bronches) et hétérogène le long de l'arbre

bronchique. De plus, l'augmentation des volumes inspiratoires élève l'étirement bronchique dans un plan circonférentiel et en longitudinal avec un effet plus marqué sur les diamètres des bronches de petits calibres (bronche distale ou bronchiole). Quant à la pression expiratoire positive, elle renforce ces effets avec l'atteinte plus fréquente d'une limite dans la tension appliquée à la paroi [72]. (Sinclair, 2009 J Crit Care) Récemment, une étude chez la souris a pu confirmer le rôle des bronches comme « soupape » des pressions générées dans l'arbre respiratoire. En effet, pour des volumes courant supérieurs à 6 ml/kg, une imagerie in-vivo à haute définition (scanner de type Flat-panel) montre une dilatation réversible des bronches proximales. Les auteurs évoquent la possibilité que cette réponse constitue une protection du compartiment alvéolaire lors de l'application de pressions élevées [4] (Nickles 2014 AJRCCM). Un plateau est atteint pour 10 ml/kg, au-delà la protection ne paraît plus assurée.

La bronche est source d'intérêt en cas de pathologies telles que l'asthme ou la bronchite chronique obstructive pour lesquelles la cellule musculaire lisse et la paroi subissent des remaniements importants au cours du temps pouvant conduire à une hyperréactivité bronchique. Par contre, la bronche comme interface de la ventilation mécanique reste peu étudiée et c'est par conséquent l'objet de ce travail.

A retenir :

- La ventilation mécanique peut être délétère sur le poumon générant volo et barotraumatisme ce qui a fait évoluer vers le concept de « ventilation protectrice ».
- Les effets de la ventilation sur le compartiment bronchique restent peu étudiés comparativement au compartiment alvéolaire.

Chapitre 2.

Vers un modèle de stretch cyclique

2.1. Contrainte appliquée – stretch / strain:

Lorsqu'on s'intéresse à la ventilation, les forces qui vont indirectement s'appliquer sur les structures de l'arbre respiratoire peuvent varier en fonction de plusieurs paramètres. Tout d'abord en ventilation spontanée, la mobilisation du volume inspiré dépend de la contraction active du diaphragme qui génère une pression négative intrathoracique. Dès lors la pression appliquée à l'épithélium est faible et la structure bronchique est soumise principalement à la pression transmurale comme stimulus. Celle-ci maintient les bronches ouvertes et est de l'ordre de 10 cmH₂O. Le soupir est éventuellement à distinguer dans la mesure où il s'agit de la mobilisation rapide et importante d'un grand volume inspiratoire comparativement à la ventilation spontanée. Dans ce cadre, la variation de pression et de contrainte sur les parois bronchiques va au moins doubler passant d'une pression de crête de 10 cmH₂O à des pressions pouvant atteindre 40 cmH₂O en fonction de l'état basal du tissu. En ce qui concerne, la ventilation mécanique, la grande particularité est qu'il s'agit d'un mode « pressurisé » quel que soit le mode de ventilation prescrit avec dès lors un compartiment intra-thoracique soumis à une pression positive tout au long du cycle ventilatoire. En détail, deux niveaux de pressions sont décrits au niveau de l'arbre trachéo-bronchique: la pression de plateau obtenue en fin d'inspiration lorsque le débit d'insufflation est nul et la pression expiratoire positive obtenue en fin d'expiration. La première est soigneusement monitorée car à l'origine potentiellement de barotraumatisme : en pratique, il est recommandé de ne pas dépasser les 30 mmHg [66] ([Brower 2004 NEJM](#)). Quant à la seconde, elle a pour but de maintenir les alvéoles ouvertes mais par transmission elle s'applique également à l'arbre bronchique [67]([Briel 2010 JAMA](#)). En définitive, lors de la ventilation mécanique, la pression appliquée à l'épithélium depuis la lumière bronchique varie cycliquement mais reste positive.

L'équation du mouvement revue par L. Brochard renseigne les interactions entre pression et flux de l'espace respiratoire :

$$\text{Pression} = (\text{Volume} / \text{Compliance}) + \text{Flux} \times \text{Résistance}.$$

Dans cette équation, les constantes représentent les caractéristiques de l'arbre respiratoire (compliance et résistance) tandis que les variables au cours du cycle ventilatoire sont la pression, le volume, le flux et le temps qui n'apparaît pas ici directement. Ainsi en fin d'inspiration (flux = 0), on retrouve une équation simplifiée et bien connue. L'intérêt de cette équation du mouvement est de séparer la part des résistances revenant à la portion proximale de l'arbre respiratoire et celles de la portion alvéolaire. Par ailleurs, en fonction de forces exercées sur la paroi des cellules présentes le long de l'arbre respiratoire, il est nécessaire de définir également plusieurs éléments : le stress, mesure de la force par unité de surface ; la tension, mesure de la force par unité de longueur. La contrainte est le terme générique de stimulus appliquée au tissu considéré. Enfin dans la suite du propos, on emploiera aussi le stretch ou étirement comme mode de stimulation calibré et réponse mécanique, les réponses cellulaires ou tissulaires observées dans le champ de la mécanique respiratoire.

En effet, les modèles expérimentaux présentent généralement deux modalités pour reproduire la contrainte ventilatoire. Le premier est l'application directe sur la surface de cellules, de cultures cellulaires ou de tissu d'un stress variable en intensité et en forme (focal ou diffus). Le second est indirect avec un étirement de cellules, cultures disposés sur un support extensible ou tissus par le biais de transducteur (variation de longueur ou variation de pression transmembranaire). Rares sont les modèles in-vivo avec application d'une ventilation mécanique plus ou moins prolongée.

Les gammes de variations attendues sont un étirement de l'ordre de 4% sur la paroi bronchique en ventilation spontanée au repos contre 12% lors d'un soupir ou d'un effort physique [11](Gump, 2001 JAP). En expérimental, il a été montré qu'un stretch faible (3%) suffisait à diminuer de moitié la force de contraction des cellules musculaires lisses reflétant la force d'interaction des filaments d'actine et myosine [10](Fredberg 1997 AJRCCM). Ces fluctuations mécaniques et périodiques de la contrainte sont transmises aux têtes de myosine et provoquent le détachement de celles-ci des filaments d'actine plus précocement qu'habituellement ou qu'en condition d'isométrie. Ce détachement prématuré réduit considérablement la durée du cycle de la myosine de 50 à 80% et le nombre de ponts actifs d'actine-myosine ainsi que la force développée par la cellule. Ainsi le muscle peut conserver une certaine compliance alors même qu'il est activé par une stimulation répétée. A l'arrêt de cette stimulation, un équilibre s'est créé tel que seule une fraction des ponts d'actine-

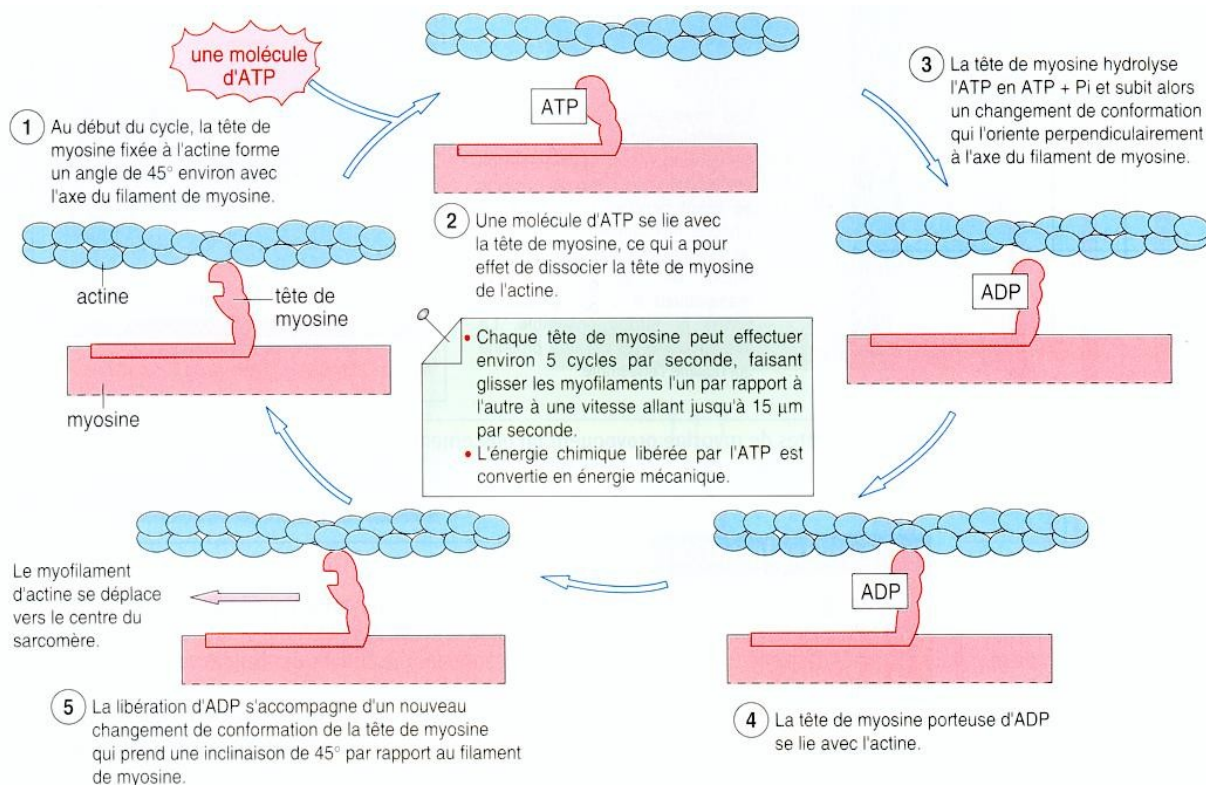
myosine restent attachés. Cet état « moléculaire activé » associant des cycles d'attachement et détachement rapides, une élasticité cellulaire modifiée et un métabolisme ATP dépendant a été décrit par Fredberg dès la fin des années 90 [9] (Fredberg 1999 AJRCCM). Lorsque cet état domine, on s'attendrait à une diminution concomitante de la force musculaire développée, à une limitation de la variation de calibre des voies aériennes, et une dilatation en réponse à une inspiration profonde causée par la rupture des ponts restant. En fait la cellule musculaire lisse ne répond pas de la même manière que la cellule striée squelettique et à l'adaptation en longueur décrite selon la relation classique de Hill correspond également une adaptation en force qui maintient constante les capacités de contractilité dans des valeurs telles qu'un étirement jusque 40% de la longueur initiale de repos. [55, 73](Bates, 2005 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol; An et al. 2007).

Il convient de rappeler ici les spécificités du muscle lisse squelettique par rapport au muscle strié squelettique (**Table 1**). En effet, dans les deux cas le stimulus de déclenchement de la contraction est l'élévation brutale de calcium intra-cytosolique. Dans le cas de la fibre lisse, cet afflux passe principalement par une entrée de calcium depuis l'espace extra-cellulaire ce qui explique en partie la présence d'un réticulum endoplasmique peu développé et l'inhibition des propriétés contractiles en milieu appauvri en calcium. Par ailleurs, plusieurs types de canaux calciques ont été décrits au sein de cette cellule. Si le canal calcique voltage-dépendant par le biais d'une stimulation nerveuse (système cholinergique), ou d'une dépolarisation de proche en proche est commun et peut comporter deux sous-groupes (voltage lent et rapide), il existe une autre famille de canaux calciques spécifiques de la cellule musculaire lisse. Ces canaux sont les canaux calciques sensibles à l'étirement (Stretch-Activated Receptor - SAR) qui vont être le principal effecteur du mécanisme de mécanotransduction. L'étirement de la cellule provoque l'ouverture de ces canaux calciques et l'influx de calcium permet la contraction et augmente la résistance de la cellule à l'étirement éventuel. Cette famille de canal calcique a été décrite récemment et appartient probablement à la grande famille TRPV1 car l'exposition au Gadolinium (inhibiteur des canaux sensibles à l'étirement), comme au Ruthenium implique directement cette famille de récepteurs [74, 75](Ito, 2006 EJR– Ito 2008 Am J Respir Cell Mol Biol). L'autre particularité de ces récepteurs est leur capacité à stimuler directement une contraction musculaire sans impliquer un second messager. L'élévation de la concentration de calcium intracytosolique

suffit à induire directement la phosphorylation de la myosine et par conséquent l'activation des ponts actine-myosine aboutissant à la contraction musculaire.

La seconde caractéristique principale concerne l'activation des ponts actine-myosine par le calcium. Dans le cas de la fibre lisse, l'élévation de calcium lié à la caldesome mène à la phosphorylation de la myosine via l'action d'une phosphatase des chaînes lourdes (**Figure 2.1**). Ceci libère le site d'accroche entre les filaments de myosine et d'actine. C'est la principale différence avec les fibres striées squelettiques dans lesquelles, le calcium intracytosolique interagit avec la tropomyosine ou la troponine présentes sur les complexes de myosine pour libérer le site de fixation à l'actine. Ainsi, l'interaction dans le cas de la fibre lisse est plus rapidement déclenché ce qui peut être avantageux dans le cas de cycles d'événements rapprochés comme observé lors de la ventilation spontanée.

Figure 2.1 : Cycle de fixation actine myosine conduisant au raccourcissement de la fibre lisse squelettique.



Enfin, le chevauchement des ponts actine-myosine est particulier puisque les fibres gardent une capacité de contraction élevée en situation de contraction (longueur plus faible que L_0 – longueur de repos) ou lorsqu'elles sont largement étirées. En effet, contrairement

aux fibres striées squelettiques, les fibres musculaires lisses sont courtes et arrangées en feuillets et de ce fait elles ne présentent pas macroscopiquement et plus encore microscopiquement de zone de transition marquée à l'origine de la strie Z des muscles striés. Par contre, on observe plus volontiers des corps denses et l'orientation globale des filaments épais (plus long que la cellule elle-même) et fins forment un réseau orienté légèrement en diagonale. De fait de la disposition des filaments de myosine une contraction musculaire conduit à modifier la taille et la forme de la cellule avec des renflements aux points d'ancrage de la membrane cellulaire. Une particularité provient du fait que lors d'une contraction isométrique, seule une fraction des ponts d'actine myosine interagissent même dans le cas où le muscle soit activé par ailleurs (cas de l'asthme) [33](Krishnan 2009 JAP).

Table 2.1 : Comparaison des principales caractéristiques d'une fibre musculaire lisse et striée.

	Fibres musculaires lisses	Fibres musculaires striées
Mécanisme de contraction	Glissement des filaments d'actine sur les filaments de myosine	
Innervation	Système nerveux autonome	Système nerveux somatique
Contrôle de la contraction	Involontaire	Volontaire ou inconscient
Déclenchement de la contraction	Neurogène ou mécanique (stretch)	Neurogène
Importance du réticulum sarcoplasmique	Peu développé	Très développé
Activation des ponts d'union	Augmentation intracytosolique de la concentration en calcium	
Source d'augmentation du calcium	Milieu extracellulaire et réticulum sarcoplasmique	Réticulum sarcoplasmique
Sites de régulation du	Myosine des filaments épais	Troponine des filaments fins

calcium

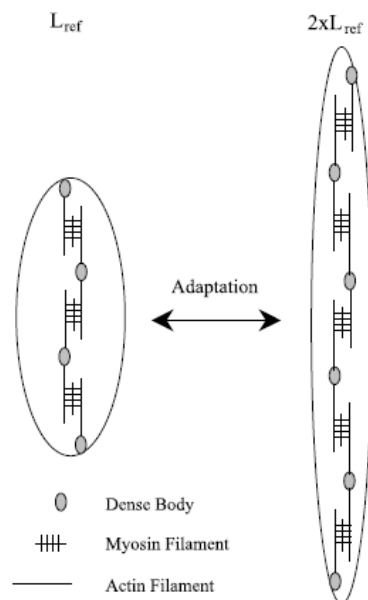
46

Mécanisme d'action du calcium	Phosphorylation des ponts d'union de la myosine	Déplacement du complexe troponine-tropomyosine découvrant les sites de liaison d'actine aux ponts d'union
Activité ATPase de la myosine : vitesse de contraction	Très lente	Rapide ou lente selon le type de fibre
Relation force longueur	Non	Bien caractérisée
Mode de gradation	Variation de concentration de calcium cytosolique liée à l'activité myogène, à l'influence du système nerveux autonome, d'hormones et à l'étirement	Variation du nombre d'unités motrices et de la fréquence de leur stimulation (sommation temporelle)

La relation entre longueur des fibres et force produite existe dans le cas des cellules musculaires lisses mais elle est moins étroite que pour les fibres striées squelettiques. En effet, l'étendue de variation de longueur compatible avec la production d'une force quasi maximale est large et la cellule peut encore produire une force importante même avec une longueur 2.5 fois la longueur de repos : c'est le phénomène d'adaptation de la longueur [76](Bai, 2004 JAP). L'hypothèse initiale pour expliquer ce phénomène fait état d'une modulation dynamique de l'organisation du cytosquelette avec réarrangement des filaments d'actine-myosine et optimisation des phénomènes de polymérisation et dépolarisation telle que la forme de la cellule s'adaptait pour répondre aux modifications de longueur [77, 78](Kuo 2001 JAP - Wang 2003 Respi Phsyiol Neurobiol) Cette réorganisation tend à maintenir un chevauchement des filaments contractiles [79](Seow, 2005 Am J Physiol Cell Physiol). Ceci peut notamment s'expliquer par le fait le muscle lisse non étiré est plus court que sa longueur de repos ce qui laisse une marge d'étirement et par le fait que même étiré les filaments fins chevauchent toujours les filaments de myosine de sorte que les ponts d'union peuvent entrer en action et produire de la force. L'étendue de variation d'un muscle

lisse va de 0.5 à 2.5 fois sa longueur de repos. Par ailleurs en raison de la « lenteur » du cycle de contraction-relaxation de la fibre lisse, les ponts d'union restent liés plus longtemps que dans la fibre squelettique : ils restent verrouillés. Cette notion est importante dans la suite de l'exposé et notamment en cas de modification répétée du statut des fibres : contractées – relâchées.

Figure 2.2: Représentation schématique des interactions actine-myosine et des possibilités de recrutement d'unités. La modification en longueur de la fibre lisse squelettique jusque 2.5 la longueur de repos se fait sans perte de puissance grâce à l'organisation en série des complexes actine-myosine (d'après Kuo, 2003)



A retenir :

- Les contraintes appliquées à la bronche lors de la ventilation positive sont de deux types : l'étirement ou stretch et la tension (force par unité de longueur)
- En conditions physiologiques, la variation de ces paramètres est faible de l'ordre de 10%
- Un certain nombre de différences distinguent les muscles lisses des muscles striés squelettiques
- Le muscle lisse est principalement sous la dépendance du calcium extracellulaire d'où un réticulum sarcoplasmique peu développé

- La fibre musculaire est capable de s'étirer largement et conserve des ponts d'union actine-myosine même étirée

2.2. Interaction entre épithélium et muscle lisse bronchique:

2.2.1 Principaux médiateurs

La commande du muscle lisse est assurée pour l'essentiel par le système nerveux végétatif via des neurotransmetteurs mais aussi par un contrôle paracrine via de nombreux médiateurs. Concernant le système végétatif qui est médié par le nerf vague, il repose sur le système cholinergique et ses récepteurs muscariniques M2 et M3 essentiellement présents à la surface des cellules musculaires lisses. Ceux-ci ont des actions opposées. Les récepteurs M3 entraînent une bronchoconstriction directe, tandis que l'action de l'acétylcholine sur les récepteurs M2, couplés à une protéine Gi, conduit à l'inhibition de la production d'AMP cyclique, qui aboutit indirectement au relâchement du muscle lisse [80] (Shen, 1997 JAP). A l'opposé, la densité en récepteurs adrénergiques au sein du compartiment musculaire bronchique est comparativement faible et l'activation de ces récepteurs passe exclusivement par l'adrénaline et les récepteurs Bêta-2 adrénergiques. Malgré leur faible nombre, leur stimulation est très puissante et entraîne une bronchodilatation rapide et complète. Enfin le système découvert plus récemment est le système non adrénergique et non cholinergique (NANC) constitué de deux composantes : le système NANC inhibiteur - NANCi qui libère du monoxyde d'azote ou un peptide vasointestinal (VIP) aboutissant en une bronchodilatation et le système NANC excitateur - NANCe à l'origine d'une contraction. Le système NANCi n'a pas de structure nerveuse propre et chemine avec la voie cholinergique. Chez l'homme, où l'innervation adrénergique joue un rôle relaxant mineur, le NANCi est considéré comme la seule commande nerveuse bronchodilatatrice [6] (Linden, 1992 JAP). Le NANCe possède quant à lui des fibres nerveuses propres qui cheminent dans le sens antidromique via les fibres sensitives de type C jusqu'en sous-épithélial [81] (Scotland, 2004 Circ Res). Ces fibres répondent facilement en cas de stimulation nociceptive ou en cas de dommage tissulaire et aboutissent en une constriction. Les effets du système NANCe sont la conséquence de la libération de médiateurs appelés tachykinines (substance P, neurokinines A et B et le « calcitonin gene-related peptide » (CGRP)) qui agissent sur 3 types de récepteurs : NK1, NK2 et NK3 [82] (Joos, 2000 Allergy). Ces récepteurs couplés aux protéines

Gi ont été retrouvés notamment chez les mammifères et induisent l'activation de la phospholipase C puis la voie de l'inositol triphosphate. L'action de ces neurokinines et en particulier de la Neurokinine A est de provoquer une bronchoconstriction chez les sujets atteints d'hyperréactivité bronchique et non chez les sujets sains.

Le muscle lisse des voies aériennes possède également des récepteurs membranaires spécifiques de médiateurs libérés par les cellules inflammatoires (mastocytes...). Parmi ces médiateurs ubiquitaires, on peut citer l'histamine qui agit spécifiquement sur le récepteur H1 des cellules musculaires bronchiques, les éicosanoïdes dérivés de l'oxydation de l'acide arachidonique qui se divisent eux-mêmes en deux familles : prostanoïdes (prostaglandines de type PGD₂, PGE₂ et thromboxane A₂) et les leucotriènes de type LTC₄ et LTD₄, la tryptase et certaines cytokines (Th2, IL-1 et TNF-alpha) [83] (Berger P 2002 Rev Mal Respir).

Le calcium quant à lui joue le rôle de second messenger au sein des cellules musculaires lisses et l'élévation brutale de sa concentration intracytosolique contrôle les complexes actine-myosine tout en favorisant leur interaction. Deux stimulations peuvent aboutir à cette modification brutale de concentration : les couplages pharmacomécanique et électromécanique. La première et la plus fréquente stimulation correspond au couplage électromécanique qui implique des messagers extracellulaire à l'origine d'une activation d'une protéine G et de la cascade médiée par la phospholipase C. La phospholipase C catabolise les phospho-inositides membranaires, ce qui induit la production d'inositol triphosphate. Or, l'inositol triphosphate joue un rôle central dans ce couplage en se fixant sur son récepteur spécifique, récepteur canal calcique situé sur la membrane du réticulum sarcoplasmique, induisant la libération des stocks de calcium et l'augmentation de la concentration calcique cytosolique [10] (Fredberg, 1997 JAP) à l'origine d'une contraction musculaire lisse. La deuxième stimulation correspond au couplage électromécanique par activation de canaux ioniques lors de l'augmentation du potentiel de membrane induisant une dépolarisation et une entrée de calcium dans la cellule (canaux calcique, potassique, cationique non spécifique et chlore). Cette dernière situation peut être inhibée par les inhibiteurs calciques de la classe des dihydropyridines (inhibition des récepteurs de type canal de type L).

Les protéines appartenant au complexe contractile intracytosolique de la cellule musculaire lisse bronchiques sont : la myosine et l'actine. La myosine est un filament épais comportant deux chaînes lourdes et quatre chaînes légères. L'actine par contre est un

filament fin composé de petits polymères associés et enroulés autour d'un axe. La contraction repose sur la phosphorylation réversible de la myosine par la kinase des chaînes légères (MLCK) activée par le complexe calcium-calmoduline. Suite à la contraction, la déphosphorylation est assurée par une phosphatase des chaînes légères de la myosine (MLCP). Ainsi ces différents effecteurs de la contraction modulent indirectement la sensibilité au calcium de l'appareil contractile. La sensibilisation de l'appareil contractile au Ca^{2+} est principalement la conséquence de l'inhibition de la MLCP tandis que la désensibilisation est due à la phosphorylation de la MLCK ou par l'action de la protéine G Rho sur la MLCP par l'intermédiaire de la protéine kinase GMPc-dépendante. La relaxation n'est pas une étape passive mais implique également un certain nombre de voies intracellulaires. Ainsi le second messenger AMPc joue un rôle important à plusieurs niveaux. Il va diminuer l'amplitude de variation des concentrations en calcium intracytosolique par l'intermédiaire de la protéine kinase AMPs-dépendante (PKA) en intervenant à différents niveaux : membrane (canal potassique calcium dépendant ; pompe Ca^{2+} -ATPase), intracytosolique (inositol triphosphate (IP3) ; PKA) (**Figure 2.3**).

Au total, quatre étapes conduisent à la contraction musculaire. Au cours de la première, l'élévation du calcium intracytosolique démasque les sites de liaisons de la myosine par phosphorylation de cette dernière. Ensuite, la liaison actine-myosine est stabilisée et la myosine change de conformation : la tête de la myosine bascule et entraîne un mouvement relatif entre filament fin et épais. Dans un troisième temps, la fixation d'une molécule d'ATP sur la tête de myosine entraîne la dissociation de la liaison actine-myosine. Enfin l'hydrolyse de cet ATP en ADP + Pi modifie la conformation de la myosine : l'angle formé par la tête et la queue de myosine revient à sa position initiale. Le cytosquelette répond à un modèle de « tenségrité » qui correspond à une structure stabilisée par l'équilibre entre les forces de compression et de tension et qui met en jeu à la fois la tunique musculaire lisse mais également la matrice extra-cellulaire, les protéines transmembranaires et la noyau cellulaire [17] ([Ingber, 1994, Intern Rev Cytol](#)). L'ensemble de ces intervenants peut expliquer la possibilité de mécanotransduction et également d'amplification du signal de contraction par la coordination de ces différentes entités.

D'autres facteurs tels que des facteurs transcriptionnels ont été mis en évidence plus récemment. Il s'agit notamment de facteurs de croissance : EGF (epithelial growth factor) et

de protéines régulatrices produites par les cellules épithéliales lorsqu'elles sont soumises à un étirement important. Le facteur initiateur dépend de la voie des c-fos. Les protéines produites appartiennent à la famille des facteurs de croissance cellulaire. Ainsi, l'intérêt de cette activité transcriptionnelle concerne la réparation cellulaire et l'EGF permet ainsi d'augmenter la vitesse de réparation de l'épithélium [84] (Bara, 2010 ERJ).

A retenir :

- La commande de la contraction musculaire lisse fait intervenir 3 composants : un stimulus externe, une accumulation brutale du stock calcique intracytosolique et l'interaction des filaments épais de myosine et fins d'actine
- La stimulation conduisant à la contraction peut être produite par un couplage pharmacomécanique (action de médiateur externe) ou électromécanique (par dépolarisation de la membrane cellulaire)
- La balance « bronchique » est plutôt en faveur de mécanisme de contraction (système cholinergique et NANCe) avec relativement peu de récepteurs bronchodilatateur (NANCi et récepteur Bêta 2).

2.2.2 Interactions intercellulaires

Au-delà des médiateurs qui vont agir sur un type cellulaire et dont la cible principale reste la cellule musculaire lisse, les interactions des cellules entre elles participent aussi largement à la fonction contractile de la trachée et de la bronche. En ce qui concerne la bronche, les principaux effecteurs de cette interaction sont les zones d'adhésion à la matrice extracellulaire, ou les jonctions intercellulaires ainsi que les interactions paracrines par la production notamment par les cellules épithéliales de différents médiateurs tels que l'endothéline ou le monoxyde d'azote.

L'implication des structures d'ancrage de la cellule épithéliale sur la matrice extracellulaire n'est pas récente et a été largement développée avec la découverte des intégrines au milieu des années 80 [19] (Tamkun, 1986 Cell). Cette famille de glycoprotéines transmembranaires est constituée de deux sous-unités (hétérodimère associant les sous-unités 18alpha et 18bêta) et relie le cytosquelette via les filaments d'actine notamment et

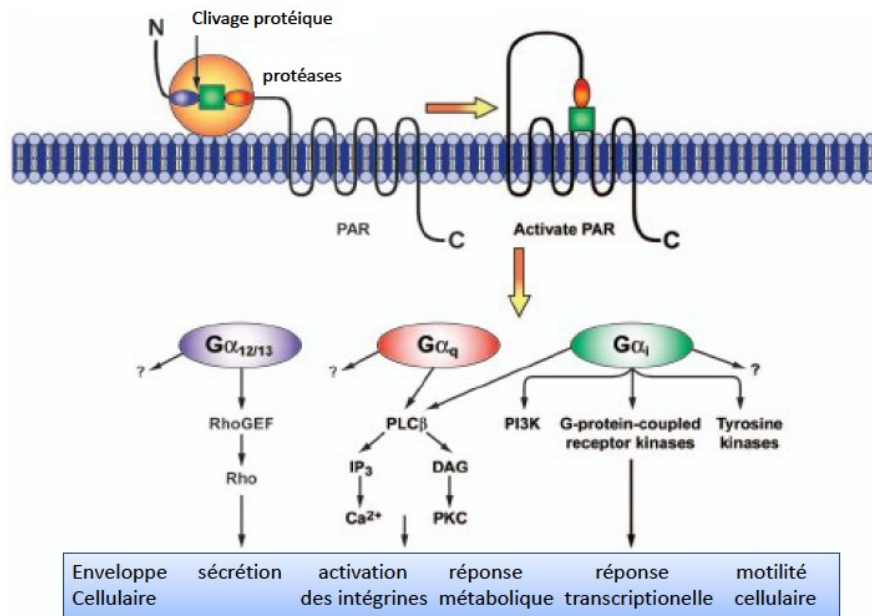
la matrice extracellulaire en se fixant sur différents ligands tels que le collagène, la laminine et la fibronectine [20, 85] (Hynes, 2002 Cell – Legate, 2009 J Cell Sci). Les intégrines participent donc à la structure de la bronche (renforcement basal des cellules, élasticité) tout en piégeant un certain nombre de médiateurs ou de cellules participant à la signalisation et faisant de cette structure un senseur et intégrateur puissant des signaux provenant de l'environnement [86] (Geiger, 2009 Nat Rev Mol Cell Biol). Une autre structure particulière localisée également au niveau épithélial est la jonction serrée (tight junction). En effet, si son rôle principal est de maintenir une cohésion intercellulaire solide et une certaine imperméabilité transépithéliale, il convient de noter l'interaction avec le cytosquelette puisque il existe au niveau de cette jonction des îlots de filaments d'actine-myosine qui confèrent à la cellule une zone de solidité. A ce titre, il a été montré expérimentalement que des cellules disposées sur une membrane « mobile » épithélialisait uniquement la membrane tandis qu'elle la dépassait largement lorsque celle-ci était immobile suggérant bien une interaction entre le milieu extracellulaire et les cellules [87, 88] (Balaban, 2001 Nat Cell Biol - Saez, 2007 Proc Natl Acad Sci). Par ailleurs, la taille des zones d'adhésion focale dépend des forces exercées sur la cellule et implique donc une association dynamique entre les filaments d'actine du cytosquelette, les forces de traction cellulaires, et les systèmes d'adhésion intercellulaire [89](Tan, 2003 Proc Natl Acad Sci). Une élévation de la contrainte appliquée sur la cellule favorise la phosphorylation de la focal adhesion kinase (FAK) et la paxilline et modifie l'élasticité de la cellule épithéliale [90](Engler, 2004 Cell Biol). Il existe finalement une régulation négative dynamique entre les forces exercées dans la matrice extracellulaire et la cellule puisque par exemple la disparition d'une zone de traction modifie rapidement la forme de la cellule [91] (Kumar, 2006 Biophysics). L'ensemble de ces mécanismes sont intégrés dans le concept de mécanotransduction détaillé ci-après.

L'épithélium quant à lui est directement exposé aux contraintes extérieures, ainsi qu'à certaines stimulations immunologiques et ces stimulus vont conduire à la constitution de message intra et intercellulaire pour agir sur les récepteurs des cellules musculaires lisses. C'est notamment le cas de l'endothéline (ET). Trois isoformes (ET-1, ET-2 et ET-3) existent chez l'être humain. L'isoforme ET-1 ne sera pas abordée ici, quoique la plus importante, parce qu'elle est sécrétée exclusivement par les cellules endothéliales. Par contre, on retrouve l'ET2 dans les cellules épithéliales et ainsi que dans le milieu endobronchique

puisqu'on les retrouve dans le lavage broncho-alvéolaire de sujets asthmatiques alors qu'absentes chez le sujet sain [92] (Candenas, 1992 Eur J Pharmacol). Deux récepteurs (ETa et ETb) existent et sont situés sur les cellules musculaires lisses et induisent une constriction lorsqu'ils sont activés. L'endothéline est donc un messenger important de la « communication » inter-cellulaire au sein des bronches [92] (Candenas, 1992 Eur J Pharmacol). Malheureusement à ce jour, les stimuli à l'origine de la production d'endothéline restent imparfaitement connus. La principale hypothèse reste la mécanotransduction. C'est un phénomène qui vise à transformer un signal mécanique en signal biologique et est détaillée ci-après.

Enfin, des protéases sécrétées par les mastocytes présents dans le tissu de soutien matriciel peuvent activer un récepteur transmembranaire spécifique : le PAR-2 (protease activated receptor type 2). La particularité de ce récepteur est sa capacité à activer en fonction de l'intensité du stimulus au sein de la cellule plusieurs voies de signalisation : phospholipase C, tyrosine kinase, ou de la voie Rho A. La réponse obtenue s'étend de la simple sécrétion à la prolifération cellulaire par activation transcriptionnelle. Enfin, la matrice extra-cellulaire par l'intermédiaire des myofibroblastes ou des mastocytes recrutés peut aussi interagir avec les cellules musculaires (Figure 2.3).

Figure 2.3 : Réponse de la cellule musculaire lisse à l'activation des récepteur PAR (sécrétion, réponse transcriptionnelle, intégrines) faisant notamment intervenir la voie des inositol3P et des RhoA kinases. (extraite de Reed and Kita 2004 [93])



L'ATP est un acteur majeur de la cohésion intercellulaire au niveau des jonctions serrées [94] (Mandel 1994). En son absence on note un effondrement des résistances trans épithéliales [42] (Baccalao, 1994 JAP). Le cytosquelette intervient à trois niveaux au sein de la cellule épithéliale. Il est largement présent au sein des structures ciliaires (structuration et mouvement des cils énergivores) en zone apicale, autour des jonctions intercellulaires (tight junctions) de la partie latérale et il permet l'ancrage de la cellule dans la membrane basale extra-cellulaire. La déplétion en ATP désorganise rapidement (dès la 20^{ème} minute) à la fois les structures ciliaires, il rend la zone intercellulaire moins défensive aux « allergènes » ou autres cellules immunitaires et il fragilise l'adhésion de cette cellule à la basale déséquilibrant ainsi la fonction barrière de l'épithélium.

2.2.3 Rôle de la matrice extracellulaire :

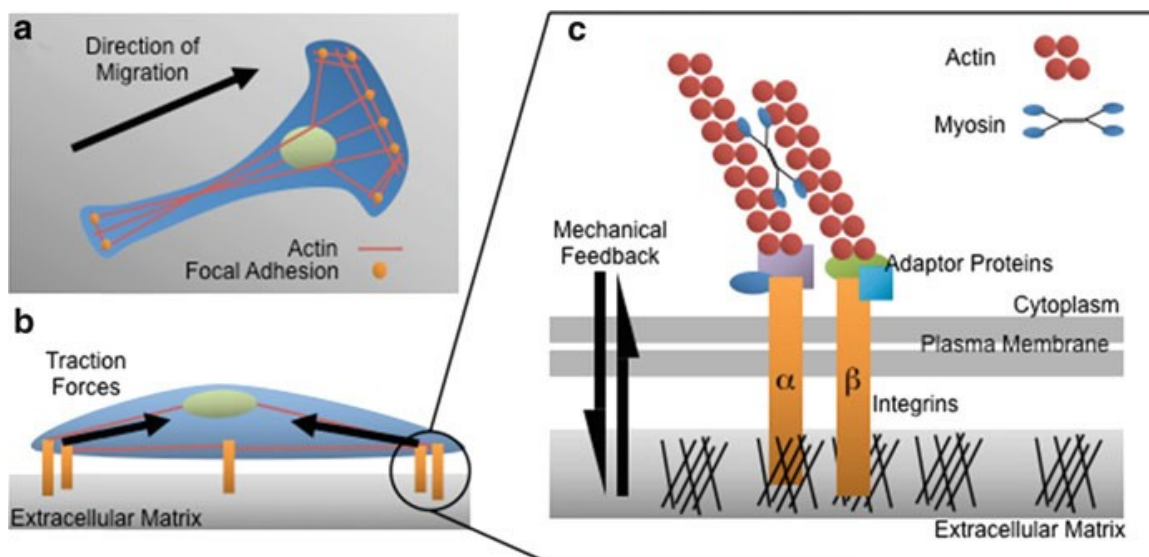
La matrice extra-cellulaire comporte un rôle double : tissu de soutien qui module l'étirement comme peut l'être la bronchoconstriction et milieu de communication avec intervention de nombreux médiateurs. La plupart des investigations concernant l'influence de l'étirement sur les cellules musculaires lisses se sont déroulées sur des modèles de cellules isolées. Dans ce cadre, les résultats sont surestimés par rapport à la réalité puisque le rôle de soutien de la matrice extra-cellulaire est ignoré. Les principaux constituants de cette matrice comportent des cellules et notamment les fibroblastes et leur forme différenciée en myofibroblastes ainsi que des cellules monocytaires en cas d'agression ou de

réponses inflammatoires: mastocytes et dérivés. Par ailleurs, la trame de soutien repose sur les fibres de collagène de type I ou IV pour les plus représentées et les plus importantes en taille. On retrouve également des molécules de fibronectine, de laminine, perlecan... [95] (Araujo, 2008 EJR) L'importance de ces dépôts est notamment régulée par l'action des métalloprotéases (MMP2 ou 9 pour le tissu bronchique) qui dégradent les molécules de soutien (fibres élastiques: lamilline, vinculine...) et leurs inhibiteurs respectifs (TIMP).... et qui confèrent à l'ensemble de la structure extracellulaire soit souplesse soit au contraire rigidité dans certaines situations d'inhibition de la production de ces métalloprotéases. A ce titre, la pathologie asthmatique est intéressante car elle aboutit à la fois à un remodelage des cellules musculaires lisses mais aussi à un remodelage de la matrice extracellulaire [84] (Bara ERJ 2010). D'ailleurs sous stimulation extérieure, la cellule musculaire lisse peut déclencher une boucle autocrine d'activation par la production de cytokines (IP-10, Fraktaline...) aboutissant à une infiltration mastocytaire de la membrane extra-cellulaire [96] (Brightling, 2002 NEJM). Ce phénomène participerait en partie à l'hypersensibilité retrouvée dans l'asthme par la facilitation de dégranulation des mastocytes localement présents.

Par ailleurs, des expérimentations ont pu montrer que l'élasticité de la matrice extracellulaire pouvait avoir une influence sur la forme des cellules au contact et induire de ce fait une polarisation et un alignement des composants du cytosquelette [24](Deng, 2003 JAP) et de la même façon agir sur la capacité de force de traction du tissu. Ainsi en cas de matrice extra-cellulaire « immobile », les points de contacts fixes entre cellules et matrice augmentent aboutissant soit en l'apparition de cellules en dehors de leur matrice initiale en cas d'études expérimentales ou en une rigidification de l'ensemble de la structure (matrice et cellule). A l'inverse, une matrice souple ou mobile conduit principalement à une augmentation des relations intercellulaires et à une organisation en réseau. Dans les deux cas de figure, le rôle des intégrines comme points d'attache entre les cellules via un couplage avec leur cytosquelette et la matrice extra-cellulaire est majeur et participe au remodelage de l'environnement cellulaire. Par ailleurs, les intégrines participent à la transmission intracellulaire des signaux mécaniques et ont un rôle important dans le phénomène de mécanotransduction. La migration cellulaire est un exemple typique des interactions entre milieu extra-cellulaire et cellules médiés par les intégrines en tant que points d'ancrages variables sur la matrice dans l'espace et le temps (**Figure 2.4**). Les intégrines sont elles-mêmes reliées aux filaments d'actine qui vont influencer la forme et le déplacement de la

cellule. Une meilleure connaissance de ces interactions permet d'envisager le développement de bio-matériaux plus performants [40] (Merrien, 2010 Rev Mal Resp). Enfin, récemment, le rôle de l'acide hyaluronique, un glycosaminoglycane non sulfaté, composé de disaccharides découvert en 1934 a été souligné. En effet, en cas d'inflammation, il apparaît au sein de la matrice extra-cellulaire dans un polymère de bas poids moléculaire. Ce complexe témoigne d'une activité pro-inflammatoire comme observé lors d'agression pulmonaire et il induit également la production d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-8 [97](Ochoa, 2011 Swiss med wkly) via AP-1 (activator protein-1) et NF- κ B dont le taux est augmenté notamment en cas de lésions pulmonaires.

Figure 2.4 : Rôle des intégrines en tant que médiateur intercellulaire permettant la migration et la déformation cellulaire.



(a) Migration cellulaire typique sur un support utilisant des points d'ancrage sur la matrice extra-cellulaire à partir desquels les filaments d'actine s'organisent. (b) Ces points d'ancrage composés d'intégrines facilitent l'adhésion cellulaire au substrat, mais aussi la contraction cellulaire et la génération de force. (c) Aggrandissement du point d'ancrage. Les fibres d'actine reliées aux intégrines transmembranaires sont elles-mêmes reliées par les fibres de myosine. Cet ensemble participe au phénomène de mécanotransduction.

2.2.4 Mécanotransduction en résumé: spécifique du compartiment bronchique

En résumé, la mécanotransduction permet d'expliquer au moins partiellement les descriptions initiales de réponse myogène de la cellule musculaire qui était défini comme une contraction obtenue sans médiateur identifié. Aujourd'hui, le phénomène de mécanotransduction est mieux décrit. Il fait intervenir dans l'arbre bronchique une première ligne de mécano-senseurs que sont : les récepteurs spécifiques de stretch (stretch activated receptors -SAR), les intégrines et les cils des cellules épithéliales de la lumière bronchique. D'autres intervenants ont été décrits comme les récepteurs couplés aux protéines Gi, les zones d'adhésion intercellulaires, le cytosquelette composés des filaments d'actine et myosine. Le point commun de ces senseurs est la conversion d'un signal mécanique en une cascade d'activation intracellulaire. La multitude d'effecteurs potentiels, notamment au niveau du compartiment bronchique, indique un phénomène robuste et indispensable à l'interaction cellulaire [40] (Merrien, 2010 Rev Mal Resp). D'ailleurs, une défaillance de l'équilibre génère rapidement des signes pathologiques : hyperréactivité bronchique, asthme...

A retenir :

- Les interactions cellulaires interviennent dans les phénomènes de contraction et de relaxation
- Les jonctions serrées intercellulaires ou les structures d'ancrage avec la membrane basale font appel aux structures actine myosine
- L'ensemble de ces interactions ne peut se faire sans énergie. L'absence d'ATP conduit en la destructuration de l'architecture intercellulaire.

2.3. Vers un modèle intégré (article 1)

2.3.1 Introduction :

La plupart des études explorant la réponse bronchique repose sur des modèles de lignées cellulaires isolées [74] (Ito 2006 JAP). Toutefois les contraintes appliquées à la bronche font intervenir différents types cellulaires et des interactions entre les cellules. Par

conséquent, des modèles intégrés constituent des pistes pour explorer la réponse bronchique face à différents stimuli. Parmi ces modèles, on retrouve l'examen de l'organe isolé tels que des fragments de bronches ou de trachée qui vont permettre l'analyse de l'ensemble du tissu [98](Hernandez 2008). Par ailleurs, lorsqu'on s'intéresse au stress appliqué sur les bronches, différents modèles existent. Parmi eux ont été développés des supports « mobiles » permettant d'étendre les cellules de façon régulière et calibrée ou des systèmes de variation de pressions internes en clampant les deux extrémités de la bronche étudiée et en faisant varier le volume interne et indirectement la pression [99](Noble 2004 JAP). Le type de contrainte appliquée (compression, étirement...) conserve aussi son importance dans l'analyse des effets. En effet, une stimulation très localisée (application d'une pointe sur une zone précise du tissu) ou plus diffuse (barre parallèle ou perpendiculaire aux fibres musculaires ou encore support extensible dans la longueur des fibres) va générer une réorganisation du cytosquelette totalement différente qui va dépendre du type et de l'intensité de la stimulation [23](Krishnan PLOS one 2009).

Dans le cadre de la pathologie humaine, la ventilation mécanique constitue un modèle standardisé de contrainte appliquée à l'appareil trachéo-bronchique. En effet, il s'agit de l'application d'une pression positive au sein de cette structure tubulaire ramifiée représenté par l'arbre respiratoire. Celle-ci provoque une modification des pressions trans-bronchiques et stimule en premier lieu l'épithélium bronchique par l'intermédiaire des structures ciliaires. Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré les effets délétères d'une ventilation mécanique non protectrice, qui a fortiori va générer des pressions élevées en rapport avec des volumes mobilisés très importants ($> 10 \text{ ml.kg}^{-1}$) et le non contrôle des pressions de plateau. Dreyfuss *et al.* a ainsi démontré l'effet de ces variations de pressions non physiologiques sur la partie distale du poumon avec la création de lésions de la barrière alvéolo-capillaire communément appelées lésions de barotraumatisme. Elles associent des disjonctions membranaires, des traumatismes cellulaires, une augmentation de l'apoptose et une augmentation de la perméabilité alvéolo-capillaire [100]. (Cavanaugh KJ AJRCMB 2001) Cette description historique a été suivie de nombreuses publications expérimentales montrant également la sécrétion de cytokines, témoins d'une réaction inflammatoire depuis l'épithélium et d'une cytotoxicité épithéliale. Ainsi, la démonstration de ces lésions locales tant expérimentales que cliniques ont aboutit à des recommandations internationales concernant les réglages des paramètres ventilatoires lors de la ventilation artificielle avec

une diminution des volumes courant (entre 6-8 ml.kg⁻¹) tout en ne dépassant pas 30 cmH₂O de pression de plateau (obtenue à la fin de l'inspiration) [67](Briel 2010 JAMA). Par ailleurs, l'application sur la bronche de contraintes externes génère une cascade d'événements biochimiques (mécanotransduction) médiée notamment par des complexes transmembranaires comme les intégrines, les récepteurs sensibles au stretch (Stretch Activating Receptors - SAR) et les complexes actine-myosine du cytosquelette liés à la membrane plasmique. L'activation génomique est l'étape ultime de cette activation [40] (Merrien 2011 Rev Mal Respir). Ainsi à partir d'un modèle de pressurisation d'une lignée de cellules épithéliales (pression continue transcellulaire de 30 cmH₂O), l'analyse transcriptomique a révélé l'expression accrue de certains gènes : facteurs de croissance, molécules de liaisons aux protéines du cytosquelette, activateurs du plasminogène, phosphatases de MAPK mais aussi diminution de l'expression d'autres gènes (facteurs de réplication de l'ADN...) [101] (Chu, AJRCMB 2006). L'augmentation de l'expression des gènes de la famille du plasminogène (uPA, uPAR, PAI-1 tPA) et ainsi que des protéines MMP-9 et MMP-2 est intéressante car ces deux dernières sont les principales gélatinases sécrétées par les cellules épithéliales qui peuvent intervenir dans la régulation du chimiotactisme dans un modèle d'asthme [102] (Corry, 2004 FASEB J). Par ailleurs, les gènes des familles CCN (Connective tissue growth factor/nephroblastoma) et WNT (wingless-type mouse mammary) sont les principaux décrits dans la littérature et impliquent en conséquence l'élasticité de la matrice extra-cellulaire pour le premier et la communication inter-cellulaire pour le deuxième.

Toutefois, l'impact de ces contraintes sur le compartiment trachéo-bronchique tant au niveau de la réponse myogénique ou du couplage pharmacomécanique reste parcellaire sur l'organe. Ce constat et cette réflexion ont déterminé la réalisation d'une première étude sur des fragments de bronche humaine auxquelles est appliqué un étirement unique d'intensité variable soutenu pendant 5 minutes correspondant au maximum au développement d'une pression aérienne équivalente à 30 cmH₂O.

2.3.2 ARTICLE CRIT CARE 2011

RESEARCH

Open Access

Airway response to acute mechanical stress in a human bronchial model of stretch

Christophe Faisy^{1,2*}, Francisco M Pinto³, Morgan Le Guen¹, Emmanuel Naline¹, Stanislas Grassin Delyle¹, Edouard Sage⁴, Maria-Luz Cadenas³ and Philippe Devillier¹

Abstract

Introduction: Lung inflation may have deleterious effects on the alveoli during mechanical ventilation. However, the consequences of stretch during excessive lung inflation on basal tone and responsiveness of human bronchi are unknown. This study was undertaken to devise an experimental model of acute mechanical stretch in isolated human bronchi and to investigate its effect on airway tone and responsiveness.

Methods: Bronchi were removed from 48 thoracic surgery patients. After preparation and equilibration in an organ bath, bronchial rings were stretched for 5 min using a force ($2.5 \times$ basal tone) that corresponded to airway-inflation pressure > 30 cm H₂O. The consequences of stretch were examined by using functional experiments, analysis of organ-bath fluid, and ribonucleic acid (RNA) isolation from tissue samples.

Results: Following removal of the applied force the airways immediately developed an increase in basal tone ($P < 0.0001$ vs. paired controls) that was sustained and it did so without significantly increasing responsiveness to acetylcholine. The spontaneous tone was abolished with a Rho-kinase inhibitor and epithelium removal, a leukotriene antagonist or nitric oxide synthase inhibitors reduced it, whereas indomethacin, sensory nerve inhibitors or antagonists for muscarinic, endothelin and histamine receptors had no effect. Stretch enhanced leukotriene-E₄ production during the immediate spontaneous contraction of human bronchi ($P < 0.05$). Moreover, stretch up-regulated the early mRNA expression of genes involved in wingless-type mouse mammary tumor virus integration-site family (WNT)-signaling and Rho-kinase pathways.

Conclusions: Stretching human bronchi for only 5 min induces epithelial leukotriene release via nitric oxide synthase activation and provokes a myogenic response dependent on Rho-kinase and WNT-signaling pathways. From a clinical perspective, these findings highlight the response of human airway to acute mechanical stress during excessive pulmonary inflation.

Introduction

In healthy subjects, air movement into and out of the lungs throughout respiration produces estimated pressure variations of 5 to 25 cm H₂O, corresponding to functional residual capacity and total lung capacity, respectively. Airway inflation of the lungs induces mechanical strain and in turn causes either smooth muscle relaxation or contraction, which are mediated for the most part by airway epithelium and mechanosensors, such as slowly and rapidly adapting receptors and C-fiber receptors [1,2]. Excessive airway inflation leads to up-regulation of the

genes encoding inflammatory protein expression and mediator secretion by airway cells [3]. Mechanical ventilation could enhance alteration of mechanical forces in the lungs of patients with asthma, emphysema or acute respiratory distress syndrome, thereby causing ventilator-associated lung injury. Damage to the epithelial cell lining of the airways and alveoli during high tidal volume ventilation have been extensively investigated but the effects of excessive pulmonary ventilation on airway basal tone and bronchial responsiveness are not well known in humans [2,4-6].

Mechanical strain imposed on airway cells induce a cascade of signaling events, primarily mediated by the macromolecular protein complexes associated with the transmembrane integrins that transduce the external forces from the extracellular matrix to the actin cytoskeleton,

* Correspondence: christophe.faisy@egp.u-psg.fr

¹Research Unit UPR5 EA220, University Versailles-Saint-Quentin, Hôpital Foch, 40 rue Worth, Suresnes 92150, France

Full list of author information is available at the end of the article

resulting in the production of various mediators, cytokines, and growth factors, coupled with gene activation [67]. The mechanotransduction induced by integrin activation involves a variety of intracellular-signaling pathways mediated by protein kinases, eicosanoids, nitric oxide synthases (NOS), reactive oxygen species, proinflammatory cytokines and stretch-activated channels [5,8-12]. Furthermore, stretch-induced mechanotransduction is dependent on immediate early gene activation, especially the overexpressed cysteine-rich 61/connective tissue growth factor/nephroblastoma (CCN) family [3,13]. WNT (wingless-type mouse mammary tumor virus integration-site family), a large family of secreted glycoproteins with highly conserved cysteine residues, may also be involved in cytoskeletal reorganization after airway stretching [14]. However, the pathways involved in the stretch-induced mechanotransduction in freshly isolated human bronchi remain unknown and results extrapolated from cell-culture systems in either static or under cyclic strain conditions have limitations. Similarly, the myogenic response to stretch is not well understood for intact human bronchi. Our study was conducted to establish an experimental model of static acute mechanical stretch that corresponded to airway hyperinflation in isolated human bronchi to investigate the effect of stretch on airway tone and responsiveness.

Materials and methods

The study was approved by our local Ethics Committees (Comité de Protection des Personnes se Prêtant à la Recherche Biomédicale de Versailles, France, and Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain) and patients gave informed consent before scheduled surgery. Bronchi were surgically removed from 48 patients with lung cancer (35 men, 13 women, mean age 64 ± 9 years; all patients were smokers or ex-smokers).

Bronchus preparations

Just after resection, segments of mid-sized (inner diameter 1.5 to 3 mm) human bronchi were excised as far as possible from the malignant lesion and the absence of tumoral infiltration was retrospectively established in all bronchi. After removal of adhering lung parenchyma and connective tissue, bronchi were washed in oxygenated Krebs-Henseleit solution (composition mM: NaCl 119, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25 and glucose 11.7). Bronchial rings of similar lengths were prepared and then suspended on hooks in a 5-ml organ bath containing Krebs-Henseleit solution, gassed with 95% O₂, 5% CO₂ and maintained at 37°C. Each preparation was connected to a force displacement transducer and isometric tension changes were recorded on a polygraph. Rings were equilibrated for at least 60 minutes with changes of fresh Krebs-Henseleit solution every 10 minutes during the first 30 minutes of the equilibration period. Bronchi

were suspended with an initial tension of 1 g [15]. When required, the epithelium was removed before suspension in the organ bath as previously described [16]. After experiments, rings that had been patted dry were weighed.

Mechanical stress

After tissue equilibration, rings were stretched for five minutes by increasing tension by 2, 2.5 or 3-fold. A strain of 2-fold or more than the basal tone was chosen because it corresponds to an airway-inflation pressure more than 30 cmH₂O in mid-sized human and porcine bronchi [17]. Once post-stretch basal tone was re-stabilized, concentration-response curves to acetylcholine (ACh; 0.1 μ M to 10 mM) were then obtained. Contractile responses are expressed as g/basal tone recorded immediately before obtaining concentration-response curves to ACh. Emax (g) represents the maximal contraction induced by 10 mM ACh. Δ Emax represents the difference between Emax obtained with the stretched bronchi and Emax obtained with their paired controls. ACh potency ($-\log EC_{50}$) was derived graphically from the $\log_{10}$ concentration-effect curves and defined as the negative $\log_{10}$ of the ACh concentration achieving 50% of the maximal 10 mM ACh effect. $\Delta(-\log EC_{50})$ represents the difference between $-\log EC_{50}$ obtained with the stretched bronchi and $-\log EC_{50}$ obtained with the paired control human bronchi.

Functional study

To investigate the different signaling pathways potentially implicated in the stretch-induced response, experiments were run in parallel (control and pretreated groups) in the absence or presence of drugs added immediately to the organ bath after the last change of fresh Krebs-Henseleit solution during the equilibration period: 1) a cyclooxygenase (COX) inhibitor: indomethacin (0.1 μ M); 2) a leukotriene Cyst-LT₁ receptor antagonist: MK476 (0.1 μ M); 3) a nonspecific NOS inhibitor at high concentration and specific NOS₃ inhibitor at low concentration = L-nitroarginine methyl ester (L-NAME, 1 mM and 1 μ M, respectively) [11,18,19]; 4) a selective inhibitor of inducible NOS₂: 1400 W (1 mM) [11]; 5) a selective inhibitor of constitutive NOS₁: N^G-propyl-L-arginine (5 mM) [11]; 6) a mixture of the tachykinin NK₁, NK₂, and NK₃-receptor antagonists: SR 140333 (0.1 μ M), SR 48968 (0.1 μ M), SR 142801 (0.1 μ M) [20]; 7) a histamine H₁-receptor antagonist: mepyramine (0.1 μ M); 8) a mixture of the selective endothelin ET_A and ET_B-receptor antagonists: BQ 123 (0.1 μ M) and BQ 788 (0.1 μ M); 9) a muscarinic ACh-receptor antagonist: atropine (0.1 μ M); 10) a nonspecific blocker of acid-sensing ion and stretch-activated channels: gadolinium (Gd³⁺, 0.1 mM) [21,22]; 11) a selective Rho-kinase (ROCK1 and ROCK2) inhibitor: Y27632 (0.1 μ M) [23,24]. ACh, indomethacin, L-NAME, mepyramine, BQ

123, BQ 788, atropine and gadolinium were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). MK476 came from Merck Sharp & Chibret (Paris, France). 1400 W and N^ω-propyl-L-arginine were purchased from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). SR 140333, SR 142801 and SR 48968 were provided by Sanofi-Aventis Research (Montpellier, France). Y27632 was purchased from Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA). All drugs were dissolved in distilled water except for indomethacin, 1400 W and N^ω-propyl-L-arginine which were dissolved in pure ethanol and then diluted in Krebs solution. The final ethanol concentration (0.03%) did not alter airway tone or contractility.

Analysis of organ-bath fluid

Concentrations of prostaglandins (PG) and leukotrienes (LT) in the organ bath were measured immediately before and 15 minutes after stretch by sampling 250 µl of organ-bath fluid each time from stretched bronchi and their paired controls. Individual samples were assayed using specific ELISA kits for the stable excretory LTE₄, PG screening, and PGE₂ (all from Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Optical density was read on the microplate autoreader (MRX II, Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA). The mean net optical density of the standards was plotted and the individual sample concentrations were read from the standard curves. For each assay, all samples were analyzed on the same day in a blinded fashion. Results were expressed as the means of duplicate samples. Stretch-induced production of LTE₄ and PG are expressed in pg/mg of bronchial tissue and corresponds to the difference of the amount (concentration × volume) of LTE₄ or PG excreted into the organ bath immediately before and 15 minutes after stretching.

RNA isolation and RT-PCR array

To isolate RNA, paired bronchial rings were immediately immersed in RNAlater (Sigma, St. Louis, MO, USA) after preparation (control H0) or were stretched (5 minutes) or non-stretched and then stabilized for three hours in an organ bath before immersion in RNA later. No concentration-response curves to ACh were obtained. Bronchi were then stored at -80°C until further use. Total RNA was isolated with the RNeasy Fibrous Tissue kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands) and quantified spectrophotometrically at 260 nm. Genomic DNA contamination was removed and retrotranscription performed with RT first-strand kit (SABiosciences, Frederick, MD, USA). Gene expression in template cDNAs was characterized with the Human Signal Transduction and the human WNT-signaling PathwayFinder RT² Profiler PCR Arrays (SABiosciences, Frederick, MD, USA). The human signal transduction finder pathway PCR array was used to investigate the pathways involved in the stretch-induced response. From the results obtained

in these experiments, we carried out further investigations using WNT-signaling pathway PCR array, which analyses the expression of a focused panel of genes related to the different pathways regulated by WNT. These real-time quantitative PCR arrays generate expression patterns of different genes products involved in inflammation, migration-adhesion, growth-differentiation, apoptosis, WNT-mediated signal transduction, and five housekeeping genes to normalize the PCR-array data. The kit also contains a control for genomic DNA contamination, three replicate RT controls and three positive replicate controls of the PCR reaction. Real-time PCR was performed on a Bio-Rad iCycler iQ real-time detection apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using a RT SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix purchased from SABiosciences (Frederick, MD, USA). After a hot start (10 minutes at 95°C), the parameters used for PCR amplification were: 15 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 30 seconds at 72°C for 45 cycles, and fluorescence was measured after amplification. At the end of each PCR run, an amplification plot was generated for each DNA sample. From each of these plots, the iCycler software calculated the threshold cycle (C_T) value for each gene on each PCR array. Quantitative real-time PCR values are expressed as the fold change of each target-gene expression compared with the mean mRNA expression of the five housekeeping genes in each sample. Gene-expression fold changes were calculated according to the ΔΔC_T method using the Web-based software provided by SuperArray Biosciences Corp (Frederick, MD, USA). mRNA expression levels are shown as the ratio of stretched or non-stretched bronchi/paired control H0. A positive or negative value indicates respective gene up- or down-regulation.

Statistics

Values are presented as means ± standard error of the mean. The results were analyzed using Student's *t* test for paired data and repeated measures analysis of variance with Bonferroni adjustments for multiple comparisons (StatView 5.0, SAS Institute, Cary, NC, USA). A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

Mechanical stress

In preliminary experiments (*n* = 11), following a five minute stretch of the tissue tone spontaneously increased and reached a sustained plateau in 11 ± 1 minutes (Figure 1a). The magnitude of the effect was also dependent of the applied force (Figure 1b). As spontaneous tone development was greatest following the stretch protocol which increased tension to 2.5 times passive tone, this amplitude of stretch was chosen for further studies. Basal tone was recorded when it reached a peak after stretching and

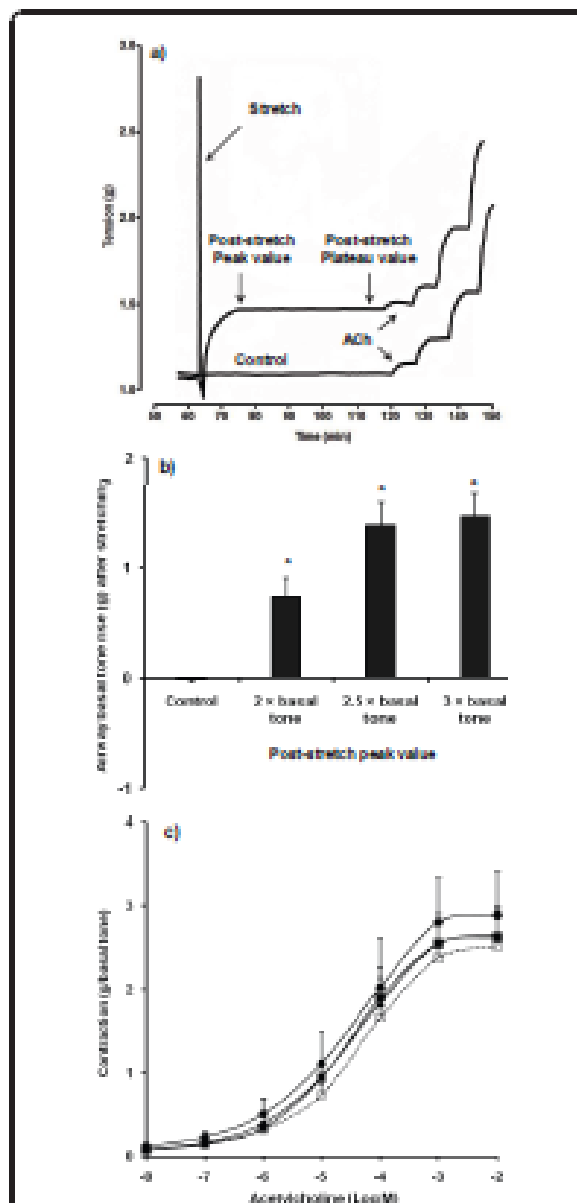


Figure 1 Effect of mechanical stress on airway tone and responsiveness. (a) Basal tone and responsiveness to acetylcholine (ACh) in single control and stretched human bronchial rings. After tissue equilibration in an organ bath for 60 minutes, acute mechanical stretch (5 minutes, 2.5 × basal tone) provokes a quick rise of basal tone (immediate contraction corresponding to post-stretch peak) followed by a prolonged plateau (sustained contraction). (b) Post-stretch peak is strain-dependent with a maximal response for a tension corresponding to 2.5-fold resting basal tone in 11 human bronchial rings. (c) Responsiveness to ACh is not significantly altered by stretching in the same 11 paired bronchial rings. Filled squares, stretch 2 × basal tone; filled triangles, stretch 2.5 × basal tone; filled circles, stretch 3 × basal tone; open squares, paired controls. Values are means ± standard error of the mean. * $P < 0.001$ vs. paired control.

when re-stabilization (plateau) was maintained for at least 30 minutes, immediately before obtaining concentration-response curves to ACh. Moreover, stretch did not significantly modify the ACh-induced contraction of human bronchi (Figure 1c).

Mean patied-dry weight of stretched bronchi was comparable with that of their paired controls (37.3 ± 3.6 vs. 38.3 ± 3.4 mg, $P = 0.57$, $n = 48$). Stretch (5 minutes, 2.5 × basal tone) induced a basal tone rise of 1.22 ± 0.08 g at peak and 1.16 ± 0.08 g at plateau (all $P < 0.0001$ vs. paired control, $n = 48$). $\Delta E_{\max}$ ACh was 0.22 ± 0.20 g and $\Delta(-\log EC_{50})$ ACh was 0.04 log units between stretched bronchi and their paired controls (all > 0.05 , $n = 48$).

Functional study

Epithelium removal, leukotriene Cyst- LT_1 -receptor blockage and selective inhibition of $NOS_{1,2,3}$ resulted in a significantly reduced rise in stretch-induced spontaneous tone (Table 1). Y27632 inhibition of Rho-kinase pathway abolished the stretch-effect on basal tone. In contrast, blocking/inhibiting $NK_{1,2,3}$, histamine, endothelin or muscarinic receptors, acid-sensing ion or stretch-activated channels or COX had no effect on the stretch-induced basal tone rise. Only gadolinium and BQ 123 + BQ 788 affected ACh potency or maximal efficacy by significantly increasing the $\Delta E_{\max}$ ACh recorded after stretching (Table 2).

ELISA analysis of organ-bath fluid

Stretching human bronchi significantly increased LTE_4 release compared with paired controls (Figure 2). Neither PG nor PGE_2 release were significantly increased.

RT-PCR

mRNA levels of the five housekeeping genes were unaffected by the interval between bronchus extraction on H0 onset and suspension in organ bath (Table 3). Control gene mRNA levels in stretched tissues were comparable with those observed in non-stretched tissues. Compared with paired controls, stretch did not significantly change mRNA expression of genes implicated in inflammation of human bronchi (Figure 3a). Stretch led to significantly higher mRNA levels of: *FN1*, *SELP*, *CCND1*, *CCND3*, *BGR1*, *FOSL1*, *JUN*, *WISP1*, *BAX*, *GADD45A*, *MYC*, and *TPS3B* (Figures 3b to 3d). Moreover, stretch up-regulated mRNA expression of various genes involved in the WNT-signaling pathway, especially *WNT7B* (Figure 3e). Stretch also abolished the increased *WNT2* repression that what observed in paired control bronchi maintained in an organ bath.

Discussion

The results of this study demonstrated that stretching human isolated bronchi for only five minutes while using a force that corresponded to an inflation pressure of more

Table 1 Effects of pretreatment on the rise of airway basal tone (g) in human bronchi at peak or plateau post-stretch (5 minutes, 2.5 × basal tone)

Pretreatment	n	Post-stretch peak		Post-stretch plateau	
		Control	Pretreated	Control	Pretreated
Epithelium removal	12	1.43 ± 0.21	0.93 ± 0.15 ^b	1.38 ± 0.22	0.89 ± 0.16 ^b
MK476 (0.1 μM)	13	1.47 ± 0.19	0.89 ± 0.18 ^b	1.45 ± 0.19	0.61 ± 0.18 ^b
Indomethacin (1 μM)	9	1.25 ± 0.23	1.29 ± 0.23	1.21 ± 0.24	1.21 ± 0.21
1400 W (1 mM)	11	1.19 ± 0.11	0.89 ± 0.14 ^b	1.13 ± 0.11	0.79 ± 0.16 ^b
L-NAME (1 μM)	9	1.16 ± 0.12	0.97 ± 0.29	1.09 ± 0.11	0.91 ± 0.29
L-NAME (1 mM)	13	1.37 ± 0.20	0.86 ± 0.16 ^b	1.31 ± 0.22	0.80 ± 0.16 ^b
N ^ω -propyl-L-arginine (5 mM)	11	1.19 ± 0.11	0.83 ± 0.09 ^d	1.13 ± 0.11	0.84 ± 0.10 ^d
SR 140333 + SR 48968 + SR 142801 (0.1 μM each)	9	1.01 ± 0.12	0.90 ± 0.16	0.96 ± 0.12	0.92 ± 0.17
BQ 123 + BQ 788 (0.1 μM each)	6	1.08 ± 0.16	1.20 ± 0.17	1.01 ± 0.14	1.17 ± 0.24
Atropine (0.1 μM)	9	1.23 ± 0.20	1.02 ± 0.22	1.16 ± 0.20	1.05 ± 0.22
Gadolinium (0.1 mM)	7	1.12 ± 0.11	0.98 ± 0.14	1.05 ± 0.12	0.95 ± 0.15
Mepyramine (1 μM)	9	1.15 ± 0.24	1.33 ± 0.20	1.11 ± 0.24	1.24 ± 0.23
Y27632 (1 μM)	7	1.12 ± 0.11	0.15 ± 0.07 ^c	1.05 ± 0.12	0.11 ± 0.05 ^c

Values are means ± standard error of the mean. ^aP < 0.05; ^bP < 0.01; ^cP < 0.001 vs. paired control. 1400 W, selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase; BQ 123, selective endothelin ET_A-receptor antagonist; BQ 788, selective endothelin ET_B-receptor antagonist; L-NAME, L-nitroarginine methyl ester; MK476, leukotriene Cyt-LT₁ receptor antagonist; SR 140333, tachykinin NK₁-receptor antagonist; SR 48968, tachykinin NK₂-receptor antagonist; SR 142801, tachykinin NK₃-receptor antagonist; Y27632, selective Rho-kinase (ROCK1 and ROCK2) inhibitor.

than 30 cmH₂O increased basal tone, but did not increase tissue responsiveness to ACh. The stretch-induced increase in basal tone was Rho-kinase dependent and in part bronchial epithelium dependent. Some mediators were also implicated, such as leukotrienes and reactive oxygen species, which may have been released from the epithelium. Interestingly, the five minute stretch resulted in the up-regulation of the WNT-signaling, which is known to interact with the Rho-kinase pathway [25]. Activation of these intracellular signaling-pathways could have clinical relevance in mechanically ventilated patients,

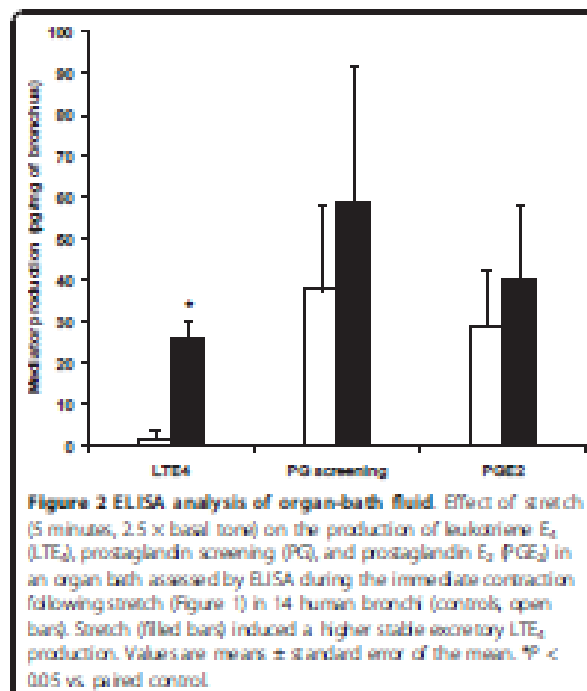
especially those with obstructive pulmonary diseases. Indeed, lung inflation has been shown to alter the airway smooth muscle functions [26]. In normal adults with induced bronchoconstriction, a deep inspiration results in bronchodilatation. For unclear reasons, this is impaired in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease [27]. Moreover, a large body of work suggests that imposed tidal fluctuations of airway smooth muscle length relax isolated airway smooth muscle strips [26].

In mechanically ventilated rabbits, the bronchodilating effect of changes in lung volume is caused by the direct

Table 2 Effects of pretreatments on airway responsiveness in human bronchi post-stretch (5 minutes, 2.5 × basal tone)

Pretreatment	n	Δ(log EC ₅₀) ACh (log unit)		ΔEmax ACh (g)	
		Control	Pretreated	Control	Pretreated
Epithelium removal	12	0.31 ± 0.12	-0.02 ± 0.14	0.28 ± 0.23	-0.06 ± 0.19
MK476 (0.1 μM)	13	0.12 ± 0.22	0.10 ± 0.24	1.03 ± 0.57	-0.30 ± 0.44
Indomethacin (1 μM)	9	0.08 ± 0.30	0.77 ± 0.39	0.74 ± 0.86	1.29 ± 0.59
1400 W (1 mM)	11	0.02 ± 0.18	-0.20 ± 0.28	0.22 ± 0.33	-0.02 ± 0.26
L-NAME (1 μM)	9	0.16 ± 0.17	0.24 ± 0.11	0.45 ± 0.24	-0.04 ± 0.25
L-NAME (1 mM)	13	0.15 ± 0.25	-0.08 ± 0.13	0.11 ± 0.21	-0.16 ± 0.22
N ^ω -propyl-L-arginine (5 mM)	11	0.02 ± 0.18	0.34 ± 0.20	0.22 ± 0.33	0.14 ± 0.61
SR 140333 + SR 48968 + SR 142801 (0.1 μM each)	9	0.30 ± 0.16	0.11 ± 0.17	0.02 ± 0.09	0.14 ± 0.42
BQ 123 + BQ 788 (0.1 μM each)	6	0.17 ± 0.19	0.72 ± 0.20	-0.35 ± 0.22	1.12 ± 0.32 ^d
Gadolinium (0.1 mM)	7	0.24 ± 0.17	0.47 ± 0.15	-0.16 ± 0.27	1.34 ± 0.42 ^b
Mepyramine (1 μM)	9	-0.03 ± 0.36	-0.09 ± 0.24	1.45 ± 0.81	0.58 ± 0.46
Y27632 (1 μM)	7	0.24 ± 0.17	-0.02 ± 0.10	-0.16 ± 0.27	0.05 ± 0.31

Values are means ± standard error of the mean. ^aP < 0.01; ^bP < 0.001 vs. paired control. 1400 W, selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase; ACh, acetylcholine; BQ 123, selective endothelin ET_A-receptor antagonist; BQ 788, selective endothelin ET_B-receptor antagonist; L-NAME, L-nitroarginine methyl ester; MK476, leukotriene Cyt-LT₁ receptor antagonist; SR 140333, tachykinin NK₁-receptor antagonist; SR 48968, tachykinin NK₂-receptor antagonist; SR 142801, tachykinin NK₃-receptor antagonist; Y27632, selective Rho-kinase (ROCK1 and ROCK2) inhibitor.



effect of stretch on force generation by the airway smooth muscle [28]. Lung inflation strains airway smooth muscle and causes a dynamic modulation of cytoskeletal filament organization such as rearrangement of actin and myosin filaments, detachment and attachment of actin filaments and plaques, and polymerization and depolymerization of these filaments [26,29]. In oscillatory experiments, it is the very first tidal oscillation that provokes most of any force and stiffness reduction in cells or tissues [29]. A single transient stretch may acutely fluidize airway smooth muscle which is normally solid, leading to perturbed

equilibrium of myosin binding and alteration of airway smooth muscle mechanical properties (the cell becomes much less stiff and much more viscous) [30]. When stretch is stopped, the cell resolidifies but the muscle reshortens to a new biophysical state different from the prior under identical loading conditions [30]. Moreover, the relaxing effect persists even if stretch oscillation amplitude is reduced [28]. Herein, the absence of hyper-responsiveness following stretch could be explained by the stretch-induced perturbation of myosin binding [29,30]. In addition, we found epithelial removal failed to enhance responsiveness to ACh after stretch, suggesting excessive mechanical strain also alters the epithelial modulation of airway smooth muscle contraction. However, the hypothesis that force fluctuations on airway smooth muscle can diminish airway tone and responsiveness has been recently challenged by LaPrad and colleagues in healthy intact airway [31], questioning the role of cytoskeleton fluidization on airway responsiveness [32].

Consistent with our results using whole intact human tissue, Hernandez and colleagues showed that bovine airway segments also responded similarly to stretch, but only following pretreatment with selected contractile agonists [20]. This strain-induced increase in basal tone could reflect length adaptation of the airway smooth muscle: next a stretch and return, the cytoskeleton fluidizes softening, which is then followed by an increase in attachment of actin filaments and increase in tone [26,29]. Indeed, basal tone is critically influenced by the length at which the airway smooth muscle is adapted [33]. After priming the contractile apparatus induced by pretension or contractile agonists such as ACh, quick stretch or very first force oscillations might cause contractile apparatus rearrangements, with many myosin heads interacting with actin filaments, leading to regeneration of a force exceeding prestretch levels [5,20,34,35]. The strain-stiffening behavior of human airway smooth-muscle cells observed in response to sustained stretch or reconstituted cross-linked actin gels could also explain in part the increase in basal tone [29,36]. However, the myogenic response to stretch did not entirely explain the effects of various inhibitors or receptor antagonists on the stretch-induced spontaneous airway-smooth muscle contraction observed previously and herein [9,12,19,20,37].

In addition to direct mechanical injury, lung injury may be also caused by cell-mediated inflammation and soluble mediators such as $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$ and substance P [38-44]. Cytokine release can be related to the degree of lung stretch and inhibition of cytokine actions decreases stretch-induced injury [45,46]. However, as suggested by the present study, the mechanisms of stretch-induced injury in intact human bronchi appear to be more complex involving neural, mechanical, and mediator effects. The mechanotransduction

Table 3 mRNA for the housekeeping genes (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1, and RPL13A) in human bronchi after suspension in an organ bath with (5 minutes, $2.5 \times$ basal tone) or without stretch

Gene	No stretch		Stretch	
	Paired rings	Δ mRNA vs. Control H0	Paired rings	Δ mRNA vs. Control H0
ACTB	9	0.11 ± 0.58	9	0.01 ± 0.62
B2M	9	-0.40 ± 0.46	9	-0.40 ± 0.45
GAPDH	9	1.18 ± 0.42	9	-0.88 ± 0.39
HPRT1	9	0.14 ± 0.59	9	-0.31 ± 0.61
RPL13A	9	-0.07 ± 0.52	9	0.47 ± 0.50

After normalization to the mean of the five housekeeping genes, Δ mRNA for each target gene was calculated as the fold mRNA-value change of each non-stretched or stretched ring relative to the mRNA value in its paired control H0. Values are mean $\pm$ standard error of the mean. No significant differences in expression of housekeeping genes were observed. ACTB, β -actin; B2M, β -microglobulin; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HPRT1, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; RPL13A, ribosomal protein L13a.

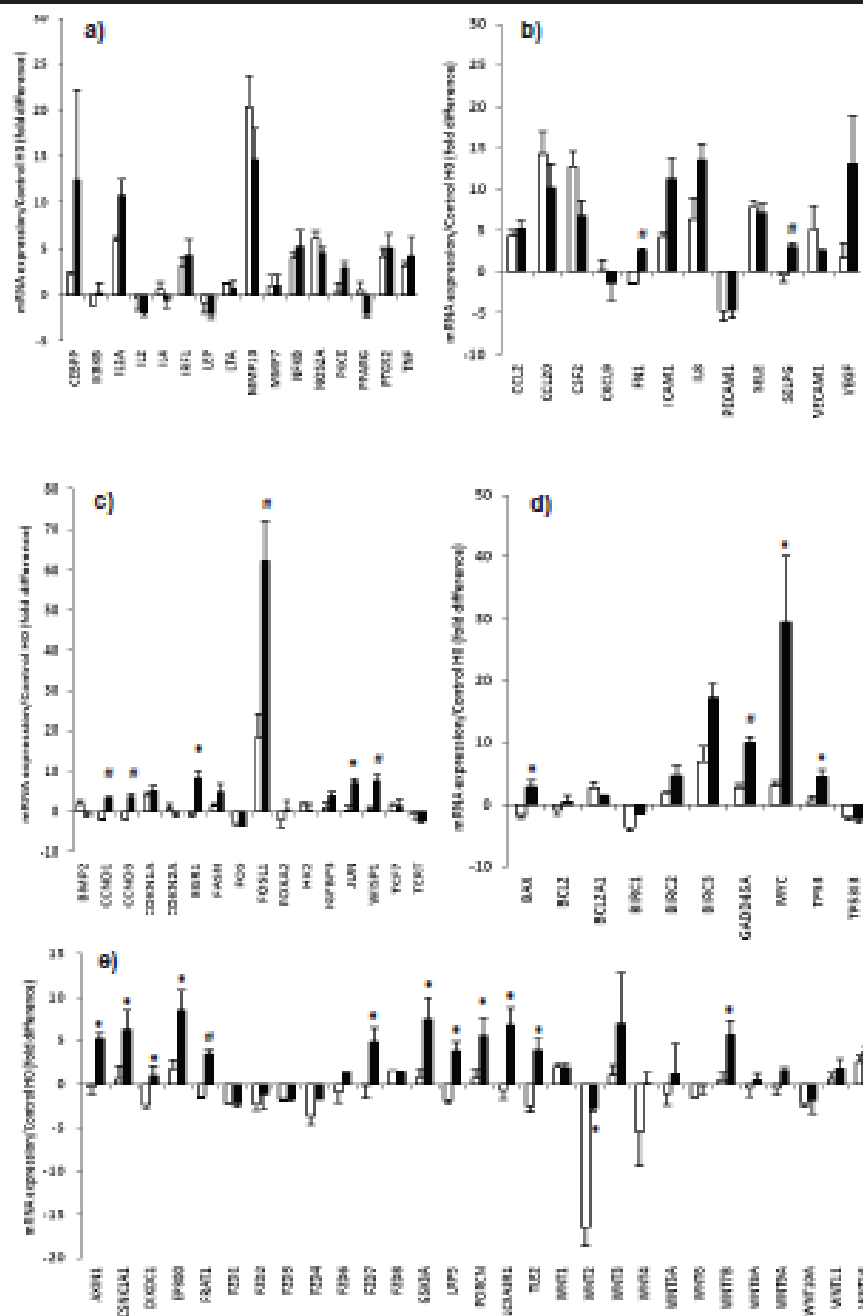


Figure 3 RT-PCR array. Effect of stretch (5 minutes, 25 × basal tone) on the early mRNA expression (3 hours after stretching) of genes implicated in (a) cell inflammation, (b) cell migration-adhesion, (c) cell growth-differentiation, (d) cell apoptosis, and (e) Wnt-mediated signal transduction. mRNA expression represents the ratio of experimental value/HO value (fold difference). Filled bars, stretch; open bars, paired controls. Values are means ± standard error of the mean (n = 9). *P < 0.01; **P < 0.001 vs. paired control.

involved in the force generation in the immediate response to stretching airways should involve pathways with short activation times, for example, such as mediator release or neurogenic mechanisms or cellular Ca^{2+} influx via membrane depolarization caused by the stimulation of acid-sensing ion and stretch-activated channels [12,20,47]. Herein, we showed that the rapid rise in basal tone following stretch of human bronchi was abolished in the presence of a Rho-kinase inhibitor or attenuated after epithelium removal, blocking of the Cys-LT_1 receptor or inhibition of $\text{NOS}_{1,2,3}$. These results differ from those reported previously when using pre-contracted tissue from other species [12,20,48]. Differences among bovine and rodent species models of airway response to stretch have been reported previously [12,20,48]. Therefore, the discrepancies between our results and those from animal models are likely to be due to interspecies differences rather than differences among experimental protocols. For example, in the airways of guinea pigs, basal tone is dependent on COX products and epithelium, and stretch-induced spontaneous contraction is independent of LT [12,48]. Conversely, the intrinsic tone of human airways results from a balance of contractile LT and, to a lesser extent, histamine and bronchodilating prostanoids, like PGE_2 [15,48,49]. Stretch modulates prostanoid synthesis by inhibiting COX-1 and activating COX-2, probably via stimulation of the inducible Ca^{2+} -independent NOS_2 and production of reactive oxygen species in airway epithelial cells [4,8,10-12]. It was also shown that airway epithelial cells could produce LT during inflammatory conditions or mechanical stretch [10,50]. Moreover, lung epithelial response to stretch appears to be extremely rapid and sensitive [4]. In accordance with these observations, our results confirmed the role of bronchial epithelium in enhancing the myogenic response to stretch and in particular the stretch-induced imbalance between prostanoid and LT production in human bronchi. However, mechanical stretch may induce LT release from other cells like bronchial smooth muscle and further investigations would examine stretch-induced prostanoid release in epithelium-denuded bronchial tissues. Taken together, these findings suggest that the immediate rise in basal tone following stretch of human bronchi involves increased epithelial LT production due to activation of Ca^{2+} -independent inducible NOS_2 . In addition, the Rho-kinase inhibitor Y27632 abolishes the Ca^{2+} -independent delayed contraction of airway smooth muscle by modulating COX-2 and NOS_2 activation [12,24,29]. In isolated guinea-pig airways, stretch caused delayed contraction attributable to Ca^{2+} influx into the muscle cells mediated by stretch-activated channel stimulation [12]. In rats exposed to injurious high airway pressure, substance P, which acts on the NK_1 and transient receptor potential ion channels, is implicated in ventilator-induced lung

injury [43]. In our study gadolinium and the tachykinin NK_1 -, NK_2 -, and NK_3 -receptor antagonists had no significant effect on either the immediate or sustained phase of spontaneous basal tone provoked by stretch. Therefore, we cannot confirm that stretch-activated channels or substance P are involved in airway response to acute mechanical stress in intact isolated human bronchi.

In rodents, cyclical stretch induced by high tidal volume ventilation quickly increased transcription of several genes that regulate transcription like *BGR1*, *GADD45A* or *JUN*, whereas the induction of *TNF* mRNA expression was not significantly deviated, consistent with our results [3,39,51]. Mechanical stress also provoked vascular distension in rat trachea that may lead to activation of endothelial cells causing expression of P-selectin and endothelin-1 [40,52]. Interestingly, we showed herein that P-selectin ligand gene expression was increased by stretching human bronchi, whereas ET_A - and ET_B -receptor antagonists did not reduce airway response to stretch suggesting that endothelin-1 is not implicated in this phenomenon in human airways. The mechanotransduction leading to mechanical regulation of gene expression in contractile tissues has principally been investigated in bladder smooth muscle cells, where the Rho-kinase pathway seems to play a major role in the stretch-induced modulation of CCN-family genes [13,53,54], but it is not well known in human bronchi. To elucidate the signal transduction pathways that are activated in human bronchi following five minutes of stretch, we used the human signal transduction pathway finder PCR array, which analyses the expression of 84 genes representative of 18 different signal transduction pathways. The results of this assay showed that changes in early gene expression provoked by mechanical stretch involved genes implicated in cell proliferation-apoptosis or migration-adhesion but not cell inflammation in isolated human bronchi. Notably, we observed that stretching up-regulated the mRNA of genes implied in the WNT-signaling pathways. The WNT gene family includes 19 members encoding glycoproteins known as WNTs, which can activate two distinct signaling pathways (canonical and non-canonical), responsible for several cellular processes, including cell movement and polarity, proliferation and differentiation [14,25,55,56]. Our experiments with the human WNT-signaling pathway finder PCR array confirm that stretch modulates the mRNA levels of different genes of the WNT-signaling pathway, particularly *WNT7B* and *WNT2* expression. *WNT7b* and *WNT2* are expressed in the distal mesenchyme and in airway epithelium, and act via the seven membrane-spanning frizzled Wnt receptor (FZD) cell-surface receptors [14,25]. In addition, *WNT7b* activates the canonical but not the noncanonical pathway and exerts autocrine-signaling activity on airway epithelial cells [14]. Depending on the cellular context, WNTs stimulate the canonical signaling pathway via FZD receptors

and nuclear translocation of β -catenin, thereby up-regulating genes such as *WISP1*, *MYC*, *CCND1*, *CCND3*, *CSNK1N1*, *DKDC1*, *EP300*, *FDZ7* or *PORCN* [14,25], or activate the noncanonical signaling pathway through the Fzd receptors and ROR2/Ryk coreceptors as suggested by the up-regulation of *JUN*, *FOSL1*, and *FRAT1* observed herein. It is also known that WNT-signaling might induce cytoskeletal reorganization via up-regulation of *MYC*, *CCND1*, *CCND3* [25,57], or via the activation of Rho-kinase-activated protein kinase pathways elicited by the up-regulation of *GADD45A*, *SLC9A3R1* and *TP53* [58], as suggested by our results. Nevertheless, further investigations will be needed to confirm the functional role of the stretch-induced changes in mRNA expression, especially WNT.

Conclusions

Collectively, our results indicate that the immediate component of myogenic response to stretch for human bronchi is mediated mostly by epithelial LT release via NOS activation and that the sustained component is dependent on Rho-kinase and WNT-signaling pathways. Moreover, the role of the bronchial epithelium in enhancing the myogenic response to stretch in our study illustrates the airway cells interactions during excessive pulmonary inflation. In this way, freshly human isolated bronchus represents a relevant tool to test the stretch-effects on complex networks of multiple airway cells. From a clinical perspective, our experimental model highlights the response of human airway to acute mechanical stress during excessive pulmonary inflation. Future work based on the results of the present study will be needed to determine the impact of long-term cyclic stretch on human airway mechanics, especially in mechanically ventilated patients with obstructive pulmonary diseases.

Key messages

- The consequences of mechanical stress during excessive pulmonary ventilation on human bronchi are unknown.
- Airway response to acute mechanical stretch (using a force that corresponded to airway-inflation pressure > 30 cmH₂O) in isolated human bronchi involves LT release, NOS activation and Rho-kinase and WNT-signaling pathways.
- This experimental model could help to appraise the impact of excessive pulmonary ventilation on human airway mechanics, especially in mechanically ventilated patients with obstructive pulmonary diseases.

Abbreviations

ACh: acetylcholine; CCN: connective tissue growth factor; nNOS: neuronal nitric oxide synthase; ELISA: enzyme-linked

immunosorbent assay; FZD: frizzled Wnt receptor; IL: interleukin; L-NAME: L-nitroarginine methyl ester; LT: leukotriene; NOS: nitric oxide synthase; PG: prostaglandin; RT-PCR: reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; TNF: tumor necrosis factor; WNT: wingless-type mouse mammary tumor virus (WNT) integration site family.

Acknowledgements

This research was supported by a grant (CTQ2007-61024) from Ministerio de Educación y Ciencia (Spain). A 70% of this grant is contributed by FEDER funds.

Author details

¹Research Unit UPRIS EA220, University Versailles-Saint-Quentin, Hôpital Foch, 40 rue Worth, Suresnes, 92150, France. ²Medical Intensive Care Unit, European Georges Pompidou Hospital, 20 rue Leblanc, Paris Cedex 15, 75008, France. ³Instituto de Investigaciones Químicas, CSIC, Av. Americo Vespucio, S/N, Isla De La Cartuja, Sevilla, 41092, Spain. ⁴Department of Thoracic Surgery, Hôpital Foch, 40 rue Worth, Suresnes, 92150, France.

Authors' contributions

CF conceived the study, performed functional experiments, interpreted the data and drafted the manuscript. RMP performed RT-PCR experiments, interpreted the data and drafted the manuscript. MLG performed statistical analyses, interpreted the data and revised the manuscript. EN collected the tissue samples, interpreted the data and revised the manuscript. SGD performed ELISA analysis of organ-bath fluid and revised the manuscript. ES collected the tissue samples and revised the manuscript. MLC performed RT-PCR experiments, interpreted the data and revised the manuscript. PD participated in the design and coordination of the study and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 21 April 2011 Revised: 11 August 2011

Accepted: 13 September 2011 Published: 13 September 2011

References

- Noble PB, Sharma A, McFadden PK, Mitchell HW: Elastic properties of the bronchial mucosal epithelial unfolding and stretch in response to airway inflation. *J Appl Physiol* 2005, **99**:2061-2066.
- Yu J: Airway mechanosensors. *Respir Physiol Neurobiol* 2005, **148**:217-243.
- Copland IB, Kewenig BP, Engelbrecht D, McNeill C, Bell J, Post M: Early changes in lung gene expression due to high tidal volume. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **168**:1051-1059.
- Copland IB, Reynaud Q, Pace-Asciak C, Post M: Mechanotransduction of stretch-induced prostanoic release by fetal lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006, **291**:L487-L495.
- Waters CM, Spon PH, Liu M, Friedberg JE: Cellular biomechanics in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, **283**:L504-L509.
- Tepper RS, Remchenderi R, Argyr E, Zhang L, Xue Z, Liu Y, Gurne S: Chronic strain alters the passive and contractile properties of rabbit airways. *J Appl Physiol* 2005, **98**:1949-1954.
- Zhang W, Gurne S: Interactions of airway smooth muscle cells with their tissue matrix: implications for contraction. *Proc Am Thorac Soc* 2008, **5**:S2-S3.
- Kerem N, Lumburg M, Ha CM: Cholinergic receptor and cyclic stretch-mediated inflammatory gene expression in intact ASM. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006, **34**:417-425.
- Oudin S, Pugin J: Role of MAP kinase activation in interleukin-8 production by human BEAS-2B bronchial epithelial cells submitted to cyclic stretch. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002, **27**:107-114.
- Chipman KE, Sinclair SE, Zhuang D, Hensel A, Desai LP, Waters CM: Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, **289**:L854-L861.
- Alen F: iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004, **75**:639-653.
- Ito S, Kume H, Oguma T, Ito Y, Kondo M, Shimokata K, Saki B, Narae K: Roles of stretch-activated cation channel and Rho-kinase in the spontaneous contraction of airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2006, **552**:135-142.

15. Chappour B, Goppel-Staub N: Mechanical regulation of the Cytb1/CCN2 and CTGF/CCN2 proteins. *Febs J* 2008, **273**:359-364.
16. Konigshof M, Eichlbauer G: WNT signaling in lung disease: a failure or a regeneration signal? *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010, **4**:27-31.
17. Watson N, Magnusson H, Rube KF: The relevance of resting tension to responsiveness and inherent tone of human bronchial smooth muscle. *Br J Pharmacol* 1998, **123**:694-700.
18. Candenas ML, Naline E, Serrie B, Achener C: Effect of epithelium removal and of endothelin inhibition on the bronchoconstrictor response to three endothelins of the human isolated bronchus. *Eur J Pharmacol* 1992, **210**:291-297.
19. McFadden PW, Mitchell HW: Bronchial compliance and wall structure during development of the immature human and pig lung. *Eur Respir J* 1997, **10**:27-34.
20. Chu EK, Foley JS, Cheng J, Patel AS, Drienen JM, Tschumpelin DJ: Bronchial epithelial compression regulates epidermal growth factor receptor family ligand expression in an autocrine manner. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005, **32**:575-580.
21. Sarda U, Sporn PH, Waters CM: Cyclic stretch of airway epithelium inhibits prostanoil synthesis. *Am J Physiol* 1997, **273**:L1015-L1019.
22. Hernandez JM, Cox G, Jansen LE: Involvement of the neurokinin-2 receptor in airway smooth muscle stretch-activated contractions assessed in perfused intact bovine bronchial segments. *J Pharmacol Exp Ther* 2008, **327**:503-510.
23. Bennerberg GL, Gustafsson LE: Stretch-induced stimulation of lower airway nitric oxide formation in the guinea-pig: inhibition by gadoxolium chloride. *Pharmacol Toxicol* 1997, **81**:13-18.
24. Kumar A, Liu S, Mulya R, Baron D, Moore J, Cory DB, Bonick AM: Mechanical stretch activates nuclear factor-kappaB, activator protein-1, and mitogen-activated protein kinases in lung parenchyma: implications in asthma. *FASEB J* 2003, **17**:1800-1811.
25. Iizuka K, Shimizu Y, Tsukaguchi H, Yoshii A, Harada T, Otsuchi K, Muramoto T, Nakawawa T, Mori M: Evaluation of Y-27632, a rho-kinase inhibitor, as a bronchodilator in guinea pigs. *Eur J Pharmacol* 2000, **406**:275-279.
26. Kravacki NC, Conroy DA, Elmer HL, Kelley TJ: Mechanisms of NO22 regulation by rho GTPase signaling in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002, **283**:L604-L611.
27. Chien AJ, Conrad WH, Mason RT: A Wnt survival guide from flies to human disease. *J Invest Dermatol* 2009, **129**:1614-1627.
28. Krishnan R, Trepat X, Nguyen TT, Jancovici G, Madani O, Friedberg JE: Airway smooth muscle and bronchospasm: fluctuating, fluidizing, freezing. *Respir Physiol Neurobiol* 2008, **163**:17-24.
29. Sliemers AM, Jansen K, Van Schickel A, Van der Plas CF, Schot R, Van der Aarweg JG, De Jongste JC, Huisman PS, Maas T, Rube KF, Stek P: Bronchial inflammation and airway responses to deep inspiration in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **176**:121-128.
30. Shen X, Guntz SJ, Tepper RS: Effect of tidal volume and frequency on airway responsiveness in mechanically ventilated rabbits. *J Appl Physiol* 1997, **83**:1202-1208.
31. Trepat X, Ding L, An SS, Navajas D, Tschumpelin DJ, Gethoffier WT, Butler JP, Friedberg JE: Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature* 2007, **447**:592-595.
32. Friedberg JE: Airway smooth muscle in asthma: Perturbed equilibria of myosin binding. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **161**:S158-S160.
33. LaParo AS, Satrio TL, Suki B, Lutzchen RT: Tidal stretch does not modulate responsiveness of intact airways in vitro. *J Appl Physiol* 2010, **109**:295-304.
34. LaParo AS, Satrio TL, Suki B, Lutzchen RT: Reply to Noble, Hernandez, Mitchell, and Jansen. *J Appl Physiol* 2010, **109**:940-941.
35. Wang L, Park PD, Snow CY: Effect of chronic passive length change on airway smooth muscle length-tension relationships. *J Appl Physiol* 2001, **90**:734-740.
36. Lenoir TL, Dowell ML, Laiser CJ, Gethoffier WT, Friedberg JE, Snow CY, Mitchell RW, Solway J: Disrupting actin-myosin-actin connectivity in airway smooth muscle as a treatment for asthma? *Proc Am Thor Soc* 2009, **6**:295-300.
37. Zhang W, Wu Y, Wu C, Guntz SJ: Integrin-linked kinase regulates N-WASP-mediated actin polymerization and tension development in tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 2007, **282**:34968-34980.
38. Mathews BD, Overby DR, Merritt R, Ingber DE: Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *J Cell Sci* 2006, **119**:508-518.
39. Mohammed KA, Nasreen N, Tepper RS, Antony VB: Cyclic stretch induces PIGF expression in bronchial airway epithelial cells via nitric oxide release. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 2007, **292**:L509-L516.
40. Tremblay LN, Slutsky AS: Ventilator-induced injury: from barotrauma to biotrauma. *Proc Assoc Am Physicians* 1998, **110**:402-408.
41. Tremblay LN, Valera F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS: Injurious ventilatory strategies increase cytokines and α -fetoprotein expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997, **99**:944-952.
42. Lim LH, Wagner EM: Airway distension promotes leukocyte recruitment in rat tracheal circulation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, **168**:1068-1074.
43. Zhang H, Downey GP, Suter PM, Slutsky AS, Ranieri VM: Conventional mechanical ventilation is associated with bronchoalveolar lavage-induced activation of polymorphonuclear leukocytes: a possible mechanism to explain the systemic consequences of ventilator-induced lung injury in patients with ARDS. *Anesthesiology* 2002, **97**:1426-1433.
44. Pugin J, Dunn J, Jolliffe P, Tessier D, Megret J, Nizet LP, Chevret JC: Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998, **275**:L1040-L1050.
45. Tremblay LN, Matto D, Hamid Q, Govindarajan A, Slutsky AS: Injurious ventilation induces widespread pulmonary epithelial expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 messenger RNA. *Crit Care Med* 2002, **30**:1693-1700.
46. Brignon F, Steinberg JS, Andewelt NJ, Sabalet JM, Delpiere S, Rouille S, Jemmen Y: Substance P receptor blockade decreases stretch-induced lung cytokines and lung injury in rats. *J Physiol* 2010, **588**:1309-1319.
47. Nakamura T, Malloy J, McCarty L, Yao L, Joseph M, Lewis J, Veldhuisen R: Mechanical ventilation of isolated septic rat lungs: effects on surfactant and inflammatory cytokines. *J Appl Physiol* 2001, **91**:811-820.
48. Imai Y, Kawano T, Iwamoto S, Nakagawa S, Takata M, Miyazaki K: Intratracheal anti-tumor necrosis factor- α antibody attenuates ventilator-induced lung injury in rabbits. *J Appl Physiol* 1999, **87**:510-515.
49. Ito S, Kurai H, Naruse K, Kondo M, Tokuda N, Iwata S, Hasegawa Y, Sakabe M: A novel Ca^{2+} influx pathway activated by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008, **38**:407-413.
50. Schmidt D, Rube KF: The role of leukotrienes in the regulation of tone and responsiveness in isolated human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000, **161**:562-567.
51. Ellis JL, Underhill BJ: Role of cytokines-leukotrienes and histamine in mediating intrinsic tone in isolated human bronchi. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, **149**:118-122.
52. Luo M, Lee S, Brock TG: Leukotriene synthesis by epithelial cells. *Histo Histopathol* 2003, **18**:587-595.
53. Papadogiorgaki S, Yenapureddy A, Reddy SR, Reddy NM, Dadd-O JM, Crow MT, Grigoryev DN, Barnes K, Tudor RM, Yamamoto M, Kessler TW, Bissell MJ, Milner W, Houson PM, Reddy SP: Genetic and pharmacologic evidence links oxidative stress to ventilator-induced lung injury in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2009, **179**:1222-1230.
54. Uhlig S: Taking a PEEP at the upper airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **168**:1026-1027.
55. Tamas L, Rosenblum J, Mecanic E, Chappour B: Regulation of Cytb1 gene expression by mechanical stretch through multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001, **281**:C1534-C1537.
56. Zhou Q, Herrick DJ, Rosenblum J, Chappour B: Cytb1 mediates the expression of VEGF, alpha-integrin, and alpha-actin genes through cytoskeletonally based mechanotransduction mechanisms in bladder smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 2005, **98**:2344-2354.
57. Katch M, Katch M: Wnt signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res* 2007, **13**:4040-4045.
58. Wang Z, Shi W, Lu MM, Morrisey EE: Wnt7b activates canonical signaling in epithelial and vascular smooth muscle cells through interactions with Fzd1, Fzd10, and LRP5. *Mol Cell Biol* 2005, **25**:5022-5030.
59. Armstrong DD, Bae KA: Wnt/beta-catenin signaling activates growth-control genes during overload-induced skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005, **289**:C853-C859.

Falvey et al. *Critical Care* 2011, **15**:R208
<http://ccforum.com/content/15/5/R208>

Page 11 of 11

58. Dolinsky T, Wu W, Kaminski N, Fediglo E, Kayser AM, Srikel M, Watkins SC, Ryter SW, Hoidal A, Choi AM: Mitogen-activated protein kinases regulate susceptibility to ventilator-induced lung injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:16101.

doi:10.1186/cc10443

Cite this article as: Falvey et al.: Airway response to acute mechanical stress in a human bronchial model of stretch. *Critical Care* 2011 **15**:R208.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



2.3.3 Résultats et éléments de discussion.

48 patients avec cancer pulmonaires ont consenti à l'exploitation de la pièce opératoire. Parmi eux, on retrouve une majorité d'hommes (35 /13) avec un âge moyen de 64 ± 9 ans et 100% d'histoire personnelle avec tabagisme.

Les résultats marquants de cette première étude sont un effet significatif d'élévation du tonus basal de la bronche au décours de l'étirement avec obtention d'un nouvel équilibre après 11 ± 1 minutes sans modification de la sensibilité et de l'affinité de la bronche à l'acétylcholine. Cette phase d'élévation progressive du tonus basal est particulièrement démonstrative sur la **figure X**. De plus, l'amplitude de cette élévation atteint un plateau au-delà d'une contrainte multipliant par 2.5 le tonus basal suggérant des mécanismes «limités » en réponse. Cette réponse basale qui génère une élévation du tonus basal de l'ordre de 0.5g ou 50% sera discutée plus longuement par la suite mais suggère d'emblée une implication du contingent de cellules musculaires lisses. En effet l'ablation de l'épithélium sur ces segments de bronches humaines diminue cette réponse sans l'abolir complètement. Par contre, le prétraitement par des inhibiteurs des voies Rho-kinases abolissent l'effet stretch sur le tonus basal. Une participation inflammatoire ou une réponse génomique semblent également impliquer puisqu'on retrouve une élévation significative des cytokines pro-inflammatoires dérivées des leucotriènes dans le bain [103] ([Schmidt 2000 AJRCCM](#)) et que les gènes des voies de signalisation WNT et plus particulièrement commandant WNT2 et WNT7 sont les plus dérégulés par le stretch lorsqu'on applique une recherche d'ARN par RT-PCR. Or cette voie est connue pour interagir spécifiquement avec la voie des Rho-A kinases [74]([Ito 2006 JAP](#)).

Ainsi l'étirement transitoire de la bronche avec un tonus supra-physiologique aboutit à une modification rapide des conditions de repos de celle-ci. La description de ce modèle statique se rapproche de la réflexion des équipes de Noble et Laprad qui ont largement étudié le réflexe "d'inspiration profonde" [48] ([LaPrad, 2008 JAP](#)). Ce dernier correspond en une réponse réflexe qui conduit par étirement maximal en une relaxation bronchique (bronchodilatation) transitoire avec levée d'une bronchoconstriction préexistante sur une bronche saine : ceci est observé en conditions physiologiques dans certains cas de

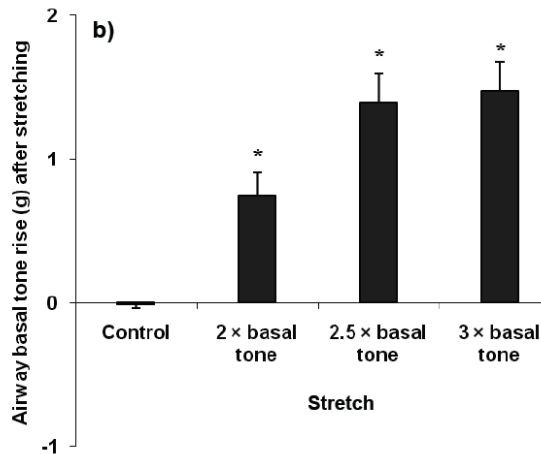
constriction (stimulation au froid...) ou en tant que mécanisme de protection. Par contre, des pathologies telles que l'asthme voient cette réponse déficiente et en conséquence une incapacité à lever un tonus bronchique élevé, ce qui aboutit à une diminution irréversible du calibre de la bronche ([27, 104] (Oliver, 2007 *Am J Respir Cell Mol Biol* -Donovan, 2012 *Plos One*)). Nous retrouvons dans cette étude au décours immédiat de l'étirement une phase de relaxation très transitoire et de faible amplitude (**Figure W**) qui vient conforter les travaux précédents portant sur la Deep Inspiration [48](LaPrad 2008 *JAP*). Toutefois, l'amplitude de cette réponse et sa durée très brève (environ 30 secondes) sont largement moindres que l'élévation du tonus basal post-étirement tels que décrit par Laprad. L'absence d'activation préalable des bronches pourrait en partie expliquer cette différence (**tableau synoptique**). Par ailleurs, il est intéressant de noter que récemment, les mêmes auteurs ont constaté que leur modèle ne retrouvait pas le tonus basal initial et restait dans un état plus contracté évocateur de bronchoconstriction. Les hypothèses soulevées alors font état d'une réponse intrinsèque de la bronche à l'intensité du stretch telle qu'une réponse myogène, ou liée à l'hystérisis du parenchyme pulmonaire avec une diminution des capacités de forces de retour à l'état basal [7](LaPrad 2008): "*Ceasing ventilation has been shown to result in further constriction and is probably due to a twofold effect: a reduced mean load o the ASM and a loss of oscillatory load on the ASM. In our present study, we also mimicked these conditions and found that an absence of tidal ventilation after DI resulted in significant airway constriction within 1 min of DI.*" Une autre piste pourrait faire intervenir l'hyperpolarisation de la cellule musculaire lisse. En effet, des travaux portant notamment sur l'endothélium ont pu montrer que des contraintes de cisaillement ou des déformations imposées à des cellules endothéliales entraînaient une hyperpolarisation de leur membrane cellulaire par activation de canaux potassiques. Ceux-ci sont contrôlés par un couplage cytosquelette-protéine G et vont permettre l'entrée du Calcium et son accumulation dans le cytosol provoquant une déformation du cytosquelette [105](Ohno M et al 1993 *Circulation*).

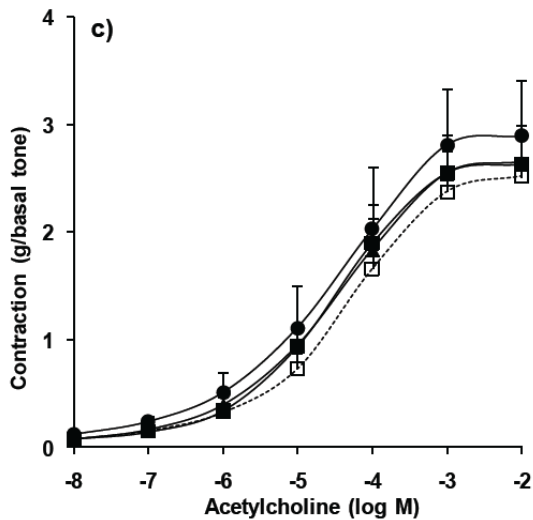
Ce nouvel état de base (Tonus Basal) de la bronche soumise à un étirement sans modification de l'affinité à l'acétylcholine pourrait passer par une réorganisation du cytosquelette avec un réarrangement et modification d'affinité entre les filaments d'actine et de myosine: phénomène de couplage [33] (Kh Krishnan 2008 *JAP*). Cette modification du couplage avec renforcement des interaction actine-myosine a été décrite pour des stimulations uniques comme réalisées ici, lesquelles diffèrent d'un stretch cyclique que l'on

peut observer lors de la respiration ou de la ventilation mécanique avec une succession d'étirements et de contractions définie aussi comme oscillations [34] (Trepap, 2007 Nature). Ainsi la réponse développée lors de l'interruption brutale d'une contrainte fait intervenir une réduction brutale de la charge appliquée sur les cellules musculaires lisses qui après une phase de fluidification obtenue par l'étirement conduit à un renforcement secondaire: le tissu devient alors plus rigide [25](Fredberg 2000 AJRCCM). Il est intéressant de noter d'emblée que cette réponse de renforcement est « partiellement » inhibée durant les oscillations et limite ainsi la broncho-constriction et la statufication du tissu bronchique définie comme une broncho-constriction irréversible. Ce rétrocontrôle négatif limite cette réponse en impliquant en particulier les voies de signalisation des MAP kinases. La stimulation de la cascade des MAP kinases par une contrainte mécanique implique intégrines, protéine G et phosphorylation de récepteurs de type tyrosine kinase. Elle aboutit à la transcription de gène de type ERK et c-jun et peut être inhibée notamment par la protéine RhoA ou la RhoA kinase [106](Jo, 1997, J Biol Chem). Dans le cas présent, la broncho-constriction atteint une phase de plateau après 10 minutes et laisse supposer des mécanismes de contre-régulation à la phase initiale [107] (Shen 1997 JAP). Ce type de résultat avec élévation du tonus basal a été décrit également sur un modèle animal de segments trachéo-bronchiques de bovin [98] (Hernandez 2008 J Pharmacol Exp Ther). L'hypothèse pour l'expliquer suggère une adaptation en longueur de l'arbre bronchique liée à ses propriétés élastiques avec le développement d'une force dépassant le tonus avant le stretch [80, 108] (Shen 1997 JAP - Wang 2001 JAP). Ces propriétés élastiques dépendant des liaisons d'actine sur les filaments de myosine existent également chez l'humain et peuvent expliquer cette élévation secondaire du tonus basal [17] (Matthews 2006 J Cell Sci). Elles font également intervenir le tissu de soutien et ces constituants tels que les fibres de collagène ou des médiateurs pro-inflammatoires. D'autres mécanismes participent probablement à cette mécanotransduction qui implique une réponse immédiate (pic) et tardive (plateau). Ainsi, le plateau est aboli en présence d'inhibiteurs des Rho-kinase tandis que la réponse initiale est altérée par le retrait de l'épithélium et l'inhibition des NOSynthase (L-NAME) suggérant une interaction entre les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses. La participation et la mobilisation du calcium intracytosolique par les récepteurs calciques L dépendants a été également montré dans d'autres études mais n'a pas été spécifiquement recherché ici [74] (Ito 2006 JAP). Par ailleurs, ces résultats suggèrent une

réponse spécifique à l'espèce humaine puisqu'ils ne sont pas retrouvés pour d'autres modèles animaux comme les rongeurs [109](Noble, 2010 JAP) Il est enfin intéressant de noter que les résultats de RT-PCR montrent que l'étirement produit une activation des gènes impliqués dans la prolifération ou la migration cellulaire et non dans la réponse inflammatoire. Ainsi, l'activation de la voie des WNT, famille de 19 glycoprotéines, passe notamment par l'expression de WNT-7B impliqué dans la voie de signalisation intracellulaire dite canonique et agissant notamment sur la différenciation et la polarisation de la cellule ce qui est conforme à une réorganisation du cytosquelette [110] (Konigshoff 2010 Am J respir Cell Mol Biol).

En ce qui concerne l'absence de modification de l'affinité l'acétylcholine associé à une élévation du tonus basal, elle peut s'expliquer par une réorganisation des ponts activés actine-myosine sans modification intrinsèque de la réponse passant par l'activation des récepteurs transmembranaires.





2.3.4 Conclusions

En conclusion, ces résultats sur des segments distaux de bronches humaines isolés montrent que la phase de constriction qui suit immédiatement un étirement bronchique atteint un plateau au bout d'environ 10 minutes suggérant une réorganisation du cytosquelette et de l'activation des ponts actine-myosine. Par ailleurs, elle semble impliquer également des cytokines pro-inflammatoires dérivées des leucotriènes et les voies de signalisation sous la dépendance du NO et WNT. Toutefois il s'agit là d'une stimulation unique et non physiologique comparativement aux phénomènes présents lors de la ventilation spontanée ou encore mécanique.

A retenir:

- La réponse de la bronche à un étirement mécanique (correspondant au développement d'une force de 30cmH₂O) provoque une élévation significative du tonus basal qui atteint un plateau en 10 minutes
- Ces modifications de tonus impliquent le relargage de leucotriènes, l'activation des voies des NO, des Rho-kinases et des WNT

Chapitre 3.

Etude du stretch cyclique sur bronche humaine

3.1. modèle motorisé de stretch cyclique :

3.1.1 Introduction :

Les principales limites au précédent modèle sont de deux ordres : un étirement « extra-physiologique » tant dans sa durée (étirement maintenu pendant 5 minutes consécutives) que son intensité, et un stimulus unique qui confère au modèle un aspect statique alors que la respiration ou même la ventilation sont des domaines dynamiques pour lesquels la répétition d'un cycle ou oscillation est partie intégrante du phénomène d'étirement. Dès lors, les conclusions proposées avec ce modèle de stretch unique pourraient différer d'un modèle de stretch cyclique et d'autres mécanismes y participer.

Pour ces différentes raisons, nous avons développé un modèle de stretch cyclique utilisant un banc expérimental motorisé où la motorisation d'une vis sans fin permet d'obtenir via un transducteur électronique à la fois la commande de la tension développée et surtout conserver la possibilité de recueil continu de cette tension (logiciel IOX de la société EMKA). Nous avons ainsi pu mettre en parallèle plusieurs cuves à organes témoins non motorisées et motorisées permettant la réalisation en parallèle de différentes conditions expérimentales avec une synchronisation des conditions appliquées tout en éliminant l'effet temps appliqué à ces bronches humaines issues de pièces opératoire « fraîches ». Enfin l'un des avantages du modèle est d'éviter un étirement longitudinal des tissus qui en pratique n'intervient que peu dans la réponse comparativement à un étirement axial comme cela est observé en cas de modification des pressions intra-bronchiques ou intra-alvéolaires. D'un point de vue mécanique, les caractéristiques des mesures sont la précision estimée à 0,1 mN tandis que la motorisation et l'application d'un étirement calibré repose sur la vitesse de rotation des vis sans fin avec une réactivité suffisante pour anticiper la réponse « élastique » de la bronche et de procéder à un ajustement des tensions immédiat. Pour ce faire, l'algorithme de la motorisation intègre ces différents paramètres. Enfin l'acquisition et l'exploitation des enregistrements reposent sur le logiciel IOX (v2.1) et Dataanalyst Software (v1.58) qui permet une sauvegarde des données mesurées toutes les 0,1 secondes (EMKA technologies, Paris, France).

Il a été montré précédemment que ce type de distension génère un étirement oscillant active les cellules endothéliales avec une expression préférentielle de P-sélectine et

d'endothéline-1 [92] (Candenas, 1992), qui participent à la communication entre les cellules épithéliales et musculaires lisses. De façon intéressante, en cas de stretch unique, l'expression du gène ligand de la P-sélectine (SELPG) augmente tandis que les antagonistes des récepteurs à l'endothéline A et B ne parviennent pas à réverser la réponse du tonus basal. Enfin, dans le muscle vésical (musculature lisse squelettique), la modulation des gènes de la famille CCN par l'étirement semble jouer un rôle très important évoquant donc un rôle de la génomique. Les études sur la bronche restent parcellaires et le plus souvent conduites sur des modèles de cellules isolées: cellule musculaire lisse bronchique notamment. Aussi avons-nous décidé de travailler dans les valeurs de capacité individuelle d'une bronche en ne dépassant pas le tonus maximal que celle-ci peut développer lorsqu'elle est exposée à une gamme croissante d'acétylcholine (10^{-8} à 3.10^{-3} M).

La première étude a eut pour but de déterminer la faisabilité et les performances du système automatisé tout en déterminant la durée de stretch optimale pour l'examen de la réponse bronchique.

3.1.2 Phase 1: développement du modèle automatisé

- **éléments de méthodologie**

A partir des caractéristiques intrinsèques des segments bronchiques analysés et par la programmation de la motorisation, un modèle de stretch cyclique « physiologique » sur organe isolé (bronche humaine) a été développé. Comme dans le chapitre précédent, les segments bronchiques étudiés proviennent de pièces opératoires « fraîches » obtenues avec le consentement préalable des patients opérés pour une chirurgie d'exérèse large pulmonaire (segmentectomie ou lobectomie). Une fois suspendus et équilibrés, les segments étaient soumis à une stimulation cholinergique maximale afin de tester leur capacité individuelle de réponse maximale en tension développée. Dès lors, la programmation de la séance de stretch cyclique respectait les conditions suivantes : réalisation de séquences « contraction-relaxation » avec un ratio 1/3 pour la phase de contraction et 2/3 pour la phase de relaxation conforme au pattern respiratoire habituel et aux réglages usuels de ventilation mécanique. L'application de la tension maximale à développer était programmée telle que correspondant à 80% à 100% de la réponse maximale du segment bronchique pour éviter tout étirement supra-physiologique et rupture potentielle du segment bronchique. Le

tonus de repos était défini après la période d'équilibration et correspondait finalement à la tension développée spontanément par la bronche en l'absence de stimulation externe. Elle est essentiellement fonction du calibre de la bronche et de la proportion de cellules musculaires lisses dans sa paroi. Au cours du stretch cyclique, la valeur de relaxation était programmée selon cette valeur de repos mais pouvait différer en cas de sensibilisation potentielle de cette bronche ou en cas d'incapacité à atteindre cette valeur de repos. La valeur réellement atteinte est appelée valeur basale. L'effet temporel de cette séquence cyclique contraction-relaxation (stretch cyclique) a été testé par une variation de la durée de stimulation testée à 5 minutes (étude préliminaire), 20 minutes, 40 minutes et 60 minutes. Pour chaque expérimentation, chaque bronche stretchée était pairée avec une bronche témoin non soumise au stretch (calibre similaire et origine du même patient). Par ailleurs, l'exposition à une gamme croissante d'acétylcholine (entre une concentration de 10^{-8} M et $3 \cdot 10^{-3}$ M) afin de réaliser la courbe dose-réponse était réalisée avant et après stimulation afin d'établir l'affinité à l'acétylcholine et les références individuelles en tension maximale développée. L'amplitude de la réponse entre le tonus maximal développé et le tonus basal était définie comme Emax. L'affinité à l'acétylcholine était mesurée comme la concentration provoquant 50% de la réponse maximale développée à $3 \cdot 10^{-3}$ M. Elle était définie comme l'ED50.

3.1.3 Article 2 (soumis)

Effectiveness of a novel load imposing device for cyclic stretching human isolated bronchi: a benchmark study

80

M Le Guen^{1,2}, E Naline¹, S Grassin delyle^{1,3}, P Devillier¹, C Faisy^{1,4}.

¹Laboratory of Respiratory Pharmacology – UPRES EA220, Université Versailles – Saint-Quentin, Suresnes, France

²Department of Anesthesiology, Hôpital Foch, Université Versailles – Saint-Quentin, Suresnes, France

³Laboratory of Toxicology – Hôpital Raymond Poincaré, Université Versailles – Saint-Quentin, Garches, France

⁴ Medical Intensive Care Unit, Hôpital Européen Georges Pompidou, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Corresponding author: Dr Morgan Le Guen, Hôpital Foch, 40 rue Worth, 92150 Suresnes, France. Email: m.leguen@hopital-foch.org, phone: +33(1)46252998, fax: +33(1)46252081

Funding: UPRES EA 220, Université Versailles – Saint-Quentin, Suresnes, and Medical Intensive Care Unit, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France.

Acknowledgments: thanking to Hervé Mahait (EMKA society); bioengineering for his advices and support about the automatized benchmark and the thoracic department (Pr Chapelier) of Foch hospital to the relationship with our unit (UPRES EA 220).

Abstract

Purpose: Mechanical ventilation can induce alveolar Injuries. Nevertheless, the knowledge about effects of airway inflation on bronchial compartment is more confidential. The aim of this study was to assess the accuracy of a new experimental model of cyclic stretch into physiological contractile response.

Material and methods: Bronchi were removed from 118 thoracic surgery patients. After preparation and equilibration in an organ bath, bronchial rings (1-2 mm of diameter and 0.5 cm of length) were cyclically stretched using repetitive coaxial strain generated by a motorized transducer. Maximal planned force corresponded to 80% of the maximal contractile response to acetylcholine and minimal force to the basal tone. Standardized cycles on one minute (1/3 contraction – 2/3 relaxation) were applied over a variable period (5, 20, 40, and 60 min). Performance of the stretch and bronchial consequences compared to paired control bronchi were examined.

Results: The target of imposed stretch was poorly reached despite intrinsic characteristics of the system and of the software. This time-dependent deviation mainly provided to a significant rise in the basal tone of stretched bronchi within 5 minutes with a maximum at 20 minutes. A second rise in basal tone was observed after stretch period and reached a plateau in 10 minutes. Moreover, cyclic stretch induced a bronchial hyperresponsiveness for acetylcholine and the maximal developed force during stretch was greater than the reference value.

Conclusion: Physiological cyclic stretch applied on an integrative model of human isolated bronchi sensitized bronchial responsiveness mainly via the stretch-induced adjustment of the contractile apparatus of airway smooth muscle. This stretch-induced mechanotransduction emphasized the relevance of a protective strategy of limitation of airway inflation during mechanical ventilation.

Key words: airway inflation; mechanical ventilation; airway hyperresponsiveness; mechanotransduction; human bronchus

Word counts: 271

Introduction:

Both spontaneous and mechanical ventilation induced a cyclic strain in the trachea-bronchial tree. If transpulmonary pressure reaches the same level in both cases, pressure applied on epithelial and smooth musculature appears very different. In case of pressure positive ventilation, the most usual mode of mechanical ventilation, a positive pressure is directly transmitted on the apical side of the bronchial cells. Then as previously documented on experimental airway smooth cells models, the type of external stimulus led to different consequences and interpretation. A focal but homogeneous pressure applied on the apical side gives a response which is completely different than a longitudinal strain with a difference in the involved pathway [23, 24]. If the literature predominantly proposed isolated cell-models describing the impact of a cyclic stretch on airways, integrative models were rarely studied except proximally with tracheal response [111]. In a specific situation of positive and repetitive pressure, acute lung injury can occur per se and micro barotraumas are involved. As described by Pugin *et al.*, a secondary inflammation provoked by airway stretching can rapidly promote nosocomial infections through acidification of the milieu related to lactic acid production [68]. The generalization of mechanical ventilation in surgical or intensive care settings points out the clinically impact of airway inflation on the trachea-bronchial compartment during ventilatory support.

Such a beneficial or harmful influence of cyclic stretch has been investigated on isolated airway alveolar or airway smooth muscle (ASM) cells [109] but the effect of cyclic stretch on whole fresh human bronchi is not well known. Some promising data have shown that stretching human bronchi for only 5 minutes while using a continuous force that corresponded to an inflation pressure of more 30 cmH₂O markedly altered the crosstalk between airway cells by raising epithelial leukotriene release via nitric oxide synthase activation and by inducing a myogenic response dependent on Rho-kinase and WNT-signaling pathways [41, 71]. However, the impact of prolonged cyclic stretch on human bronchial compartment remains largely unexplored.

The aim of this study was further to investigate the performances of a new model of automated cyclic stretch in human isolated bronchi based on the physiological bronchial contractile response.

Material and methods

Bronchus preparation

The study was approved by our local Ethics Committee (Comité de Protection des Personnes, Ile de France VIII, Boulogne-Billancourt, France). Before scheduled surgery for lung cancer, patients gave informed consent about experimental study on a segment of their retrieved lung. Upon the lung resection was performed, bronchial tissues were immediately collected from 128 patients (82/46 men/women, 58 ± 10 years of age); all were smokers or ex-smokers. Bronchial segments macroscopically free of cartilaginous tissue (inner diameter 1–2 mm) were removed from sites distant from the tumor. The bronchi were dissected away from adhering lung parenchyma and vessels and cut into rings of identical length and diameter, as described previously [112]. 4 to 8 bronchial segments with an inner diameter of between 1 mm and 2 mm and a length of about 5 mm were selected and paired (treated group versus control) according to their size. The muscle strips were finally suspended horizontally between two hooks in an isolated organ bath filled with 5 mL of Krebs-Henseleit solution, oxygenated with 95% O₂/5% CO₂ and thermostated at 37°C and an initial load of 1.5 g was applied [113]. Tension was applied through a force-length transducer and measured isometrically with a strain gauge (UF1: Piodem, Canterbury, UK) connected to an amplifier (EMKA Technologies France, Paris). Data were acquired, processed and analyzed with a computerized system running IOX (v2.1 and Datanalyst v1.58 software – EMKA technologies France).

Experimental device structure and settings

The cyclic-stretch device consists in a modification of the conventional and fully manual organ bath system to integrate an automated controller where the key element is an automated transducer allowing both measure of isometric contraction and automated tissue tensioning. The upper tissue hook is indeed connected to the transducer via a swivel which permits to apply a software-driven rotatory movement, hence controlling the tension applied

to the bronchial ring. The main characteristics of the system and parameters which may be automatically controlled by the software are shown in **table 1**.

Experimental protocol – definition of automated cyclic stretch:

After preparation, the bronchial rings were maintained in organ bath for 1 hour with washing every 10-15 minutes to equilibrate and determine their basal tone at rest (**Figure 1A**). Equilibration was considered to be achieved when the basal tone was maintained during 20 minutes with a variation lower than 10% (baseline value). Bronchial reactivity was then assessed with a maximal contraction to $3 \cdot 10^{-3}$ M Acetylcholine (Ach). Only the rings able to develop an increase in tension equal to or greater than 0.8 g were retained for the full protocol. The values of the basal tone before Ach and of the tension obtained with the maximal contraction to 3 mM Ach were recorded to be later used as parameters for the automated controller. After a new wash and resting period of one hour, a first dose-response curve to Ach (10^{-8} to $3 \cdot 10^{-3}$ M) with 5-minutes intervals for every concentration was performed to determine intrinsic contractile characteristics (potency and efficacy) of each bronchial ring. Bronchial rings were then subjected to a third 45 min wash and rest period before the randomized allocation to an automated cyclic stretch or a control arm to limit selection bias (**Figure 1A, 1B**). In the stretched group, cyclic stretching consisted in a repetition of identical and standardized stretch cycles, defined as a sequence of a stretch contraction with a target tension applied for 15 seconds followed with a relaxation during 15 seconds with another target tension and finally a 30 seconds resting period without any tension applied. The target tensions for each cycle were: for the contraction phase, 80% of the maximal contraction previously obtained with 3 mM Ach; for the relaxation phase, the basal tone value recorded just before the maximal contraction to Ach. The different total stretch durations assessed in distinct protocols were 5, 20, 40 or 60 minutes respectively. The tension was left to evolve spontaneously during the same time period for the half of the bronchial rings which were used as paired control and not subjected to stretch. This pattern imposed a 1:3 contraction of the whole stretch period and corresponds to clinical setting as

spontaneous or mechanically assisted respiration. At the end of this stage, a 15 minutes period was observed during which changes in tension that may occur after the stretch cycles were recorded. Finally, a second concentration-response curve to Ach was obtained (**Figure 1B**).

The purpose of this study was to examine the functional changes in human bronchi (including bronchial cells and smooth muscle) after a period of cyclic stretch using a repetitive and standardized strain. Therefore, we have developed a model of stretch based on the use of a force applied to each surface of the strip and tensioning coaxially the airway smooth muscle. Indeed, in the airways, microscopic studies have shown a transitional morphology of the smooth muscle from a concentric form as in trachea to a quite parallel arrangement to the bronchial with a spiroid disposition. Thus, using coaxial strain has some advantages by limiting axial strength on the bronchial preparation and allowing a homogenous repartition of strain all along the length of the bronchial ring. We created a novel load imposing device with EMKA technologies help (Paris, France) to obtain a controlled, accurate and rapid cyclic variation in the strain applied to the human bronchi. Rotation of the arm hanging one of the clips determines a vertical movement and consequently strength applied on the strip. This was possible through a developed tension controller (IOX2 software EMKA technologies, Paris, France). After daily calibration, main characteristics of the servo-controlled force system are a force resolution of 10 μ N with a very short time-to response when set values were prescribed. An algorithm was built to automate the stretch period with a sequence that was detailed as followed. Time to reach the target was relatively short (1/3 of the dedicated time for contraction) to provoke stretch of bronchi in two-phases: a rapid increase in applied strength whose expected maximal tension was individualized for every ring depending its intrinsic capabilities, then an accurate setting with a lower rate of strain as observed during ventilator setting with decelerating output. Rotation speed of the motor was set at the maximal value (2.5 tour/second) to increase the rate of correlation between (determines the speed to reach a target effect-tension and at the opposite way it allowed a quick relaxation of the strip. After this strain, relaxation was

followed during 1/3 of the period to obtain the prescribed value which corresponded to the basal tone before stretching the strip. At last, any external tension was removed to let the bronchus to reach its proper basal tone.

Model validation:

To assess the performance of this motorized model of cyclic stretch, uncontrolled strength with ring rupture was reported. The measured target compared to the prescribed target was collected in 40 patients to assess accuracy related to the duration of the procedure and to determine the number of cycle to equilibration. A dedicated software (IOX2-6-41) give a continuous control of the developed tension with measured on-line value with a recording every 100 milliseconds.

Moreover, a second set of analysis was performed with other human bronchi (n=139) to check the reproducibility of the experiment. This first part of the study was aimed at the model development, characterization and validation. We then retained 60 minutes as stretch duration, which was considered to be the most relevant since maximal values of the different measured parameters (for both basal tone and contraction to exogenous Ach) were shown to be reached and stable after a 60 minutes stretch. We thus sought to replicate our initial findings and performed a finely-tuned characterization of our automated cyclic stretch model with a larger number of human tissues, which were obtained from different individuals

Functional study

To assess the impact of the duration of stretching on the airway responsiveness and basal tone, we performed variable duration of the imposed contraction-relaxation sequence during 5, 20, 40 and 60 cycles without any modification in the preset values (period, prescribed maximal and basal tension) of stretch. To check the secretion of stretch-induced mediators in the organ bath, an additional washout following the stretch period was achieved five minutes after with continuous measurement of the developed tension and with parallel array of mediator in the organ bath.

Expression of the results and statistical analyses

Data are presented as means $\pm$ SE (where n is the number of subjects) and percentage (95% confident interval). Maximal effect of Ach ($E_{\max}$, g) represented the maximal response induced by 3.10^{-3} M Ach. Ach potency ($-\log EC_{50}$) was defined as the negative log of the Ach concentration achieving 50% of the maximal effect.

The results were analyzed using paired Student t-test or Fischer exact test. Basal tone and contractile responses (maximal tension, $E_{\max}$ for example) are expressed in tension (g). $\Delta E_{\max}$ in tension (g) represented the difference between $E_{\max}$ obtained with Ach 3.10^{-3} M and basal tone just before the dose-response curve. Comparison of $\Delta E_{\max}$ between the stretched bronchi and their paired controls used a paired Student-test. $\Delta(-\log EC_{50})$ represents the difference between $-\log EC_{50}$ obtained with the stretched bronchi and $-\log EC_{50}$ obtained with their paired controls. Because inadequate statistical power cannot rule out related to small samples, the standardized effect size d for the difference between means was calculated to determine whether the observed effect of stretching was small ($|d| \geq 0.20$), medium ($|d| \geq 0.50$) or large ($|d| \geq 0.80$) according to the Cohen's conventions. The 95% confidence interval (CI) for d was calculated to determine the uncertainty around the real effect of stretching. Data analysis, statistical tests, and curve fitting were achieved using Graphpad Prism (v4.03, GraphPad Software, San Diego, CA) and Statistica (99 Edition, StatSoft, Tulsa, OK).

Results*Samples*

On the first cohort of human bronchi ($n=40$), one ring in the 20 minute-stretched group was elongated till rupture related to a setting error and was excluded from analysis and replaced. Moreover, one datasheet was incomplete for an experiment in the stretched group for 5 minutes in the first cohort ($n=39$). Every data from the validation cohort were analyzed

(n=119). Mean patted-dry weight of stretched bronchi was comparable with that of their paired controls (24 ± 7 mg vs. 27 ± 8 mg, $p > 0.05$).

Characteristics of the automated cyclic stretch and validation of the model:

Table 2 shows performances of the motorized system and spontaneous behavior of stretched bronchial rings. Mean absolute tension values for the 3 phases of the stretch were: 1.03 ± 0.06 g for the basal tone just before the start of the stretch, 2.59 ± 0.11 g for the maximal contraction, 1.90 ± 0.07 g for the tone at the end of the 15-second relaxation period. These value were mainly observable as soon as the first stretch cycle, but there was a variability which required between 3-7 cycles to normalize and reach a coefficient of variation $<10\%$: 3.5 ± 0.5 , 7.5 ± 0.5 , 5.5 ± 0.5 and 7.0 ± 0.5 cycles for respectively a stretch duration of 5, 20, 40 and 60 minutes. After this, the values observed for each stretch cycle were highly reproducible and stable until the end of a stretch period lasting up to 1 hour.

The settings in the software were to obtain a stretch contraction that should reach 80% of the maximal contraction with $3 \cdot 10^{-3}$ M Ach and a basal tone at the end of each cycle identical to the basal tone just before the start of the stretch period. The differences between these theoretical targets and the measured tension values are shown in **Table 2**. The main findings are the adequacy between the target and measured maximal stretch-induced contraction (between 87 and 115% of the nominal value) whereas the measured basal tone is constantly 0.37-0.58 g (157-178%) greater than the theoretical value for total stretch durations between 5 and 60 minutes. As a consequence, the amplitude of stretch indicated a trend to be less important than prescribed with a total respect of the prescription that spreads from 43% to 88% with a time-dependent response. Nevertheless, after 40 minutes of cyclic stretch, the difference between the prescribed target of magnitude and the observed one were similar and constant. At the opposite, basal tone never reached the prescribed value with a significant difference as soon as 5 minutes of stretching (**Table 2 and Figure 2**).

Effect of cyclic stretch on basal tone

As depicted in figure 2, we observed two different effects on the basal tone – a stretch effect and a post-stretch effect. The post-stretch effect was defined like the increase in the basal tone after the cessation of the cyclic stretch period. This effect was added to the increase in basal tone observed during stretch (stretch effect = pre-stretch vs post-stretch basal tone), that was partially dependent on the total duration of the stretch period since a 5-minutes stretch provided a mean increase of 0.55 ± 0.12 g whereas the increase was almost identical for stretch durations between 20 and 60 minutes (**Table 3**). The plateau tension of the post-stretch basal tone was slowly reached in 10 minutes and then remained stable until the end of the 15 minutes resting period. The magnitude of the rise is not related to the duration of the stretch as depicted in figure 3 with a plateau in the response after 20 minutes for the basal tone and the post-stretch tone. As expected, there was no significant change in the bronchial tone in the control rings that were suspended for the same duration in organ bath but not subjected to the cyclic stretch.

Effect of cyclic stretch on bronchial reactivity to exogenous acetylcholine

Accordingly, the first series of concentration-response curves were highly similar among the control and stretch groups, with $\Delta E_{\max}$ values of 2 ± 0.11 and 1.94 ± 0.11 g, and $-\log EC_{50}$ values of 5.32 ± 0.06 and 5.33 ± 0.06 log units, respectively. The differences of $\Delta E_{\max}$ and $-\log EC_{50}$ between the first and second Ach concentration-response curves for each control and stretch groups are shown in **Table 4**. The difference in $\Delta E_{\max}$ between these two curves was not statistically different from zero in either control or stretch group for the 4 studied stretch durations at the exception of a decrease of 0.27 g in $\Delta E_{\max}$ in the control group for a 5-minute stretch and there was not difference at all between the stretch and control groups. By contrast, stretch induced a decrease of 0.15 to 0.62 log-units in the $-\log EC_{50}$ of the second concentration-response curve to Ach which reached statistical significance after stretch durations of 40 and 60 minutes. This effect was not observed in the

control group and the differences between the stretch and control groups were significant for all the four stretch durations, demonstrating an increased potency of Ach.

Replication study

This replication study included a larger number of human tissues, which were obtained from 79 different individuals. On these tissues, we confirmed the initial observations obtained during model development, i.e. an increase in stretch-related basal tone (**Table 3**), in post-stretch basal tone (**Table 3**) and a sensitization to exogenous Ach resulting in an increased $\Delta E_{\max}$ (0.17 ± 0.07 g) and decrease in $-\log EC_{50}$ (**Table 4**) of Ach for the second concentration-response curves. The increase in maximal effect of Ach reached statistical significance due to the larger number of bronchi.

Impact of organ bath washout on the stretch-effect:

In order to assess if the increase in basal tone or the sensitization to Ach may be related to the release in organ bath fluid of mediators involved in the regulation of bronchial tone, we performed experiments where tissues were washed at the end of the stretch period, to eliminate all mediators that may be released in the bath. Washout following stretch did not influenced post-stretch basal tone and only a transient decrease in the developed force was observed (**Table 5**). As a consequence, post-stretch magnitude was not different in both groups (**Table 5**).

Discussion

This study highlights the difficulty of this new motorized system in maintaining the assigned values of strain on human bronchi during cyclical stretch despite modern and accurate technology and despite physiological range of values. The full prescribed objective was quite never obtained in less than 40 minutes. The main explanation was provided by a concomitant and early significant stretch-induced rise in basal tone whatever the duration of

stretch exposure. The second important finding is the spontaneous and delayed plateau (post-stretch) 10 minutes after the end of stretching. The magnitude of this post-stretch tone was not dependent of the magnitude of the contraction and was not related to extracellular mediators. Finally, hyperresponsiveness to Acetylcholine was observed in a time-dependent stretching.

Controller performances

The inability of the automated controller to reach the assigned value of strain was likely independent from the initial settings or the imprecision of measurements but might be related to the intrinsic response to the bronchial ring submitted to repetitive force. Therefore, the inability to achieve the prescribed minimal tension during the rest period of the cyclic stretch appears to be the consequence of an early and sudden increase in the basal tone, about twice than expected. This early response within 5 minutes proved to be strong enough to oppose its strength to the transducer; thereby the closed-loop control of strain assignation below the spontaneous response of the human bronchi was unachievable and this may suggest bronchial hyperresponsiveness or calcium sensitization [114].

At the opposite, the maximal value of tension during contraction was rarely achieved and it remained lower than assigned before 40 minutes regardless of increased basal tone. As a consequence, there was a poor agreement in stretch magnitude between assigned and measured values in this period with a secondary enhancement in the developed tone as below.

Basal tone and mechanisms of early rise : calcium sensitization

This model of repetitive strain exposure highlighted the role of basal tone as key effector of the bronchial response. The stretch-induced gradual rise in basal tone suggests sensitization of human bronchi. Indeed, bronchomotor tone of ASM is regulated in healthy individuals at several levels : activation of the myosin light chain kinase (MLCK) with enhancement of the phosphorylation, inhibition of the myosin phosphatase decreasing

dephosphorylation [75, 115, 116] or calcium sensitization defined as an increased contraction produced by a similar cytoplasmic concentration [117, 118]. In this study, calcium sensitization alone cannot explain the two different phases (early and delayed) of rise of basal tone. Bronchial sensitization is likely considering the early phase with a concomitant change in Ach affinity (**Table 4**). In fact, one general view is that MLCK activation occurs in the initial phase of a contraction with the sustained phase maintained by inhibition of MLCP [117] and this could explain early rise in tone. Mizuno *et al.* [37] demonstrated a time course of constrictive response involving calcium sensitization and MLCK and they described a maximal as soon as one minute and this is similar to our study with a new equilibrium within 5 minutes (**Figure Y**). The plateau observed after 20 minutes (**Figure Y**) suggested an optimal response that cannot be override.

Post stretch response (mecanotranduction – genomic transcription - inflammation – cytoskeleton reorganization to stiffness)

After the end of cyclic stretch, a spontaneous and regular elevation of the airway basal tone with a semi-logarithmic shape followed by a plateau within 10 minutes was observed. This post-stretch response seems to be a specific effect of stretch. In a previous model of an single 5-minutes mechanical stretch using a force of $2.5 \times$ basal tone on human bronchi, an immediate rise in basal tone following stretch was also described and was triggered by an increased epithelial LTE_4 production due to the activation of Ca^{2+} -independent inducible NOS2 [112]. In the present model of prolonged and physiological cyclic stretch defined as a strain corresponding to a fraction of maximal contraction, the expression of inflammation through production of contractile mediators is questionable. If we suppose this response mediated by cytokines in the bath, a washout, whatever the moment will reverse the rise in the basal tone. In the present study, the washout of the organ bath during the post-stretch period led to a transient decrease but the final magnitude of the response was not altered. As a consequence, inflammatory mediators do not directly influence this delayed response then their theorical and definitive disappearance (stretch is

stopped) have no effect. This absence of direct relationship between physiological stretch and mediator-related rise in basal tone may protect lung from harmful inflammatory response. Second, the absence of involvement of contractile mediator in response to cyclic stretch supports the key-role played by ASM or epithelial cells in stretch-induced rise airway basal tone. Myogenic response or mecanotransduction are the two main hypotheses to explain this delayed phenomenon [119]. Therefore; a low mechanical stress on ASM, i.e., low ASM force attenuation, was demonstrated as trigger for further contraction through myogenic response of the ASM. It was previously described in another model of activation of ASM in in-vivo or in-vitro conditions [48] and consists to a decrease in the capacity of ASM to be completely relaxed. These findings are consistent with observations in healthy humans whereby periods of breath hold at total lung capacity do not produce significantly more bronchodilatation than a normal transient deep inspiratory effort [51]. Taken together, these findings suggest that under conditions of low mechanical stress on ASM corresponding to low ASM force attenuation, further constriction may occur via the myogenic responses of ASM [119]. Given that the mechanical strain imposed on the human bronchi corresponded to 80% of their maximal contractility, the present model of cyclic stretch appears physiological and therefore will complement another recent model of acute mechanical stretch in which the supraphysiological strain corresponded to airway inflation pressure >30 cm H₂O [112]. In addition, ASM exhibits a considerable mechanical plasticity that allows optimal force generation within a large range of length changes named length adaptation [120] and length oscillations produced a reversible reduction of myosin filaments, thus suggesting a rapid myosin assembly and disassembly of remaining filaments with optimized developed strength as observed in the post-stretch period [77]. At last, mecanotransduction is known to directly induces genomic transcription of genes like c-fos [121] and the delayed response observed in the post-stretch tone may involve this mechanism [122].

From a clinical point of view, all these data suggest that mechanical ventilation limiting airway inflation could be also protective to reduce damages in the bronchial compartment of the airways. In addition, the theory of ASM fluidization or stiffness might

explain the increase in post-stretch tone [33, 104]. Indeed, during tidal stretch corresponding to a shear of sufficient amplitude, physical properties of ASM cells are substantially modified leading to a perturbation in the binding between myosin and actin filaments. As a result, only a small fraction of links that can attach to actin are attached and this state is characterized by a “fluid-like” state [123]. When mechanical stress is stopped, smooth muscles undergo a journey back towards a more solid-like state and stiffness increased. This particular physical property is defined as “Soft Glassy Material” [33] and was previously described to explain change of state in airway smooth muscles [123]. During physical state transition, molecular phenomena occurred, especially cytoskeleton rearrangements, until stabilization in a new steady-state [54]. Thus, shear stress induces successive transition phases as fluidization or solidification of cytoskeleton with overall rearrangement [23, 34, 124]. These state changes engage various components: fluidization might include actin depolymerization, breaking weak bonds or cross-links, or overcoming steric constraints then stiffness.

Recruitment of contractile units

In our experimental model, airway response to cyclic stretch was remarkable because as soon as 20 minutes, developed tension during lengthening exceeded the maximal tension previously observed when the bronchial rings were exposed to $3 \cdot 10^{-3} \text{M}$ Ach. This supra-maximal gain in strength could be related to a change of isoform composition in the myosin bundles and may therefore be a mechanism to modulate ASM responsiveness. Conversely, actin filaments do not seem to play a role in the intrinsic contractility of ASM. This result indicates a maximal recruitment of the whole contractile units as previously described by Hernandez et al. on bovine airway segments during one single prolonged static stretch (3 minutes) [98]. After priming the contractile apparatus by pretension, the stimulation of the smooth muscle cytoskeleton triggered by stretch causes contractile apparatus rearrangements, leading to regeneration of a force exceeding pre-stretch level [125]. The strain-stiffening behavior of human ASM cells observed in response to cyclic stretch may involve sensitization and calcium pathways with short activation times such as mediator

release or change in the intracellular Ca^{2+} flux [43, 126]. This phenomenon of ASM adaptating to elevated muscle tone and generating more total force was described by Bossé *et al.* [114]. The main hypothesis was built on force adaptation derived from the “length adaptation” characteristic. In the present situation, force generation by cross-bridge was gradually transferred to a passive structure of the cytoskeleton that increases muscle force during the recovery period. Moreover, using experiments from isolated airway strips or ASM cells, some investigators hypothesized that, if imposed force fluctuations become too small, the ASM will stiffen due to decreased cross-bridge cycling and/or a state of reduced cytoskeletal fluidization [33]. On the other hand, when the ASM is exposed to force fluctuations, ASM length corresponds to a dynamically equilibrated state that depends on the oscillation amplitude and frequency. This mechanism derived from altering dynamic features of breathing is unique and separate from solely altering the mean static load. A computational model at the level of the actin-myosin cross bridges showed that length oscillations applied about the ASM isometric length decrease the number of attached cross bridges [25]. The effects of cyclic stretch on the bronchial reactivity to exogenous ACh are thus mainly an increase in the basal tone and an increase in the potency and efficacy of ACh, suggesting an alteration of mechanisms involved in the regulation of basal tone and a sensitization of the tissues to the cholinergic contraction.

Strength and limits of the study

One strength of our experimental model is the intact airway preparation which providing a physiologically relevant in vitro environment in which airway responsiveness can be directly measured. Another strong point is the use of a physiological strain (80% of maximal contraction developed by a complete bronchus) for stretching human airway. In other words, stretching human bronchi with excessive force would provide other results, stimulating probably more intracellular signaling pathways as the consequences of mechanotransduction induced by integrines activation [127, 128]. At last, the study used freshly human isolated bronchi. This is of real importance due to interspecies differences in

airway basal tone modulation and control of airway responsiveness [74, 75]. However, bronchi from patients undergoing thoracic surgery may have been stretched during the surgical procedure, limiting our results. In the other hand, the bronchial ring is disconnected to the extra-cellular membranous that could partially counteract the rise in basal tone and with its local mediators. This study only explores interaction between epithelial cells and airway smooth muscle.

Conclusion

Cyclic stretch significantly enhanced efficacy of Ach but not its potency, indicating this stretch-induced effect is mainly triggered by the sensitization of contractile filaments and remains independent from up-regulation of muscarinic receptors. The gain in strength observed after 20 minutes of cyclic stretch also suggested recruitment of new contractile units or a change in the cytoskeletal properties. Further works based on the present experimental model will be needed to support these mechanical hypotheses.

The poor agreement between observed tension and assigned ones is interesting because it may also occur in patients on mechanically ventilation. In the same way, an increase in basal tone should be considered in the settings of ventilator. This response in changing of basal tone could be extrapolate during a cyclic positive pressure applied on the bronchial tree

References:

1. Deng L, Bosse Y, Brown N, Chin LY, Connolly SC, Fairbank NJ, et al. Stress and strain in the contractile and cytoskeletal filaments of airway smooth muscle. *Pulm Pharmacol Ther.* 2009 Oct;22(5):407-16.
2. Krishnan R, Park CY, Lin YC, Mead J, Jaspers RT, Treppe X, et al. Reinforcement versus fluidization in cytoskeletal mechanoresponsiveness. *PLoS One.* 2009;4(5):e5486.
3. Bailey EF, Fregosi RF. Modulation of upper airway muscle activities by bronchopulmonary afferents. *J Appl Physiol.* 2006 Aug;101(2):609-17.
4. Pugin J, Dunn-Siegrist I, Dufour J, Tissieres P, Charles PE, Comte R. Cyclic stretch of human lung cells induces an acidification and promotes bacterial growth. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 Mar;38(3):362-70.
5. Noble PB, Hernandez JM, Mitchell HW, Janssen LJ. Deep inspiration and airway physiology: human, canine, porcine, or bovine? *J Appl Physiol.* 2010 Sep;109(3):938-9; author reply 40-1.
6. Schaafsma D, Gosens R, Bos IS, Meurs H, Zaagsma J, Nelemans SA. Allergic sensitization enhances the contribution of Rho-kinase to airway smooth muscle contraction. *Br J Pharmacol.* 2004 Oct;143(4):477-84.
7. Villar J, Cabrera NE, Valladares F, Casula M, Flores C, Blanch L, et al. Activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway by mechanical ventilation is associated with ventilator-induced pulmonary fibrosis in healthy lungs. *PLoS One.* 2011;6(9):e23914.
8. Faisy C, Pinto FM, Le Guen M, Naline E, Grassin Delyle S, Sage E, et al. Airway response to acute mechanical stress in a human bronchial model of stretch. *Crit Care.* 2011;15(5):R208.
9. Watson N, Magnussen H, Rabe KF. The relevance of resting tension to responsiveness and inherent tone of human bronchial smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 1998 Feb;123(4):694-700.
10. Bosse Y, Chin LY, Pare PD, Seow CY. Adaptation of airway smooth muscle to basal tone: relevance to airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009 Jan;40(1):13-8.
11. Sanderson MJ, Delmotte P, Bai Y, Perez-Zogbhi JF. Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca²⁺ signaling and sensitivity. *Proc Am Thorac Soc.* 2008 Jan 1;5(1):23-31.
12. Dimopoulos GJ, Semba S, Kitazawa K, Eto M, Kitazawa T. Ca²⁺-dependent rapid Ca²⁺ sensitization of contraction in arterial smooth muscle. *Circ Res.* 2007 Jan 5;100(1):121-9.
13. Ito S, Kume H, Naruse K, Kondo M, Takeda N, Iwata S, et al. A novel Ca²⁺ influx pathway activated by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008 Apr;38(4):407-13.
14. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev.* 2003 Oct;83(4):1325-58.
15. Lincoln TM. Myosin phosphatase regulatory pathways: different functions or redundant functions? *Circ Res.* 2007 Jan 5;100(1):10-2.
16. Mizuno Y, Isotani E, Huang J, Ding H, Stull JT, Kamm KE. Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008 Aug;295(2):C358-64.
17. Wang L, Chitano P, Murphy TM. A maturational model for the study of airway smooth muscle adaptation to mechanical oscillation. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005 Oct;83(10):817-24.
18. LaPrad AS, West AR, Noble PB, Lutchen KR, Mitchell HW. Maintenance of airway caliber in isolated airways by deep inspiration and tidal strains. *J Appl Physiol.* 2008 Aug;105(2):479-85.

19. Brown RH, Mitzner W. Airway response to deep inspiration: role of inflation pressure. *J Appl Physiol*. 2001 Dec;91(6):2574-8.
20. Bosse Y, Sobieszek A, Pare PD, Seow CY. Length adaptation of airway smooth muscle. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Jan 1;5(1):62-7.
21. Kuo KH, Wang L, Pare PD, Ford LE, Seow CY. Myosin thick filament lability induced by mechanical strain in airway smooth muscle. *J Appl Physiol* (1985). 2001 May;90(5):1811-6.
22. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest*. 1997 Mar 1;99(5):944-52.
23. Fabry B, Fredberg JJ. Mechanotransduction, asthma, and airway smooth muscle. *Drug Discov Today Dis Models*. 2007;4(3):131-7.
24. Donovan GM, Sneyd J, Tawhai MH. The importance of synergy between deep inspirations and fluidization in reversing airway closure. *PLoS One*. 2012;7(11):e48552.
25. Krishnan R, Trepas X, Nguyen TT, Lenormand G, Oliver M, Fredberg JJ. Airway smooth muscle and bronchospasm: fluctuating, fluidizing, freezing. *Respir Physiol Neurobiol*. 2008 Nov 30;163(1-3):17-24.
26. Jop P, Mansard V, Chaudhuri P, Bocquet L, Colin A. Microscale rheology of a soft glassy material close to yielding. *Phys Rev Lett*. 2012 Apr 6;108(14):148301.
27. Noble PB, Jones RL, Needi ET, Cairncross A, Mitchell HW, James AL, et al. Responsiveness of the human airway in vitro during deep inspiration and tidal oscillation. *J Appl Physiol*. 2011 Jun;110(6):1510-8.
28. Trepas X, Deng L, An SS, Navajas D, Tschumperlin DJ, Gerthoffer WT, et al. Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature*. 2007 May 31;447(7144):592-5.
29. Maksym GN, Deng L, Fairbank NJ, Lall CA, Connolly SC. Beneficial and harmful effects of oscillatory mechanical strain on airway smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol*. 2005 Oct;83(10):913-22.
30. Hernandez JM, Cox G, Janssen LJ. Involvement of the neurokinin-2 receptor in airway smooth muscle stretch-activated contractions assessed in perfused intact bovine bronchial segments. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Nov;327(2):503-10.
31. Noble PB, Ansell TK, James AL, McFawn PK, Mitchell HW. Airway Smooth Muscle Dynamics and Hyperresponsiveness: In and outside the Clinic. *J Allergy (Cairo)*. 2012;2012:157047.
32. Gunst SJ, Tang DD. The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle. *Eur Respir J*. 2000 Mar;15(3):600-16.
33. Bursac P, Fabry B, Trepas X, Lenormand G, Butler JP, Wang N, et al. Cytoskeleton dynamics: fluctuations within the network. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Apr 6;355(2):324-30.
34. Mijailovich SM, Butler JP, Fredberg JJ. Perturbed equilibria of myosin binding in airway smooth muscle: bond-length distributions, mechanics, and ATP metabolism. *Biophys J*. 2000 Nov;79(5):2667-81.
35. Ciobanasu C, Faivre B, Le Clainche C. Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: the multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions. *Eur J Cell Biol*. 2013 Oct-Nov;92(10-11):339-48.
36. Thomas RA, Norman JC, Huynh TT, Williams B, Bolton SJ, Wardlaw AJ. Mechanical stretch has contrasting effects on mediator release from bronchial epithelial cells, with a rho-kinase-dependent component to the mechanotransduction pathway. *Respir Med*. 2006 Sep;100(9):1588-97.
37. Ito S, Kume H, Oguma T, Ito Y, Kondo M, Shimokata K, et al. Roles of stretch-activated cation channel and Rho-kinase in the spontaneous contraction of airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 2006 Dec 15;552(1-3):135-42.

Figure 1: Schema of the protocol

100

Figure 2: photo with zoom

Figure 3: Influence of duration of stretch.

Table 1. Technical characteristics of the automated controller of cyclic stretch

	Range of values	Extreme values	Precision
Basal tone, g	1-3	0-12	0.10 N
Maximal developed tone, g	2-7	0-12	0.10 N
Speed of rotation, tour/second	2-2.5	1.5-2.5	0.1
Equilibration timing, second	30	free	NA
Data collection, second	1/10	1/6 to 30	NA

NA, non applicable

Table 2: Performance of the motorization for stretching cyclically human bronchi.

	Stretch duration	n	Difference between measured data and prescribed target		Effect size
			Δ (g)	%	d
Basal tone	5 min	9	0.47±0.09***	178±28	3.42 (1.8-4.7)
	20 min	10	0.58±0.09***	164±12	2.81 (1.5-3.9)
	40 min	10	0.52±0.09***	161±12	3.12 (1.7-4.3)
	60 min	10	0.37±0.09***	156±21	2.05 (0.9-3.0)
	60 min	79	0.42±0.05***	160±10	3.13 (2.6-3.6)
Maximal tension	5 min	9	-0.53±0.27**	87±10	2.11 (0.9-3.1)
	20 min	10	-0.19±0.29	104±11	0.47 (-0.4-1.3)
	40 min	10	0.00±0.21	109±8	0 (-0.9-0.9)
	60 min	10	0.23±0.26	115±10	0.91 (0-1.8)
	60 min	79	0.06±0.06	106±3	0.70 (0.2-1.2)
Magnitude of contraction	5 min	9	0.84±0.12***	43±9	7.83 (4.8-10.1)
	20 min	10	0.35±0.15**	52±9	6.59 (4.2-8.5)
	40 min	10	0.15±0.22	58±12	4.58 (2.8-6.8)
	60 min	10	0.13±0.21	88±21	0.79 (-0.2-1.7)
	60 min	79	0.14±0.13	55±5	12.73 (11.2-14.1)

min: minutes, NA: not applicable ** p < 0.01, *** p<0.001

Table 3: Effect of cyclic stretch on airway basal tone

	Stretch duration	n	Difference between first and second dose-response curve (Ach)		Effect size
			Control group	Stretched group	d
Basal tone (g)	5 min	9	-0.05±0.03	0.55±0.12**	6.86 (4.2-8.9)
	20 min	10	-0.04±0.06	0.72±0.18**	5.19 (3.2-6.7)
	40 min	10	0.14±0.11	0.70±0.12*	5.66 (3.5-7.3)
	60 min	10	0.13±0.09	0.71±0.13**	4.86 (3.0-6.3)
	60 min	79	0.02±0.02	0.82±0.06***	17.9 (15.8-19.8)
Post-stretch basal tone (g)	5 min	9	0.01±0.02	0.16±0.04**	4.74 (2.8-6.3)
	20 min	10	-0.03±0.05	0.27±0.07**	7.92 (5.1-7.6)
	40 min	10	0.01±0.01	0.29±0.05**	4.93 (3.0-6.4)
	60 min	10	0.03±0.03	0.31±0.04**	7.35 (4.7-9.4)
	60 min	79	-0.01±0.01	0.28±0.02***	18.3 (16.2-20.3)

min: minutes, * p<0.05** p<0.01*** p<0.001 vs paired unstretched control

Table 4: Responsiveness to Acetylcholine in cyclically stretched human bronchi and paired controls

	Stretch duration	n	Difference between first and second dose-response curve (Ach)		Difference between groups	Effect size
			Control group	Stretched group		d
ΔEmax (g)	5 min	9	-0.27±0.09*	-0.12±0.21	0.15±0.19	0.93 (-0.1-1.8)
	20 min	10	-0.01±0.14	0.01±0.13	0.02±0.15	0.15 (-0.7-1.0)
	40 min	10	-0.06±0.14	0.06±0.15	0.12±0.25	0.93 (-0.8-1.9)
	60 min	10	-0.16±0.15	-0.02±0.15	0.14±0.22	0.93 (0-1.8)
	60 min	79	0.04±0.04	0.17±0.07*	0.14±0.07*	2.28 (1.9-2.7)
-log EC50 (log unit)	5 min	9	-0.18±0.07	0.15±0.09	0.33±0.07**	4.09 (2.3-5.5)
	20 min	10	0.07±0.13	0.43±0.13	0.36±0.06***	2.77 (1.4-3.8)
	40 min	10	0.02±0.14	0.59±0.17**	0.58±0.14**	3.66 (2.1-4.9)
	60 min	10	-0.07±0.06	0.62±0.14*	0.61±0.12***	6.41 (4.0-8.2)
	60 min	79	0.01±0.03	0.47±0.05***	0.45±0.04***	11.1 (9.8-12.4)

min: minutes, * p<0.05 ** p<0.01 *** p<0.001 vs paired unstretched control

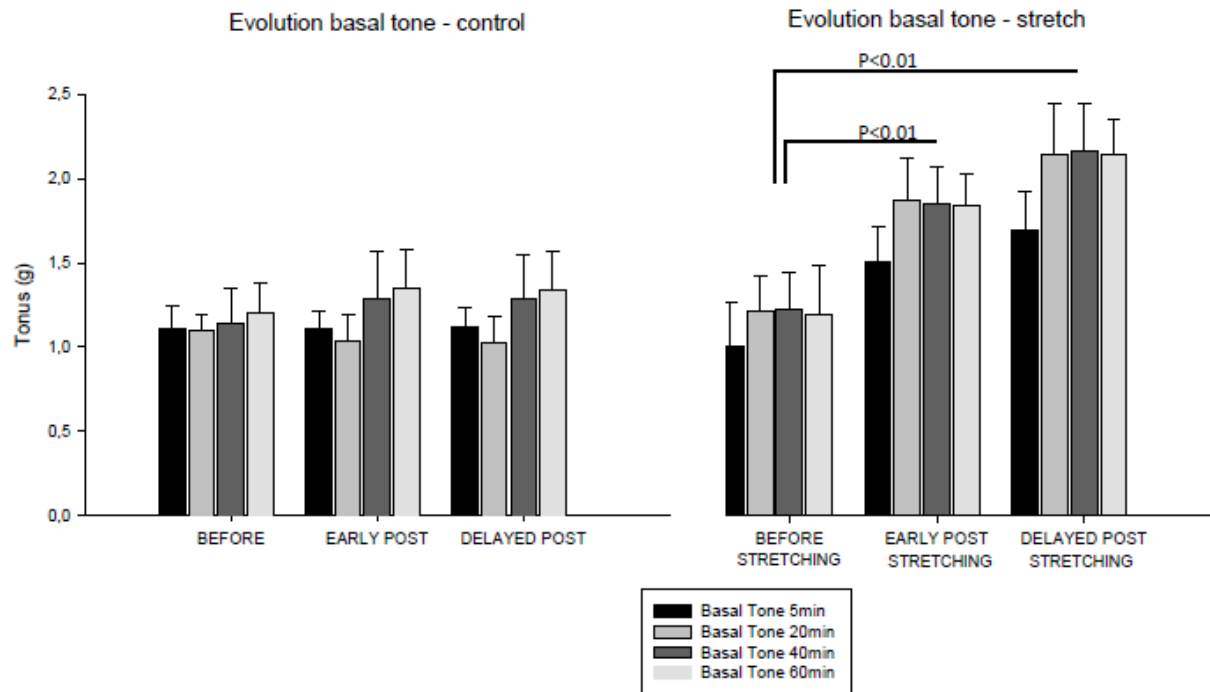
Table 5: Effect of washout on basal tone during post-stretch period

	Difference between first and second dose-response curve (Ach)		Effect size
	Non washed group	Washed group	d
Number	10	16	
Basal tone (g)	0.72±0.18	0.65±0.18	5.19 (3.2-6.7)
post-stretch Basal tone (g)	0.28±0.06	0.34±0.11	5.66 (3.5-7.3)
Post wash basal tone	NA	0.06±0.04	4.86 (3.0-6.3)
ΔEmax (g)	0.17±0.07	0.17±0.06	4.86 (3.0-6.3)

Figure 1: Schema of the protocol

Figure 2: photo with zoom

Figure 3: Influence of duration of stretch.



Relationship between duration of exposition to cyclic stretch or control and rise in basal tone (during the period of interest and in post-stretch period) - after 20 minutes both responses showed a plateau. Continuous lines represent response of stretched human bronchi and dotted line represent paired control bronchi.

3.1.4 Résultats et discussion concernant la phase 1

108

Cette première analyse pourrait se révéler décevante dans la mesure où la prescription du stretch à appliquer n'était que rarement atteinte par le système motorisé: entre 43 et 88% du temps dans l'intervalle considéré. Or il ne s'agit pas d'une imprécision de l'automate mais d'une modification précoce des propriétés de la bronche soumise à un stretch cyclique qui empêche de respecter les objectifs quelle que soit la durée du stretch. En effet, on constate très rapidement (dès la 5^{ème} minute) une élévation du tonus basal de la bronche qui ne permet pas le retour à l'état initial. Dès lors, l'amplitude du stretch appliqué est diminuée. Un élément intéressant toutefois est le fait que la contrainte maximale est elle-aussi non respectée avec une force développée qui devient supérieure à la tension prescrite. Ce phénomène apparaît décalé dans le temps puisqu'il est présent à partir de la 40^{ème} minute. Ces deux éléments suggèrent une modification significative des propriétés physiques temps-dépendant de bronches humaines soumises à un stretch cyclique même peu puissant puisque ne dépassant pas la réponse maximale de la bronche obtenue à l'exposition d'acétylcholine à 3.10^{-3} M. Parmi elles, on constate une élévation significative du tonus basal non réductible, une modification d'effet sur l'amplitude de réponse et de l'affinité à l'acétylcholine.

Ainsi, comme suggéré sur la **figure 2**, l'exposition à un stretch cyclique standardisé élève progressivement le tonus basal des bronches jusqu'à atteindre d'un plateau entre 20 et 40 minutes. Il faut noter que ce délai est conforme à d'autres études qui ont étudié les performances de contractilité de muscle lisse squelettique soumis à une contraction et relaxation calibrée (isométrique) obtenue par stimulation électrique [129] ([Guardiola 2007 JAP](#)). Ainsi, Ali et al. ont décrit un délai de 30 minutes de récupération de la force isométrique optimale après étirement ou rétraction de cellules musculaires lisses alors même que la vitesse de contraction n'est pas modifiée par les changements de contraintes appliquée au tissu [130]. Dans ce contexte, une sensibilisation bronchique est suggérée faisant intervenir soit une plus grande phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLCK) soit à une sensibilisation calcique directe: une même réponse contractile est obtenue pour une concentration calcique inférieure [116] ([Dimipoulos 2007 Circ Res](#)). Cette sensibilisation a été notamment montré par Mizuno sur des fibres musculaires vésicales de souris [37] ([Mizuno 2008 Am J Physiol Cell Physiol](#))

De la même façon, un délai d'équilibration existe pour le retour à un tonus de repos après une série de contraction-relaxation. Ce délai plus bref de l'ordre de 10 minutes avait déjà été retrouvé dans notre précédente étude en condition d'étirement unique supra-maximal [112]. (Faisy 2011 CC) Cette fois, on retrouve un délai comparable de 10 minutes pour atteindre un plateau dans la force développée par la bronche en situation de repos. Ce phénomène de latence dans les deux cas fait probablement intervenir soit un remodelage du cytosquelette, ou des unités contractiles, soit une modification des interactions au sein des unités contractiles entre les ponts d'actine et de myosine. A l'inverse, l'hypothèse inflammatoire paraît discutable dans la mesure où le remplacement complet du bain d'organe avec manœuvres de lavage répété ne modifie pas le tonus basal secondaire. Ainsi, une réorganisation peut s'envisager puisque cytosquelette et appareil contractile sont des structures intimement connectées avec la démonstration de zones comme les filaments épais au contact des filaments d'actine soit polymérisée soit dépolymérisée [79](Seow AJPCP 2005). Différentes études ont suggéré que le cytosquelette était une structure malléable [131](Seow JAP 2000), avec des propriétés physiques proches du verre, aboutissant à une forme de cellule dépendante d'un ensemble de contraintes extérieures. La déformation de la cellule telle qu'on peut l'observer dans le cas d'un étirement unique ou répété (stretch cyclique) implique le réarrangement et le réattachement des filaments d'actines notamment avec la structure filamentaire du cytosquelette ainsi que l'addition ou la « disparition » d'unités contractiles en série ou en parallèle. Ce phénomène décrit récemment implique la capacité des filaments de myosine à se dissoudre [77](Kuo JAP 2001) et à se reformer secondairement permettant l'adaptation du nombre d'unités contractiles de la cellule tout en passant par un état intermédiaire. Cette hypothèse est représentée schématiquement dans la **figure «2.2 »**. Ce réarrangement correspond finalement au modèle de réponse myogène observée par la cellule musculaire et l'impossibilité de relaxation complète [56, 119] (LaPrad 2010 JAP - Wang 2005 Can J Physiol Pharmacol). Toutefois, il ne faut pas omettre les phénomènes de mécanotransduction qui représente l'autre caractéristique de ce tissu bronchique.

Dès lors, les caractéristiques de la force développée par un même tissu bronchique peuvent varier au fil du temps en fonction des contraintes et notamment dans le cas de contraintes répétées (oscillation ou stretch cyclique): adaptation en longueur [120] (Bosse 2008 Proc Am Thorac). Il convient de noter que la variation de force développée selon

l'étirement ou la contraction n'est pas symétrique. La performance augmente en effet significativement en cas d'étirement ce qui suggère un recrutement plus important d'unités contractiles disposées en série (**Figure 2.2**). En effet, le maintien de la force isométrique alors même que la cellule est soumise à un allongement tel que sa longueur double met en évidence le double d'unités contractiles mais avec une densité similaire [132] (Kuo APJCELL 2003). Dans cette configuration les portions de filaments de myosine en dehors de l'unité participant à la contraction sont dissoutes et reformées secondairement si besoin. La disparition de ces contraintes permet à la cellule de retrouver un état d'équilibre précédant l'apparition de ces phénomènes suggérant le retour à une « architecture » par défaut optimale dans le développement ultérieur d'une force contractile [77]. (Kuo 2001 JAP) D'autres mécanismes sont susceptibles d'intervenir dans cette variation de la force exprimée tels qu'une variation de niveau calcique, une sensibilisation au calcium [116](Dimopoulos 2007 Circ Res) ou une variabilité de l'activité des kinases des chaînes légères de myosine (MLCK). L'implication de ces voies peut être déterminée par des études fonctionnelles ainsi que la participation de voies de signalisation intracytosolique. La plupart des études sus-mentionnées comportent une différence avec le modèle que nous avons développé puisque qu'il s'agit en général de contraction générée par une stimulation électrique externe en condition isométrique de force développée. En ce qui concerne l'activité ATPasique, elle est modifiée parallèlement au recrutement des unités contractiles fonctionnelles comme démontré par Kuo en 2003 par une analyse Triton du contenu cellulaire en activité ATPasique fonction de l'étirement des cellules musculaires lisses. Un doublement de la longueur de la cellule musculaire lisse aboutit à une augmentation de 67% du nombre d'unités contractiles branchées en série. La force développée par contre est inchangée par cette disposition en série [132](Kuo 2003). Enfin, l'hypothèse d'une élévation du nombre de fibre par synthèse est évoquée par Kuo par filamentogenèse. Le nombre de filaments de myosine contenu dans une fibre musculaire lisse est finalement régulé par la longueur de celle-ci. Cette plasticité est importante en physiopathologie puisqu'il s'agit de s'adapter aux conditions de l'arbre respiratoire (modification de la fréquence ventilatoire, de la bronchoconstriction en cas d'hypersensibilité ou d'œdème de la paroi...). Le stretch cyclique est également connu pour provoquer une réponse cellulaire via des mécanismes de mécanotransduction impliquant les récepteurs sensibles au stretch (SAR) mais aussi

l'activation de transcription génomique via l'activation de gènes comme c-fos [121] (Tremblay 1997 J Clin Invest).

De façon similaire, l'élévation et le maintien d'un tonus basal élevé induit par l'arrêt brutal des cycles de contraction-relaxation répétée est une étape critique de la fonction contractile bronchique. L'aspect temporel avec un gain en force progressif sur 10 minutes suivant la fin de l'exposition au stretch laisse supposer une réorganisation du cytosquelette. En effet, des études fonctionnelles montrent l'absence de cible évidente et d'autres études antérieures sur des modèles équivalents retrouvent cette même séquence [33, 104] (Donovan 2012 Plos One - Krishnan 2008 Respir Physiol). La séquence « fluidization » du cytosquelette après une contraction est privilégiée. Celle-ci est notamment provoquée par une modification des interactions entre les filaments actine et myosine qui maintient un faible nombre de ponts activés: "fluid-like" state et qui retrouve un état de contraction à l'arrêt des oscillations exercées sur les cellules musculaires lisses. Il convient de préciser que la stimulation est non supra-physiologique par rapport à d'autres études et que par conséquent elle correspond à une réponse que l'on peut retrouver en physiopathologie. L'impact de la ventilation mécanique peut ainsi être évoqué comme il sera discuté dans le chapitre suivant.

Enfin, l'élévation du tonus observée dans notre étude sur un grand nombre de prélèvements montre un gain significatif spontané d'environ 1 gramme ce qui équivaut à un quasi-doublement de la force développée au repos. Toutefois, l'amplitude de la réponse à une concentration croissante d'acétylcholine ne variait pas dans le même sens. Malgré cela, pour maintenir une réponse constante, les bronches développaient en fin de stimulation une force maximale qui allait au-delà de la force maximale développée préalablement. Ce phénomène qui se développe sur les premières 20 minutes suggère par conséquent une sensibilisation du segment bronchique exposé à un stretch cyclique avec le recrutement d'unités contractiles supplémentaire. Cette réserve de contractilité est un phénomène également décrit récemment au sein de cellules musculaires lisses [98] (Hernandez). Plusieurs hypothèses ont été soulevées comme une réorganisation de l'architecture cellulaire (forme-fonction) avec un allongement de la fibre cellulaire qui tout en conservant une même surface « expose » un plus grand nombre d'unités contractiles disposées en série et renforçant par la même occasion le pouvoir de contraction de la cellule [32](Morioka 2011 JAP).

Une critique méthodologique est relevée par le fait que l'élévation du tonus basal lors du stretch cyclique diminue progressivement l'amplitude de la stimulation. Ainsi au décours du délai nécessaire à l'équilibration du tonus de repos, l'amplitude de la contrainte diminue significativement. Or il semble que le maintien d'un étirement constant quel que soit la force développée soit à l'origine du maintien d'une phase fluide : phénomène « longueur dépendant ». Ainsi l'équilibre signerait davantage la réponse finale stabilisée en contraction de la bronche laquelle serait moindre en conservant l'amplitude tout au long de l'expérimentation. [133](Kanghure JAP 2004)

3.1.5 Phase 2: explication des réponses observée du tonus maximal et du tonus basal

3.1.5.1 éléments de méthodologie

Dans la première approche du stretch unique, les études fonctionnelles montrent l'intervention de voies de signalisation intracellulaire notamment médiée par l'activité des Rho-A kinases et des MAP kinases. D'un autre côté, l'application d'un stretch cyclique aux segments bronchiques cette fois avec une durée d'exposition variable conduit à modifier significativement le tonus basal en deux étapes (précoce et retardée) ainsi que la réponse maximale développée (Emax).

Pour mieux explorer les voies de signalisation impliquées dans cette réponse, une nouvelle étude a été menée associant des études fonctionnelles complémentaires, des dosages de marqueurs de l'inflammation et la recherche par RT-PCR de synthèse protéique (transcrits ARN) pour déterminer les cibles de ces phénomènes au sein du tissu bronchique. Pour se faire, les mêmes conditions que développées précédemment (bronche humaine isolée, séquence de contraction et objectifs de contraction et relaxation similaires) sont appliquées au modèle pendant 60 minutes auxquelles s'ajoutaient différents prétraitements. Le choix de ces prétraitements vise différentes cibles de la communication intercellulaire: entre cellules musculaires lisse et matrice extra-cellulaire par le biais de l'indométhacine (10^{-7} M) (inhibiteur des cyclo-oxygénases), entre épithélium et cellules musculaires lisses par le biais du MK476 (10^{-7} M) qui est un antagoniste spécifique des récepteurs des leucotriènes (Cyst-LT1) et de L-NAME (10^{-3} M) (inhibiteur non spécifique des NO synthase). Cette dernière voie semble privilégiée dans la relaxation musculaire lisse notamment à partir de l'activation du contingent NO synthase épithélial (NOS_e) et l'inhibition de cette voie témoignerait du rôle de l'épithélium et de la communication intercellulaire entre épithélium

et cellule musculaire lisse squelettique. Par ailleurs, une série de mesures a été réalisée en retirant l'épithélium des bronches testées par technique d'abrasion afin de déterminer la part de la réponse revenant directement à l'épithélium ou à la communication intercellulaire (épithélium-cellules musculaires lisses. De plus, la relation entre récepteurs membranaires et cellule musculaire lisse est également explorée par le biais de bloqueurs calciques de type-L comme la nifédipine (10^{-5} M) ou encore par un bloqueur des canaux sodiques voltage-dépendant: tétrodotoxine (10^{-6} M); un bloqueur non spécifique des ions acides et des récepteurs des canaux activés par l'étirement (Stretch activated channel) avec le Gadolinium (Gd^{3+} , 10^{-4} M) défini comme l'antagoniste non spécifique des récepteurs sensibles à l'étirement, principaux effecteurs du mécanisme de mécanotransduction [74](Ito 2006 EJR, 2008 Am J Respir Biol); un inhibiteur des canaux potassiques - tertiapine (10^{-5} M) et enfin un antagoniste de synthèse des récepteurs transitoires à la vanilloïde 1 (TRPV1) et inhibiteur des récepteurs activés au froid mélastraline 8 (TRPM8): capsazepine (10^{-6} M). Ces récepteurs TRPV sont décrits dans la physiologie de la bronchoréactivité générée par mécanotransduction et cette famille de récepteurs appartient à la grande famille des canaux calciques. La séquence fonctionnelle explore également l'information intracellulaire et dans cette optique ont été testés: un bloqueur des protéines kinase C (PKC) - calphostin C (10^{-7} M); un inhibiteur des protéines kinases activé par le mitogène p-38 kDa (MAPK): SB203580 (10^{-7} M); et un inhibiteur sélectif des récepteurs Rho-kinase (ROCK1 and ROCK2): Y27632 (10^{-6} M) [134] (Barchasz E, 1999 Eur J Pharmacol). L'exposition à ces différents traitements se déroulait en deux temps, une première fois sur la bronche isolée au repos et au cours de la réalisation d'une courbe dose-réponse à l'acétylcholine. Une deuxième plus tard après lavage et récupération d'un tonus basal stable 10 minute avant l'exposition de la bronche au stretch cyclique ou à une période contrôle sans stretch.

Par ailleurs afin de confirmer ou infirmer la participation de médiateurs inflammatoires extra-cellulaires excrétés dans la solution de Krebs support des bronches, on a procédé au cours d'une série d'expériences au rinçage du bain d'organe 5 minutes après la fin de la simulation pour évaluer l'amplitude de la réponse avec et sans bain porteur de médiateurs de l'inflammation éventuel tandis que sur une autre série de mesures sans prétraitement, on a procédé à l'analyse de la solution Krebs des bains d'organe. La concentration de prostaglandines (PG), de leucotriènes (LT) et d'interleukines 8 (IL-8) et 10 (IL-10) a été dosée par méthode ELISA en prélevant un échantillon de liquide (500 μ l) 15

minutes après la fin de l'exposition au stretch ou au contrôle. Des kits spécifiques ELISA ont été utilisés conformément aux descriptions dans la littérature pour la mesure d'IL-8, IL-10, LTE4, et PGE2. Enfin, la présence d'une réponse tardive dans l'élévation du tonus basal suivant l'arrêt de la contrainte cyclique a conduit à la recherche d'une réponse transcriptionnelle avec notamment la production d'ARN messager. Une recherche par RT-PCR après broyage des fragments de bronches par agitateur à billes de titane et purification de la solution d'ARN a donc été conduite pour identifier une réponse génomique impliquant notamment la voie des métalloprotéases (présents au sein de la matrice extracellulaire), la voie des MAP et WNT kinases dont l'implication était supposée au regard de certains articles et de notre premier travail. Des marqueurs d'inflammation ont aussi été recherchés. Au final les mesures étaient effectuées par technique de Reverse transcriptase (RT-qPCR Taqman) sur plaque de Taqman en deux étapes. Les sondes de TaqMan sont propres à l'amplification d'une région ADN spécifique et à la fin la polymérase finit par relarguer la fluorescence révélant ainsi la trace spécifique de l'ADN. L'intensité de fluorescence détectée en temps réel est proportionnelle à la quantité de fluorophore libérée et reflète la quantité d'ADN présent dans la PCR. L'expression des transcripts des gènes précoces d'intérêt suivants ont été analysés en détection : WNT2, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT7B, FZD7, MAPK1, MAPK3, MAP3K14, MAPK9, MAPK14, COL4A1, ELN, LAMC1, MMP9, MYC, CXCL8, ADRB2, CHRNA7, and CACNA1S) [112] (Faisy, Crit Care 2011) La standardisation de la technique reposait sur l'extraction et l'amplification simultanée d'ARN messager intact de trois gènes de référence (hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT1), glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -glucuronidase (GUSB)).

3.1.5.2 Articles 3 (soumis)

Cyclic stretch limiting supraphysiological strain reduces proinflammatory signaling pathways in human bronchi

Morgan Le Guen^{1,2}, Stanislas Grassin-Delye¹, Emmanuel Naline¹, Amparo Buenastado¹, Marion Brollo¹, Philippe Devillier¹, Christophe Faisy^{1,3}

¹Laboratory of Respiratory Pharmacology – UPRES EA220, Université Versailles – Saint-Quentin, Suresnes, France; ²Department of Anesthesiology, Hôpital Foch, Université Versailles – Saint-Quentin, Suresnes, France; ³Medical Intensive Care Unit, Hôpital Européen Georges Pompidou, Université Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Running Head: Cyclic Stretching of Human Isolated Bronchi

Corresponding author: Pr Christophe Faisy, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France. Email: christophe.faisy@egp.aphp.fr; Phone: +33(1)56093201, fax: +33(1)56093202.

Key words: airway stretch, cyclic stretch, airway hyperresponsiveness, mechanical ventilation

Abstract word count: 250

Text word count: 4348

Abstract

116

Purpose: The effect of cyclic stretch imposed on bronchi during mechanical ventilation is not well known. The aim of this study was to investigate the functional and genomic response of human bronchi to a repetitive mechanical strain based on the intrinsic contractile characteristics of bronchi.

Material and methods: Bronchi were removed from 85 thoracic surgery patients. After preparation and equilibration in an organ-bath, bronchial rings were cyclically stretched for 60 min using a force that corresponded to 80% of their maximal contractile response to 3×10^{-3} M acetylcholine. The consequences of cyclic stretch were examined by using functional experiments, analysis of organ-bath fluid, and RNA isolation from tissue samples.

Results: The bronchi immediately developed an increase in basal tone followed by a sustained contraction and hyperresponsiveness to acetylcholine after cessation of stretch (all $p < 0.05$ vs. paired controls). Drugs inhibiting inflammatory mediators or pathways involved in the stress-induced mechanotransduction were inefficient to reduce the effects of cyclic stretch. Only epithelium removal, inhibition of Rho-kinase, and blockage of inward-rectifier K^+ or L-type Ca^{2+} channels significantly decreased the stretch-induced effects, suggesting a myogenic response to mechanical stress. Cyclic stretch up-regulated the early mRNA expression of *IL-8* and genes (*COL4A1*, *MMP9*) implied in actin filaments modulation and in smooth muscle relaxation but did not change the production of pro-inflammatory mediators in organ-bath.

Conclusion: Cyclic stretch limiting supraphysiological strain reduces proinflammatory signaling pathways activated by mechanotransduction in human bronchi, emphasizing the relevance of a protective strategy of limitation of airway inflation-deflation during mechanical ventilation.

Introduction

117

Basal tone and responsiveness are the main functional characteristics of the bronchial compartment of the lung allowing an adaptive response to adjust intra-pulmonary ventilation and perfusion pattern to the level of oxygen consumption, work of breathing or alveolar pressure [1]. The common adaptive response may be modulated by external stimulation or pharmacological agents but also by mechanical stress such as mechanical ventilation. If airway smooth muscle (ASM) cell is continuously exposed to mechanical strains as the lung cyclically expands and deflates, stretching is now known to modulate the ASM responsiveness [2]. Nevertheless, positive pressure ventilation induced by mechanical ventilation as a repetitive standardized strain may influence or provoke specific response related to changes in the pressure [3, 4]. Therefore, it has been shown that mechanical stress imposed during mechanical ventilation induces airway cell activation in the alveolar compartment of the lung [5, 6]. The effects of mechanical ventilation as defined by cyclic stretch on pulmonary cells have been mainly modeled in vitro by using cultured cells [7, 8], highlighting the stimulation of intracellular signaling pathways, channels, carriers or pumps, and the production of inflammatory mediators provoked by stretch [8, 9, 10]. Moreover, cyclic stretch of alveolar cells provokes plasma membrane stress failure with breaks in the membrane and lactic acidosis in the cell medium [11, 12].

The consequences of cyclic stretch, whether beneficial or harmful, have been extensively investigated in isolated alveolar or ASM cells [8, 10, 11, 13] but the effect of cyclic stretch on intact fresh human bronchi is not well known. Some encouraging data have shown that stretching human bronchi for only 5 min using a continuous force that corresponded to an inflation pressure of more 30 cm H₂O altered the crosstalk between airway cells by increasing epithelial leukotriene release via nitric oxide synthase (NOS) activation and by inducing a myogenic response dependent on Rho-kinase- and WNT-signaling pathways [14]. However, the impact of prolonged cyclic stretch on the human bronchial compartment remains largely unexplored.

The aim of this study was further to investigate the functional and genomic response of intact human bronchi to a repetitive mechanical strain based on their intrinsic contractile characteristics by using an experimental model of imposed cyclic stretch.

Material and methods

The study was approved by the local Ethics Committee (Comité de Protection des Personnes, Ile de France VIII, Boulogne-Billancourt, France). Before scheduled surgery for lung cancer, patients gave written informed consent to the collection and the use of bronchial segments for experimental purposes.

Bronchus preparation

All bronchoactive medications were suspended the evening before the surgical procedure. Bronchial segments macroscopically free of cartilaginous tissue were excised as far as possible from the malignant lesion (the absence of tumoral infiltration was retrospectively established in all bronchi) and were immediately immersed and washed thoroughly in oxygenated Krebs-Henseleit solution (NaCl 119 mM, KCl 4.7 mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 29 mM, and glucose 11.7 mM) to remove any intraoperative drug residue. Bronchial rings of similar inner diameter (1–2 mm) and free of cartilaginous tissue were prepared by removal of adhering lung parenchyma and connective tissue and then were washed again in oxygenated Krebs-Henseleit solution. The bronchial rings were suspended horizontally on hooks in an organ-bath containing 5 ml of Krebs-Henseleit solution, gassed with 95% O₂, 5% CO₂ and maintained at 37°C. Experiments were run in parallel (unstretched control and stretched groups) with and without pretreatment. Bronchi were suspended with an initial tension of 1.5 g [15] and were equilibrated for at least 60 min with changes of fresh Krebs-Henseleit solution every 10 min during the first 30 min of the equilibration period. Tension was applied through a force-length transducer and measured isometrically with a strain gauge (UF1 Piodem, Canterbury, UK) connected to an amplifier (EMKA Technologies, Paris, France). Data were acquired, processed and analyzed with a computerized system running IOX (v2.4.2) and Datanalyst (v2.1.0) softwares (EMKA

technologies). When required, the epithelium was removed before suspension in the organ-bath as previously described [16].

Cyclic stretch

After equilibration in organ-bath, viability of bronchi was tested with 3×10^{-3} M acetylcholine (ACh). After a new washing and resting period of 60 min, the initial resting basal tone of bronchial rings was determined and then a first cumulative dose-response curve to ACh (10^{-8} to 3×10^{-3} M) was performed to define the intrinsic contractile characteristics of each bronchial ring based on the potency and efficacy of ACh. The measured values of the resting basal tone and of the maximal tension developed in response to 3×10^{-3} M ACh were used thereafter as setting parameters to determine the minimal and maximal strength imposed on human bronchi during cyclic stretch. The baseline tension was restored by washing the rings with Krebs-Henseleit solution and, after a third resting period, the imposition or non-imposition of 60-min cyclic stretch was randomly determined for each pair of bronchi, limiting the selection bias. We used an automatized load imposing device to obtain a controlled and rapid cyclic variation in the strain applied on the human bronchi (EMKA technologies). This device applied a force to each surface of the ring by tensioning coaxially the ASM. We chose a stretch duration of 60 min as optimal since stretch-induced effect remained stable after 20-40 min of cyclic stretch in a preliminary study (not shown). Cyclic stretching consisted in the repetition of the following 1-min cycle: 1) a first 15-sec sequence of stretch targeting a tension corresponding to 80% of the maximal contraction to 3×10^{-3} M ACh; 2) a shortening period during 15 sec targeting the initial resting basal tone; 3) a 30-sec recovery period without applying force. One-min cycle (1/4 stretching-1/4 shortening-1/2 recovery) was proportionate to the settings of volume-assisted mechanical ventilation in clinical practice. In the paired unstretched control group, no strain was imposed on bronchi during this time. Thereafter, a 15-min period without strain was completed before the achievement of a second cumulative dose-response curve to ACh (10^{-8} to 3×10^{-3} M). After experiments, rings that had been patted dry were weighed.

Functional study

To investigate the different signaling pathways potentially implicated in the stretch-induced response of human bronchi, experiments were run in the absence or presence of pretreatment added to the organ-bath immediately before the first cumulative dose-response curve to ACh and again before the stretching period: 1) a cyclooxygenase (COX) inhibitor (indomethacin, 10^{-6} M); 2) a leukotriene Cyst-LT₁ receptor antagonist (MK476, 10^{-6} M); 3) a non-specific NOS inhibitor at high concentration (L-nitroarginine methyl ester (L-NAME), 10^{-3} M); 4) a calcium blocker of L-type calcium channel (nicardipine, 10^{-5} M); 5) a natural blocker of voltage-sensitive Na⁺ channels inhibiting action potentials and nerve conduction (tetrodotoxin, 10^{-6} M); 6) a nonspecific blocker of acid-sensing ion and stretch-activated channels (gadolinium (Gd³⁺), 10^{-4} M); 7) an inhibitor of the inward-rectifier K⁺ channel and the calcium activated large conductance potassium channels (tertiapine, 10^{-5} M); 8) a synthetic antagonist of the vanilloid transient receptor potential 1 (TRPV1) receptor and inhibitor of the cold-activated transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) channel (capsazepine, 10^{-6} M); 9) a protein kinase C (PKC) blocker (calphostin C, 10^{-7} M); 10) an inhibitor of the 38-kDa mitogen-activated protein kinase (MAPK) (SB203580, 10^{-7} M); 11) a selective Rho-kinase (ROCK1 and ROCK2) inhibitor (Y27632, 10^{-6} M). All drug concentrations used in the study were chosen according to previous literature data.

Drugs

ACh, indomethacin, L-NAME, tetrodotoxin, Gd³⁺, nicardipine, capsazepine, and calphostine C were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), tertiapine from Bachem (Voisin le Bretonneux, France), SB-203580 from Calbiochem (San Diego, CA, USA). MK476 came from Merck Sharp & Chibret (Paris, France). Y27632 was purchased from Alexis Biochemicals (San Diego, CA, USA). All drugs except indomethacin, nicardipine and SB-203580 were dissolved in distilled water; indomethacin was dissolved in pure ethanol and then diluted in Krebs-Henseleit solution; nicardipine and SB-203580 was dissolved in pure

ethanol and DMSO and then diluted in Krebs-Henseleit solution. The final amount of ethanol and DMSO did not alter ACh reactivity [17].

Analysis of organ-bath fluid

The production of mediators involved in the regulation of bronchial basal tone (leukotriene E_4 (LTE_4) and prostaglandin E_2 (PGE_2)) or interacting with the stretch-induced mechanotransduction (interleukin 8 (IL-8) and tumor necrosis- α ($TNF\alpha$)) or having an anti-inflammatory effect (interleukine-10 (IL-10)) were investigated in organ-bath. Concentrations of LTE_4 , PGE_2 , IL-8, IL-10, and $TNF\alpha$ in the organ-bath were assessed immediately before and after cyclic stretch by sampling 250 μ l of organ bath fluid from stretched bronchi and their paired controls. Individual samples were assayed using specific ELISA kits for the stable excretory LTE_4 , PGE_2 , and $TNF\alpha$ (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA), IL-8 and IL-10 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). The limits of detection were 25 pg/ml for LTE_4 , 36 pg/ml for PGE_2 , 7.5 pg/ml for IL-8, and 3.9 pg/ml for IL-10 and $TNF\alpha$. For each assay, all samples were analyzed on the same day in a blinded fashion.

RNA isolation and RT-PCR array

To isolate RNA and explore genomic response to cyclic stretch, paired bronchial (control and stretched) rings were immediately immersed in RNAlater (Sigma, St. Louis, MO, USA) after experiment. Bronchi were then stored at -80°C until further use. The reverse transcriptase – quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR TaqMan) studies were conducted on bronchial segments crushed and homogenized in TRIzol[®] reagent immediately after dissection, using a ball mill TissueLyser LT (Qiagen, Courtaboeuf, France). Total RNAs were extracted from homogenates of human bronchi by a method derived from that of Chomczynski and Sacchi [18] using TRIzol[®]. After crushing the preparation in a total RNase free environment, the amount of RNA extracted was estimated by spectrophotometry at 260 nm (Spectrophotometer Biowave DNA; Biochrom, Cambridge, UK), and its quality assessed by a microfluidic electrophoresis system (RNA Standard Sensitivity kits for Experion[®], BioRad, Marnes la Coquette, France). After a DNase step (DNase I, Life Technologies), 1 μ g

of total RNA was subjected to reverse transcription (SuperScript® III First-Strand SuperMix kit, Life Technologies). The resulting cDNA was then used for quantitative real-time PCR experiments with TaqMan® chemistry (Life Technologies). The amplification was carried out using 20 ng cDNA (Gene Expression Master Mix, Life Technologies) in a StepOnePlus thermocycler (Life Technologies). The conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of annealing/extension (95°C for 15 sec, then 60°C for 1 min). Fluorescence was measured at each cycle and the threshold cycle (C_t) of the real-time PCR was defined as the point at which a fluorescence signal corresponding to the amplification of a PCR product was detectable. The reaction volume was set at 10 μ l. The expression of transcripts of the early genes of interest (*WNT2*, *WNT3A*, *WNT4*, *WNT5A*, *WNT7B*, *FZD7*, *MAPK1*, *MAPK3*, *MAP3K14*, *MAPK9*, *MAPK14*, *CXCL8/IL8*, *COL4A1*, *ELN*, *MMP9*, *LAMC1*, *MYC*, and *CACNA1S*) [14] has been analyzed in the bronchi using a specific TaqMan® Array based on predesigned reagents (Assay-on Demand, Life Technologies). To ensure the extraction of intact cellular mRNA and standardize the quantitative data, three reference genes (hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT1), glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and β -glucuronidase (GUSB) were amplified simultaneously.

Expression of the results and statistical analyses

Data are presented as means $\pm$ SEM (where n = number of subjects). Basal tone and contractile responses are expressed in tension (g). ACh efficacy (E_{max}) represents the maximal contraction induced by 3×10^{-3} M ACh. ACh potency ($-\log EC_{50}$) represents the negative log of the ACh concentration achieving 50% of the maximal effect. The quantitative data obtained from RT-qPCR experiments are expressed as relative expression ($2^{-\Delta C_t}$) [19], where ΔC_t is the difference between the target gene C_t and the mean C_t of reference genes. Results of ELISA tests are expressed as the means of duplicate samples. Stretch-induced production of LTE_4 , PGE_2 , IL-8, IL-10 or TNF α is expressed in pg/mg of bronchial tissue and corresponds to the difference of the amount (concentration $\times$ volume) of mediator excreted

into the organ-bath immediately before and after cyclic stretch. The results were analyzed using Student's *t* test for paired data or by one-way repeated measures ANOVA when required. Because inadequate statistical power cannot rule out related to small samples, the standardized effect size *d* for the difference between means was calculated to determine whether the observed effect of each pretreatment was small ($|d| \geq 0.20$), medium ($|d| \geq 0.50$) or large ($|d| \geq 0.80$) according to the Cohen's conventions [20]. The 95% confidence interval (CI) for *d* was calculated to determine the uncertainty around the real effect of each pretreatment. A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant. Data analysis, and statistical tests were achieved using Statistica (99 Edition, StatSoft, Tulsa, OK, USA).

Results

Sample

Eighty-five tissue samples were each obtained from 85 different patients (53/32 men/women, 56 ± 10 years of age; all were ex-smokers). Mean patted-dry weight of stretched bronchi was comparable with that of their paired controls (25 ± 7 mg vs. 27 ± 8 mg, $p = 0.11$, $n = 85$).

Effect of cyclic stretch on bronchial basal tone and responsiveness

Compared to paired controls, 60-min cyclic stretch significantly increased the human bronchial basal tone in two steps: an early stretch-induced effect at the outset of stretching and a delayed post-stretch effect that corresponded to a spontaneous and sustained increase in basal tone 10 min after the cessation of cyclic stretch (**Figures 1 and 2**). Cyclic stretch strongly increased the efficacy and potency of ACh in human bronchi when tension was expressed in g (**Figure 3A**). The stretch-induced hyperresponsiveness persisted when tension was expressed in g/basal tone to account the effect of stretch on basal tone and its effect was predominant on ACh potency (**Figure 3B**).

Effect of epithelial removal on stretch-induced responses

Epithelium removal reduced, but not significantly, the early stretch-induced rise in basal tone (**Table 1**) while it significantly decreased the delayed rise in bronchial basal tone after the cessation of cyclic stretch (**Table 2**). Moreover, the ablation of epithelium tended to increase

the bronchial responsiveness to ACh after cyclic stretch but the standardized size effect and its 95% CI were non-discriminatory (**Tables 3-4**).

Effects of blockage of the epithelial regulation of smooth muscle contraction on stretch-induced responses

Blockage of leukotriene Cyst-LT₁ receptors by MK476 did not have a discriminatory effect on the early and delayed rises in bronchial basal tone induced by cyclic stretch (**Tables 1-2**). In contrast, NOS inhibition by 10⁻³ M L-NAME increased the early response in basal tone while its effect on the delayed increase in basal tone and on the responsiveness to ACh remained non-discriminatory as shown by the standardized size effects and their 95% CI (**Tables 1-4**). Inhibition of COX by indomethacin had no significant impact on the stretch-induced responses in basal tone and responsiveness (**Tables 1-4**).

Effects of drugs decreasing the intracellular Ca²⁺ concentration on stretch-induced responses

Early and delayed rises in bronchial basal tone were not significantly prevented by pretreatment with nifedipine, tetrodotoxine, Gd³⁺ or capsaicin (**Tables 1-2**). In contrast, blocking the inward-rectifier K⁺ channel and the calcium-activated large conductance K⁺ channels by 10⁻⁵ M tetraethylammonium significantly decreased the early stretch-induced increase in bronchial basal tone (**Table 1**). Moreover, blockage of L-type calcium channel by 10⁻⁵ M nifedipine decreased powerfully the effect of cyclic stretch on potency of ACh whereas blockage of stretch-activated channels by Gd³⁺ had the opposite effect (**Tables 3-4**).

Effects of inhibition of PKC, MAPK or Rho-kinase signaling intracellular pathways on stretch-induced responses

Calphostine C and SB203580 had no effect on the stretch-induced rises in bronchial basal tone and responsiveness to ACh (**Tables 1-4**). Inhibition of Rho-kinases by 10⁻⁷ Y27632 significantly decreased the early rise in bronchial basal tone but did not alter the delayed spontaneous contraction or the responsiveness to ACh after stretching (**Tables 1-4**).

Transcript expression and ELISA analysis of organ-bath fluid

mRNA levels of the three reference genes (GAPDH, HPRT1, and GUSB) were unaffected by stretching 9 human bronchi for 60 min (**Table 5**). Compared with paired controls, stretch slightly up-regulated mRNA expression of early genes implicated in the WNT- (*WNT2*, *WNT3A*, *WNT4*, *WNT5A*, *WNT7B* and *FZD7*) or MAPK- (*MAPK1*, *MAPK9*,) signaling pathways, extracellular matrix modulation (*ELN*, *LAMC1*), stress or inflammation (*MAP3K14*, *MAPK14*) and encoding of type-L calcium channels (*CACNA1S*), cholinergic receptors (*CHRNA7*) or β_2 -adrenergic receptor (*ADRB2*). However, only mRNA expression of IL-8 was significantly increased by stretch while mRNA expression of early genes implicated in basement membrane proteins and actin filament modulation (*COL4A1* and *MMP9*) was three-fold up-regulated by stretching (**Table 5**). Moreover, stretching of the same 9 human bronchi for 60 min did not change the LTE_4 , PGE_2 , IL-8, IL-10 and $\text{TNF}\alpha$ production in organ bath (**Figure 4**).

Discussion

The present study shows that cyclic stretch imposed on isolated human bronchi markedly increased their basal tone in two distinct steps: an immediate phase related-to stretch followed by a delayed spontaneous and sustained bronchial contraction after the cessation of cyclic stretch. Our results show that the stretch-induced rise in basal tone is powerful and seems to be mainly mediated by membrane depolarization phenomena and stimulation of the Rho-kinase pathways, on the one hand, and, on the other, by the perturbation of the epithelial regulation of ASM. Herein, drugs inhibiting inflammatory mediators or pathways involved in the stretch-induced mechanotransduction had no effect on the rise in basal tone and responsiveness. These results suggest that limiting supraphysiological strain during cyclic stretch can reduce the cascade of signaling events that transduce the external forces from the extracellular matrix to the actin cytoskeleton via the transmembrane integrins, resulting in the production of contractile mediators, cytokines, growth factors and specific stretch-activated channels, coupled with early gene activation [14, 21-24]. The absence of strong expression of immediate early gene activation, except *IL-8*, and the low production of

contractile epithelial mediators also support this assumption. In our experimental model, the stretch-induced sensitization to ACh involved the intracellular Ca^{2+} concentration via the voltage dependent L-type Ca^{2+} channels but not the stretch-activated channels since nicardipine but not Gd^{3+} diminished the increase in ACh potency provoked by cyclic stretch. Overall, our results indicate that the consequences of a low-intensity imposed stretching-shortening are mainly triggered by the sensitization of ASM contractile filaments and probably remain independent of up-regulation of muscarinic receptors. An alternative explanation might be that cyclic stretch directly alters the physical properties of ASM at any level of imposed force.

Effect of cyclic stretch on airway basal tone – Bronchoconstriction or failure in relaxation?

The intrinsic in-vivo tone of human airways is modulated either by nervous stimulation or by a balance between contractile mediators (leukotriene and histamine) and bronchodilating prostanoids (PGE_2 and nitric oxide) [25]. In a previous model of static mechanical stretch (5 min, using a force $2.5 \times$ basal tone), the immediate rise in basal tone following stretch of human bronchi was partially caused by increased epithelial LTE_4 production and activation of the Ca^{2+} -independent inducible NOS-2 [14]. Herein, cyclic stretch induces a spontaneous increase in bronchial basal tone despite a less important developed force. But neither contractile mediators (leukotrienes, prostanoids, and inducible NOS-2) nor early genes interacting with mechanotransduction, except *IL-8*, appear to be involved in the stretch-induced effects. The discrepancy between our results and those from our precedent model of static mechanical stretch can be due to differences in force created by the stretch-system or differences in stretch duration. In the present model, our results argue in favor of the involvement of airway epithelial cells and pathways with short activation times such as cellular Ca^{2+} influx via membrane depolarization and Rho-kinases activation since epithelium removal, teritapin and Y27632 decreased the rise in basal tone. The involvement of stretch-activated receptors, which are present all along the bronchial tree and can increase airway basal tone through C-fiber nerves stimulation in case of repetitive strain [26] seems unlikely in our study because pretreatment with tetrodotoxine, an inhibitor of nerve conduction, did

not change the stretch-induced rise in basal tone. Similarly, the implication of the stretch-activated channels or transient receptor potential ion channels, which are respectively antagonized by Gd^{3+} and capsazepine, seem improbable. Consistent with our previous model of static stretch, the present study confirms the involvement of Rho-kinases in the effects of cyclic stretch on bronchial tone. However, Rho-kinases does not seem activated by early genes interacting with Wnt-signaling pathways, as our previous model of supraphysiological stretch suggested. These observations are of importance because they indicate that limiting stretch at a low stress level corresponding to the physiological contractile characteristics of bronchi may reduce harmful consequences, and it confirms previous experimental and in-vivo observations that recommended a continuous measure of airway pressure plateau during mechanical ventilation [27]. Moreover, it has been shown that ceasing ventilation with tidal volumes resulted in further bronchoconstriction within 1 min whatever the presence of a deep inspiration [28], suggesting that the further airway constriction was only due to the removal or the drop in tidal oscillations through a twofold effect, i.e., a reduced mean load on the ASM and a loss of oscillatory load on the ASM. As a consequence, maintaining consistent stress on ASM is really important to prevent constriction. Finally, the ASM contraction system might be the key end-effector of the effects of cyclic stretch on bronchial tone. Indeed, actin-myosin complex is one target since basal tone depends on the locked actin-myosin bridges related to the electromechanical coupling [29]. Inflation-deflation provoked by mechanical forces, such as cyclic stretch or those occurring during breathing or deep inspiration, exert multiple effects on the contractile characteristics of ASM [30]. Cyclic stretch may modify the initial equilibrium by enhancing polymerization of actin through conformational changes, intracytosolic calcium transfer and activation of Rho-kinase pathway [31]. The sudden increase in basal tone occurring after stretch withdrawal may also involve a failure in bronchial relaxation or ASM stiffness. Indeed, the delayed post-stretch effect was abolished by epithelium removal and potentiated by the inhibition of NOS, suggesting a perturbation of the epithelial regulation of ASM. However, cytoskeleton rearrangements during cyclic stretch period and stabilization in a new steady-

state could explain the sustained ASM contraction [32]. As a response to stretch the cytoskeleton can stiffen, increasing traction forces [27]. This change in physical properties of ASM in response to chronic strain has been also suggested in asthma where the contracted ASM cells fail to fluidize and remain frozen in a stiff, solid-like glassy phase [33, 28].

Effect of cyclic stretch on airway responsiveness

We found that cyclic stretch increased the efficacy and potency of ACh. This effect of cyclic stretch could be mediated by Ca^{2+} sensitization or recruitment of contractile units within ASM. Nonetheless, we also showed that drugs decreasing the intracellular Ca^{2+} concentration or inhibition of intracellular pathways (MAPK, PKC, and Rho-kinase) involved in Ca^{2+} sensitization did not prevent the hyperresponsiveness provoked by cyclic stretch, indicating a myogenic response to stretch rather than Ca^{2+} sensitization. In this way, it is known that force oscillations cause contractile apparatus rearrangements leading to regeneration of a force exceeding pre-stretch level [5, 34, 35]. In addition, ASM exhibits a considerable mechanical plasticity that allows optimal force generation within a large range of length changes. For example mechanical perturbations produce a reversible reduction of myosin filaments when compared to ASM adapted to a given length, thus suggesting a rapid myosin assembly and disassembly [36]. The plasticity of ASM and its structural adaptation to mechanical stress may further provide an alternative regulation of bronchial contractility in the dynamic context of breathing with reinforcement of ASM.

Effect of cyclic stretch on early gene mRNA expression

It has been shown that cyclic stretch during high tidal volume mechanical ventilation induced immediate early genes activation, especially transcription factors, stress proteins, and inflammatory mediators [37, 38]. We showed herein only 60 min cyclic stretch significantly increased *IL-8* mRNA expression and up-regulated more than three-fold the mRNA expression of early genes implied in basement membrane proteins and actin filament modulation. Pertinently, *COL4A1* encodes the major type IV alpha collagen chain of basement membranes, a ligand for the transmembrane integrines that transduce the external forces from the extracellular matrix to the actin cytoskeleton. In addition, *MMP9* is

up-regulated by *IL-8* and encodes an enzyme which degrades type IV and V collagens, a major component of the airway sub-epithelial basement membrane and promotes relaxation of smooth muscle [39]. In our model of cyclic stretch limiting supraphysiological strain, mRNA expression of early genes involved in Wnt or MAP-kinase pathways, stress or inflammation, and encoding of cholinergic receptors or type-L Ca^{2+} channels was not markedly up-regulated, contrasting with results from study based on ventilation-induced lung injury models [14, 38]. Finally, our genomic analysis highlights the relevance of a protective strategy of limitation of airway inflation to reduce consequences in the bronchial compartment of the airways during mechanical ventilation.

Strength and limits of the study

Major specificity of this study results from the use of a strain based on the intrinsic contractile characteristics of each human bronchus. Stretching human bronchi with excessive force would provide other results, stimulating probably more intracellular signaling pathways as the consequences of mechanotransduction induced by integrines activation. A second strength of this study was the use of freshly human isolated bronchi. This is of real importance due to interspecies differences in airway basal tone modulation and control of airway responsiveness [24]. Nevertheless, bronchi from patients undergoing thoracic surgery may have been stretched during the surgical procedure, limiting our results. Another limitation of this study is the short-time period between stretch and fixation for mRNA analysis restraining the investigation to very early genes up- or down-regulated by cyclic stretch. At last, as other isolated organ models, experiments were performed in non-aerated conditions and in absence of surfactant, which could inhibit bronchial narrowing [40].

Conclusion

Our results indicate that stretching cyclically human bronchi using a force that corresponded to a submaximal contraction increases airway basal tone and responsiveness mainly via a myogenic response mediated by the adaptive changes in physical state of ASM. Moreover, our experimental model of cyclic stretch limiting supraphysiological strain imposed on human

bronchi emphasizes the relevance of a protective strategy of limitation of airway inflation-deflation to reduce harmful consequences of mechanotransduction in the bronchial compartment of the lung during mechanical ventilation.

References

131

1. Townley RG, and Horiba M. Airway hyperresponsiveness: a story of mice and men and cytokines. *Clin Rev Allergy Immunol* 24: 85-110, 2003.
2. Maksym GN, Deng L, Fairbank NJ, Lall CA, and Connolly SC. Beneficial and harmful effects of oscillatory mechanical strain on airway smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 83: 913-922, 2005.
3. McFawn PK, and Mitchell HW. Effect of transmural pressure on preloads and collapse of immature bronchi. *Eur Respir J* 10: 322-329, 1997.
4. Shen X, Wu MF, Tepper RS, and Gunst SJ. Mechanisms for the mechanical response of airway smooth muscle to length oscillation. *J Appl Physiol* 83: 731-738, 1997.
5. Waters CM, Sporn PH, Liu M, and Fredberg JJ. Cellular biomechanics in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L503-509, 2002.
6. Ware LB, and Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342: 1334-1349, 2000.
7. Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, and Hubmayr RD. Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 277: L167-173, 1999.
8. Pugin J, Dunn I, Jolliet P, Tassaux D, Magnenat JL, Nicod LP, and Chevrolet JC. Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *Am J Physiol* 275: L1040-1050, 1998.
9. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, and Tracey KJ. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405: 458-462, 2000.
10. Pugin J. Molecular mechanisms of lung cell activation induced by cyclic stretch. *Crit Care Med* 31: S200-206, 2003.
11. Vlahakis NE, and Hubmayr RD. Cellular stress failure in ventilator-injured lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 1328-1342, 2005.

12. Pugin J, Dunn-Siegrist I, Dufour J, Tissieres P, Charles PE, Comte R. Cyclic stretch of human lung cells induces an acidification and promotes bacterial growth. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38: 362–370, 2008.
13. Noble PB, Hernandez JM, Mitchell HW, and Janssen LJ. Deep inspiration and airway physiology: human, canine, porcine, or bovine? *J Appl Physiol* 109: 938-939; author reply 940-931, 2010.
14. Faisy C, Pinto FM, Le Guen M, Naline E, Grassin Delyle S, Sage E, Candenas ML, and Devillier P. Airway response to acute mechanical stress in a human bronchial model of stretch. *Crit Care* 15: R208, 2011.
15. Watson N, Magnussen H, and Rabe KF. The relevance of resting tension to responsiveness and inherent tone of human bronchial smooth muscle. *Br J Pharmacol* 123: 694-700, 1998.
16. Candenas ML, Naline E, Sarria B, and Advenier C. Effect of epithelium removal and of enkephalin inhibition on the bronchoconstrictor response to three endothelins of the human isolated bronchus. *Eur J Pharmacol* 210: 291-297, 1992.
17. Barchasz E, Naline E, Molimard M, Moreau J, Georges O, Emonds-Alt X, and Advenier C. Interleukin-1 β -induced hyperresponsiveness to [Sar⁹,Met(O₂)¹¹]substance P in isolated human bronchi. *Eur J Pharmacol* 379: 87-95, 1999.
18. Chomczynski P, and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987.
19. Livak KJ, and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25: 402-408, 2001.
20. Cohen J. A power primer. *Psychol Bull* 112: 155–159, 1992.
21. W, and Gunst SJ. Interactions of airway smooth muscle cells with their tissue matrix: implications for contraction. *Proc Am Thorac Soc* 5: 32-39, 2008.
22. Kanefsky J, Lenburg M, and Hai CM. Cholinergic receptor and cyclic stretch-mediated inflammatory gene expression in intact ASM. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 417-425, 2006.

23. Chapman KE, Sinclair SE, Zhuang D, Hassid A, Desai LP, and Waters CM. Cyclic mechanical strain increases reactive oxygen species production in pulmonary epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L834-841, 2005.
24. Ito S, Kume H, Oguma T, Ito Y, Kondo M, Shimokata K, Suki B, and Naruse K. Roles of stretch-activated cation channel and Rho-kinase in the spontaneous contraction of airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 552: 135-142, 2006.
25. Schmidt D, and Rabe KF. The role of leukotrienes in the regulation of tone and responsiveness in isolated human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 161: S62-67, 2000.
26. Ho CY, Gu Q, Lin YS, and Lee LY. Sensitivity of vagal afferent endings to chemical irritants in the rat lung. *Respir Physiol* 127: 113-124, 2001.
27. LaPrad AS, Szabo TL, Suki B, and Lutchen KR. Tidal stretches do not modulate responsiveness of intact airways in vitro. *J Appl Physiol* 109: 295-304, 2010.
28. LaPrad AS, West AR, Noble PB, Lutchen KR, Mitchell HW. Maintenance of airway caliber in isolated airways by deep inspiration and tidal strains. *J Appl Physiol* 105:479-85, 2008.
29. Bershadsky AD, Balaban NQ, and Geiger B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 677-695, 2003.
30. Wang L, Pare PD, and Seow CY. Effects of length oscillation on the subsequent force development in swine tracheal smooth muscle. *J Appl Physiol* 88: 2246-2250, 2000.
31. Tepper RS, Ramchandani R, Argay E, Zhang L, Xue Z, Liu Y, and Gunst SJ. Chronic strain alters the passive and contractile properties of rabbit airways. *J Appl Physiol* 98: 1949-1954, 2005.
32. Noble PB, Jones RL, Needi ET, Cairncross A, Mitchell HW, James AL, and McFawn PK. Responsiveness of the human airway in vitro during deep inspiration and tidal oscillation. *J Appl Physiol* 110: 1510-1518, 2011.
33. Bosse Y, Chin LY, Pare PD, and Seow CY. Adaptation of airway smooth muscle to basal tone: relevance to airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40: 13-18, 2009.

34. Hernandez JM, Cox G, and Janssen LJ. Involvement of the neurokinin-2 receptor in airway smooth muscle stretch-activated contractions assessed in perfused intact bovine bronchial segments. *J Pharmacol Exp Ther* 327: 503-510, 2008.
35. Noble PB, Ansell TK, James AL, McFawn PK, and Mitchell HW. Airway Smooth Muscle Dynamics and Hyperresponsiveness: In and outside the Clinic. *J Allergy (Cairo)* 2012: 157047, 2012.
36. Kuo KH, Wang L, Pare PD, Ford LE, and Seow CY. Myosin thick filament lability induced by mechanical strain in airway smooth muscle. *J Appl Physiol (1985)* 90: 1811-1816, 2001.
37. Copland IB, Kavanagh BP, Engelberts D, McKerlie C, Belik J, and Post M. Early changes in lung gene expression due to high tidal volume. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 1051-1059, 2003.
38. Contreras M, Ansari B, Curley G, Higgins BD, Hassett P, O'Toole D, and Laffey JG. Hypercapnic acidosis attenuates ventilation-induced lung injury by a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Crit Care Med* 40: 2622-2630, 2012.
39. Yin Z, Sada AA, Reslan OM, Narula N, and Khalil RA. Increased MMPs expression and decreased contraction in the rat myometrium during pregnancy and in response to prolonged stretch and sex hormones. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303: E55-70, 2012.
40. Siddiqui [S](#), [Tsuchiya K](#), [Risse PA](#), [Bullimore SR](#), [Benedetti A](#), [Martin JG](#). Site of allergic airway narrowing and the influence of exogenous surfactant in the Brown Norway rat. *Plos One* 2012;7:e2938.

Table 1. Effects of pretreatments on the early rise in bronchial basal tone provoked by 60-min cyclic stretch.

Pretreatment	n	Early stretch-induced effect on basal tone (g)		Effect of pretreatment	Effect size pretreatment <i>d</i> [95% CI]
		Absence of pretreatment	Presence of pretreatment		
Epithelium removal	13	0.76 ± 0.08***	0.53 ± 0.10***	−0.23 ± 0.09	−0.70 [−1.48–0.10]
Indomethacin (10 ^{−6} M)	8	1.14 ± 0.21**	1.14 ± 0.18***	0.01 ± 0.10	0.00 [−1.01–1.01]
MK476 (10 ^{−6} M)	7	1.22 ± 0.22**	0.89 ± 0.14***	−0.33 ± 0.12 [†]	−0.68 [−1.70–0.44]
L-NAME (10 ^{−3} M)	14	0.61 ± 0.15**	1.18 ± 0.15***	0.57 ± 0.14 ^{††}	1.02 [0.20–1.77]
Nicardipine (10 ^{−5} M)	10	0.65 ± 0.12***	1.03 ± 0.18***	0.38 ± 0.18	0.78 [−0.16–1.66]
Tetrodotoxin (10 ^{−6} M)	7	1.07 ± 0.19**	1.29 ± 0.28**	0.22 ± 0.16	0.35 [−0.73–1.38]
Gadolinium (10 ^{−4} M)	8	1.18 ± 0.20***	1.24 ± 0.15***	0.06 ± 0.18	0.12 [−0.87–1.10]
Tertiapine (10 ^{−5} M)	9	0.51 ± 0.13**	−0.74 ± 0.12***	−1.25 ± 0.17 ^{†††}	−3.32 [−4.50– −1.85]
Capsazepine (10 ^{−6} M)	8	1.19 ± 0.14***	0.92 ± 0.20**	−0.26 ± 0.23	−0.67 [−1.31– −0.01]
Calphostine C (10 ^{−7} M)	9	1.10 ± 0.23***	1.12 ± 0.25**	0.02 ± 0.29	0.03 [−0.90–0.95]
SB203580 (10 ^{−7} M)	10	1.11 ± 0.27**	0.84 ± 0.42	−0.27 ± 0.37	−0.24 [−1.11–0.65]
Y27632 (10 ^{−6} M)	11	1.10 ± 0.25**	−0.75 ± 0.30*	−1.85 ± 0.50 ^{††}	−2.03 [−2.96– −0.93]

The early stretch-induced effect corresponded to the change in bronchial basal tone at the outset of stretching in comparison to paired unstretched control (**Figures 1 and 2**). Data shown are mean ± SEM and standardized effect size (*d*) and its 95% confidence interval [CI] for the difference between means. The observed effect of pretreatment is small ($|d| \geq 0.20$), medium ($|d| \geq 0.50$), or large ($|d| \geq 0.80$) according to the Cohen's conventions [20]. The 95% CI for *d* consists of the uncertainty around the real effect of pretreatment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ stretched vs. paired unstretched control bronchi. [†] $p < 0.05$, ^{††} $p < 0.01$, ^{†††} $p < 0.001$ pretreatment vs. no pretreatment.

Table 2. Effects of pretreatments on the delayed rise in bronchial basal tone after the cessation of 60-min cyclic stretch.

Pretreatment	n	Delayed post-stretch effect on basal tone (g)		Effect of pretreatment	Effect size pretreatment <i>d</i> [95% CI]
		Absence of pretreatment	Presence of pretreatment		
Epithelium removal	13	0.24 ± 0.03***	0.15 ± 0.03***	−0.09 ± 0.03 [†]	−3.00 [−4.01– −1.80]
Indomethacin (10 ^{−6} M)	8	0.36 ± 0.07**	0.29 ± 0.07**	−0.07 ± 0.11	−0.37 [−1.34–0.64]
MK476 (10 ^{−6} M)	7	0.35 ± 0.08**	0.23 ± 0.06*	−0.12 ± 0.10	−0.64 [−1.67–0.47]
L-NAME (10 ^{−3} M)	14	0.29 ± 0.03***	0.21 ± 0.03***	−0.08 ± 0.02 [†]	−0.73 [−1.47–0.06]
Nicardipine (10 ^{−5} M)	10	0.17 ± 0.03***	0.12 ± 0.08***	−0.05 ± 0.07	−0.27 [−1.13–0.63]
Tetrodotoxin (10 ^{−6} M)	7	0.37 ± 0.08**	0.29 ± 0.06**	−0.07 ± 0.10	−0.43 [−1.46–0.66]
Gadolinium (10 ^{−4} M)	8	0.36 ± 0.07**	0.26 ± 0.03***	−0.10 ± 0.08	−0.69 [−1.65–0.36]
Tertiapine (10 ^{−5} M)	9	0.23 ± 0.06**	0.27 ± 0.04***	0.04 ± 0.08	0.26 [−0.68–1.18]
Capsazepine (10 ^{−6} M)	8	0.29 ± 0.06**	0.37 ± 0.05***	0.08 ± 0.06	0.74 [−0.31–1.71]
Calphostine C (10 ^{−7} M)	9	0.21 ± 0.03***	0.26 ± 0.02***	0.05 ± 0.05	0.65 [−0.32–1.57]
SB203580 (10 ^{−7} M)	10	0.29 ± 0.05***	0.15 ± 0.19	−0.14 ± 0.22	−0.32 [−1.19–0.58]
Y27632 (10 ^{−6} M)	11	0.28 ± 0.05***	0.33 ± 0.07**	0.05 ± 0.08	0.25 [−0.60–1.08]

The delayed post-stretch effect corresponded to the spontaneous and sustained increase in basal tone 10 min after the cessation of cyclic stretch in comparison to paired unstretched control (**Figures 1 and 2**). Data shown are mean ± SEM and standardized effect size (*d*) and its 95% confidence interval [CI] for the difference between means. The observed effect of pretreatment is small ($|d| \geq 0.20$), medium ($|d| \geq 0.50$), or large ($|d| \geq 0.80$) according to the Cohen's conventions [20]. The 95% CI for *d* consists of the uncertainty around the real effect of pretreatment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ stretched vs. paired unstretched control bronchi. [†] $p < 0.05$ pretreatment vs. no pretreatment.

Table 3. Effects of pretreatments on the change in efficacy ($\Delta E_{\max}$) of acetylcholine (ACh) after 60-min cyclic stretch.

Pretreatment	n	Comparison of $\Delta E_{\max}$ (ACh) between stretched and control (g/basal tone)		Effect of pretreatment	Effect size pretreatment <i>d</i> [95% CI]
		Absence of pretreatment	Presence of pretreatment		
Epithelium removal	13	-0.01 ± 0.15	0.27 ± 0.14	$0.27 \pm 0.12^{\dagger}$	0.54 [−0.26–1.29]
Indomethacin (10^{-6} M)	8	0.12 ± 0.25	0.19 ± 0.11	0.07 ± 0.25	0.25 [−0.75–1.22]
MK476 (10^{-6} M)	7	0.15 ± 0.29	0.51 ± 0.23	0.37 ± 0.28	0.53 [−0.57–1.55]
L-NAME (10^{-3} M)	14	-0.01 ± 0.07	0.26 ± 0.14	$0.25 \pm 0.11^{\dagger}$	0.66 [−0.12–1.40]
Nicardipine (10^{-5} M)	10	0.25 ± 0.18	$1.02 \pm 0.44^*$	0.76 ± 0.43	0.73 [−0.21–1.60]
Tetrodotoxin (10^{-6} M)	7	0.16 ± 0.25	-0.02 ± 0.12	-0.18 ± 0.30	−0.35 [−1.38–0.73]
Gadolinium (10^{-4} M)	8	0.11 ± 0.22	0.39 ± 0.19	0.28 ± 0.28	0.49 [−0.53–1.45]
Tertiapine (10^{-5} M)	9	-0.02 ± 0.08	$0.25 \pm 0.10^*$	0.27 ± 0.18	0.95 [−0.03–1.92]
Capsazepine (10^{-6} M)	8	0.36 ± 0.26	0.29 ± 0.19	-0.07 ± 0.26	−0.11 [−1.08–0.88]
Calphostine C (10^{-7} M)	9	0.00 ± 0.28	0.18 ± 0.22	0.18 ± 0.22	0.24 [−0.70–1.15]
SB203580 (10^{-7} M)	10	-0.22 ± 0.21	-0.25 ± 0.16	-0.03 ± 0.25	−0.05 [−0.93–0.83]
Y27632 (10^{-6} M)	11	-0.13 ± 0.22	$0.21 \pm 0.08^*$	0.33 ± 0.21	0.63 [−0.25–1.46]

ACh efficacy ($E_{\max}$, g/basal tone recorded just before the dose-response curve) represented the maximal contraction induced by 3×10^{-3} M ACh at time T1 and T2 (**Figure 1**). $\Delta E_{\max}$ represented the change in $E_{\max}$ between times T2 and T1 (**Figure 3**). Data shown are mean $\pm$ SEM and standardized effect size (*d*) and its 95% confidence interval [CI] for the difference between means. The observed effect of pretreatment is small ($|d| \geq 0.20$), medium ($|d| \geq 0.50$), or large ($|d| \geq 0.80$) according to the Cohen's conventions [20]. The 95% CI for *d* consists of the uncertainty around the real effect of pretreatment. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ stretched vs. paired unstretched control bronchi. $^{\dagger}p < 0.05$ pretreatment vs. no pretreatment.

Table 4. Effects of pretreatments on the change in potency ($-\log EC_{50}$) of acetylcholine (ACh) after 60-min cyclic stretch.

Pretreatment	n	Comparison of $\Delta(-\log EC_{50})$ (ACh) between stretched and control (log unit)		Effect of pretreatment	Effect size pretreatment d [95% CI]
		Absence of pretreatment	Presence of pretreatment		
Epithelium removal	13	$0.48 \pm 0.08^{***}$	$0.50 \pm 0.14^*$	0.02 ± 0.13	0.05 [−0.70–0.80]
Indomethacin (10^{-6} M)	8	$0.38 \pm 0.07^{***}$	$0.32 \pm 0.13^*$	-0.05 ± 0.12	−0.23 [−1.20–0.76]
MK476 (10^{-6} M)	7	$0.41 \pm 0.07^{**}$	0.26 ± 0.23	-0.15 ± 0.24	−0.34 [−1.37–0.74]
L-NAME (10^{-3} M)	14	$0.30 \pm 0.07^{***}$	$0.44 \pm 0.05^{***}$	0.14 ± 0.05	0.54 [−0.23–1.28]
Nicardipine (10^{-5} M)	10	$0.57 \pm 0.10^{***}$	0.11 ± 0.12	$-0.45 \pm 0.17^{\dagger}$	−1.26 [−2.16– −0.25]
Tetrodotoxin (10^{-6} M)	7	$0.25 \pm 0.05^{**}$	$0.38 \pm 0.04^{***}$	0.13 ± 0.06	1.12 [−0.07–2.16]
Gadolinium (10^{-4} M)	8	$0.27 \pm 0.05^*$	$0.49 \pm 0.08^{***}$	$0.22 \pm 0.08^{\dagger}$	1.19 [0.07–2.18]
Tertiapine (10^{-5} M)	9	$0.40 \pm 0.13^*$	$0.41 \pm 0.09^{**}$	0.03 ± 0.19	0.03 [−0.90–0.95]
Capsazepine (10^{-6} M)	8	$0.40 \pm 0.11^{**}$	$0.54 \pm 0.12^{**}$	0.14 ± 0.15	0.41 [−0.60–1.38]
Calphostine C (10^{-7} M)	9	$0.26 \pm 0.04^{***}$	0.24 ± 0.19	-0.01 ± 0.20	−0.04 [−0.80–0.88]
SB203580 (10^{-7} M)	10	$0.37 \pm 0.07^{***}$	0.36 ± 0.10	-0.01 ± 0.13	−0.04 [−0.91–0.84]
Y27632 (10^{-6} M)	11	$0.37 \pm 0.08^{***}$	$0.37 \pm 0.16^*$	-0.01 ± 0.16	−0.12 [−0.95–0.72]

ACh potency ($-\log EC_{50}$) was defined as the negative log of the ACh concentration achieving 50% of the maximal effect at time T1 and T2 (**Figure 1**). $\Delta(-\log EC_{50})$ (log unit) represented the change in $-\log EC_{50}$ between times T2 and T1 (**Figure 3**). Data shown are mean $\pm$ SEM and standardized effect size (d) and its 95% confidence interval [CI] for the difference between means. The observed effect of pretreatment is small ($|d| \geq 0.20$), medium ($|d| \geq 0.50$), or large ($|d| \geq 0.80$) according to the Cohen's conventions [20]. The 95% CI for d consists of the uncertainty around the real effect of pretreatment. $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ stretched vs. paired unstretched control bronchi. $^{\dagger}p < 0.05$ pretreatment vs. no pretreatment.

Table 5. Effect of 60-min cyclic stretch on the early mRNA-expression of genes of interest.

<i>mRNA Expression</i>		mRNA relative expression ($2^{-\Delta C_t}$)		Fold change Stretch/control
<i>Gene symbol</i>	<i>Gene name</i>	Control n = 9	Stretch n = 9	
WNT pathway				
<i>WNT2</i>	Wingless-type MMTV integration site family member 2	0.04	0.02	2.04
<i>WNT3A</i>	Wingless-type MMTV integration site family member 3	0.04	0.02	2.04
<i>WNT4</i>	Wingless-type MMTV integration site family member 4	0.18	0.08	2.33
<i>WNT5A</i>	Wingless-type MMTV integration site family member 5A	0.09	0.03	2.59
<i>WNT7B</i>	Wingless-type MMTV integration site family member 7B	0.13	0.05	2.31
<i>FZD7</i>	Frizzled family receptor 7	0.31	0.13	2.31
MAP-Kinase pathways				
<i>MAPK1</i>	Mitogen-activated protein kinase 1	0.35	0.17	2.03
<i>MAPK3</i>	Mitogen-activated protein kinase 3	0.22	0.12	1.88
<i>MAPK9</i>	Mitogen-activated protein kinase 9	0.16	0.06	2.72
Stress and inflammation				
<i>IL8/CXCL8</i>	Interleukin 8	28.81	9.90	2.91*
<i>MAP3K14</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	0.15	0.08	1.78
<i>MAPK14</i>	Mitogen-activated protein kinase 14	0.15	0.06	2.65
Extracellular matrix				
<i>COL4A1</i>	Collagen, type IV, α_1	0.68	0.22	3.12 [†]
<i>ELN</i>	Elastin	0.07	0.03	2.45
<i>MMP9</i>	matrix metalloproteinase 9	2.45	4.13	3.20 [†]
Apoptosis				
<i>MYC</i>	Transcription factor p64	2.47	1.43	1.72
G-coupled receptors				
<i>ADRB2</i>	β_2 -adrenergic receptor	0.67	0.28	2.39
<i>CHRNA7</i>	Acetylcholine receptor	0.04	0.02	2.11
L-type calcium channels				
<i>CACNA1S</i>	Voltage-dependent L-type calcium channel subunit α -1S	0.02	0.01	2.26
Housekeeping genes				
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase	4.30	3.26	1.32
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase	0.38	0.22	1.72
<i>GUSB</i>	β -glucuronidase	0.69	0.31	1.57

Values were determined with RT-qPCR and are expressed as relative expression ($2^{-\Delta C_t}$), where ΔC_t is the difference between the target gene C_t and the mean C_t of reference genes (HPRT1, GAPDH and GUSB) amplified simultaneously. * $p < 0.05$ stretch vs. paired control.

[†]Fold-change > 3.

Legends for figures

Figure 1. Effect of 60-min cyclic stretch on basal tone and responsiveness to acetylcholine (ACh) in paired human bronchi (top, unstretched control; bottom, stretching). Cyclic stretch increased bronchial basal tone and responsiveness to ACh (see **Figures 2 and 3**). Cyclic stretch triggered two types of effect on bronchial basal tone: an early stretch-induced effect (black arrow) at the outset of stretching and a delayed post-stretch effect (white arrow) that corresponded to a spontaneous and sustained increase in basal tone 10 min after the cessation of cyclic stretch.

Figure 2. Effect of 60-min cyclic stretch on basal tone in 85 human bronchi. The early stretch-induced effect corresponded to the change in bronchial basal tone provoked by cyclic stretch (**Figure 1**, bottom). The delayed post-stretch effect corresponded to the spontaneous increase in basal tone after the cessation of cyclic stretch until basal tone reached a plateau in 10 min (**Figure 1**, bottom). Values are means $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$ stretched bronchi vs. paired controls; $^{\dagger\dagger}p < 0.01$ early vs. delayed post-stretch.

Figure 3. Effect of 60-min cyclic stretch on cumulative dose-response curve to acetylcholine (ACh) expressed in g (**A**) or in g/basal tone (**B**) recorded immediately before at times T1 and T2 (**Figure 1**) in 85 human bronchi. Cyclic stretch increased efficacy ($\Delta E_{\max}$) and potency ($\Delta(-\log EC_{50})$) of ACh. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ T2 vs. T1 dose-response curves.

Figure 4. Effect of 60-min cyclic stretch on the production of leukotriene E_4 (LTE $_4$), prostaglandin E_2 (PGE $_2$), and interleukine-8 (IL-8), Tumor necrosis- α (TNF α) and interleukine-10 (IL-10) in organ bath assessed by enzyme-linked immunosorbent assays in 9 human bronchi. Cyclic stretch (filled bars) did not change significantly the production of mediators. Values are means $\pm$ SEM.

Figure 1

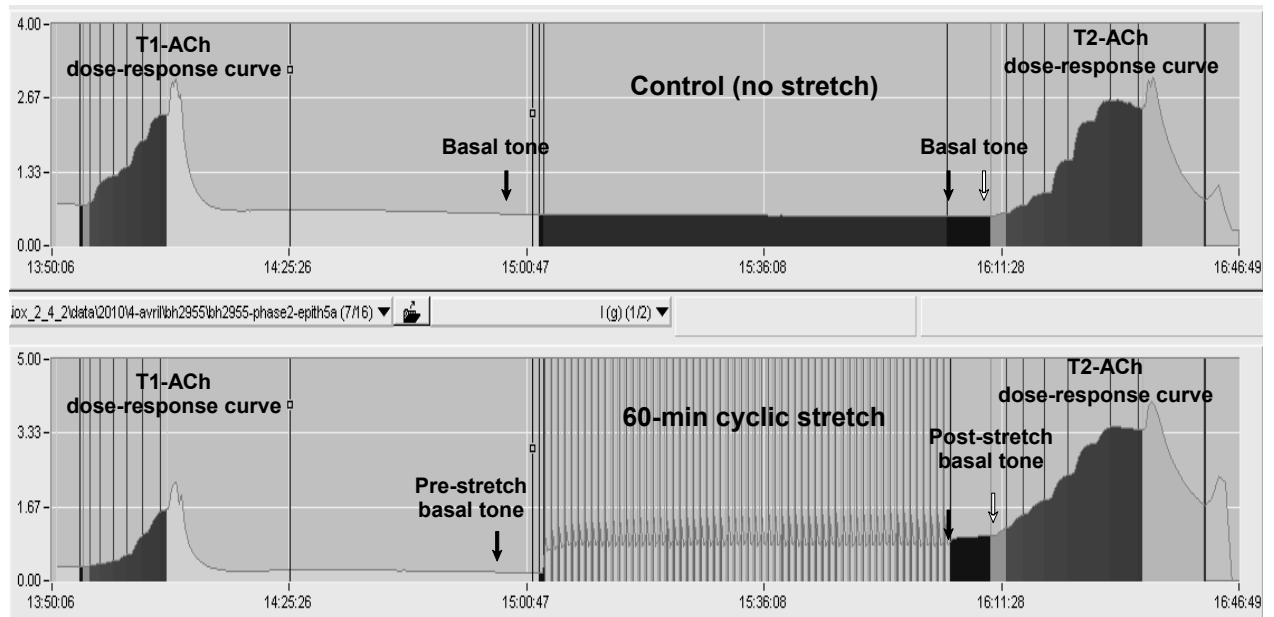


Figure 2

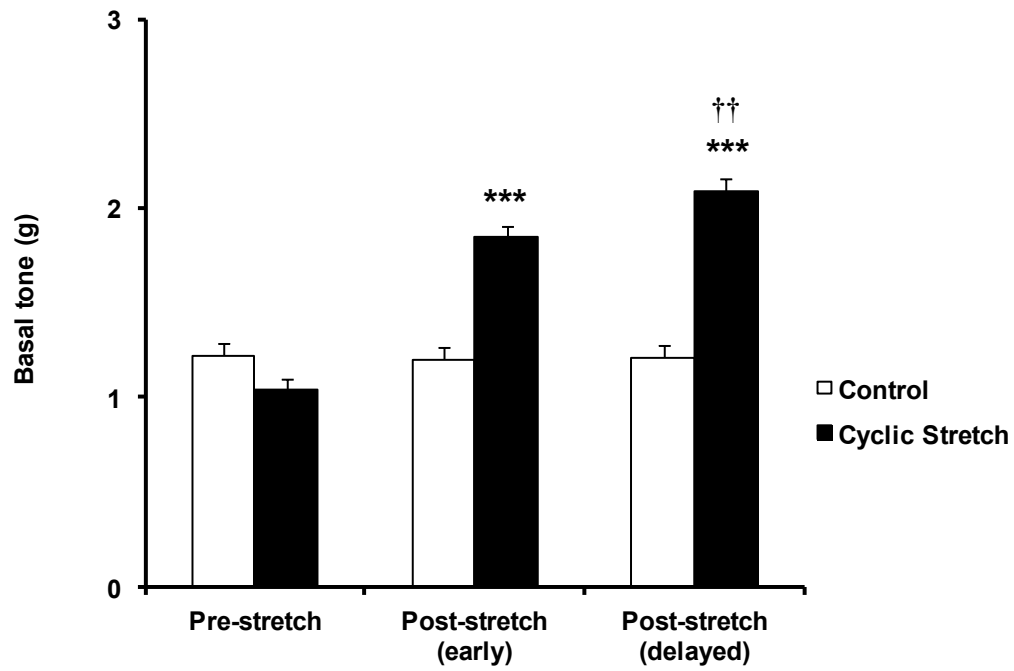


Figure 3

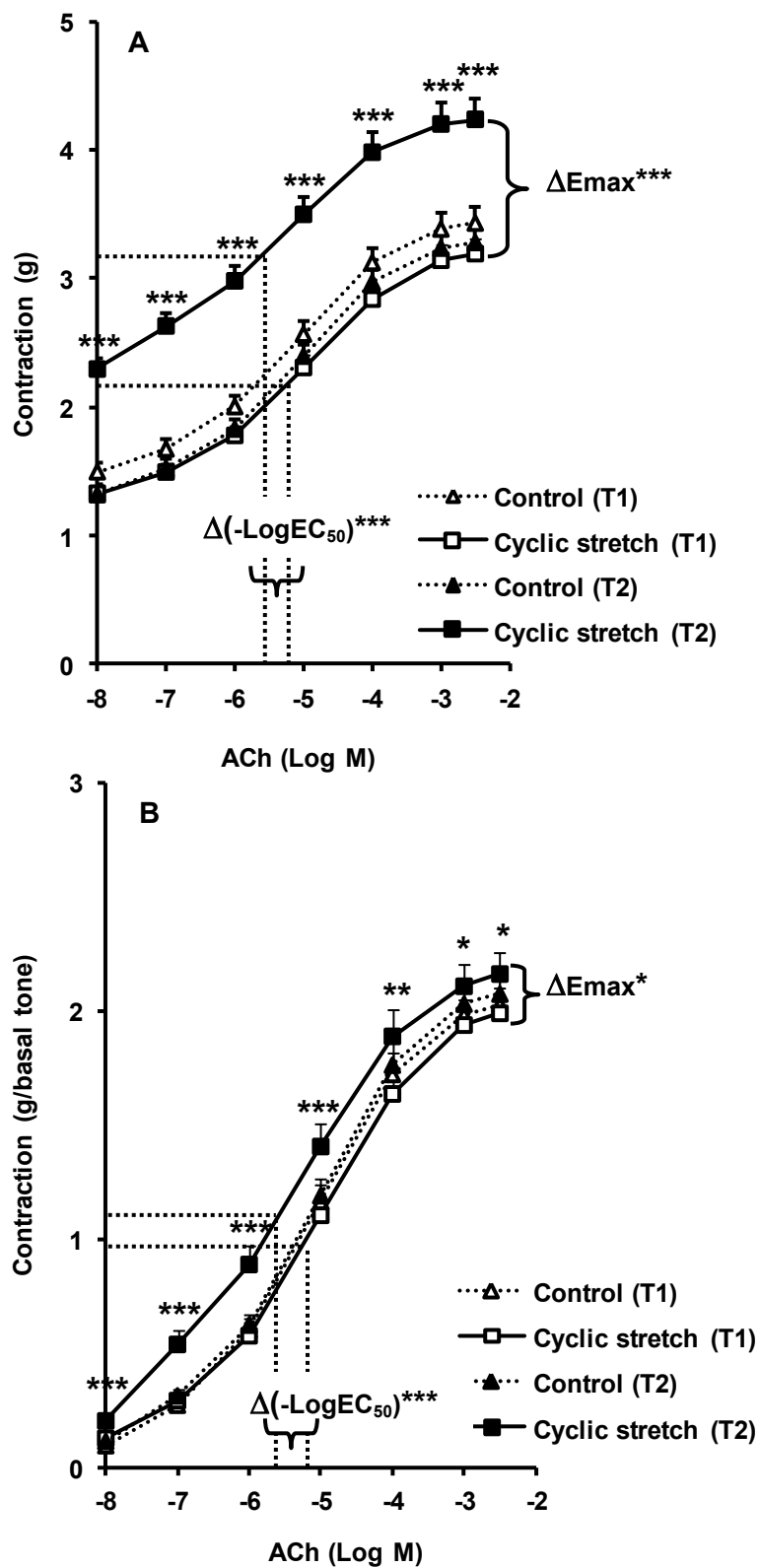


Figure 4

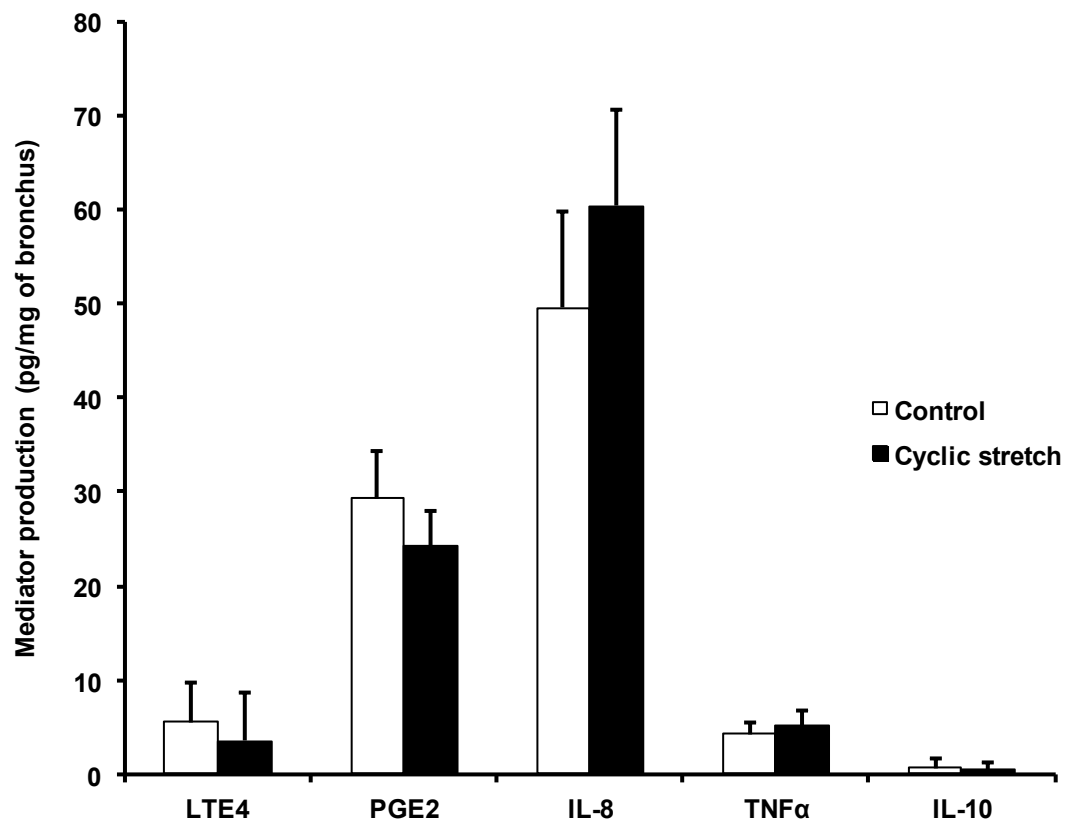


Table 3.1: Valeurs brutes du tonus basal au décours de la période de contrôle ou de stretch cyclique de 60 min. Les bronches sont pairées pour l'étude.

Traitement	condition	Phase 1		Phase 2 tardive		p
Aucun	Contrôle	1,40	±0,07	1,21	±0,07	**
(n=13)	Stretch	1,20	±0,07	2,09	±0,07	***
Abrasion épithélium	Contrôle	0,96	±0,09	0,78	±0,09	*
(n=10)	Stretch	1,15	±0,16	1,59	±0,12	**
Indométhacine	Contrôle	1,57	±0,47	1,41	±0,40	
(n=10)	Stretch	1,45	±0,45	2,57	±0,42	**
Nicardipine	Contrôle	1,06	±0,12	0,66	±0,06	*
(n=10)	Stretch	1,23	±0,12	1,86	±0,22	*
L-NAME	Contrôle	1,26	±0,15	1,21	±0,17	
(n=10)	Stretch	1,26	±0,15	2,25	±0,12	**
Gadolinium	Contrôle	1,22	±0,04	1,05	±0,06	*
(n=10)	Stretch	1,18	±0,20	2,20	±0,22	**
Tertiapine	Contrôle	0,95	±0,10	0,79	±0,09	*
(n=10)	Stretch	1,13	±0,18	1,71	±0,15	*
SB	Contrôle	1,57	±0,28	1,41	±0,30	
(n=10)	Stretch	1,48	±0,26	2,48	±0,21	**
Y27632	Contrôle	1,25	±0,27	1,06	±0,27	
(n=10)	Stretch	1,69	±0,33	2,29	±0,26	**
Calphostine	Contrôle	1,55	±0,17	1,30	±0,20	*
(n=10)	Stretch	1,10	±0,15	2,35	±0,17	**
Tétradotoxine	Contrôle	1,08	±0,16	0,77	±0,13	*
(n=10)	Stretch	1,54	±0,22	2,41	±0,20	**

*p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001

Table 3.2: Valeurs brutes de l'amplitude de réponse à une gamme d'acétylcholine ($1.10E^{-8}$ à $3.10E^{-3}$ M) au décours de la période de contrôle ou de stretch cyclique de 60 min. Les bronches sont paires pour l'étude.

Traitement	condition	Phase 1		Phase 2		p
Aucun	Contrôle	2,03	±0,11	2,07	±0,12	
	Stretch	1,99	±0,12	2,14	±0,13	
Abrasion épithélium	Contrôle	1,39	±0,18	1,43	±0,17	
	Stretch	1,26	±0,17	1,56	±0,29	
Indométhacine	Contrôle	2,32	±0,24	2,15	±0,20	
	Stretch	2,60	±0,28	2,61	±0,31	
Nicardipine	Contrôle	2,17	±0,33	1,94	±0,27	
	stretch	2,05	±0,35	2,83	±0,65	*
L-NAME	Contrôle	1,87	±0,14	1,66	±0,14	
	stretch	1,75	±0,17	1,80	±0,16	
Gadolinium	Contrôle	1,84	±0,22	2,02	±0,25	
	stretch	1,74	±0,24	1,91	±0,24	
Tertiapine	Contrôle	1,50	±0,17	1,61	±0,14	
	stretch	1,33	±0,18	1,56	±0,22	
SB203580	Contrôle	2,15	±0,38	2,28	±0,36	
	stretch	2,59	±0,42	2,47	±0,46	
Y27632	Contrôle	2,58	±0,24	2,40	±0,23	
	stretch	2,23	±0,24	2,25	±0,23	
Calphostine	Contrôle	2,44	±0,37	2,49	±0,38	

	stretch	2,79	±0,54	3,02	±0,44		147
Tétradotoxine	Contrôle	1,90	±0,21	1,88	±0,18		
	Stretch	1.57	±0,22	1,69	±0,22		

*p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001

3.1.5.3 Résultats et discussion concernant la phase 2

Comme lors de la précédente étude, deux phénomènes remarquables se produisent sous stimulation cyclique. Tout d'abord, le tonus basal de la bronche s'élève significativement évoquant une constriction. Celle ci apparait dès les premières oscillations (réponse précoce) pour se stabiliser à une valeur d'environ 172% (2.09 ± 0.07 vs 1.21 ± 0.07 g pour $n=85$) du tonus basal préalable au repos. Par contre à l'arrêt de la stimulation cyclique, une nouvelle élévation du tonus basal de la bronche est observée. La cinétique de cette réponse est identique à un étirement unique provoqué lors de notre première étude avec une élévation lente qui atteint un plateau au bout de 10 minutes. A ce stade, il peut soit s'agir d'une activation retardée (réponse dite tardive) soit d'une levée de mécanisme d'inhibition présents au cours de la période de stretch cyclique. L'autre élément remarquable reste la capacité individuelle de la bronche à développer un tonus maximal supérieur à une réponse à l'acétylcholine à $3.10E^{-3}$ M considéré pourtant comme une concentration d'agoniste saturant les récepteurs de surface. Dès lors une modification des performances de la bronche par sensibilisation au calcium ou une réorganisation du cytosquelette et des ponts actine-myosine peut être évoquée.

Mécanismes et implication sur le tonus basal

Le tonus bronchique est modulé in-vivo soit par une stimulation nerveuse soit par la libération de neuromédiateurs dont l'effet résulte d'une balance contraction/relaxation médiée par les médiateurs pro ou anti-inflammatoires. En cas d'étirement unique, nous avons pu démontrer l'implication de la réponse inflammatoire avec la production de leucotriènes notamment. Or, l'hypothèse de l'inflammation est ici totalement infirmée pour un étirement établi dans des limites physiologiques de la bronche: le changement de la solution support de Krebs après la période de stretch cyclique ou encore la mesure de

médiateurs au sein du liquide par des techniques ELISA se révèlent tous deux négatifs (**Figure 4**). Il est possible que la répétition de la contrainte ou son amplitude ait activé d'autres voies de signalisation. Cette absence d'activation des leucotriènes est compatible avec des études de stretch appliqué à des matrices contenant de la fibronectine et des cellules éosinophiles. En effet, le stretch de la matrice inhibe transitoirement la production de leucotriènes par les éosinophiles même lorsque ceux-ci sont activés artificiellement [135] (**Waters 2002 AJP**). L'ensemble de ces réponses inhibitrices n'est présent qu'en cas de cytosquelette intègre ce qui renforce donc le rôle de ce dernier.

L'adjonction d'antagonistes ou d'agonistes aux récepteurs membranaires ou cellulaires impliqués dans la contraction bronchique se révèle assez décevante puisqu'aucun annihile complètement la réponse observée tant au niveau du tonus basal que de la réponse maximale développée. Ceci suggère une réponse puissante de la bronche régulée par plusieurs mécanismes simultanément. Parmi ceux-ci on retrouve le rôle des récepteurs calciques non spécifiques (de type L) puisque la pré-exposition à la nicardipine réduit significativement l'amplitude d'élévation du tonus basal (**Figure 3.1**), tandis que les récepteurs au stretch (SAR) ne modifient pas la réponse à un stretch cyclique physiologique. En effet, la le Gadolinium et la Capsazépine qui agissent spécifiquement sur ces récepteurs n'ont pas eu d'effet d'inhibition de la réponse du tonus basal. Par contre, l'interaction épithélium-cellule musculaire lisse bronchique est suggérée par plusieurs éléments. D'abord, l'ablation de l'épithélium par abrasion réduit significativement cette élévation de tonus basal et notamment l'élévation retardée (post-stretch) du tonus basal tandis que les voies des NO synthases et des RhoA kinases diminuent également l'amplitude de réponse à l'acétylcholine. Toutefois, il ne s'agit que de réponse partielle et il n'y a pas de suppression totale de la réponse dans tous les cas. Les Rho-kinases ne sont pas dans ce contexte activés par la synthèse précoce de gènes interagissant avec la voie des WNT alors qu'elles le sont en cas d'étirement unique. Ceci suggère que l'amplitude de la contrainte active ou non la synthèse protéique et qu'un contrôle strict de cette contrainte peut limiter la réponse du tissu bronchique.

Figure 3.1: Modélisation des cascades intracellulaires à l'origine de la contraction et de son maintien dans la cellule musculaire lisse avec une phase rapide et lente.

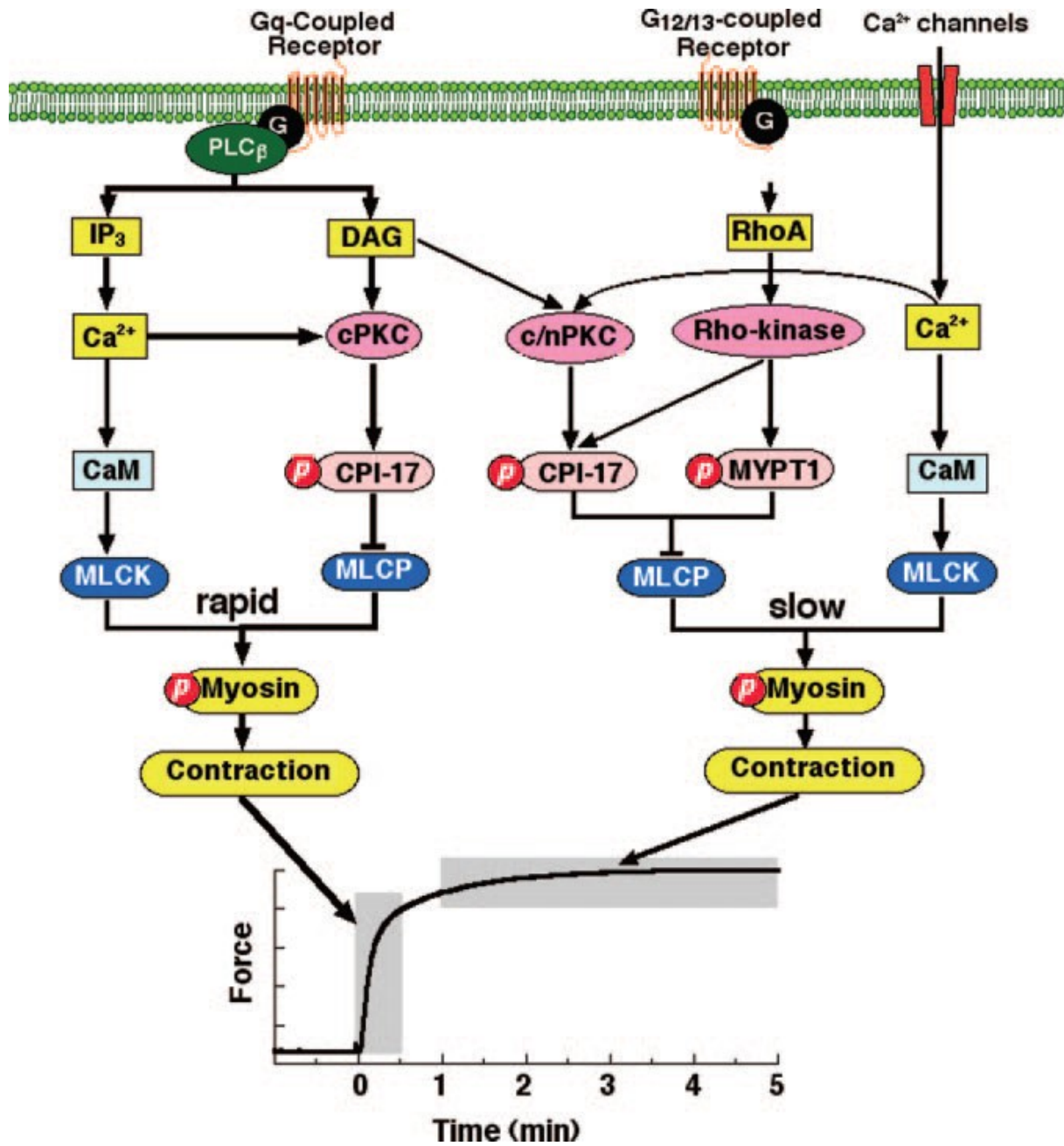
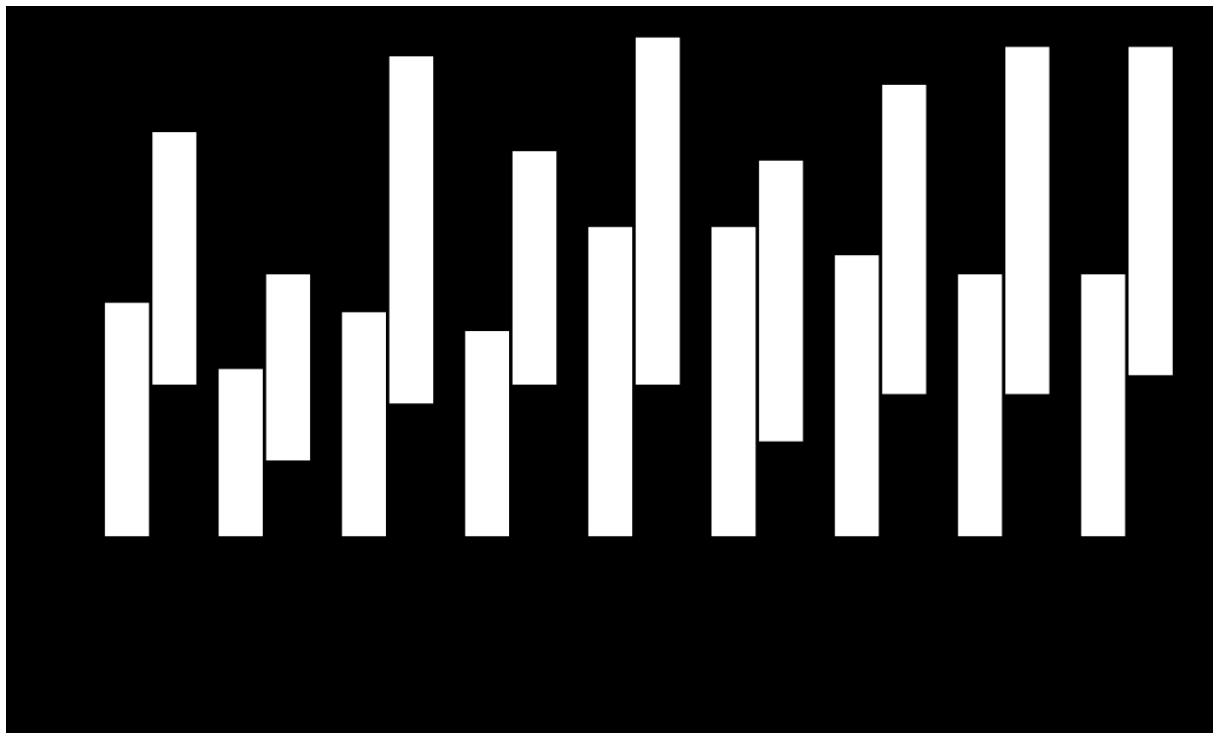


Figure 3.2: Effets des différents prétraitements sur le tonus basal et l'amplitude de réponse à une gamme d'acétylcholine (ΔE_{max}) de bronches humaines suivant soit une période contrôle soit une période avec un stretch cyclique de 60 minutes. Les barres noires représentent les variations de tonus basal (avant après période d'intérêt) et les barres blanches la variation de tonus développé (ΔE_{max}).

L'abrasion de l'épithélium et l'exposition à Y27632 réduisent significativement le tonus basal tandis que le L-Name réduit E_{max} . La Nicardipine élève l' E_{max} après stretch. * $p < 0.05$ diminution significative et § $p < 0.05$ pour élévation significative après pré-exposition.



150

L'arrêt brutal de la contrainte cyclique génère une élévation de tonus bronchique soit par levée brutale de la charge appliquée sur la cellule musculaire lisse soit par l'arrêt de l'alternance entre deux états (relaxation/contraction). La première hypothèse pourrait conduire soit à une modification conformationnelle de la bronche comme cela est observé au niveau du cytosquelette soumis de façon répétée à une contrainte locale ou diffuse. L'autre possibilité est la levée de mécanismes de contre-régulation présents au moment du stretch qui visent à prévenir une trop grande rigidité du système ou statufication et qui empêchent la relaxation complète de la cellule musculaire bronchique. Ceci est notamment la base de la transition entre deux états: état souple (softy or glassy) - état rigide (stiffness) commun dans certaines matières physiques et décrits également pour certaines cellules comme c'est le cas de la cellule musculaire lisse [23] (Krishnan 2009 JAP). Dans ce contexte, l'ablation de l'épithélium, la tertiapine et les inhibiteurs des Rho-kinases semblent les voies principales comme le montre la différence entre les groupes observée pour le tonus basal notamment. L'interaction actine-myosine est dans ce contexte une cible d'action clé puisque la constriction est dépendante d'un certains nombre de ponts activés et le stretch cyclique pourrait favoriser la polymérisation de filaments d'actine et maintenir activé un certain nombre de ponts pour limiter l'énergie dépenser dans les mécanismes de contraction.

Le stretch cyclique provoque une augmentation de l'affinité à l'acétylcholine mais également une élévation de la puissance développée par la bronche non inhibée par la diminution de mobilisation de calcium intracytosolique. Les inhibiteurs des MAP kinases, de la PKC et des Rho-kinase ne montrent pas d'inhibition de cette réponse. Deux pistes peuvent être évoquées: la première fait intervenir le concept de sensibilisation au calcium définie comme une réponse contractile augmentée pour une même stimulation externe et la seconde fait intervenir un recrutement optimal d'unités contractiles au sein des cellules musculaires lisses. En ce qui concerne la sensibilisation au calcium, la description de ce phénomène a été détaillée par Dimipoulos et est résumé sur la figure ci-dessous [116]([Dimipoulos, 2011 Circ Res](#)). L'oscillation provoquée par le stretch cyclique produit un réarrangement des filaments intracellulaires et une amélioration des performances pour une large étendue de longueur [125] ([Noble J Allergy 2012](#)). Ce mécanisme a été mis en évidence récemment par Kuo et al. qui ont montré un décalage des ponts d'actine-myosines activés aboutissant en un allongement du corps cellulaire mais une optimisation des ponts actine-myosine [77] ([Kuo JAP 2001](#)). Cet assemblage réassemblage est une caractéristique de la cellule musculaire lisse qui allie performance et économie énergétique. De plus, un modulateur de cette réponse sur tissu (et non cellules) est possiblement la matrice extra-cellulaire. En effet, des modifications de son élasticité vont directement interagir avec la force contractile produite. Dans cette perspective, le rôle des protéines MMP-9 et MMP-2 est intéressante car ces deux dernières sont les principales gélatinases sécrétées par les cellules épithéliales. Elles possèdent deux actions telles que la souplesse de la matrice lorsque leur production est stimulée et la régulation du chimiotactisme, décrite notamment dans un modèle d'asthme [102] ([Corry DB, FASEB J 2004](#)). La PCR réalisée dans cette étude suggère l'intervention de MMP-9 et de COL4A1 qui code pour le collagène de type IV largement présent au sein de la membrane extra-cellulaire. Enfin, la production d'IL8, cytokine proinflammatoire à l'origine d'une bronchoconstriction via la synthèse de MMP9 est logiquement retrouvée.

La seconde hypothèse est basée sur la théorie de thermodynamique. Parmi les énigmes qui persistent en biophysique, sont celles du changement d'état observé après agitation de certains matériaux : verre, pâte de dentifrice... Or, dans les cellules vivantes aussi, une source d'énergie ATP-indépendante proviendrait de cette contrainte brutale aboutissant à la

modification d'état « fluidization » par transfert d'énergie consécutif à une contrainte extrême. Il a été noté que plus le système est proche d'un état solide, plus il était susceptible à la fluidification dépassant dans ce cadre un certain seuil énergétique restitué par le changement d'état [44](Bursac 2005 Nat Mater).

Ces différents résultats suggèrent donc que limiter la contrainte appliquée aux bronches à un étirement physiologiques comparé à leur capacité individuelle réduit la cascade de mécano-transduction et par conséquent limite la production de médiateurs de l'inflammation ou d'activation génomique. Ceci est particulièrement intéressant dans la clinique et renforce la notion de "ventilation protectrice" décrite lorsque les variations de pressions aériennes sont limitées.

3.2. Modèles comparés

Les équipes de P Noble et McFawn travaillent depuis longtemps autour de la thématique de stretch appliqué à la cellule musculaire lisse ou à la bronche. Le travail que nous présentons ici possède un socle de réflexion proche et un certains nombre de différences, qui peuvent en partie expliquer des résultats différents.

– Origine des cellules et notion de différences interespèces

La première différence concerne le modèle étudié. La spécificité et la limite potentielle de notre modèle est de s'intéresser à des bronches humaines. En effet, LaPrad et Noble ont réalisé la plupart de leurs études sur des bronches animales issues de porc en particulier. Or la généralisation des résultats reste souvent discutable pour deux raisons principales. La première fait état de différences possibles inter-espèces. Ainsi, l'orientation des fibres musculaires varie entre les espèces avec des fibres qui demeurent quasi-perpendiculaires chez le porc sur l'ensemble de l'arbre trachéo-bronchique. Cette différence va interférer directement avec les longueurs pour lesquelles la tension maximale sera obtenue par exemple [133] (Khangure, 2004 JAP). De plus, les variations inter-espèces peuvent intervenir sur certains modèles pathologiques tels que l'hyperréactivité bronchique qui reste spécifique de la bronche humaine et qui requiert une activation pharmacologique dans d'autres espèces. Une synthèse récente à examiner les

différences inter-espèce avec des résultats moins marqués que par le passé [136] (Chin, 2010 *European Respiratory Journal*).

Par ailleurs, les études explorent des divisions bronchiques différentes. Notre modèle s'est attaché à l'examen de bronches distales dépourvues de cartilage dont le diamètre au moment du prélèvement est de l'ordre de 1 mm. Au contraire, Noble et al. ont mené la majorité de leurs investigations sur des bronches plus proximales de l'ordre de 2 à 2,5 mm avec une longueur de 2 cm. Cette distinction conduit à de nombreuses différences morphologiques lesquelles ne sont pas authentifiées par une étude histologique systématique. Toutefois, l'étude du compartiment distal présente pour avantage d'étudier une monocouche épithéliale et une monocouche musculaire lisse. Par ailleurs, l'élasticité du tissu de soutien va varier significativement entre les deux.

La limite de notre modèle toutefois réside dans le fait que l'on ne peut exclure l'existence de tissu pathologique dans sa réponse. En effet, les résections pulmonaires se font par essence sur la notion d'existence de tumeur : maligne ou non (inflammatoire) et que l'impact sur les propriétés de bronches contiguë est inconnu à ce jour. Par ailleurs, une hyperréactivité bronchique préexistante n'était pas recherchée systématiquement lors du bilan pré-opératoire en l'absence de signe clinique d'appel. Ces éléments peuvent entretenir une variabilité dans la réponse obtenue au cours des différentes étapes de l'expérimentation. Toutefois, le comportement des bronches reste globalement superposable avec un tonus basal de l'ordre de 1 gramme et une élévation de ce tonus au décours de l'application d'un stretch cyclique.

– Modèle d'organe isolé :

Le deuxième élément de différence qu'il convient de souligner est le modèle de stretch évalué. En effet, notre modèle diffère complètement de celui de P Noble et al. dans la mesure où la bronche reste ouverte aux extrémités et que la tension développée s'exerce de façon homogène sur les deux faces épithéliales. A l'inverse, l'évaluation se fait soit en isométrie, soit en isovolumétrie dans les modèles expérimentaux autres. Ainsi, en cas de stimulation sur organe isolé, la bronche isolée est fermée à ses deux extrémités. Sur l'une se trouve de façon « historique » les capteurs de pression, sur la seconde s'amarre soit une colonne de liquide de façon à générer une variation de pression interne comprise entre 5 et 30 cmH₂O, ou encore une seringue qui fait varier précisément la pression interne, soit un clip monté sur un transducer qui permet d'obtenir une élongation de la bronche. En conséquence, l'isométrie est le plus souvent

étudiée dans ce modèle et l'application de la contrainte se répartie sur l'ensemble de la paroi avec une variation potentielle de longueur et de calibre de la bronche.

L'autre différence notable est que le raisonnement des études présentées précédemment se fonde sur une bronche à l'état basal non activée, tandis que la plupart des modèles expérimentaux étudiés s'intéresse à la physiopathologie de l'hyperréactivité bronchique. Dès lors, les bronches sont préalablement activées par une préexposition à des agents induisant une bronchoconstriction tels que l'acétylcholine ou le carbachol. L'état basal est donc distinct dans ces modèles.

- Typologie du stretch / force de l'inspiration forcée.

Le type de contrainte enfin varie selon les études. Nous avons choisi l'application d'une contrainte physique « positive » de façon répétée, calibrée dans des normes physiologiques et prolongée dans le temps. La fréquence choisie, le pattern appliqué et les forces développées tentent de se rapprocher au maximum des contraintes lors de la ventilation mécanique en pression positive à pression contrôlée. A l'inverse, dans les modèles à bronches fermées, soit une élongation multiple est appliquée une dizaine de minutes soit une stimulation électrique (EFS) sert à stimuler la bronche. Dans le cas de l'élongation répétée ou plus précisément d'oscillation le régime de pression appliquée est un étirement longitudinal principalement avec un profil sinusoïde sans pose et sans modification au cours du cycle des tensions appliquées comme cela peut être rapporté sous ventilation mécanique avec des débits décélérants... En ce qui concerne la stimulation électrique, les mécanismes de réponse impliqués sont différents avec un relargage exclusif d'acétylcholine dans l'espace intercellulaire. . En cas de stimulation électrique, on assiste à un relargage précoce de médiateurs dérivés de l'acétylcholine....

Enfin, l'objectif principal de nombre d'études de Noble et al. est la compréhension du phénomène d'inspiration profonde et de la dilatation bronchique secondaire. Dès lors, ils appliquent un cycle particulier au sein d'oscillation. Cette recherche est particulièrement intéressante à la fois dans le cas particulier des bronches activées mais aussi en cas de soupir, phénomène physiologique qui mobilise un volume inspiratoire au moins double du volume courant et qui par conséquent mobilise au-delà de la CRF. En cas de ventilation mécanique, il est aujourd'hui recommandé de surimposer ce type de phénomène sur le cycle de ventilation prescrit. Enfin, l'intérêt de ces études dans la compréhension des phénomènes fonctionnels qui participent à la réactivité bronchique sont l'utilisation de techniques supplémentaires dignes d'intérêts pour de futures études telles que les techniques ultrasonores et fibroscopiques. La

contrainte inhérente est du matériel expérimental de dimension correcte et nos prélèvements sont probablement aujourd’hui non adaptés à ces techniques compte tenu d’un calibre réduit [137]([Raqeeb," Journal of Applied Physiology, 2010](#)). 155

3.3. Synthèse comparée des modèles stretch cyclique :

Tableau 3.3 : Table synoptique de stretch cyclique bronchique décrit dans la littérature depuis 2004:

Auteurs	Matériel	Contrainte appliquée	Répétition	Résultats
Kanghure et al. JAP 2004 [133]	Porc	isovolumétrique sur bronche activée	Etirement ou oscillations physiologiques pendant 5 minutes	En conditions statiques, la force développée est longueur dépendante (jusque 20% de L0) En condition de stretch, augmentation de la force développée sur bronches classique. Implication de forces passives et de recoil. Sur bronche activée, perte de résistance transitoire: bronchodilatation avec retour à un état plus contracté (hypothèse de médiateurs inflammatoire ou de réponse myogène).
Noble et al. 2004 JAP [99]	Porc	Isovolumétrique sur bronches natives et cellules musculaires lisses	Oscillation physiologiques pendant 10 min	Elévation de la force développée sous stimulation électrique après stretch cyclique non altéré par indométhacine. A l'inverse les cellules musculaires lisses isolées voient leur force diminuer.
Deng et al. JAP 2005 [138]	Chien	Elongation de cellules musculaires lisses	Elongation uniaxiale pendant 60 minutes	Une élongation répétée augmente les paramètres de rigidité de la cellule (G) et l'arrêt de la stimulation ne permet pas un retour à baseline, la cellule reste « activée ». Plusieurs voies intracellulaires sont impliquées car l'adjonction de relaxants différents ont un effet.
LaPrad et al. JAP 2008 [48]	Porc	Isovolumétrique sur bronches activées	Oscillations physiologiques pendant 20-40 minutes	L'inspiration profonde génère une relaxation dépendante de l'amplitude de pression admise mais non temps dépendante. L'arrêt de l'élongation cyclique provoque une bronchoconstriction indépendamment de l'inspiration

				profonde.
Hernandez 2008 [98]	Bovin	Isovolumétrie sur bronche activée	Elongation physiologique de 10 minutes	Démonstration du rôle des récepteurs activés par le stretch avec une inhibition médiée par les inhibiteurs calciques, le gadolinium et un neurotoxique
LaPrad et al. JAP 2008 [48]	Porc	Isovolumétrie sur bronche activée (carbachol)	Etirement ou oscillations physiologiques pendant 10 minutes	Réflexe d'inspiration profonde suivie d'une bronchodilatation puis d'une constriction. Dilatation dépendant de l'intensité d'activation préalable expliquée par les interactions intercellulaires. Constriction sous la dépendance de la relation force-longueur. Intérêt du stretch pour maintenir une ouverture de la bronche
Faisy et al. CC, 2011[112]	Bronche humaine isolée	Dilatation extra-physiologique de la bronche native (2.5fois le tonus basal)	unique	Développement d'une constriction progressive sur 10 minutes post-stretch. Implication de médiateurs pro-inflammatoires et de la voie des Rho-A kinases
LaPrad et al. JAP 2010 [56]	Bovin	Isovolumétrie sur bronches natives non activées	Elongation longitudinales d'amplitude variable de 60 minutes	Absence de modulation de la bronchorelaxation et de l'hypersensibilité bronchique quel que soit la pression appliquée sur les bronches.
Morioka et al. PlosOne 2011 [32]	Humain	Elongation de culture de cellules musculaires lisses	Elongation uniaxiale pendant 2 heures	Rôle des microtubules dans les modifications d'orientation cellulaires en cas d'étirement répété. Un inhibiteur spécifique des microtubules empêche la cellule de prendre une orientation perpendiculaire à la force d'étirement
Noble et al. JAP	Humain	Isovolumétrie sur	Elongation physiologique pendant 45	Pas de modification de la réponse bronchique à l'acétylcholine. Bronchodilatation

2011 [54]		bronches natives	minutes	puissante et transitoire (< 1minute) après l'application d'une « inspiration profonde ».	158
Di Paolo et al. 2012 [36]	Humain	Elongation de cellules alvéolaires	Stretch biaxial sur surface	Diminution élancement dépendante de l'activité Rho kinase et de la phosphorylation de la MLC phosphatase	
Krishnan et al. Am J Physiol 2012 [31]	Humain	Élongation de cellules endothéliales	Étirement uniaxial physiologique	En cas de stretch périodique, la réponse contractile augmente. Ceci est lié à une réorientation des complexes actine-myosine précédée d'une phase de fluidification et de contraction	
Lavoie et al. AJRCCM 2012 [139]	Humain	Elongation de lamelles bronchiques activées	Etirement radiaire 12/min en quatre phases (élongation, repos, rétraction, repos)	Un stretch cyclique modéré réverse significativement plus la bronchoconstriction qu'une élancement forte. Confirmation de précédents travaux sur l'inspiration profonde	

L0 : longueur de repos de la cellule musculaire ou de la bronche étudiée ; MLC : Myosin Light Chain

Table3.4: Comparaison Stretch unique à 2.5x le tonus basal et stretch multiple pendant 60 min

	Stretch unique de 5 minutes	Stretch cyclique pendant 60 min
	Tension développée (2.5 à 3 x le tonus basal) (article 1).	Tension développée (80% de la force maximale - 2.5 x le tonus basal) (articles 2 et 3)
Evolution du tonus basal		
Elévation du tonus basal	Oui	Oui
Phase de relaxation à l'arrêt de la stimulation	Oui	Non
Phase tardive dite "post-stretch"	Oui avec plateau obtenu à la 11 ^{ème} minute	Oui avec plateau obtenu à la 10ème minute
	Elévation médiane de : Non applicable	Elévation médiane de 15% après l'arrêt du stretch
Réponse à une gamme d'Acétylcholine		

Force maximale développée sous Ach $3.10E^{-3}M$	Force plus élevée qu'avant le stretch ($\Delta E_{max}: 0.22 \pm 0.20$ g)	Force plus élevée qu'avant le stretch ($\Delta E_{max}: 0.27 \pm 0.14g$)
Sensibilité à l'acétylcholine	Modification avec affinité augmentée (0.04 log)	Modification avec sensibilité augmentée dans le groupe stretch sans prétraitement (0.04 log)

Voies de signalisation impliquées

Médiateurs de l'inflammation	Oui avec sécrétion de leucotriènes	Non
Synthèse transcriptomique	Oui avec synthèse d'ARN correspondant aux voies d'activation spécifiques du poumon WNT2 et WNT7B	Faible réponse pour les gènes de l'IL8 et MMP9 impliqués dans la matrice extra-cellulaire
Rôle de l'épithélium	Oui sur l'élévation de tonus basal	Oui sur l'élévation de tonus basal
Rôle des canaux calcique et sodique	Oui en particulier via le Gadolinium et la cascade calcique intracytolsolique	Oui mais pas via les récepteurs au stretch
Rôle des inhibiteurs de MAPK et RhoK	Oui inhibition totale de l'effet stretch sur le tonus basal par les inhibiteurs des RhoA kinases	faiblement

3.4. Forces et limites des modèles

160

La principale force de ces différentes études est le matériel puisqu'il s'agit de segments distaux de bronches humaines dont les prélèvements ont permis de réaliser systématiquement des comparaisons paires (diamètre et longueur similaires). Par ailleurs, nous avons chaque fois déterminé un stimulus propre aux caractéristiques de chaque bronche en se référant soit au tonus basal de repos (**article 1**) soit au tonus basal et à la force maximale susceptible d'être développée par une exposition à de l'acétylcholine en concentration supra-thérapeutique. Enfin, il s'agit d'une étude sur "organe" isolé permettant d'explorer certains mécanismes intercellulaires ou d'interrelation avec notamment la matrice extracellulaire.

Toutefois, des limites doivent être évoquées. D'abord, cela reste un modèle artificiel d'organe isolé et particulièrement, la bronche est stimulée dans un environnement non aéré puisque plongée dans une solution de Krebs. Par conséquent, l'extrapolation de certains résultats est difficile et le rôle du surfactant totalement négligé. Par ailleurs, il s'agit d'un stretch dans le plan co-axial (radiaire) qui est non homogène puisqu'une pression plus importante va s'appliquer sur la partie en contact direct avec le transducer. Dans ce cadre, les modèles à bronches fermées avec variation du volume interne sont intéressants car la pression va s'exercer de façon homogène tout en autorisant éventuellement un étirement axial (élongation). Le schéma d'application de la contrainte sur la bronche enfin est éloigné de la ventilation spontanée ou de la ventilation mécanique car la fréquence est de 1 cycle/minute même si le rapport entre contraction et relaxation est conservé. Il n'a pas été modifié entre les deux séries de manipulation pour des raisons techniques (pour éviter notamment de dépasser l'objectif de tension par une montée en charge trop rapide) puis méthodologiques (exploration des voies de régulation évoquées lors de la mise en place du modèle). D'un point de vue méthodologique, il est possible que le choix des prétraitements ou des ARNm à encoder n'ait pas été le plus pertinent. Il s'est fait avec la littérature disponible. On peut aujourd'hui regretter de ne pas avoir testé plus nettement l'hypothèse thermodynamique découverte lors de la rédaction de l'article en exposant les bronches à un inhibiteur de l'ATP. Par ailleurs la démonstration de recrutement d'unités contractile requiert des techniques dont nous ne disposons pas mais qui pourrait représenter un vrai intérêt.

Chapitre 4

Mesure de la réactivité bronchique in-vivo

(Travail initié en collaboration avec les Hôpitaux
Universitaires de Genève)

La mécanique respiratoire fait référence aux forces résistives, élastiques et inertielles qui doivent être vaincues afin qu'un individu ou un animal puisse être ventilé tant en ventilation spontanée que mécanique. Elle est typiquement décrite par la relation entre les changements en pression, débit et volume durant un cycle respiratoire et englobe les propriétés mécaniques passives des voies aériennes, du parenchyme pulmonaire et de la paroi thoracique (passive et dynamique). Elle renseigne l'état du poumon et son comportement et représente donc une évaluation utile au clinicien. Par ailleurs, la mécanique respiratoire permet d'évaluer la progression d'une pathologie donnée, d'en établir le pronostic [140](Bates 2005 Respir Physiol Neurobiol) et d'évaluer l'efficacité des thérapeutiques prodiguées. Il est également possible de réduire significativement l'incidence et la sévérité des complications qui sont associées à la ventilation mécanique telles que les pneumothorax, l'hyperinflation mécanique, l'obstruction du tube endotrachéal... [141](Grinnan 2005 Crit care)

Nous avons pu explorer précédemment l'impact d'un stretch cyclique appliqué à des bronches isolées dans un bain d'organe. Une des limites évidentes soulignées est la perte d'un certain nombre d'interactions et de médiateurs par rapport à un modèle in-vivo. Toutefois, les technologies actuelles d'explorations de la réactivité bronchique et de la ventilation cycle par cycle est complexe et si des développements existent chez le petit animal (endoscopie, imagerie à rayons X micro focale, synchrotron), elles ne sont pas transposables encore chez l'être humain. L'objectif de ce travail est d'approcher la mécanique ventilatoire bronchique et matricielle par oscillation haute fréquence afin d'estimer in-vivo les caractéristiques de l'appareil ventilatoire. Cette technique est par ailleurs utilisable en pratique clinique et peut ainsi représenter un vrai apport dans la compréhension des phénomènes observés précédemment.

4.1. Mécanique respiratoire globale:

La respiration est un processus complexe dans lequel plusieurs forces s'opposent afin de permettre à l'air d'entrer et de sortir du poumon au cours du cycle ventilatoire. En physiologie, ces forces sont mesurées par la pression (pression = force / surface), alors que le déplacement qu'elles induisent est associé au volume (volume = surface x déplacement) et le rythme auquel ces volumes changent fait référence au débit (débit moyen = Δ volume / Δ temps). Lorsqu'un individu inspire naturellement, la musculature respiratoire se charge de

générer une dépression capable d'initier le déplacement d'un volume d'air à l'intérieur des voies aériennes. En ventilation mécanique, une pression positive est générée par le ventilateur et se mesure à l'ouverture des voies aériennes. Pour générer un tel débit de gaz, il faut s'opposer à toutes les forces résistant à l'expansion du poumon et de la paroi thoracique. Il en découle l'équation du mouvement (**Chapitre 1**), décrite par Roher en 1916, dans laquelle les trois différentes forces/pressions, rattachées aux composantes résistives (Pre), élastiques (Pel) et inertielles (Pin) de la mécanique respiratoire, s'opposent à la pression d'entrée.

$$P \text{ (cmH}_2\text{O)} = \text{Pre} + \text{Pel} + \text{Pin}$$

La résistance du système respiratoire (R) se définit comme le changement de pression ΔPre (cmH₂O) en relation avec le débit (V) en litre par seconde (1/s), alors que l'élastance (cmH₂O/l), soit l'inverse de la compliance, traduit le ΔPel (cmH₂O) en phase avec le volume (V) en litre (l). R (cmH₂O-s/l) est donné par les éléments du système respiratoire offrant une résistance au débit d'air dans voies aériennes (Raw), ainsi que par la résistance visqueuse des tissus et de la paroi thoracique. Il s'agit en fait d'une perte d'énergie sous forme de friction. Pour sa part, l'élastance (El) décroît en fonction de la compliance des poumons, de la paroi thoracique et des voies aériennes, ainsi qu'avec la compression du volume de gaz dans les poumons. Elle témoigne de la résistance des structures à se distendre et peut être vue comme l'énergie emmagasinée durant l'inspiration qui est relâchée sous forme de rappel élastique lors de l'expiration (**Figure 4.1**).

Finalement, l'inertie (In) (cmH₂O.s²/l) représente la force nécessaire pour mettre en mouvement le volume d'air présent dans les voies aériennes, ainsi que pour initier la distension de la masse tissulaire du poumon. L'équation 1 peut être réécrite en considérant la variation des composantes de la mécanique respiratoire en fonction du temps, soit au cours d'un cycle respiratoire :

$$\text{PR}(t) = \text{RR} \times V'(t) + \text{El} \times V(t) + \text{In} \times V''(t)$$

où PR est la pression respiratoire en cmH₂O, t le temps en seconde, RR la résistance du système respiratoire en cmH₂O.s/l, V' le débit en l/s, El l'élastance du système respiratoire en cmH₂O/l, V le volume en l, In l'inertance du système respiratoire en cmH₂O.s²/l et V'' l'accélération en l/s². En regard cette équation, on peut déduire V(t) et V''(t) de PR (t) et V'(t), qui représentent l'essence de la mécanique respiratoire. Comme ils varient en fonction du temps, il est d'usage de les mesurer simultanément, à l'aide d'un transducteur de pression et

d'un pneumotachographe, à l'ouverture des voies aériennes. En général, les lectures de $P(t)$ et $V'(t)$ sont ensuite transmises à un micro-ordinateur afin d'être traité à l'aide d'une transformée de Fourier. Les signaux de pression et de volume enregistrés sont digitalisés et filtrés. Le rapport du signal transformé de pression ($Pr(jw)$) et de débit ($V'(jw)$) permet de déterminer l'impédance du système respiratoire $Zr(jw)$ cmH₂O.s/l

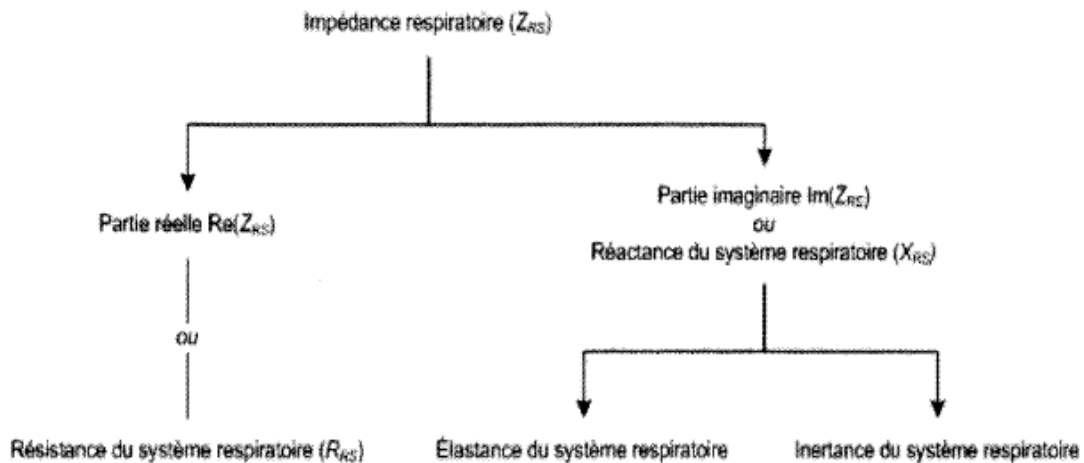
$$Zr(jw) = Pr(jw)/V'(jw)$$

Où w est la vélocité circulaire ($w=2\pi f$) et $j = \sqrt{-1}$, l'unité imaginaire.

D'un point de vue purement physiologique, l'impédance exprime la restriction globale du système respiratoire, provenant de la résistance, de l'élastance et de l'inertie du système, s'opposant au flux d'air dans les voies aériennes et à l'expansion du poumon et de la paroi thoracique. Dans les faits, il s'agit plutôt d'un nombre complexe composé d'une partie réelle et d'une partie imaginaire. En physiologie, $Im(ZRs)$ est appelée réactance du système respiratoire (XR) et $Re(ZRs)$ résistance du système respiratoire (RRS).

La résistance est certainement le paramètre de l'impédance respiratoire le plus utilisé. Il faut bien comprendre cependant que la réactance est représentée quantitativement par un seul nombre, mais est en fait la sommation de deux forces opposées dont la contribution mécanique n'est pas en phase avec le débit: celle due aux éléments élastiques du système respiratoire et celle due aux forces inertielles provenant de l'accélération des tissus et des gaz ou du liquide dans le système respiratoire. Le schéma ci-dessous permet de mieux comprendre l'interaction entre les différentes composantes de l'impédance et la façon dont elles se rapportent au système respiratoire.

Figure 4.1 : impédance du système respiratoire (Zrs) et ses deux subdivisions : la partie réelle ($Re(Zrs)$) qui traduit la résistance du système respiratoire (Rr) et la partie imaginaire ($Im(Zrs)$) ou réactance provenant des composantes élastiques et inertielles du système respiratoire.



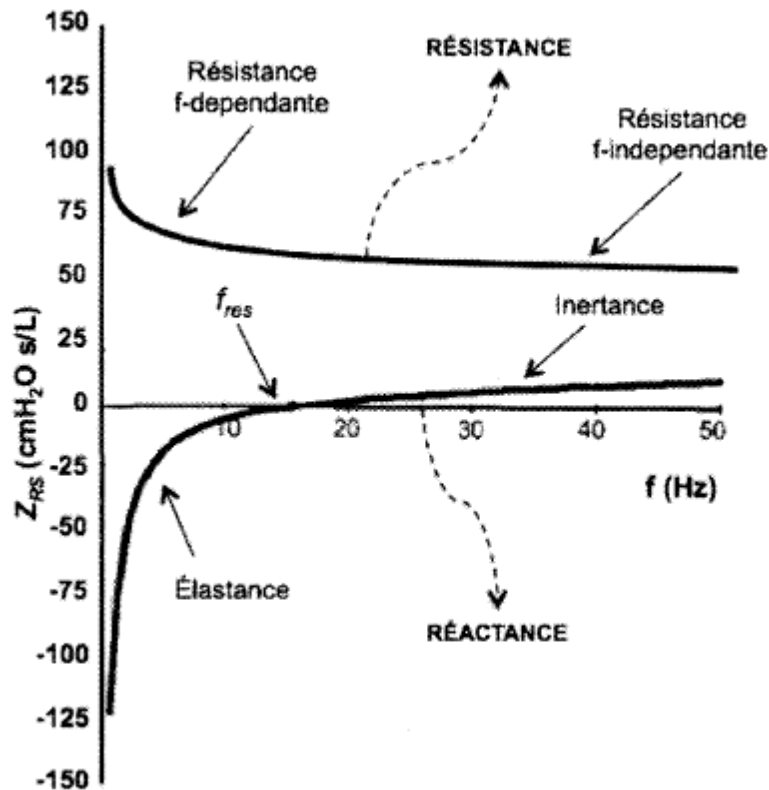
Nous avons vu précédemment que la bronchoréactivité notamment pouvait être approchée par des études expérimentales sur la cellule (épithéliale ou musculaire lisse), ou sur l'organe isolée. Une voie d'exploration très importante en clinique reste l'exploration in-vivo. Si certaines études ont été réalisées notamment chez le porc, elles requièrent une logistique complexe et ne sont guère envisageable chez l'être humain. Aussi ont été développées depuis la fin des années 1990, des techniques de mesure de la mécanique ventilatoire in-vivo, de manière peu invasive mais robuste. Elles sont aujourd'hui progressivement remplacées par des techniques d'imagerie fonctionnelles performantes. Parmi les techniques d'évaluation globale de la mécanique ventilatoire que nous avons étudiées se trouve la technique d'oscillations forcées qui permet l'évaluation des résistances et impédance pulmonaires tant de la portion médiale (bronchique et segmentaire) que périphérique (bronchiole et alvéoles).

4.2. Technique d'oscillations forcées :

La technique d'oscillation forcée -TOF est un outil puissant permettant l'évaluation expérimentale, intégrée et translationnelle de la fonction pulmonaire. Elle mesure l'impédance du système respiratoire en y appliquant des variations de pressions (oscillations) extrinsèques à basse fréquence, généralement produites par un haut-parleur. Il s'agit d'une technique non invasive pour mesurer la mécanique respiratoire d'un sujet ou

d'un patient respirant spontanément [142](Dubois, 1956 J Appl Physiol) ou avec l'aide d'un support respiratoire conventionnel. Outre son innocuité et contrairement à la plupart des tests de fonction pulmonaire (p. ex. la spirométrie), la TOF n'exige pas la collaboration active du sujet. Ces caractéristiques en font une technique de prédilection pour investiguer la mécanique respiratoire chez les nouveau-nés ou les animaux, qu'ils soient anesthésiés, curarisés et/ou ventilés. Dans sa forme la plus simple, une perturbation de TOF générerait une seule forme d'onde sinusoïdale à une fréquence bien définie. La survenue de perturbations plus complexes se composerait d'une superposition d'ondes avec une fréquence couvrant un large spectre. Or, la TOF s'appuie sur l'hypothèse que le dispositif de mesure, tout comme les propriétés de la mécanique respiratoire, demeure linéaire durant toute la durée du test. Cela implique notamment que $(ZRs(j\omega))$ est indépendant de l'amplitude de la pression oscillatoire et du débit qui en résulte. La résistance et la réactance peuvent être tracées sur un graphique en fonction de la fréquence de l'oscillation (**Figure 4.2**). La courbe de la partie réelle de l'impédance, soit la résistance, est toujours positive quelle que soit la fréquence, alors que la partie imaginaire, ou réactance, est négative pour les fréquences inférieures à f_{res} , mais positive pour les fréquences supérieures à f_{res} . Cette particularité permet de faire la distinction graphique entre les deux composantes de la réactance : Pélastance représente la partie d' $\text{Im}(Zrs) < 0$, tandis que l'inertance représente la partie d' $\text{Im}(Zrs) > 0$.

Figure 4.2: Graphique de l'impédance respiratoire (ZRS) en fonction de la fréquence (J), sur un spectre de 0 à 50 Hz. La courbe du haut représente la partie réelle de l'impédance $\text{Re}(ZKS)$ et renferme l'information concernant la résistance du système respiratoire. La partie fréquence-dépendante de la résistance appartient au parenchyme alors que la partie fréquence-indépendante reflète la résistance des voies aériennes centrales. La courbe du bas représente la partie imaginaire de l'impédance $\text{Im}(Z^A)$, soit la réactance du système respiratoire. La partie à gauche de la fréquence de résonance (f_{res}) correspond à l'élastance alors que la partie à droite de f_{res} correspond à l'inertance.



L'importance des comportements fréquence-dépendants de la courbe de résistance et de compliance a été décrite pour la première fois par Grimby pour identifier l'accroissement de la résistance au passage de l'air dans les voies aériennes chez les patients souffrant de maladie pulmonaire obstructive chronique [143]([Grimby 1968 J Clin Invest](#)). En fait, en appliquant successivement plusieurs sinusoïdales de fréquences différentes de façon aléatoire tout en maintenant constant la pression moyenne transpulmonaire, il est possible de mettre en évidence la fréquence de résonance et les comportements fréquence-dépendants de la résistance et de la réactance. L'utilisation de multiples fréquences permet de visualiser et de séparer le comportement fréquence-indépendant des voies respiratoires centrales, du comportement fréquence-dépendant du parenchyme pulmonaire et des petites voies périphériques [144]([Di Mango 2006](#)). Il est également essentiel d'utiliser un spectre d'oscillations à basse fréquence puisque ces dernières peuvent être transmises plus profondément dans l'arbre pulmonaire. Cette méthode de mesure de la mécanique respiratoire est donc de très grand intérêt, en physiologie comme en médecine. Lorsque le sujet est en proie à une obstruction centrale, Raw augmente de façon très rapide et masque la partie fréquence-dépendante de la courbe comptant pour la contribution tissulaire de la

résistance pulmonaire, composante tissulaire aussi appelée G . L'augmentation de la résistance des voies aériennes périphériques contribue pour sa part aux paramètres G et, par conséquent, accentue la fréquence-dépendance de $Re(Zrs)$. Si toutes les voies aériennes périphériques sont constrictées de façon homogène, $Re(Zrs)$ est simplement augmenté (translation verticale de la courbe) sans changer la fréquence-dépendance à basse fréquence. Enfin H est une grandeur qui renseigne sur l'élastance du système.

La TOF basse fréquence est également sensible aux changements d'impédance secondaire à une bronchodilatation ou une bronchoconstriction induite par la méthacholine (MCh), notamment chez différents modèles animaux [145, 146] (Kaczka, 2009 J Appl Physiol; Petak, 1997). Les effets de la MCh dépendent grandement de la voie d'administration du bronchoconstricteur : intraveineux versus inhale [147](Bayat, 2009 AJRCCM). L'influence de la bronchoconstriction sur les paramètres IRS, G , H , et Raw est primordiale afin de permettre la séparation de la mécanique pulmonaire du parenchyme et des voies respiratoires. Les plus récentes études suggèrent que l'infusion continue de MCh augmenterait Raw dans une plus grande proportion que G , sans toutefois influencer significativement IRS et H . Par opposition, la MCh en aérosol affecterait davantage la périphérie du poumon et se répercuterait principalement sur les propriétés viscoélastiques du parenchyme (G et H) et, à un moindre degré, sur les voies respiratoires (Raw)

4.3. Mécanique bronchique et Hypertension pulmonaire sur un modèle de lapin (HUG Genève)

Le syndrome de défaillance respiratoire aigüe, dont la définition a été revue récemment selon les critères de Berlin [61](Fanelli, 2013 Am Thorac Dis), est encore grevée d'une mortalité importante tant chez l'adulte que l'enfant malgré les progrès dans la connaissance des lésions induites par la maladie causale mais aussi celles liées à la ventilation mécanique. Une des caractéristiques de cette pathologie est l'apparition de zones de shunt majeures secondaires à la formation d'atélectasies ou de comblement alvéolaire (œdème alvéolaire lésionnel) et à l'altération fonctionnelle des territoires capillaires associées à une défaillance des réponses telles que la vasoconstriction régionale hypoxique. La place des manœuvres de recrutement alvéolaire en pressurant l'arbre

respiratoire tout au long du cycle ventilatoire (application notamment d'une pression expiratoire positive suffisante) est une technique largement étudiée. Or un certain nombre de patients présentent concomitamment à leur atteinte pulmonaire une hypertension artérielle pulmonaire. Cette dernière peut être soit primitive soit secondaire au SDRA et provoquée par les altérations lésionnelles des territoires capillaires ou par une réponse physiologique chronique à l'hypoxémie qu'est la vasoconstriction régionale hypoxémique. Ce phénomène est propre au territoire vasculaire pulmonaire et provoque une vasoconstriction des territoires capillaires en regard de zones alvéolaires qui ne participent plus de façon efficace aux échanges gazeux. La vasoconstriction pulmonaire hypoxique n'intéresse que les petites artères pulmonaires, de calibre inférieur à 300 μm , situées au niveau des bronchioles terminales. Le mécanisme d'action de la vasoconstriction pulmonaire hypoxique n'est pas connu avec précision. Des études réalisées sur des artères pulmonaires isolées ont démontré que tous les acteurs de la réponse (capteur, transmetteur, et effecteur) sont présents dans la paroi des artères pulmonaires. Le mécanisme de détection du signal « hypoxie » reste hypothétique ; une des hypothèses proposées est que l'hypoxie serait détectée par une enzyme oxygénodépendante (oxygénase ou oxydase par exemple). Une dépolarisation membranaire serait responsable de l'entrée intracellulaire de calcium conduisant à la contraction du muscle lisse. Aucune des substances proposées successivement comme médiateur de la vasoconstriction pulmonaire hypoxique n'a été finalement retenue. En revanche, certaines de ces substances, synthétisées par l'endothélium vasculaire pulmonaire, sont impliquées dans la régulation de la vasoconstriction pulmonaire hypoxique : le monoxyde d'azote (NO), l'endothéline, et certaines prostaglandines (PGF2a, PGE2, PGD2, PGI2).

L'objectif de cette étude était de rendre compte de l'influence de l'hypertension artérielle pulmonaire sur la mécanique respiratoire par FOT chez les sujets atteints de SDRA au cours de manœuvres de recrutement. Le modèle expérimental choisi est le lapin.

4.3.1. Méthode :

Conformément aux recommandations de protection des animaux, nous avons étudié 22 lapins New-Zealand d'environ 2,5 kg répartis en deux bras : lapins contrôle ou lapins atteint

d'HTAP induite par l'administration de monocrotaline 3 semaines auparavant et dont l'atteinte était confirmée par une échographie trans-thoracique pré-expérimentale.

Au cours de l'expérimentation, les animaux étaient maintenus sous anesthésie générale avec une ventilation mécanique assurée par une trachéotomie chirurgicale. Un Syndrome Alvéolaire Aigü Lésionnel était induit dans chaque groupe par plusieurs lavages alvéolaires consécutifs avec une solution saline (5 lavages à 20 ml/kg) afin de provoquer une altération significative du surfactant et un syndrome lésionnel direct. Le monitoring consistait en une mesure continue de la pression artérielle invasive par un cathéter artériel jugulaire et par une sonde d'admittance (Avantage, Transonic Scisense Inc.) placée dans le ventricule droit et qui renseignait en temps réel des pressions intra-cavitaires et des volumes éjectionnels permettant ainsi le recueil du débit cardiaque. Concernant les mesures de la mécanique respiratoire, la pression trachéale était mesurée en continue par pneumotachographe tandis qu'on réalisait à chaque étape de l'expérimentation des mesures par technique d'oscillation forcée de façon à obtenir les résistances globales de l'arbre trachéo-bronchique (R_{aw}), l'élastance du système (l_{aw}) et les parts respectives revenant au compartiment central ou périphérique (G et H). De plus, une mesure du volume pulmonaire résiduel en fin d'expiration était effectuée par une technique de Fick différentiel reposant sur le CO₂ expiré [148](Albu, 2013 Anesthesiology).

4.3.2 Article soumis

Concurrent effects of recruitment manoeuvres and PEEP on cardiorespiratory function in an experimental model of lung injury and pulmonary hypertension

171

Camille Doras¹, Morgan Le Guen², Ferenc Peták³ and Walid Habre¹

Institutions:

¹*Division of Anaesthesiology Investigation, University of Geneva, Geneva, Switzerland*

²*Department of Anaesthesiology, Hospital Foch, University Versailles Saint-Quentin en Yvelines, Suresnes, France*

³*Department of Medical Physics and Informatics, University of Szeged, Szeged, Hungary*

Corresponding Author:

Funding:

Acknowledgements:

Abbreviated Title:

Word count: Abstract: ; Introduction: ; Discussion:

Abstract

Introduction

Several pathophysiological mechanisms contribute to the development of atelectasis during mechanical ventilation with consecutive loss of lung volume and hypoxia [149]. The promoted ventilation strategy “open the lung and keep it open” [150] is based on the application of recruitment manoeuvres (RM) followed by the maintenance of a positive end-expiratory pressure (PEEP) [151]. Several techniques of RM are discussed in the literature but they all consist in achieving, repeatedly and for a specified period of time, an insufflation pressure corresponding to the total lung capacity [152-155].

Acute respiratory distress syndrome (ARDS) is a pathologic entity where pulmonary capillaries are damaged by increased permeability [156] and alveoli compressed by diffuse oedema and inflammation. In the presence of ARDS, lung-protective ventilation strategy designed to open the lung is of paramount to maintain effective lung volume and oxygenation [157]. Thus high PEEP and RM may benefit to patients maintained on ventilatory support for the treatment of all spectrum of ARDS, including acute lung injury (ALI) [158-163]. However, high PEEP and RM both increase intrathoracic pressure. One risk is to create alveolar overdistension, thereby creating dead space. Another limit is to compromise the venous return, thereby counteracting the haemodynamic balance [164-166]. The right circulation is specially exposed with a risk for alteration in pulmonary afterload, cardiac output, stroke volume and in PaO_2 and PaCO_2 [159, 167, 168]. Because of capillary lesions, ARDS can be complicated with pulmonary arterial hypertension (PHT) [169, 170], where right heart function is already altered. Thus we can expect major haemodynamic and respiratory effects of open lung strategy during concomitant ALI and PHT [171].

Therefore, we aimed at characterizing the effects of RM and PEEP on cardiorespiratory function during lavage-induced surfactant depleted lung injury in an experimental model of PHT, in anesthetized and ventilated rabbits.

Materials and methods

Animal Preparation

All experiments and procedures were conducted under the agreement of the Swiss animal welfare committee (Geneva Cantonal Veterinary Office, registration number 1051/3890/2). 22 New Zealand rabbits (3.1 ± 0.1 kg) were randomly assigned into 2 groups, control (CTRL) or developing a post-capillary pulmonary arterial hypertension (PHT). In the latter, PHT was induced by a single intravenous dose of 60 mg/kg of monocrotaline (Sigma-Aldrich), prepared in acidized PBS with adjusted pH around 7.4 [172-176]. 21 days later, the animals were enrolled into the final blinded procedure (figure 1).

All animals were premedicated with xylazine 2% (5 mg/kg) administered intramuscularly. After 10-15 minutes, anesthesia was induced by intravenous injection of midazolam diluted to 0.2% (3-6 mg/kg) via a catheter introduced into an ear vein. The animals were then oxygenated and tracheotomised after local anesthesia (Xylocaine 0.5% 1 mL subcutaneously) and mechanically ventilated with

pressure-regulated volume control (PRVC) mode, with a target tidal volume of 5 to 7 ml/kg, thanks to a neonatal ventilator equipped with an additional software (Servo-I, Maquet Critical Care, Solna Sweden). Respiratory rate was set around 30-40/min with an inspiration/expiration ratio of 1:2, in order to obtain an end-tidal carbon dioxide (etCO₂) of 4,5-6,5%. The inspired oxygen fraction (FiO₂) was set to 40% at baseline. The positive end expiratory pressure (PEEP) was set at 3 cmH₂O during surgery. Anesthesia was maintained throughout the experiment by a continuous infusion of a mixture of midazolam (0.6-0.75 mg/kg/h), fentanyl (20-25 µg/kg/h) and atracurium besilate (1-1.25 mg/kg/h) conveyed in 0.9% NaCl. The left carotid artery and the right jugular vein were smoothly dissected and a 20 gauge catheter was introduced in each vessel, prolonged by a three way tap connector, one way dedicated for blood sampling and the other way linked to a pressure transducer, to monitor the central arterial and central venous pressures respectively. Body temperature was continuously controlled and maintained around 38-39°C thanks to a heating pad. Electrocardiogram, blood and tracheal pressures and right ventricular PV loops were continuously collected and recorded via PowerLab data acquisition hardware, and computerized with LabChart software (ADInstrument). Low frequency forced oscillatory respiratory mechanics, venous and arterial blood gas (VetScan i-STAT1 Handheld Analyser with EG6+ cartridge) and effective lung volume were collected and registered at specified time points as described thereafter.

Study Protocol

The experimental protocol (figure 1) consisted of four conditions, baseline (BASAL) and acute lung injury (ALI) with low (3 cmH₂O) or high (9 cmH₂O) PEEP. The two PEEP were applied in a randomised chronologic order. Data were collected before and after recruitment manoeuvres (RM), throughout baseline and ALI conditions and during PEEP3 and PEEP9. After reaching steady-state conditions while rabbits were ventilated with random PEEP, a standard lung volume history was established by delivering two sighs to a pressure limit of 30 cmH₂O and holding for 5 seconds. Period 1: Five minutes later, experimental data were collected and considered as *baseline before RM*. Standardized RM were then performed in pressure control mode, as 3 hyperinflations (inspiratory pause) of 27 cmH₂O above PEEP (safe plateau pressure for right ventricle especially during ARDS [177]) during 5 seconds, every 10 seconds. Period 2: data were collected 1 min after RM as *baseline after RM*. Periods 3 and 4: same as periods 1 and 2 but with the second PEEP. Then an ALI was induced by whole-lung lavage with 0.9% NaCl solution heated at 38°C, with a volume of 20ml/kg instilled 5 times at 5 minutes interval via the endotracheal tube by gentle mechanical push. Lung fluid was then withdrawn by gentle manual suctioning and measured. This procedure was validated as creating an important surfactant depletion and alveolar collapse by synchrotron imaging (published elsewhere). Following lavage, FiO₂ was increased to 60% and respiratory rate raised if needed, to maintain adequate gas exchange with PaO₂ > 10 kPa and PaCO₂ of less than 6 kPa. Finally the animal was stabilized for 15 min. Periods 5 to 8 were similar to 1 to 4, with a new randomized order in PEEP. At the end of the experiment the heart-lung block was removed and stored in neutral buffered formalin for subsequent analyses.

Right ventricle haemodynamics

174

An admittance catheter (Scisense 3.5F Medium Rabbit Variable segment length, Transonic) was placed into the right heart ventricle via the right jugular vein and connected to a dedicated signal conditioner system (Scisense ADVantage Pressure-Volume control unit, ADV500 System, Transonic), itself linked to PowerLab data acquisition unit. The magnitude and phase of the electrical admittance as well as the right ventricle pressure and volume were continuously monitored and analyzed on LabChart software (ADInstrument). Right ventricle pressure and volume at the end of the diastole and at the end of the systole were extracted from the record over specified period of time as average cyclic peak values (min or max depending on the heart cycle). Stroke volume was obtained in subtracting end systolic volume from end diastolic volume, cardiac index was calculated as the product of the stroke volume multiplied by the heart rate and the body weight, ejection fraction was the stroke volume divided by the end diastolic volume and stroke work was the stroke volume multiplied by mean arterial pressure. All these parameters were normalized by the body weight when appropriate.

Respiratory mechanical measurements

The input impedance spectra of the respiratory system (Z_{rs}) in the rabbits was measured using a method previously described [178, 179]. In brief, the tracheal cannula was connected to a loudspeaker-in-box system at end expiration, which was pressurized to the level of PEEP to maintain the mean transpulmonary pressure constant during measurements. Small-amplitude pseudorandom signal (15 non integer multiples between 0.5 and 21 Hz) was generated by a loudspeaker and was led through a screen pneumo-tachograph (11-mm ID) connected to a differential pressure transducer (model 33NA002D; ICSensors, Milpitas, CA) to measure tracheal airflow (V'). Another pressure transducer connected to a side-port of the endotracheal tube with identical type was used to measure the airway opening pressure (P_{ao}). Z_{rs} ($Z_{rs} = P_{ao}/V'$) was calculated by Fast Fourier transformation with 4-s time windows and 95% overlapping from the 10-s long recordings. To separate airway and respiratory tissue mechanics from Z_{rs} spectra, a model containing frequency-independent airway resistance (R_{aw}) and inertance (I_{aw}), in series with a constant-phase tissue model [180] including damping (G) and elastance (H) was fitted to Z_{rs} by means of a global optimization procedure. As previously established, R_{aw} reflects mainly the flow resistance of the airways, I_{aw} is related to the cyclic acceleration and deceleration of the intra-thoracic gas, G describes the energy loss within the respiratory tissues (resistance) whereas H characterizes the energy storage capacity of the respiratory tissues (elastance). The reported R_{aw} and I_{aw} values were corrected by removing tracheal setup contribution.

Measurement of effective lung volume by Differential Fick Method

Effective lung volume (ELV), the lung volume taking part into CO₂ gas exchange, was calculated using the differential Fick equation, according to a method described elsewhere [148]. Briefly the additional software in the ventilator creates periods of five consecutive alterations in inspiratory/expiratory ratio (1:2-1.5:1) by varying the inspiratory pause. This alternating breathing pattern causes a variation in etCO₂ of approximately 0.5–1.0 kPa. Rabbit flow and expired CO₂ are measured by the ordinary Y-piece flow sensor and the main stream CO₂-transducer in Servo-i. Flow and CO₂ data from Servo-i are exported to a laptop with a specially designed software application written in Matlab™ (Mathworks, Natick, MA). By measuring and calculating the dynamic transient changes in CO₂ and elimination between each breath it is possible to use the differential Fick method continuously to determine ELV, which is the gas volume in the lung at end of expiration including the airway volume up to the location of the carbon dioxide sensor.

Histological:

Statistical Analyses

Individual data points and groups means with standard error values are reported. Normal distribution was verified with the Shapiro-Wilk test and parametric or non-parametric comparison tests applied where appropriate. Comparisons between control and PHT after RM at baseline were made with unpaired student t test. The significance of relative change in values before and after RM was tested with Wilcoxon Signed Rank Test compared to a theoretical median of 0. Two-way repeated measures ANOVA with Holm-Sidak all pairwise multiple post-test was used to compare relative change after RM between groups and conditions within each PEEP. Three-way ANOVA were performed to analyse the effect of the three parameters (PHT, ALI and PEEP) on relative variation following RM within parameters. The statistical tests were performed with SigmaPlot (Version 12.5, Systat Software, Inc.) or Prism (version 6, GraphPad Software Inc.).

Results

Model validation

Data analysed were those harvested 1 minute after RM at PEEP₃, to have the same lung volume history during basal conditions in all animals. Monocrotaline administration induced pulmonary arterial hypertension with significant increase in respiratory elastance, tissue damping and increase in right end diastolic pressure (H in cmH₂O/L 272,1±13,6 vs. 331,7±19,6 p=0,028; G in cmH₂O/L 72,6±6,7 vs. 94,2±4,4 p=0,015; EDP in mmHg 2,1±0,4 vs. 5,4±1,7 p=0,015; CTRL vs. PHT respectively). However for most of the sick animals, cardiac index and stroke volume were not compromised in the same conditions (CI in mL/min/kg 30,5±4,5 vs. 52,8±17,7 ns; SV in mL/kg 0,15±0,02 vs. 0,21±0,06 ns).

Surfactant depletion by lung lavage resulted in gas exchange alteration both in CTRL and PHT rabbits, with a significant decrease in arterial oxygen partial pressure/inspired oxygen fraction ratio

($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) and in venous oxygen saturation (SvO_2) and a significant increase in arterial carbon dioxide partial pressure (PaCO_2) (table 1). Effective lung volume was also significantly decreased and lung compliance was reduced, as shown by a significant increase in G and H (table 1). However, despite the deleterious consequences of ALI on blood gases and lung parameters, cardiac index and stroke volume were not significantly modified by ALI in all groups (table 1).

Effects of Recruitment Manoeuvres and PEEP

Table 2 summarizes the percentages of relative change after RM, statistically compared to a theoretical median of zero. Figure 2 depicts haemodynamic changes during RM. Figure 3-4 and 5-6 represent respectively respiratory mechanics and blood gas changes during RM.

In non-injured lungs

(Figures 2-6, control animals represented by black circle)

In basal conditions, following RM at PEEP3, none of the haemodynamic parameters were modified, neither systemic nor relating to the right heart (fig2), whereas respiratory elastance ($-9,2 \pm 2,7\%$ ## $p=0,008$; fig3-4) and PaCO_2 ($-6,0 \pm 2,0\%$ # $p=0,03$; fig5-6) were significantly decreased. This result confirmed thereby the haemodynamic innocuousness versus the respiratory efficiency of our recruitment strategy in “normal” condition. At PEEP9 in control animals, RM induced the same effect than at PEEP3, *i.e.* no impact on the haemodynamic function and a significant decrease in H ($-9,0 \pm 1,2\%$ ## $p=0,008$). However at PEEP9, RM led on the contrary to an unexpected increase in PaCO_2 ($7,0 \pm 3,3\%$; significantly different from PEEP3 $p=0,03$; fig6) and during PEEP9 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ dropped under 300 mmHg ($221,0 \pm 59,1$ and $215,2 \pm 59,4$ mmHg before and after RM, respectively, fig5). Thus at PEEP9 the healthy animals showed signs of alveolar overdistension and this was worsened during RM.

Message = no RM at PEEP9

In non-injured lungs with concomitant PHT

(Figures 2-6, PHT animals represented by black triangle)

In absence of lung injuries, results were slightly similar between PHT and control rabbits, except that there were some haemodynamic repercussions at PEEP3. That is, following RM at PEEP3, there was a significant increase in heart rate and end diastolic pressure ($5,4 \pm 2,0\%$ # $p=0,03$ and $22,6 \pm 12,2\%$ # $p=0,03$ respectively, fig2). Nevertheless the cardiac function was not compromised as stroke volume and cardiac index remained stable. In the same time, respiratory elastance was significantly improved ($-12,0 \pm 3,5\%$ ## $p=0,004$) and PaCO_2 tended to ameliorate ($-7,8 \pm 4,0\%$ # ns). Here again, it shows that RM are safe and useful at low PEEP in non-injured lungs, even in the presence of a clinical non-complicated PHT. In PHT rabbits as in controls however, whereas PEEP9 and RM had a neutral impact on the haemodynamic function and a positive impact on H ($-12,3 \pm 1,1\%$ ## $p=0,004$), it induced a pejorative increase in PaCO_2 ($6,3 \pm 4,2\%$; significantly different from PEEP3 $p=0,006$) and

during PEEP9, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ also dropped around 300 mmHg ($290,8 \pm 50,0$ and $301,9 \pm 50,1$ mmHg before and after RM, respectively, fig5). Thus at PEEP9, even in the presence of PHT, animals showed signs of alveolar overdistension and this was worsened during RM.

In injured lungs

(Figures 2-6, control ALI animals represented by open circle)

Following surfactant depletion by lung lavage, RM in control ALI rabbits ventilated with PEEP3 impacted some haemodynamic, respiratory and gaseous parameters. After RM heart rate increased whereas mean arterial pressure decreased ($8,3 \pm 3,6\%$ # $p=0,05$ and $-3,8 \pm 1,9\%$ # $p=0,05$ respectively, fig2), but SV and CI were unaffected. Especially, RM induced a marked increase in respiratory H (control ALI $6,9 \pm 7,0\%$ ns, significantly different from control $p=0,002$, control ALI PEEP9 $p=0,0006$ and PHT ALI $p=0,003$; fig4) and a significant decrease in SvO_2 ($-18,3 \pm 5,2\%$ # $p=0,03$ significantly different from control $p=0,006$, control ALI PEEP9 $p=0,005$ and PHT ALI $p=0,01$; fig6). Thus at PEEP3, in the presence of ALI, RM can worsen respiratory compliance and oxygen supply. On the contrary, RM during PEEP9 were beneficial in control ALI animals, with no repercussion on haemodynamic function (fig2) and a significant improvement in H and PaCO_2 ($-10,8 \pm 1,5\%$ ## $p=0,008$ and $-5,3 \pm 1,0\%$ ## $p=0,004$ respectively).

In injured lungs with concomitant PHT

(Figures 2-6, PHT ALI animals represented by open triangle)

As in control rabbits during ALI at PEEP3, RM in PHT rabbits led to increased heart rate and decreased MAP ($16,0 \pm 6,1\%$ # $p=0,04$ and $-3,2 \pm 1,4\%$ # $p=0,05$ respectively, fig2) but SV and CI were still preserved. Otherwise, RM were beneficial over respiratory G and H ($-8,7 \pm 4,1\%$ # $p=0,04$ and $-9,6 \pm 2,4\%$ ## $p=0,01$ respectively) and did not affect gas exchanges. Thus if RM were detrimental during ALI and PEEP3 on respiratory mechanics and oxygen supply (SvO_2) in control animals, it was not the case in PHT animals. Finally RM at PEEP9 were even more beneficial in PHT rabbits than at PEEP3, as they induced no haemodynamic and gaseous variations, together with a respiratory compliance improvement (G $-15,0 \pm 2,5\%$ ## $p=0,004$ and H $-8,5,3 \pm 3,1\%$ # $p=0,04$).

Discussion

Model validation

In our experiment, 3 weeks after being treated with monocrotaline, rabbits developed a post-capillary PHT with significant increase in respiratory elastance, tissue damping and right end diastolic pressure, compared to control animals. However, we did not find any macroscopic modification of the heart wall (no hypertrophy of the right ventricle; data not shown) and the haemodynamic function was maintained in PHT animals, as shown by the lack of significant difference in cardiac

index and stroke volume, compared to controls. Thus at this early stage, the developing PHT was still hemodynamically compensated in basal conditions (PEEP3).

Moreover in basal conditions after lung lavage, rabbits from both groups showed clinical gasometrical and respiratory signs expected for a mild ARDS according to the Berlin definition [181]. That is, gas exchanges were dramatically compromised with a significant decrease in SvO_2 , despite the fact that FiO_2 was set to 60% after lavage, and a significant increase in $PaCO_2$. The PaO_2/FiO_2 ratio dropped nearly 200 mmHg. ELV and lung compliance were also significantly decreased. Haemodynamic function was still preserved and therefore blood gas alterations can be linked to lung lesions provoked by surfactant depletion.

Effects of Recruitment Manoeuvres and PEEP in *non-injured lungs, control and PHT animals*

During conventional ventilation with PEEP3, in animals presenting non-injured lung and even in presence of PHT, we showed that RM were beneficial on respiratory compliance and gas exchanges, whereas innocuous for the haemodynamic balance. Indeed heart rate and end diastolic pressure rose in PHT rabbits, due to an increased pulmonary afterload during RM, but the cardiac function was overall not compromised. Extrapolated from rabbits with all necessary precautions, RM in low PEEP ventilation can be therefore considered as a good and safe open lung strategy for non-injured lungs.

With PEEP9 ventilation however, we observed in both control and PHT animals a marked drop in PaO_2/FiO_2 under 300 mmHg. Moreover $PaCO_2$ increased following RM in both control and PHT groups. This gas exchange alteration signed an alveolar overdistension, where transpulmonary overpressure and hyperinflations compressed capillaries, thereby creating ventilated but non-perfused areas (dead space). Thus in individuals with no objective signs of lung injury, high PEEP should be carefully considered for open lung strategy and the concomitant use of a high PEEP and RM should be avoided. This interpretation is besides in accordance with clinical observations.

Effects of Recruitment Manoeuvres and PEEP in *injured lungs, control and PHT animals*

Haemodynamics

As already seen, RM can compromise the venous return to the heart in elevating the pressure inside the chest. In basal conditions with PEEP3, we only observed haemodynamic modifications in pathologic context, that is to say during PHT and/or ALI, but with no repercussion on global cardiac function. Therefore the increased heart rate and the decreased arterial pressure we observed during ALI can be considered as adaptive response. This response was less obviously observed at PEEP9 than at PEEP3. With high PEEP, the increased intrathoracic pressure led to a decrease in right ventricle compliance and an increase in pulmonary artery afterload, therefore decreasing the capability of the

heart to adapt. Variations possibilities were reduced, along with relative change in HR, MAP and EDP. Moreover at PEEP9, haemodynamic parameters could have also reached the limits of their physiologic range. Finally and again, the heart function of our rabbits did well tolerate RM, despite their respiratory disorders.

Respiration

In control animals suffering from ALI and ventilated with PEEP3, respiratory elastance and SvO_2 were dramatically compromised after RM. With low PEEP, we assume that ALI caused an important ventilatory inhomogeneity due to the presence of liquid, along with alveolar closure in some parts of the lung. Recruitment hyperinflations failed in reopening the most severely affected areas, which remained atelectatic, while the other spared parts encountered overdistension. Thus the alteration of respiratory compliance and oxygen supply following RM was due to this regional heterogeneity and overdistension. Therefore low PEEP should not be applied in presence of ARDS.

Besides, the least impact of ALI on gas exchange and respiratory mechanics at PEEP9 confirmed the therapeutic properties of high PEEP in managing ALI, including in a PHT context. The benefit of PEEP9 can be attributed to the improvement of the ventilatory homogeneity and prevention of pulmonary shunt during ALI. Moreover with high PEEP, RM further ameliorated gas exchange and lung parameters. High PEEP and RM are together the proper treatment for ALI.

Now if focusing on PHT animals with ALI ventilated with PEEP3, we observed that they did not encounter the pejorative effects of RM on H and SvO_2 , compared to control. Rather RM were beneficial in their case, on H particularly. Thus there were properties in the pulmonary wall structure of our post-capillary PHT rabbits that somehow protected lungs against lavage induced injury.

“Protective” role of PHT

In this study, we observed some parameters for which PHT seemed to be unexpectedly a more favourable condition than control.

First of all at steady state, we can notice that $PaCO_2$ and ELV were always respectively lower and higher in PHT than in control animals (but non-significantly), whatever the condition (suppl. data fig. 7). However this was not a beneficial effect of PHT, but the simple fact that hypertensive animals breathed with a higher functional residual capacity than controls, as their decreased respiratory compliance introduced a shift toward the balance between pulmonary retraction versus thoracic expansion forces.

Then as already mentioned, in rabbits experiencing ALI and ventilated with PEEP3, RM worsened H and SvO_2 in control but not in PHT group. The presence of concomitant PHT has then constituted an improvement. Following RM at low PEEP during ALI, we assumed that some areas remained atelectatic, whereas others were overdistended, due to lung inhomogeneity. We think that PHT can protect against regional alveolar overdistension because PHT increases the stiffness of the lung, for structural and haemodynamic reasons. On the one hand there is a thickening of the microvasculature

walls, either in human PHT as in the monocrotaline PHT model [175]. Like in literature [174, 182-184], we have found in hypertensive lungs vessels some histologic evidences of external layers (media and adventice) hypertrophy and hyperplasia with further cross-sectional area restriction (suppl. data fig. 8). On the other hand higher pulmonary arterial pressure induces increase in H because haemodynamics and lung tissue mechanics are intimately linked [185, 186]. Therefore, we suggest that in monocrotaline PHT rabbits, the stiffening of arterial wall along with the lowest respiratory compliance linked to increased pulmonary vascular pressure, offered greater mechanical tensile strength to the alveolar capillary barrier and protection against the stress failure of RM during ALI.

Kornecki *et al.* also showed in rats that induced VILI were higher in the normotensive *versus* the hypertensive groups, in terms of worsening of oxygenation, compliance, and oedema [187]. There are some similarities between ALI and VILI in the sense that mechanical strains play a key role in their pathogenesis in contributing to alveolo-capillary barrier dysfunction [170, 187-189]. This study is thus in line with the hypothesis that PHT protects lungs against mechanical strains.

“Pejorative” role of PHT

As positive-pressure lung inflation and recruitment manoeuvres may compromise the pulmonary haemodynamic conditions, mainly through compression of the pulmonary vessels, we expected some pulmonary haemodynamic impact in PHT animals. Among a combination of pathologic situations comprising normotensive or hypertensive lung with or without ALI, PHT was initially thought to be the worse. We also expected the loss of compliance during ALI to preserve the haemodynamic balance during increased transpulmonary pressure due to RM. Nevertheless we showed that PHT in rabbits does not aggravate the RM-induced but short-lasting increases in heart rate, end-diastolic pressure and decrease in systemic pressure, neither did compromise cardiac output, at any PEEP. Yet our rabbits presented a clinical PHT with lower lung compliance and increased end diastolic pressure but no right ventricle hypertrophy. This let us say that our animals did not suffer from a sufficiently advanced stage of PHT to highlight a right heart failure. Maybe we should have wait more than 3 weeks to see more deleterious effect of RM on right heart function. However, others have shown that adverse circulatory effects of RM are not aggravated during PHT in pigs [166] and in children susceptible to pulmonary hypertensive episodes after open heart surgery [190].

Conclusion

In this work we showed the consistency of clinical practice in open-lung ventilation strategy with experimental results. Thus in individuals with no objective signs of lung injury, RM in low PEEP ventilation can be considered as a good and safe recruitment strategy, whereas high PEEP should be carefully applied and the concomitant use of high PEEP and RM avoided. Furthermore in presence of

mild ARDS, low PEEP should not be applied whereas high PEEP and RM are together the proper treatment for ALI.

Besides, we first expected some pulmonary haemodynamic impact in PHT animals during positive-pressure lung inflation and recruitment manoeuvres, instead of what PHT was a protective condition for ALI against gaseous and mechanical consequences of lung inhomogeneity due to low PEEP during RM.

Bibliography

- Albu, G., M. Wallin, et al. (2013). "Comparison of static end-expiratory and effective lung volumes for gas exchange in healthy and surfactant-depleted lungs." *Anesthesiology* **119**(1): 101-110.
- Amato, M. B., C. S. Barbas, et al. (1998). "Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome." *N Engl J Med* **338**(6): 347-354.
- Amorim, E. D., V. A. Guimaraes, et al. (2014). "Alveolar recruitment manoeuvre is safe in children prone to pulmonary hypertensive crises following open heart surgery: a pilot study." *Interact Cardiovasc Thorac Surg*.
- Badet, M., F. Bayle, et al. (2009). "Comparison of optimal positive end-expiratory pressure and recruitment maneuvers during lung-protective mechanical ventilation in patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome." *Respir Care* **54**(7): 847-854.
- Biondi, J. W., D. S. Schulman, et al. (1988). "The effect of incremental positive end-expiratory pressure on right ventricular hemodynamics and ejection fraction." *Anesth Analg* **67**(2): 144-151.
- Daudel, F., J. Gorrasi, et al. (2010). "Effects of lung recruitment maneuvers on splanchnic organ perfusion during endotoxin-induced pulmonary arterial hypertension." *Shock* **34**(5): 488-494.
- Del Sorbo, L., A. Goffi, et al. (2011). "Mechanical ventilation during acute lung injury: current recommendations and new concepts." *Presse Med* **40**(12 Pt 2): e569-583.
- Dyhr, T., N. Laursen, et al. (2002). "Effects of lung recruitment maneuver and positive end-expiratory pressure on lung volume, respiratory mechanics and alveolar gas mixing in patients ventilated after cardiac surgery." *Acta Anaesthesiol Scand* **46**(6): 717-725.
- Fischer, L. G., H. Van Aken, et al. (2003). "Management of pulmonary hypertension: physiological and pharmacological considerations for anesthesiologists." *Anesth Analg* **96**(6): 1603-1616.
- Force, A. D. T., V. M. Ranieri, et al. (2012). "Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition." *JAMA* **307**(23): 2526-2533.
- Gernoth, C., G. Wagner, et al. (2009). "Respiratory and haemodynamic changes during decremental open lung positive end-expiratory pressure titration in patients with acute respiratory distress syndrome." *Crit Care* **13**(2): R59.

- Gomez-Arroyo, J. G., L. Farkas, et al. (2012). "The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **302**(4): L363-369.
- Guerin, C., S. Debord, et al. (2011). "Efficacy and safety of recruitment maneuvers in acute respiratory distress syndrome." Ann Intensive Care **1**(1): 9.
- Gunaydin, S., Y. Imai, et al. (2002). "The effects of vasoactive intestinal peptide on monocrotaline induced pulmonary hypertensive rabbits following cardiopulmonary bypass: a comparative study with isoproterenol and nitroglycerine." Cardiovasc Surg **10**(2): 138-145.
- Habre, W., B. Babik, et al. (2002). "Role of endogenous histamine in altered lung mechanics in rabbits." Anesthesiology **96**(2): 409-415.
- Habre, W., P. Scalfaro, et al. (2006). "Measuring end-expiratory lung volume and pulmonary mechanics to detect early lung function impairment in rabbits." Respir Physiol Neurobiol **152**(1): 72-82.
- Hantos, Z., B. Daroczy, et al. (1992). "Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs." J Appl Physiol (1985) **72**(1): 168-178.
- Huang, J., J. H. Wolk, et al. (2010). "Progressive endothelial cell damage in an inflammatory model of pulmonary hypertension." Exp Lung Res **36**(1): 57-66.
- Iannuzzi, M., A. De Sio, et al. (2010). "Different patterns of lung recruitment maneuvers in primary acute respiratory distress syndrome: effects on oxygenation and central hemodynamics." Minerva Anesthesiol **76**(9): 692-698.
- Jardin, F., J. C. Farcot, et al. (1981). "Influence of positive end-expiratory pressure on left ventricular performance." N Engl J Med **304**(7): 387-392.
- Jardin, F. and A. Vieillard-Baron (2007). "Is there a safe plateau pressure in ARDS? The right heart only knows." Intensive Care Med **33**(3): 444-447.
- Kornecki, A., D. Engelberts, et al. (2008). "Vascular remodeling protects against ventilator-induced lung injury in the in vivo rat." Anesthesiology **108**(6): 1047-1054.
- Lai, Y. L., J. W. Olson, et al. (1991). "Ventilatory dysfunction precedes pulmonary vascular changes in monocrotaline-treated rats." J Appl Physiol **70**(2): 561-566.
- Lee, J., R. Reich, et al. (2009). "Golgi, trafficking, and mitosis dysfunctions in pulmonary arterial endothelial cells exposed to monocrotaline pyrrole and NO scavenging." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(4): L715-728.
- Lundquist, H., G. Hedenstierna, et al. (1995). "CT-assessment of dependent lung densities in man during general anaesthesia - Summary." Acta Radiol **36**(6): 626-632.
- Meade, M. O., D. J. Cook, et al. (2008a). "A study of the physiologic responses to a lung recruitment maneuver in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome." Respir Care **53**(11): 1441-1449.
- Meade, M. O., D. J. Cook, et al. (2008b). "Ventilation strategy using low tidal volumes, recruitment maneuvers, and high positive end-expiratory pressure for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial." JAMA **299**(6): 637-645.
- Meyrick, B., W. Gamble, et al. (1980). "Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study." Am J Physiol **239**(5): H692-702.

- Nielsen, J., M. Ostergaard, et al. (2005). "Lung recruitment maneuver depresses central hemodynamics in patients following cardiac surgery." Intensive Care Med **31**(9): 1189-1194.
- Orfanos, S. E., I. Mavrommati, et al. (2004). "Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill." Intensive Care Med **30**(9): 1702-1714.
- Petak, F., G. Albu, et al. (2009). "Lung mechanical and vascular changes during positive- and negative-pressure lung inflations: importance of reference pressures in the pulmonary vasculature." J Appl Physiol (1985) **106**(3): 935-942.
- Petak, F., B. Babik, et al. (2004). "Impact of microvascular circulation on peripheral lung stability." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(4): L879-889.
- Price, L. C., D. F. McAuley, et al. (2012). "Pathophysiology of pulmonary hypertension in acute lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **302**(9): L803-815.
- Rosenberg, H. C. and M. Rabinovitch (1988). "Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension." Am J Physiol **255**(6 Pt 2): H1484-1491.
- Rothen, H. U., P. Neumann, et al. (1999). "Dynamics of re-expansion of atelectasis during general anaesthesia." Br J Anaesth **82**(4): 551-556.
- Rothen, H. U., B. Sporre, et al. (1993). "Re-expansion of atelectasis during general anaesthesia: a computed tomography study (Summary)." Br J Anaesth **71**(6): 788-795.
- Rusca, M., S. Proietti, et al. (2003). "Prevention of atelectasis formation during induction of general anesthesia." Anesth Analg **97**(6): 1835-1839.
- Stenmark, K. R., B. Meyrick, et al. (2009). "Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(6): L1013-1032.
- Takeuchi, M., H. Imanaka, et al. (2005). "Recruitment maneuver and high positive end-expiratory pressure improve hypoxemia in patients after pulmonary thromboendarterectomy for chronic pulmonary thromboembolism." Crit Care Med **33**(9): 2010-2014.
- Tomashefski, J. F., Jr., P. Davies, et al. (1983). "The pulmonary vascular lesions of the adult respiratory distress syndrome." Am J Pathol **112**(1): 112-126.
- Tusman, G., S. H. Bohm, et al. (1999). "'Alveolar recruitment strategy' improves arterial oxygenation during general anaesthesia." Br J Anaesth **82**(1): 8-13.
- Vion, A. C., A. A. Birukova, et al. (2013). "Mechanical forces stimulate endothelial microparticle generation via caspase-dependent apoptosis-independent mechanism." Pulm Circ **3**(1): 95-99.
- Wang, B., A. Caluch, et al. (2012). "Force control of endothelium permeability in mechanically stressed pulmonary micro-vascular endothelial cells." Biomed Mater Eng **22**(1-3): 163-170.

Tables & Pictures

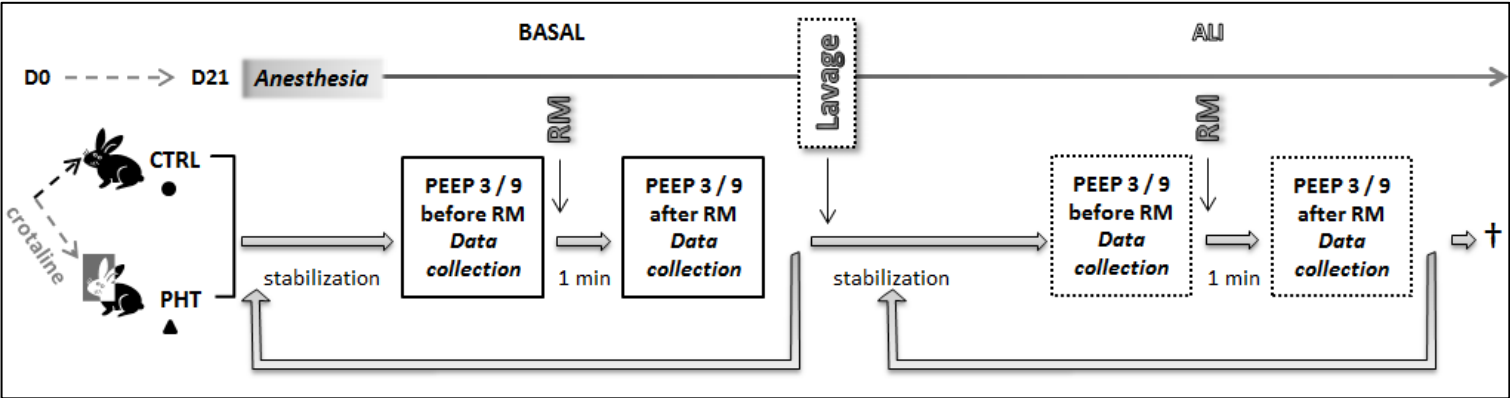


Figure 1.Study protocol

	PEEP3	BASAL	ALI	p
SvO ₂ (%)	CTRL	76,6 ± 1,9	40,6 ± 7,4	<0,0001
	PHT	72,4 ± 2,2	54,3 ± 5,8	0,002
PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	CTRL	447,5 ± 6,9	220,0 ± 38,7	0,004
	PHT	444,7 ± 2,6	199,5 ± 35,5	0,0005
PaCO ₂ (mmHg)	CTRL	44,4 ± 3,1	53,0 ± 3,8	0,002
	PHT	38,4 ± 2,4	44,2 ± 1,5	0,03
ELV (mL/kg)	CTRL	15,0 ± 0,7	8,4 ± 1,0	0,004
	PHT	16,8 ± 0,7	9,7 ± 1,0	0,0002
H (cmH ₂ O/L)	CTRL	272,1 ± 13,6	636,4 ± 84,0	<0,0001
	PHT	331,7 ± 19,5	594,8 ± 60,1	0,0001
G (cmH ₂ O/L)	CTRL	72,6 ± 6,7	142,5 ± 15,7	<0,0001
	PHT	94,2 ± 4,4	129,0 ± 10,2	0,006
SV (mL/kg)	CTRL	0,148 ± 0,024	0,156 ± 0,022	ns
	PHT	0,209 ± 0,060	0,180 ± 0,056	ns
CI (mL/kg/min)	CTRL	30,5 ± 4,5	36,2 ± 4,8	ns
	PHT	52,9 ± 17,7	50,3 ± 14,9	ns

Table 1. Blood gas parameters and respiratory parameters after RM. Comparison between basal and ALI conditions for each group at PEEP3 (two-way repeated ANOVA with Sidak's multiple comparisons test). SvO₂ oxygen venous saturation, PaO₂/FiO₂ oxygen arterial partial pressure over oxygen inspired fraction ratio, PaCO₂ carbon dioxide arterial partial pressure, ELV end lung volume, H respiratory elastance, G respiratory tissue damping, SV stroke volume, CI cardiac index

		PEEP3		PEEP9	
		control (%)	PHT (%)	control (%)	PHT (%)
heart rate ctrl n=8; PHT n=10	Baseline	3,4±3,0	5,4±2,0 # p=0,03	0,1±2,1	-0,7±1,3
	ALI	8,3±3,6 # p=0,05	16,0±6,1 # p=0,04	5,6±4,9	-4,3±2,1
MAP ctrl n=8; PHT n=10	Baseline	7,6±4,1	2,0±5,5	3,1±1,6	3,5±6,7
	ALI	-3,8±1,9 # p=0,05	-3,2±1,4 # p=0,05	-0,9±3,1	1,0±5,2
right ventricle EDP ctrl n=6; PHT n=6	Baseline	14,5±9,9	22,6±12,2 # p=0,03	-1,2±1,6	2,7±5,7
	ALI	-16,3±22,4	7,9±7,0	-5,5±13,2	3,8±3,2
stroke volume ctrl n=6; PHT n=6	Baseline	-2,0±4,6	9,9±8,8	4,9±6,1	12,1±7,4
	ALI	4,2±4,9	11,7±7,3	9,5±6,5	-7,6±4,8
cardiac index ctrl n=6; PHT n=6	Baseline	-2,3±4,4	19,7±10,5	4,6±7,1	11,9±8,8
	ALI	21,6±12,1	30,4±10,6	9,2±5,0	-11,4±4,8
Raw ctrl n=8; PHT n=9	Baseline	-1,0±2,0	8,9±9,6	-3,0±2,4	-6,6±4,3
	ALI	3,9±5,9	-4,6±3,4	-6,8±3,3	-4,3±2,6
damping ctrl n=8; PHT n=9	Baseline	-5,0±3,3	1,8±4,1	0,0±5,3	-5,6±5,1
	ALI	3,7±3,6	-8,7±4,1 # p=0,04	-5,7±3,5	-15,0±2,5 ## p=0,004
elastance ctrl n=8; PHT n=9	Baseline	-9,2±2,7 ## p=0,008	-12,0±3,5 ## p=0,004	-9,0±1,2 ## p=0,008	-12,3±1,1 ## p=0,004
	ALI	6,9±7,0	-9,6±2,4 ## p=0,01	-10,8±1,5 ## p=0,008	-8,5,3±3,1 # p=0,04
PaCO ₂ ctrl n=9; PHT n=11	Baseline	-6,0±2,0 # p=0,03	-7,8±4,0	7,0±3,3	6,3±4,2
	ALI	-1,7±3,5	-6,2±2,4	-5,3±1,0 ## p=0,004	-2,6±1,8
SvO ₂ ctrl n=9; PHT n=11	Baseline	1,4±3,1	2,6±2,0	-0,1±5,1	1,3±4,0
	ALI	-18,3±5,2 # p=0,03	-2,9±2,5	1,8±1,2	-1,6±3,7

Table 2. Percentages of relative change (%) after RM in cardiovascular, respiratory and blood gas parameters, in control and PHT groups during baseline and ALI, at PEEP3 and PEEP9; means of relative change were compared to a theoretical median of 0 thanks to Wilcoxon Signed Rank Test (MAP mean arterial pressure, EDP end diastolic pressure, Raw airway resistance, PaCO₂ partial pressure in arterial CO₂, SvO₂ venous oxygen saturation)

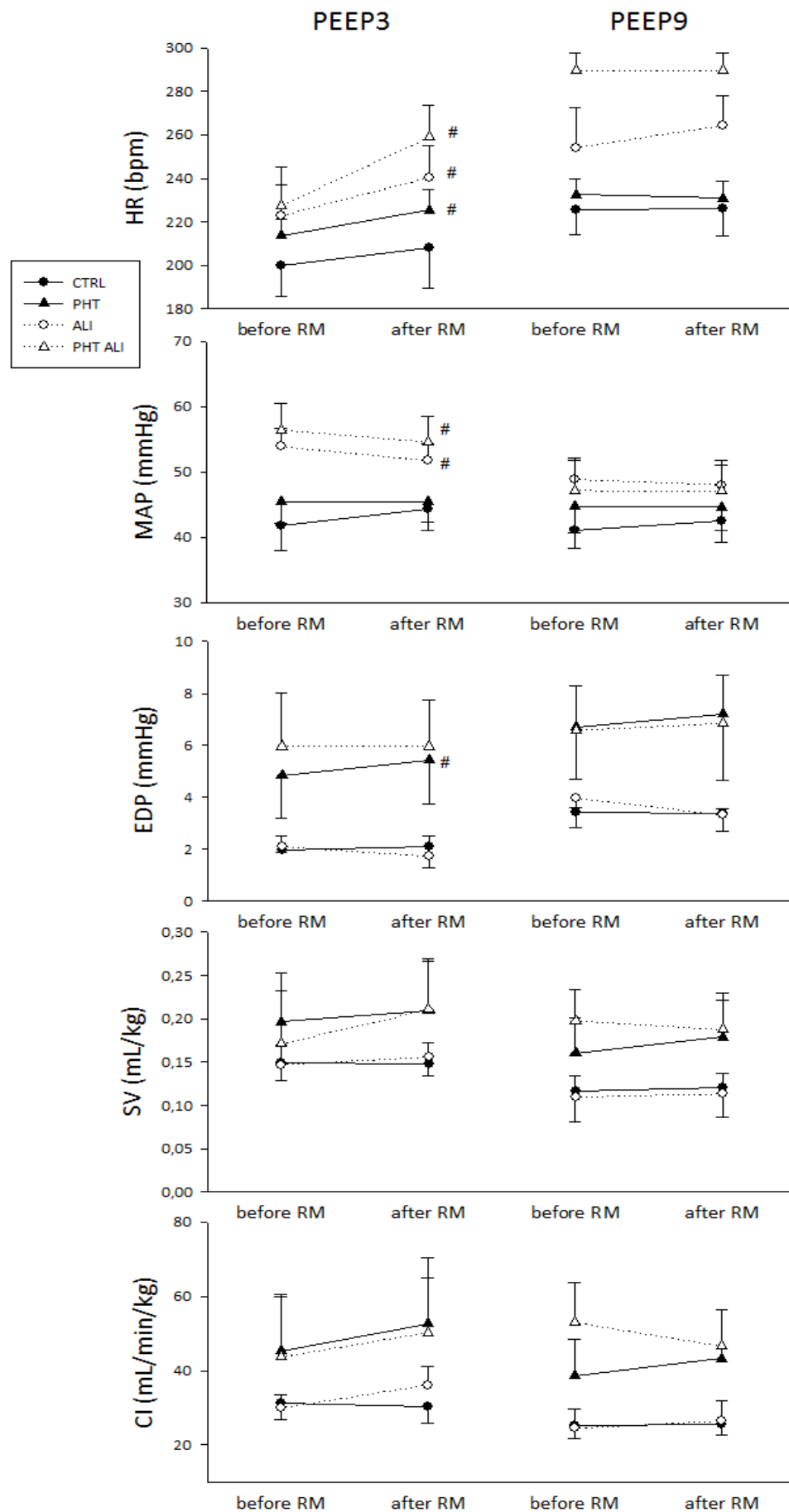


Figure 2. Heart rate (HR), mean arterial pressure (MAP), end diastolic pressure (EDP), stroke volume (SV) and cardiac index (CI) from right ventricle pressure-volume curve, before and after RM, in control (circle) and PHT (triangle) groups during baseline (full symbol) and ALI (open symbol), at PEEP3 and PEEP9; Means of relative change for each condition between before and after RM were compared to a theoretical median of 0 thanks to Wilcoxon Signed Rank Test; # $p < 0,05$

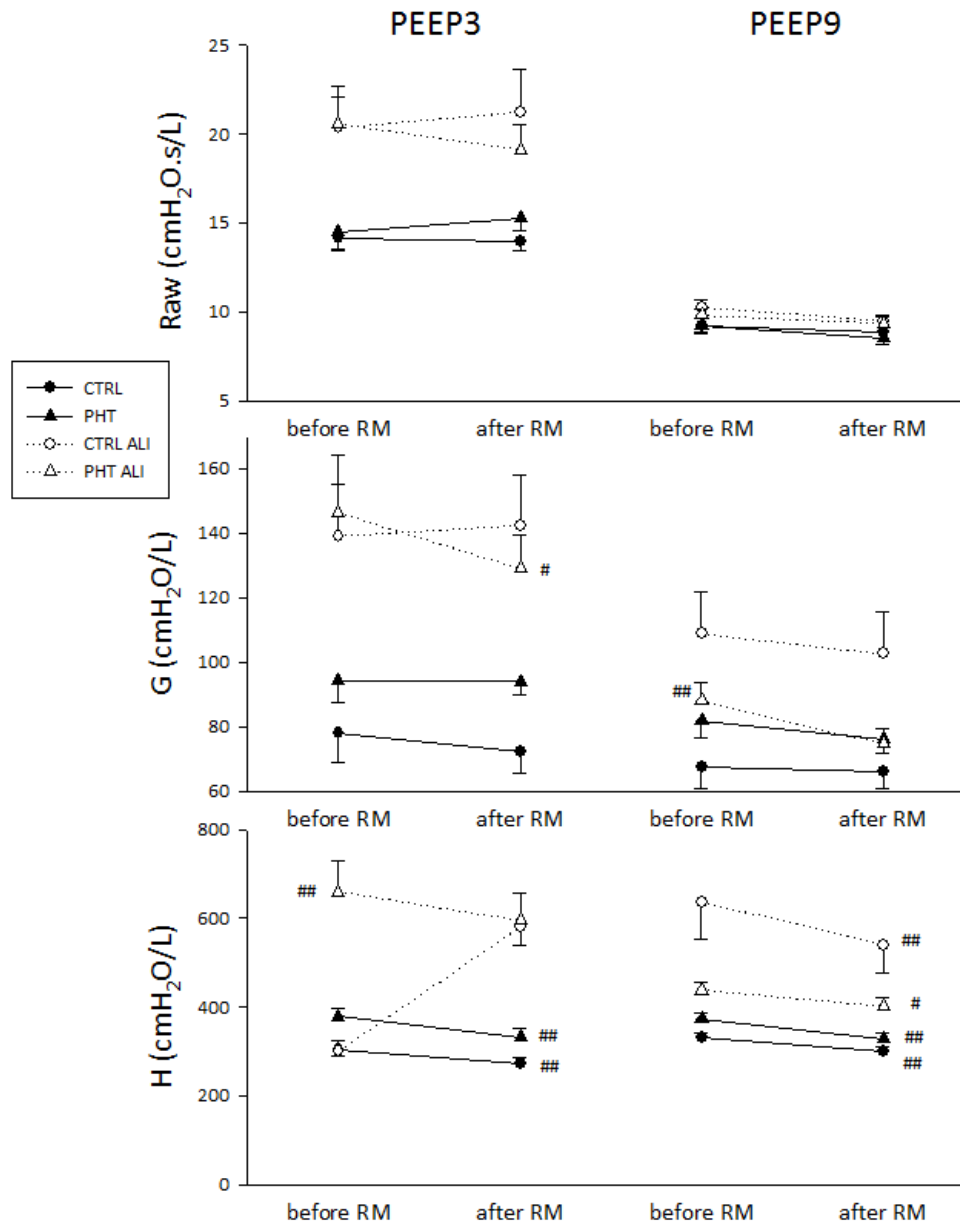


Figure 3. Airway resistance (Raw), lung tissue damping (G) and elastance (H), before and after RM, in control (circle) and PHT (triangle) groups during baseline (full symbol) and ALI (open symbol), at PEEP3 and PEEP9; Means of relative change for each condition between before and after RM were compared to a theoretical median of 0 thanks to

Wilcoxon Signed Rank Test; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$

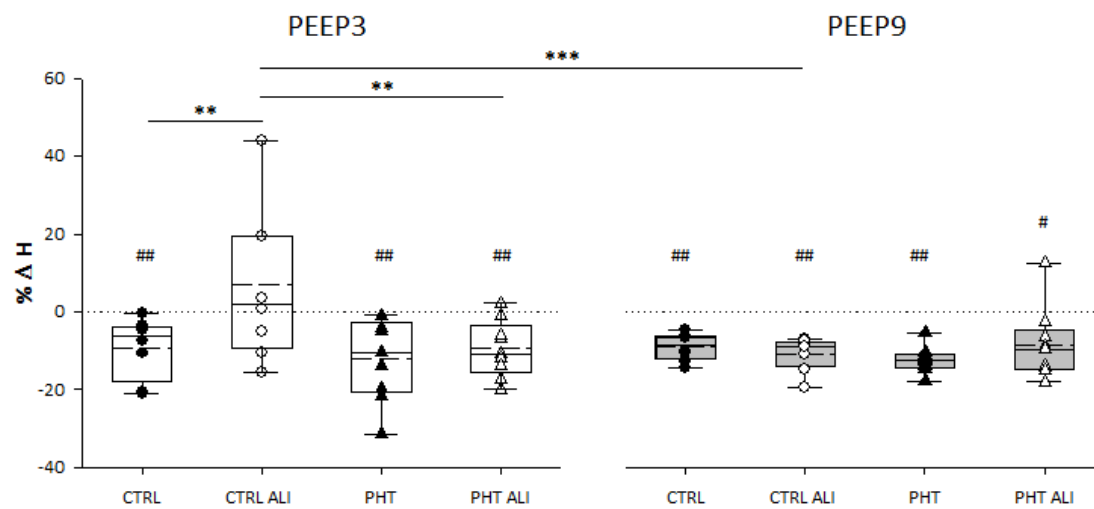


Figure 4. Percentages of relative change in elastance (% Δ H) after RM, in control and PHT groups during baseline and ALI, at PEEP3 and PEEP9; means of relative changes were compared to a theoretical median of 0 (Wilcoxon Signed Rank Test; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$) and between each other (2way ANOVA with Sidak's multiple comparison test;

** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$)

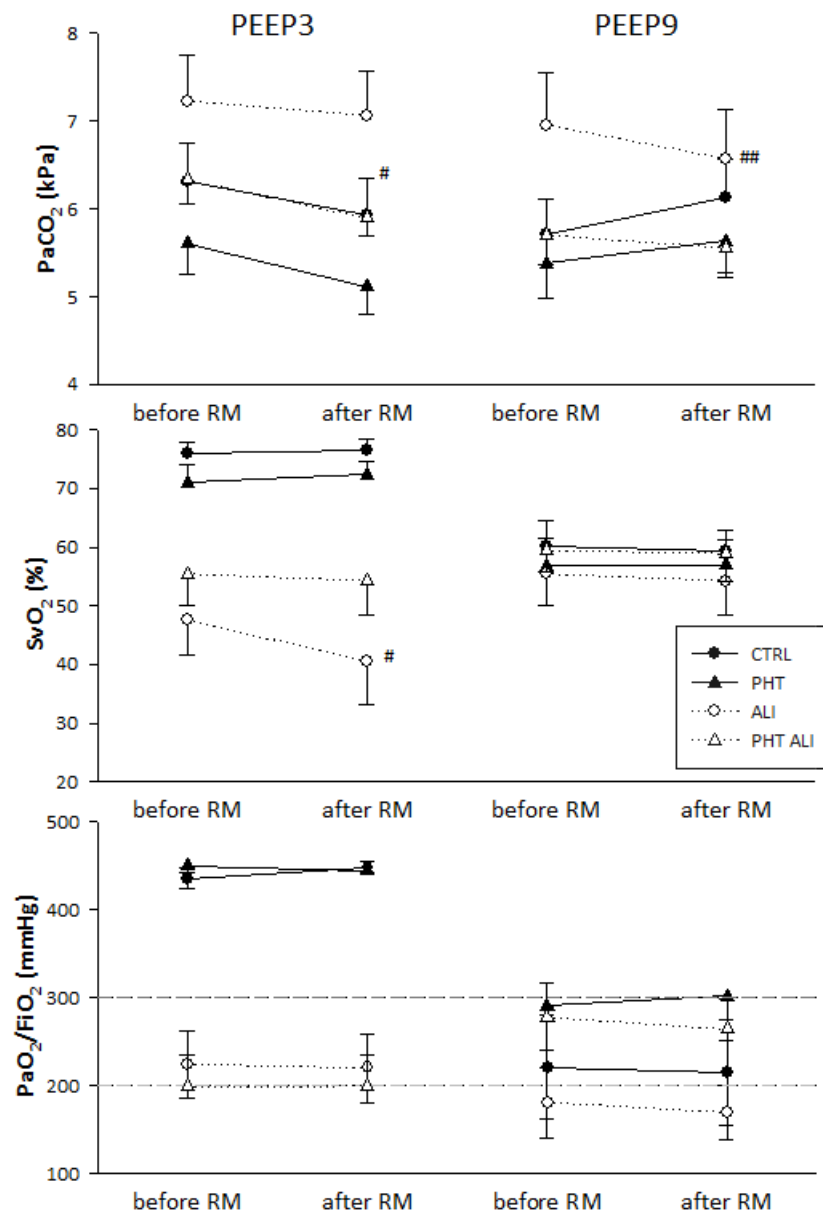


Figure 5. Blood gas before and after RM, in control (circle) and PHT (triangle) groups during baseline (full symbol) and ALI (open symbol), at PEEP3 and PEEP9; Means of relative change for each condition between before and after

RM were compared to a theoretical median of 0 thanks to Wilcoxon Signed Rank Test; # p<0,05

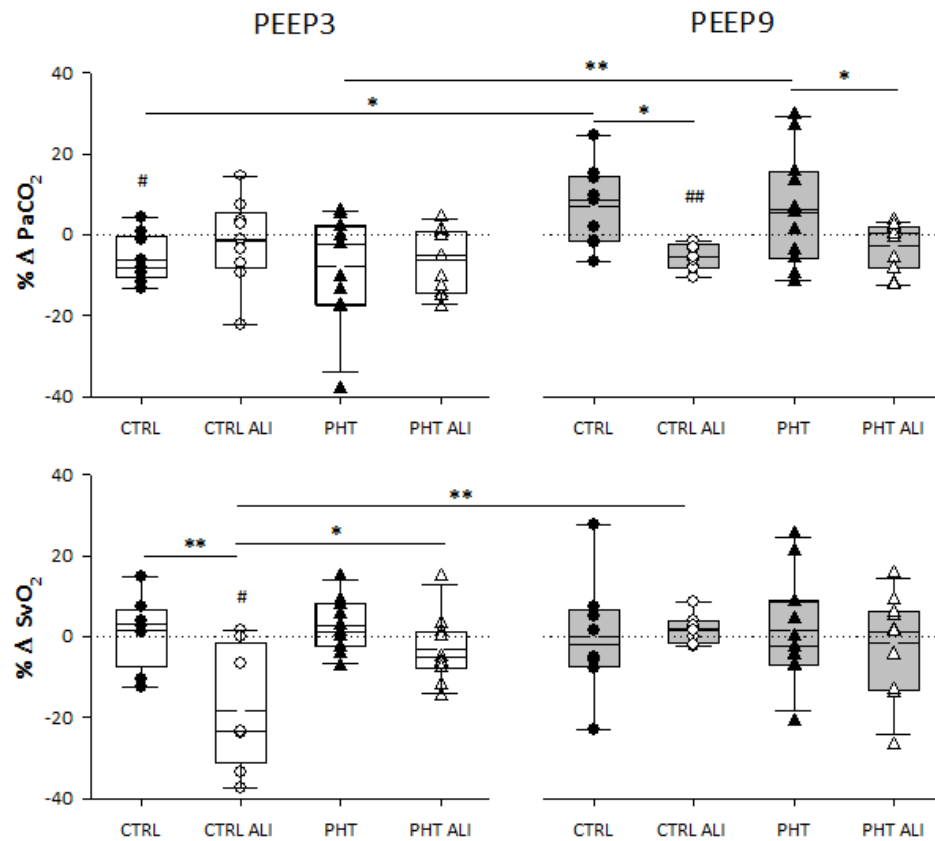


Figure 6. Percentages of relative change in PaCO_2 and SvO_2 after RM, in control and PHT groups during baseline and ALI, at PEEP3 and PEEP9; means of relative changes were compared to a theoretical median of 0 (Wilcoxon Signed Rank Test; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$) and between each other (2way ANOVA with Sidak's multiple comparison test; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

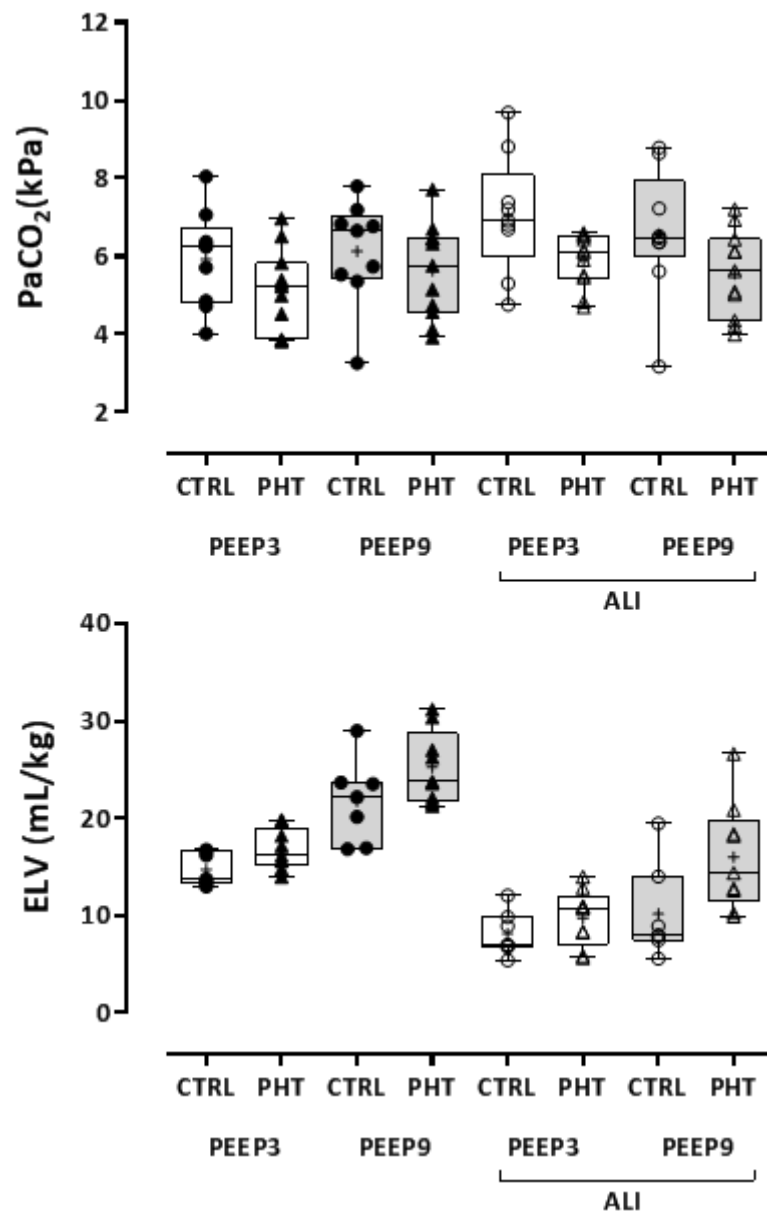


Figure 7. Carbon dioxide arterial partial pressure (PaCO_2) and effective lung volume (ELV) after RM. Comparison is made between groups (3 way anova)

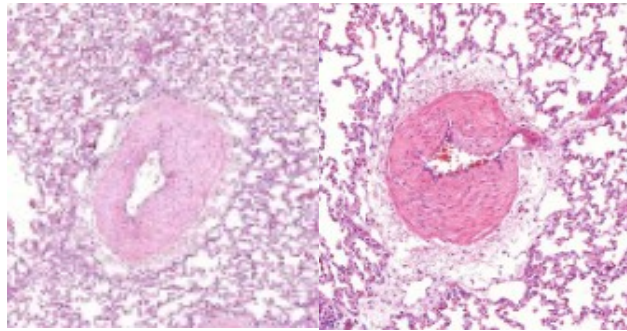


Figure 8. Histologic slide of a small pulmonary artery in control (right) and PHT (left) rabbits (H&E staining). To be completed (cf. Aurélie)...

Annex II – supplementary data of the suppl. Data

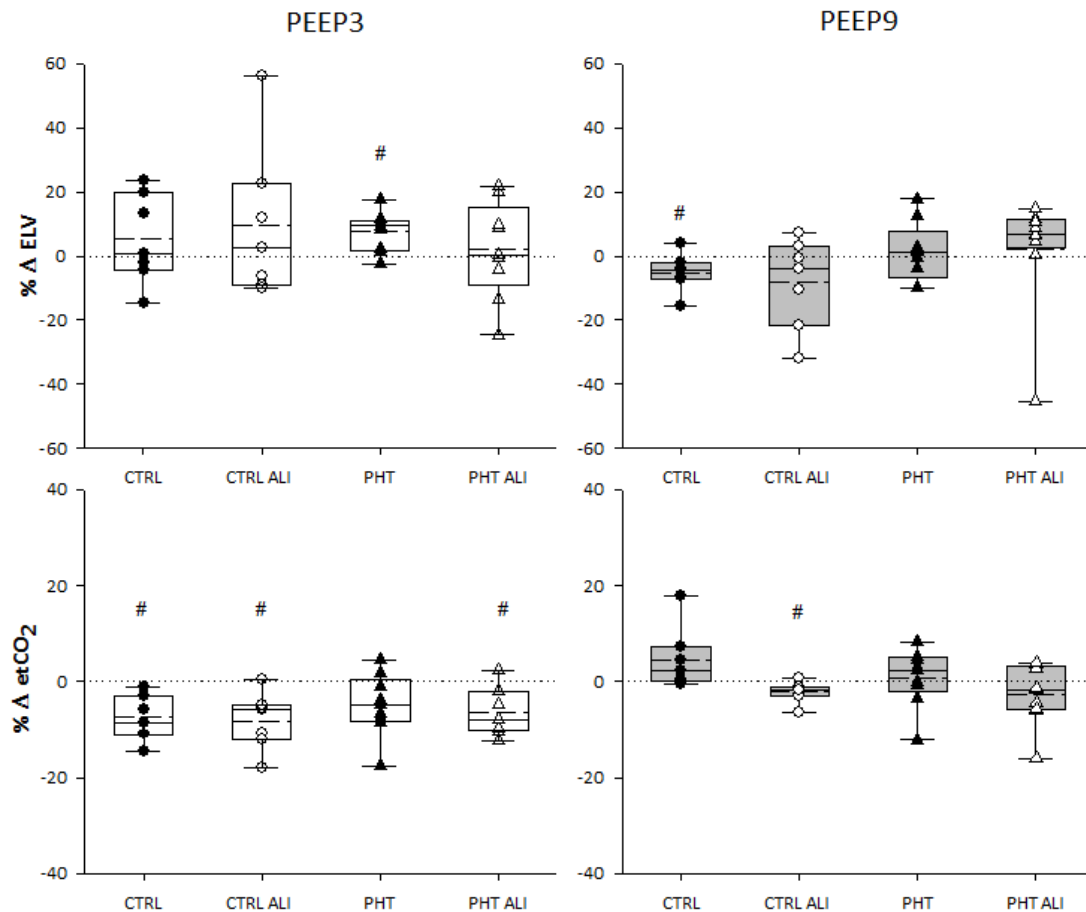


Figure 9. Percentages of relative change in effective lung volume (% Δ ELV) and end tidal CO₂ (% Δ etCO₂) after RM, in control and PHT groups during baseline and ALI, at PEEP3 and PEEP9; ELV calculation reflected gaseous CO₂ exchange; means of relative changes were compared to a theoretical median of 0 (Wilcoxon Signed Rank Test; # p<0,05)

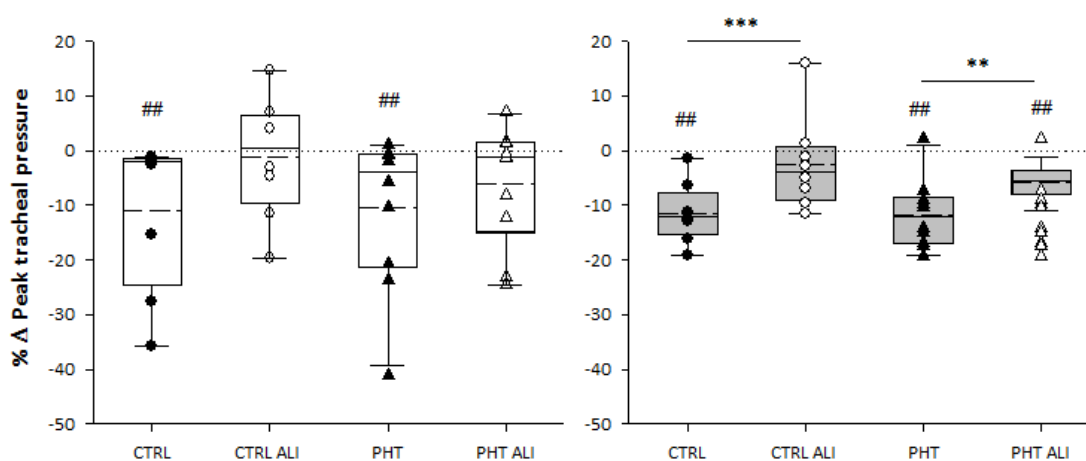


Figure 10. Percentages of relative change (% Δ) in peak tracheal pressure after RM, in control and PHT groups during baseline and ALI, at PEEP3 and PEEP9; means of relative changes were compared to a theoretical median of 0 (Wilcoxon Signed Rank Test; ##<0.01) and between each other for each PEEP separately (ALI vs. BASAL within

groups 2way repeated ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test and PHT vs. CTRL within conditions

2way ANOVA with Sidak's multiple comparison test; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

		PEEP3		PEEP9	
		control (%)	PHT (%)	control (%)	PHT (%)
ELV ctrl n=7; PHT n=9	Baseline	5,2±5,3	7,6±2,1 # $p=0,02$	-5,1±2,2 # $p=0,05$	1,4±3,1
	ALI	9,7±8,9	2,0±5,0	-8,4±5,4	2,2±6,1
peak tracheal pressure ctrl n=8; PHT n=9	Baseline	-10,9±4,9 ## $p=0,008$	-10,5±4,4 ## $p=0,01$	-11,5±1,9 ## $p=0,008$	-11,7±2,0 ## $p=0,004$
	ALI	-1,2±3,9	-6,1±3,4	-2,5±3,0	-5,8±1,0 ## $p=0,002$

Table 3. Percentages of relative change (%) after RM in ELV and peak tracheal pressure, in control and PHT groups during baseline and ALI, at PEEP3 and PEEP9; means of relative change were compared to a theoretical median of 0

thanks to Wilcoxon Signed Rank Test

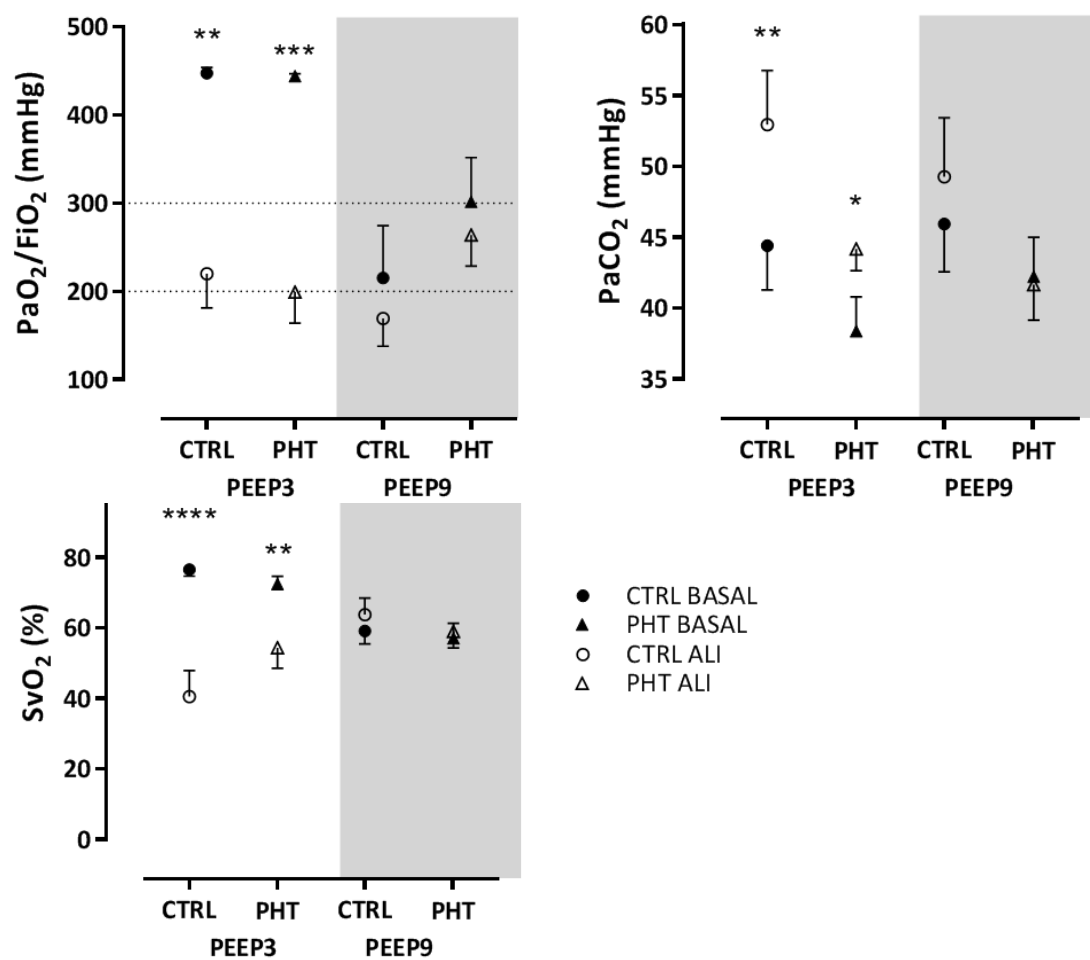


Figure 11. Arterial and venous blood gas parameters after RM. Comparison is made between basal (full symbols) and ALI (open symbols) conditions for each group/PEEP combination

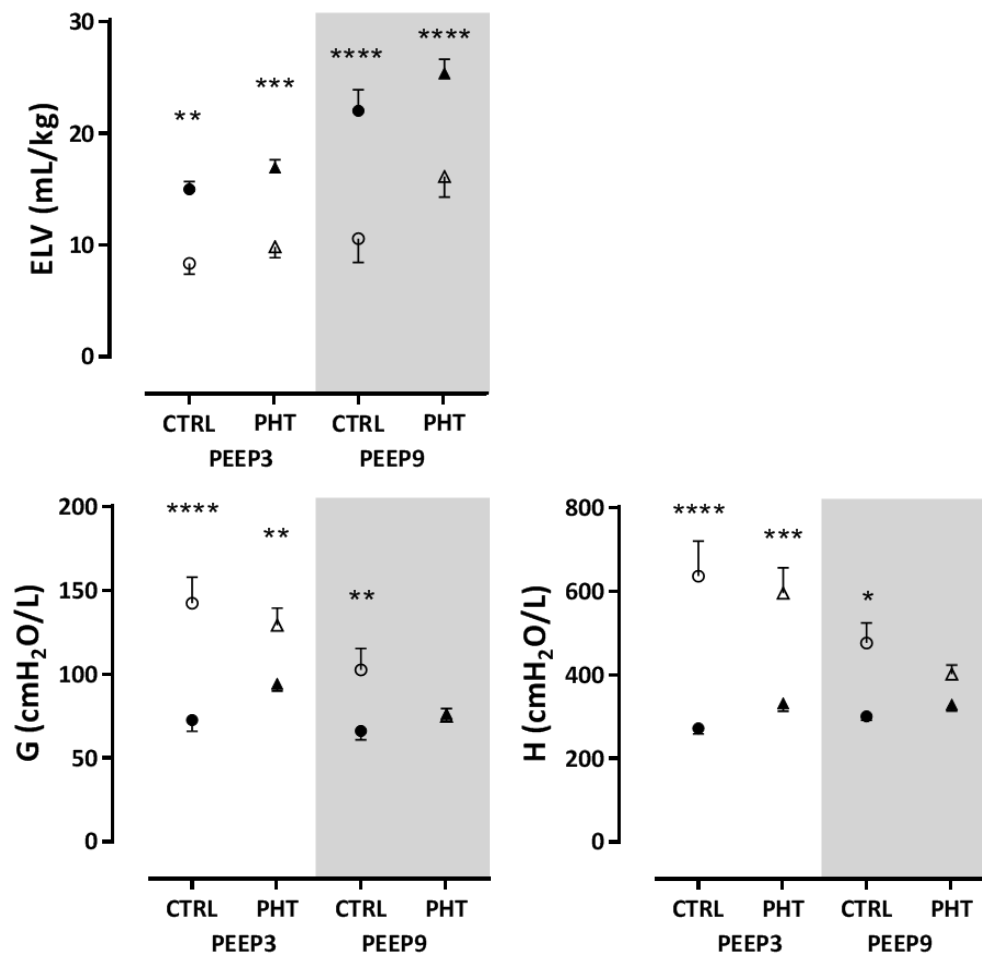
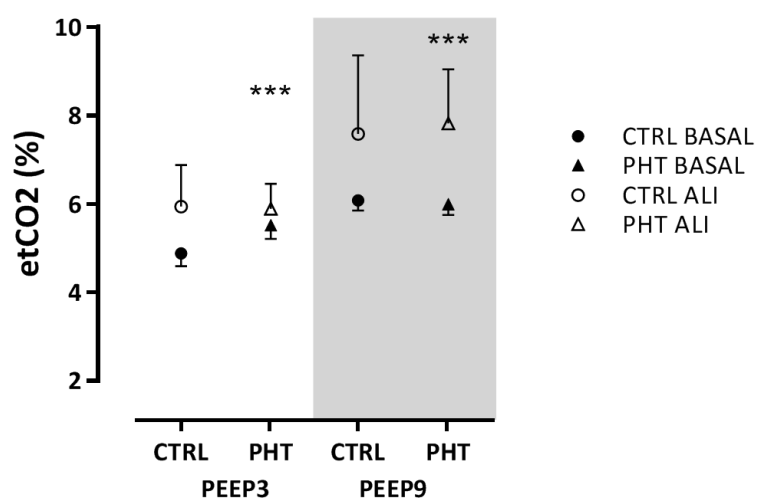
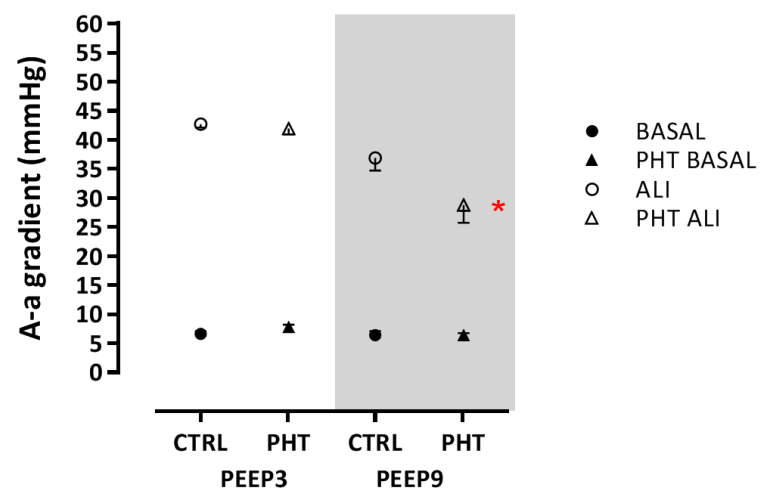
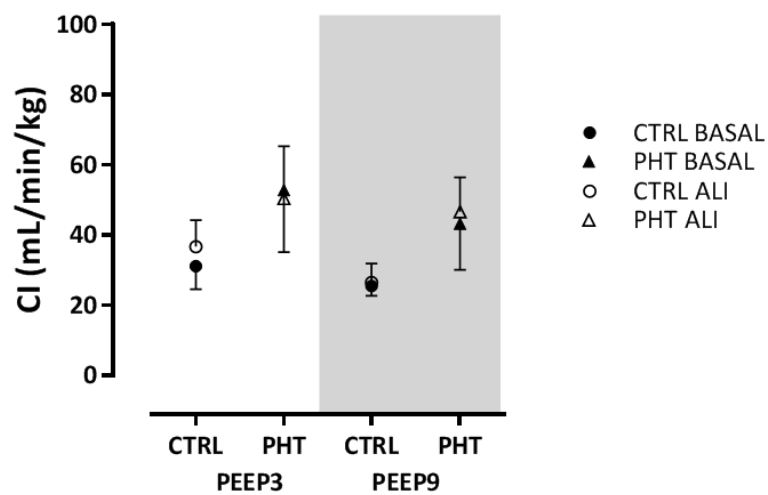
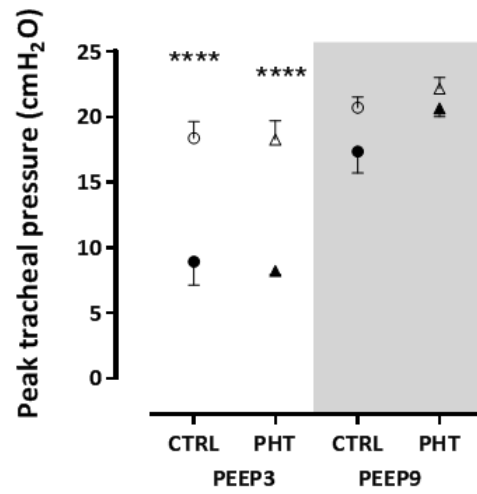


Figure 12. Effective lung volume (ELV) and lung tissue elastance (H) and damping (G) after RM. Comparison is made between basal (full symbols) and ALI (open symbols) conditions for each group/PEEP combination





4.3.3 Résultat et discussion

Les principaux résultats de cette étude montrent que la tolérance d'une manœuvre de recrutement sur poumon sain chez le lapin est similaire dans les deux groupes (contrôle et HTAP) quelle que soit la sévérité de l'HTAP préalable avec dans les deux cas l'apparition de signes de surdistension alvéolaire et altération du rapport PaO_2/FiO_2 apparaissant pour la PEEP la plus élevée (PEEP=9). Par contre, l'élastance est améliorée dans le cas des animaux avec hypertension artérielle pulmonaire ($-12,0 \pm 3,5\%$, $p=0,004$). Lors d'une atteinte alvéolaire lésionnelle surajoutée, les animaux du groupe contrôle bénéficient d'une PEEP élevée avec une répercussion hémodynamique faible de la manœuvre de recrutement alvéolaire et une amélioration de leurs paramètres H et de la capnie ($-10,8 \pm 1,5\%$, $p=0,008$ et $-5,3 \pm 1,0\%$, $p=0,004$ respectivement). De façon remarquable toutefois, il convient de noter que les animaux avec HTAP présentent des atteintes de l'échangeur moins sévères que les cas contrôles avec une meilleure tolérance et une meilleure amélioration des paramètres sous PEEP élevée complétée des manœuvres de recrutement.

Ainsi, ce modèle permet de confirmer qu'une PEEP insuffisante ne permet pas une aération alvéolaire satisfaisante quel que soit le statut d'hypertension pulmonaire (absence ou présence). A l'inverse, une PEEP élevée est bénéfique même en cas d'hypertension artérielle pulmonaire. De plus, la réponse des animaux avec HTAP est meilleure que les contrôles notamment en ce qui concerne les propriétés élastiques comme si la pathologie primitive induisait une plus grande rigidité de l'ensemble pulmonaire mais de façon plus homogène. Cette adaptation protège ainsi le poumon de surdistension comme cela peut être détecté par la FOT.

Cette approche technique a permis de montrer qu'HTAP et ventilation mécanique n'influençaient que très peu la réactivité bronchique et que l'impact de ces stimulations étaient plutôt présent au sein de l'arbre respiratoire distal et du parenchyme. Par ailleurs, la réalisation des manœuvres de recrutement alvéolaires tant chez les animaux contrôles que les animaux atteints d'hypertension pulmonaire ne générait pas de bronchodilatation réflexe comme cela a été décrit au décours d'une manœuvre d'inspiration profonde (DI). Deux explications sont possibles à ce stade même s'il ne s'agissait pas du critère principal de

l'étude. D'abord, ce réflexe a été montré absent ou peu important chez le sujet indemne d'hyperréactivité bronchique : contrôle et hypertension artérielle pulmonaire n'ont donc pas d'influence sur cette réactivité bronchique. Par ailleurs, la réponse en bronchodilatation est directement liée à l'intensité de l'étirement lors de la manœuvre de « Deep Inspiration ». Ainsi une manœuvre de recrutement appliquée de sorte d'atteindre une pression de plateau n'est pas suffisante pour déclencher cette réponse d'autant que la pressurisation des voies aériennes initiales est préexistante (animaux avec une PEP à 3 ou 6) diminuant en conséquence l'amplitude de la contrainte.

Conclusions et perspectives de recherche:

Au total, ce travail met en évidence l'impact potentiel sur le compartiment bronchique de la ventilation mécanique comme tension positive appliquée sur les parois de l'arbre trachéo-bronchique. La stimulation répétée mais physiologique (stretch cyclique) tout comme une surdistension momentanée (stretch unique) modifient significativement le tonus basal des bronches avec une élévation de celui-ci suggérant donc une bronchoconstriction. Cette réponse est robuste et implique plusieurs voies de signalisation (voie des NOsynthases, des Rho-A kinase) en parallèle et non une voie en particulier. Par ailleurs, l'épithélium – sentinelle des fluctuations de tension – dans ces événements n'est pas le seul effecteur puisque son ablation n'élimine pas complètement cette réponse, ceci renforce donc l'hypothèse de la mécanotransduction avec une réponse directe des cellules musculaires lisses. Celle-ci s'accompagne d'une transition entre fluidification et renforcement du cytosquelette en faveur d'un renforcement notamment à l'arrêt d'une stimulation répétée comme c'est le cas pour le stretch cyclique.

Par ailleurs, une autre propriété des bronches est mise en exergue. Il s'agit cette fois, de l'élévation significative de la capacité de développer une force, au-delà de la force maximale estimée sous stimulation cholinergique maximale (exposition de l'acétylcholine à $3 \cdot 10^{-3}$ M). Cette adaptation en force (force adaptation) est une réponse spécifique de la cellule musculaire lisse et fait intervenir la réorganisation du cytosquelette et du nombre de ponts activés actine-myosine. Une participation physique de thermodynamique est également évoquée pour expliquer ce phénomène. Si l'avantage principal de ces études est le matériel, à savoir des fragments de bronches humaines, la limite potentielle est qu'il s'agit de patients présentant une pathologie pulmonaire (cancer ou maladie inflammatoire) qui peut probablement présenter une atteinte fonctionnelle plus systémique et modifier ainsi la réponse bronchique par rapport à un sujet sain. S'il est possible d'affirmer l'absence de lésion à proximité des segments étudiés par un examen anatomo-pathologique, il est difficile de préciser la « normalité » de la réponse par des prélèvements réalisés sur des sujets indemnes de pathologie respiratoire.

L'impact clinique de ces comportements requiert de s'intéresser au comportement in-vivo avec des outils adaptés pour vérifier si la ventilation mécanique induit les mêmes réponses. Dans la positive, la lutte contre l'élévation du tonus à l'arrêt de la ventilation semble la piste à privilégier dans un premier temps.

Des pistes de réflexion naissent de ces différents événements. D'abord, en pratique clinique, beaucoup de travaux ont conduit ces dernières années à des modifications de la stratégie ventilatoire du patient ventilé mécaniquement en limitant notamment les pressions de plateaux appliquées aux alvéoles afin de limiter la survenue de lésions de barotraumatisme: travaux de l'ARDS network [66]([Brower, 2004 NEJM](#)) et transposition en anesthésie [191]([Severgnini, 2013 Anesthesiol](#)). L'impact de ces modifications sur la paroi bronchique reste méconnue et la limitation des pressions de plateau, de crête ou encore le profil du cycle ventilatoire requiert d'être examiné. Par ailleurs, les patients soumis à une ventilation mécanique sont le plus souvent sédatisés pour tolérer la sonde d'intubation et la pression positive appliquée. Or des études anciennes ont pu montrer la présence d'effet bronchodilatateur par l'emploi en particulier d'agents volatiles halogénés (sévoflurane ou isoflurane) comparé à des agents intra-veineux tels que le propofol. L'apparition d'une élévation du tonus basal dès l'institution du stretch cyclique ouvre ainsi des perspectives de bronchoprotection intéressante. La préexposition à ce type d'agents comme l'adjonction de ces agents reste donc à explorer. Enfin, nous avons pu montrer que l'arrêt brutal de la contrainte cyclique appliquée sur les bronches génère une majoration de la réponse du tonus basal. Cette réponse dérégulée pourrait avoir un impact à l'arrêt d'une ventilation mécanique prolongée ou encore sur des terrains particuliers tels que l'hyperréactivité bronchique.

Les méthodes d'évaluation sont également un challenge pour une évaluation in-vivo. Des techniques récentes offrent des opportunités intéressantes. Ainsi, l'imagerie du poumon par résonance magnétique haute fréquence ou l'évaluation directe de ventilation alvéolaire par synchrotron est possible aujourd'hui chez l'animal et semble possible prochainement chez l'être humain. L'imagerie directe par fibroscopie est aussi une possibilité avec une amélioration des matériels d'investigation et l'enregistrement ou l'analyse automatisée des images. Celle-ci pourrait être couplée à des sondes de doppler afin d'évaluer en parallèle l'épaississement ou l'amincissement de la média bronchique. Aujourd'hui, les techniques

d'oscillation haute-fréquence (FOT) sont possibles in-vivo et peuvent apporter des renseignements indirects de façon continue au cours du cycle ventilatoire.

Ces travaux laissent toutefois un certain nombre de question en suspens. Le soupir (ou recrutement alvéolaire) induit-il les mêmes réponses que l'Inspiration Profonde (Deep Inspiration) largement étudiée? Par ailleurs, l'ensemble des modèles expérimentaux élude le rôle du surfactant qui est tout de même un composant essentiel de « l'arbre trachéo-bronchique » par ses propriétés physiques sur la tension de surface. Enfin, il convient également d'explorer plus finement l'hypothèse de thermodynamique appliquée à la cellule musculaire lisse notamment.

Références:

1. Mitzner, W., *Airway smooth muscle: the appendix of the lung*. Am J Respir Crit Care Med, 2004. **169**(7): p. 787-90.
2. Sinclair, S.E., et al., *Airway strain during mechanical ventilation in an intact animal model*. Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(8): p. 786-94.
3. Noble, P.B., et al., *Elastic properties of the bronchial mucosa: epithelial unfolding and stretch in response to airway inflation*. J Appl Physiol, 2005. **99**(6): p. 2061-6.
4. Nickles, H.T., et al., *Mechanical ventilation causes airway distension with proinflammatory sequelae in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **307**(1): p. L27-37.
5. Hackett, N.R., et al., *The human airway epithelial basal cell transcriptome*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e18378.
6. Linden, A., et al., *The non-adrenergic, non-cholinergic response counteracts changes in guinea-pig airway tone with and without sympathetic activation*. Br J Pharmacol, 1992. **106**(3): p. 616-22.
7. Mendonca, N.T., et al., *Airway resistance at maximum inhalation as a marker of asthma and airway hyperresponsiveness*. Respir Res, 2011. **12**: p. 96.
8. Bosse, Y., et al., *Increase in passive stiffness at reduced airway smooth muscle length: potential impact on airway responsiveness*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010. **298**(3): p. L277-87.
9. Fredberg, J.J., et al., *Perturbed equilibrium of myosin binding in airway smooth muscle and its implications in bronchospasm*. Am J Respir Crit Care Med, 1999. **159**(3): p. 959-67.
10. Fredberg, J.J., et al., *Airway smooth muscle, tidal stretches, and dynamically determined contractile states*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(6): p. 1752-9.
11. Gump, A., L. Haughney, and J. Fredberg, *Relaxation of activated airway smooth muscle: relative potency of isoproterenol vs. tidal stretch*. J Appl Physiol, 2001. **90**(6): p. 2306-10.
12. Raboudi, S.H., et al., *Dynamically determined contractile states of airway smooth muscle*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **158**(5 Pt 3): p. S176-8.
13. Yeung, T., et al., *Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion*. Cell Motil Cytoskeleton, 2005. **60**(1): p. 24-34.
14. McDaniel, D.P., et al., *The stiffness of collagen fibrils influences vascular smooth muscle cell phenotype*. Biophys J, 2007. **92**(5): p. 1759-69.
15. Wells, R.G., *The role of matrix stiffness in regulating cell behavior*. Hepatology, 2008. **47**(4): p. 1394-400.
16. Discher, D.E., P. Janmey, and Y.L. Wang, *Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate*. Science, 2005. **310**(5751): p. 1139-43.
17. Matthews, B.D., et al., *Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 3): p. 508-18.
18. Ingber, D.E., *Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again*. FASEB J, 2006. **20**(7): p. 811-27.
19. Tamkun, J.W., et al., *Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin*. Cell, 1986. **46**(2): p. 271-82.
20. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
21. Hynes, R.O., *The extracellular matrix: not just pretty fibrils*. Science, 2009. **326**(5957): p. 1216-9.
22. Ingber, D.E., et al., *Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis*. Int Rev Cytol, 1994. **150**: p. 173-224.

23. Krishnan, R., et al., *Reinforcement versus fluidization in cytoskeletal mechanoresponsiveness*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5486.
24. Deng, L., et al., *Stress and strain in the contractile and cytoskeletal filaments of airway smooth muscle*. Pulm Pharmacol Ther, 2009. **22**(5): p. 407-16.
25. Mijailovich, S.M., J.P. Butler, and J.J. Fredberg, *Perturbed equilibria of myosin binding in airway smooth muscle: bond-length distributions, mechanics, and ATP metabolism*. Biophys J, 2000. **79**(5): p. 2667-81.
26. Wang, N., et al., *Cell prestress. I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(3): p. C606-16.
27. Oliver, M.N., et al., *Airway hyperresponsiveness, remodeling, and smooth muscle mass: right answer, wrong reason?* Am J Respir Cell Mol Biol, 2007. **37**(3): p. 264-72.
28. Abboud, F.M., *The Walter B. Cannon Memorial Award Lecture, 2009. Physiology in perspective: The wisdom of the body. In search of autonomic balance: the good, the bad, and the ugly*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010. **298**(6): p. R1449-67.
29. Sollich, P. and M.R. Evans, *Glassy dynamics in the asymmetrically constrained kinetic Ising chain*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2003. **68**(3 Pt 1): p. 031504.
30. Sollich, P. and M.E. Cates, *Thermodynamic interpretation of soft glassy rheology models*. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys, 2012. **85**(3 Pt 1): p. 031127.
31. Krishnan, R., et al., *Fluidization, resolidification, and reorientation of the endothelial cell in response to slow tidal stretches*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **303**(4): p. C368-75.
32. Morioka, M., et al., *Microtubule dynamics regulate cyclic stretch-induced cell alignment in human airway smooth muscle cells*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26384.
33. Krishnan, R., et al., *Airway smooth muscle and bronchospasm: fluctuating, fluidizing, freezing*. Respir Physiol Neurobiol, 2008. **163**(1-3): p. 17-24.
34. Trepac, X., et al., *Universal physical responses to stretch in the living cell*. Nature, 2007. **447**(7144): p. 592-5.
35. Fabry, B. and J.J. Fredberg, *Remodeling of the airway smooth muscle cell: are we built of glass?* Respir Physiol Neurobiol, 2003. **137**(2-3): p. 109-24.
36. DiPaolo, B.C. and S.S. Margulies, *Rho kinase signaling pathways during stretch in primary alveolar epithelia*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **302**(10): p. L992-1002.
37. Mizuno, Y., et al., *Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo*. Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **295**(2): p. C358-64.
38. Desai, L.P., et al., *High tidal volume mechanical ventilation with hyperoxia alters alveolar type II cell adhesion*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **293**(3): p. L769-78.
39. Sahai, E., M.F. Olson, and C.J. Marshall, *Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility*. EMBO J, 2001. **20**(4): p. 755-66.
40. Merrien, J., et al., *[Mechanotransduction and the bronchoalveolar epithelium]*. Rev Mal Respir, 2010. **27**(10): p. 1164-74.
41. Schaafsma, D., et al., *Allergic sensitization enhances the contribution of Rho-kinase to airway smooth muscle contraction*. Br J Pharmacol, 2004. **143**(4): p. 477-84.
42. Bacallao, R., et al., *ATP depletion: a novel method to study junctional properties in epithelial tissues. I. Rearrangement of the actin cytoskeleton*. J Cell Sci, 1994. **107** (Pt 12): p. 3301-13.
43. Bursac, P., et al., *Cytoskeleton dynamics: fluctuations within the network*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **355**(2): p. 324-30.
44. Bursac, P., et al., *Cytoskeletal remodelling and slow dynamics in the living cell*. Nat Mater, 2005. **4**(7): p. 557-61.
45. Lenormand, G. and J.J. Fredberg, *Deformability, dynamics, and remodeling of cytoskeleton of the adherent living cell*. Biorheology, 2006. **43**(1): p. 1-30.
46. Skloot, G., S. Permutt, and A. Togias, *Airway hyperresponsiveness in asthma: a problem of limited smooth muscle relaxation with inspiration*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2393-403.

47. West, A.R., et al., *Airways dilate to simulated inspiratory but not expiratory manoeuvres*. Eur Respir J, 2012. **40**(2): p. 455-61.
48. LaPrad, A.S., et al., *Maintenance of airway caliber in isolated airways by deep inspiration and tidal strains*. J Appl Physiol, 2008. **105**(2): p. 479-85.
49. Brown, R.H., et al., *High-resolution computed tomographic evaluation of airway distensibility and the effects of lung inflation on airway caliber in healthy subjects and individuals with asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(4): p. 994-1001.
50. LaPrad, A.S. and K.R. Lutchen, *Respiratory impedance measurements for assessment of lung mechanics: focus on asthma*. Respir Physiol Neurobiol, 2008. **163**(1-3): p. 64-73.
51. Brown, R.H. and W. Mitzner, *Airway response to deep inspiration: role of inflation pressure*. J Appl Physiol, 2001. **91**(6): p. 2574-8.
52. Noble, P.B., P.K. McFawn, and H.W. Mitchell, *Responsiveness of the isolated airway during simulated deep inspirations: effect of airway smooth muscle stiffness and strain*. J Appl Physiol (1985), 2007. **103**(3): p. 787-95.
53. Lassalle, N., et al., *Electropolymerisable pyrrole-oligonucleotide: synthesis and analysis of ODN hybridisation by fluorescence and QCM*. Talanta, 2001. **55**(5): p. 993-1004.
54. Noble, P.B., et al., *Responsiveness of the human airway in vitro during deep inspiration and tidal oscillation*. J Appl Physiol, 2011. **110**(6): p. 1510-8.
55. An, S.S., et al., *Airway smooth muscle dynamics: a common pathway of airway obstruction in asthma*. Eur Respir J, 2007. **29**(5): p. 834-60.
56. LaPrad, A.S., et al., *Tidal stretches do not modulate responsiveness of intact airways in vitro*. J Appl Physiol, 2010. **109**(2): p. 295-304.
57. Chapman, D.G., et al., *Effect of deep inspiration avoidance on ventilation heterogeneity and airway responsiveness in healthy adults*. J Appl Physiol (1985), 2011. **110**(5): p. 1400-5.
58. Wysocki, M., et al., *Chaotic dynamics of resting ventilatory flow in humans assessed through noise titration*. Respir Physiol Neurobiol, 2006. **153**(1): p. 54-65.
59. Samara, Z., et al., *Effects of inspiratory loading on the chaotic dynamics of ventilatory flow in humans*. Respir Physiol Neurobiol, 2009. **165**(1): p. 82-9.
60. Fredberg, J.J., *Airway obstruction in asthma: does the response to a deep inspiration matter?* Respir Res, 2001. **2**(5): p. 273-5.
61. Fanelli, V., et al., *Acute respiratory distress syndrome: new definition, current and future therapeutic options*. J Thorac Dis, 2013. **5**(3): p. 326-34.
62. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1334-49.
63. Dreyfuss, D. and G. Saumon, *Barotrauma is volutrauma, but which volume is the one responsible?* Intensive Care Med, 1992. **18**(3): p. 139-41.
64. Dreyfuss, D., et al., *High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure*. Am Rev Respir Dis, 1988. **137**(5): p. 1159-64.
65. Dreyfuss, D. and G. Saumon, *Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies*. Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(1): p. 294-323.
66. Brower, R.G., et al., *Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2004. **351**(4): p. 327-36.
67. Briel, M., et al., *Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2010. **303**(9): p. 865-73.
68. Pugin, 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): p. 362-70.
69. Krane, C.M., et al., *Altered regulation of aquaporin gene expression in allergen and IL-13-induced mouse models of asthma*. Cytokine, 2009. **46**(1): p. 111-8.
70. Pugin, J., et al., *Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro*. Am J Physiol, 1998. **275**(6 Pt 1): p. L1040-50.

71. Villar, J., et al., *Activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway by mechanical ventilation is associated with ventilator-induced pulmonary fibrosis in healthy lungs*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e23914.
72. Sinclair, S.E., et al., *Positive end-expiratory pressure alters the severity and spatial heterogeneity of ventilator-induced lung injury: an argument for cyclical airway collapse*. J Crit Care, 2009. **24**(2): p. 206-11.
73. Bates, J.H. and A.M. Lauzon, *Modeling the oscillation dynamics of activated airway smooth muscle strips*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(5): p. L849-55.
74. Ito, S., et al., *Roles of stretch-activated cation channel and Rho-kinase in the spontaneous contraction of airway smooth muscle*. Eur J Pharmacol, 2006. **552**(1-3): p. 135-42.
75. Ito, S., et al., *A novel Ca²⁺ influx pathway activated by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008. **38**(4): p. 407-13.
76. Bai, T.R., et al., *On the terminology for describing the length-force relationship and its changes in airway smooth muscle*. J Appl Physiol (1985), 2004. **97**(6): p. 2029-34.
77. Kuo, K.H., et al., *Myosin thick filament lability induced by mechanical strain in airway smooth muscle*. J Appl Physiol (1985), 2001. **90**(5): p. 1811-6.
78. Wang, L. and P.D. Pare, *Deep inspiration and airway smooth muscle adaptation to length change*. Respir Physiol Neurobiol, 2003. **137**(2-3): p. 169-78.
79. Seow, C.Y., *Myosin filament assembly in an ever-changing myofilament lattice of smooth muscle*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(6): p. C1363-8.
80. Shen, X., et al., *Pharmacological modulation of the mechanical response of airway smooth muscle to length oscillation*. J Appl Physiol, 1997. **83**(3): p. 739-45.
81. Scotland, R.S., et al., *Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation: a novel mechanism involved in myogenic constriction*. Circ Res, 2004. **95**(10): p. 1027-34.
82. Joos, G.F., P.R. Germonpre, and R.A. Pauwels, *Role of tachykinins in asthma*. Allergy, 2000. **55**(4): p. 321-37.
83. Berger, P., R. Marthan, and J.M. Tunon de Lara, *[The pathophysiological role of smooth muscle cells in bronchial inflammation]*. Rev Mal Respir, 2002. **19**(6): p. 778-94.
84. Bara, I., et al., *Pathophysiology of bronchial smooth muscle remodelling in asthma*. Eur Respir J, 2010. **36**(5): p. 1174-84.
85. Legate, K.R. and R. Fassler, *Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 2): p. 187-98.
86. Geiger, B., J.P. Spatz, and A.D. Bershadsky, *Environmental sensing through focal adhesions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(1): p. 21-33.
87. Balaban, N.Q., et al., *Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(5): p. 466-72.
88. Saez, A., et al., *Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(20): p. 8281-6.
89. Tan, J.L., et al., *Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1484-9.
90. Engler, A.J., et al., *Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments*. J Cell Biol, 2004. **166**(6): p. 877-87.
91. Kumar, S., et al., *Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics*. Biophys J, 2006. **90**(10): p. 3762-73.
92. Candenäs, M.L., et al., *Effect of epithelium removal and of enkephalin inhibition on the bronchoconstrictor response to three endothelins of the human isolated bronchus*. Eur J Pharmacol, 1992. **210**(3): p. 291-7.
93. Reed, C.E. and H. Kita, *The role of protease activation of inflammation in allergic respiratory diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(5): p. 997-1008; quiz 1009.

94. Mandel, L.J., R.B. Doctor, and R. Bacallao, *ATP depletion: a novel method to study junctional properties in epithelial tissues. II. Internalization of Na⁺,K⁺-ATPase and E-cadherin*. J Cell Sci, 1994. **107** (Pt 12): p. 3315-24.
95. Araujo, B.B., et al., *Extracellular matrix components and regulators in the airway smooth muscle in asthma*. Eur Respir J, 2008. **32**(1): p. 61-9.
96. Brightling, C.E., et al., *Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma*. N Engl J Med, 2002. **346**(22): p. 1699-705.
97. Ochoa, C., et al., *Low molecular weight hyaluronan, via AP-1 and NF-kappaB signalling, induces IL-8 in transformed bronchial epithelial cells*. Swiss Med Wkly, 2011. **141**: p. w13255.
98. Hernandez, J.M., G. Cox, and L.J. Janssen, *Involvement of the neurokinin-2 receptor in airway smooth muscle stretch-activated contractions assessed in perfused intact bovine bronchial segments*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **327**(2): p. 503-10.
99. Noble, P.B., P.K. McFawn, and H.W. Mitchell, *Intraluminal pressure oscillation enhances subsequent airway contraction in isolated bronchial segments*. J Appl Physiol (1985), 2004. **96**(3): p. 1161-5.
100. Cavanaugh, K.J., Jr., J. Oswari, and S.S. Margulies, *Role of stretch on tight junction structure in alveolar epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001. **25**(5): p. 584-91.
101. Chu, E.K., et al., *Bronchial epithelial compression regulates epidermal growth factor receptor family ligand expression in an autocrine manner*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(5): p. 373-80.
102. Corry, D.B., et al., *Overlapping and independent contributions of MMP2 and MMP9 to lung allergic inflammatory cell egression through decreased CC chemokines*. FASEB J, 2004. **18**(9): p. 995-7.
103. Schmidt, D. and K.F. Rabe, *The role of leukotrienes in the regulation of tone and responsiveness in isolated human airways*. Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(2 Pt 2): p. S62-7.
104. Donovan, G.M., J. Sneyd, and M.H. Tawhai, *The importance of synergy between deep inspirations and fluidization in reversing airway closure*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e48552.
105. Ohno, M., et al., *Shear stress elevates endothelial cGMP. Role of a potassium channel and G protein coupling*. Circulation, 1993. **88**(1): p. 193-7.
106. Jo, H., et al., *Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells. Gi2- and Gbeta/gamma-dependent signaling pathways*. J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 1395-401.
107. Shen, X., S.J. Gunst, and R.S. Tepper, *Effect of tidal volume and frequency on airway responsiveness in mechanically ventilated rabbits*. J Appl Physiol, 1997. **83**(4): p. 1202-8.
108. Wang, L., et al., *Mechanical properties of the tracheal mucosal membrane in the rabbit. I. steady-state stiffness as a function of age*. J Appl Physiol (1985), 2000. **88**(3): p. 1014-21.
109. Noble, P.B., et al., *Deep inspiration and airway physiology: human, canine, porcine, or bovine?* J Appl Physiol, 2010. **109**(3): p. 938-9; author reply 940-1.
110. Konigshoff, M. and O. Eickelberg, *WNT signaling in lung disease: a failure or a regeneration signal?* Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **42**(1): p. 21-31.
111. Bailey, E.F. and R.F. Fregosi, *Modulation of upper airway muscle activities by bronchopulmonary afferents*. J Appl Physiol, 2006. **101**(2): p. 609-17.
112. Faisy, C., et al., *Airway response to acute mechanical stress in a human bronchial model of stretch*. Crit Care, 2011. **15**(5): p. R208.
113. Watson, N., H. Magnussen, and K.F. Rabe, *The relevance of resting tension to responsiveness and inherent tone of human bronchial smooth muscle*. Br J Pharmacol, 1998. **123**(4): p. 694-700.
114. Bosse, Y., et al., *Adaptation of airway smooth muscle to basal tone: relevance to airway hyperresponsiveness*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **40**(1): p. 13-8.
115. Sanderson, M.J., et al., *Regulation of airway smooth muscle cell contractility by Ca²⁺ signaling and sensitivity*. Proc Am Thorac Soc, 2008. **5**(1): p. 23-31.

116. Dimopoulos, G.J., et al., *Ca²⁺-dependent rapid Ca²⁺ sensitization of contraction in arterial smooth muscle*. *Circ Res*, 2007. **100**(1): p. 121-9.
117. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(4): p. 1325-58.
118. Lincoln, T.M., *Myosin phosphatase regulatory pathways: different functions or redundant functions?* *Circ Res*, 2007. **100**(1): p. 10-2.
119. Wang, L., P. Chitano, and T.M. Murphy, *A maturational model for the study of airway smooth muscle adaptation to mechanical oscillation*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005. **83**(10): p. 817-24.
120. Bosse, Y., et al., *Length adaptation of airway smooth muscle*. *Proc Am Thorac Soc*, 2008. **5**(1): p. 62-7.
121. Tremblay, L., 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): p. 944-52.
122. Fabry, B. and J.J. Fredberg, *Mechanotransduction, asthma, and airway smooth muscle*. *Drug Discov Today Dis Models*, 2007. **4**(3): p. 131-137.
123. Jop, P., et al., *Microscale rheology of a soft glassy material close to yielding*. *Phys Rev Lett*, 2012. **108**(14): p. 148301.
124. Maksym, G.N., et al., *Beneficial and harmful effects of oscillatory mechanical strain on airway smooth muscle*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005. **83**(10): p. 913-22.
125. Noble, P.B., et al., *Airway Smooth Muscle Dynamics and Hyperresponsiveness: In and outside the Clinic*. *J Allergy (Cairo)*, 2012. **2012**: p. 157047.
126. Gunst, S.J. and D.D. Tang, *The contractile apparatus and mechanical properties of airway smooth muscle*. *Eur Respir J*, 2000. **15**(3): p. 600-16.
127. Ciobanasu, C., B. Faivre, and C. Le Clainche, *Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: the multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions*. *Eur J Cell Biol*, 2013. **92**(10-11): p. 339-48.
128. Thomas, R.A., et al., *Mechanical stretch has contrasting effects on mediator release from bronchial epithelial cells, with a rho-kinase-dependent component to the mechanotransduction pathway*. *Respir Med*, 2006. **100**(9): p. 1588-97.
129. Guardiola, J., et al., *Airway mechanoreceptor deactivation*. *J Appl Physiol*, 2007. **103**(2): p. 600-7.
130. Ali, F., et al., *Mechanism of partial adaptation in airway smooth muscle after a step change in length*. *J Appl Physiol (1985)*, 2007. **103**(2): p. 569-77.
131. Seow, C.Y., V.R. Pratusевич, and L.E. Ford, *Series-to-parallel transition in the filament lattice of airway smooth muscle*. *J Appl Physiol (1985)*, 2000. **89**(3): p. 869-76.
132. Kuo, K.H., et al., *Structure-function correlation in airway smooth muscle adapted to different lengths*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. **285**(2): p. C384-90.
133. Khangure, S.R., et al., *Cyclical elongation regulates contractile responses of isolated airways*. *J Appl Physiol (1985)*, 2004. **97**(3): p. 913-9.
134. Barchasz, E., et al., *Interleukin-1beta-induced hyperresponsiveness to [Sar9, Met(O2)11] substance P in isolated human bronchi*. *Eur J Pharmacol*, 1999. **379**(1): p. 87-95.
135. Waters, C.M., et al., *Cellular biomechanics in the lung*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2002. **283**(3): p. L503-9.
136. Chin, L.Y., et al., *Human airway smooth muscle is structurally and mechanically similar to that of other species*. *Eur Respir J*, 2010. **36**(1): p. 170-7.
137. Raqeeb, A., et al., *Length oscillation mimicking periodic individual deep inspirations during tidal breathing attenuates force recovery and adaptation in airway smooth muscle*. *J Appl Physiol (1985)*, 2010. **109**(5): p. 1476-82.
138. Deng, L., et al., *Airway smooth muscle tone modulates mechanically induced cytoskeletal stiffening and remodeling*. *J Appl Physiol (1985)*, 2005. **99**(2): p. 634-41.

139. Lavoie, T.L., et al., *Dilatation of the constricted human airway by tidal expansion of lung parenchyma*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **186**(3): p. 225-32.
140. Bates, J.H. and K.R. Lutchen, *The interface between measurement and modeling of peripheral lung mechanics*. Respir Physiol Neurobiol, 2005. **148**(1-2): p. 153-64.
141. Grinnan, D.C. and J.D. Truwit, *Clinical review: respiratory mechanics in spontaneous and assisted ventilation*. Crit Care, 2005. **9**(5): p. 472-84.
142. Dubois, A.B., et al., *Oscillation mechanics of lungs and chest in man*. J Appl Physiol, 1956. **8**(6): p. 587-94.
143. Grimby, G., et al., *Frequency dependence of flow resistance in patients with obstructive lung disease*. J Clin Invest, 1968. **47**(6): p. 1455-65.
144. Di Mango, A.M., et al., *Changes in respiratory mechanics with increasing degrees of airway obstruction in COPD: detection by forced oscillation technique*. Respir Med, 2006. **100**(3): p. 399-410.
145. Kaczka, D.W., et al., *Partitioning airway and lung tissue resistances in humans: effects of bronchoconstriction*. J Appl Physiol (1985), 1997. **82**(5): p. 1531-41.
146. Petak, F., et al., *Methacholine-induced bronchoconstriction in rats: effects of intravenous vs. aerosol delivery*. J Appl Physiol (1985), 1997. **82**(5): p. 1479-87.
147. Bayat, S., et al., *Methacholine and ovalbumin challenges assessed by forced oscillations and synchrotron lung imaging*. Am J Respir Crit Care Med, 2009. **180**(4): p. 296-303.
148. Albu, G., et al., *Comparison of static end-expiratory and effective lung volumes for gas exchange in healthy and surfactant-depleted lungs*. Anesthesiology, 2013. **119**(1): p. 101-10.
149. Lundquist, H., et al., *CT-assessment of dependent lung densities in man during general anaesthesia - Summary*. Acta Radiol, 1995. **36**(6): p. 626-32.
150. Dyhr, T., N. Laursen, and A. Larsson, *Effects of lung recruitment maneuver and positive end-expiratory pressure on lung volume, respiratory mechanics and alveolar gas mixing in patients ventilated after cardiac surgery*. Acta Anaesthesiol Scand, 2002. **46**(6): p. 717-25.
151. Rusca, M., et al., *Prevention of atelectasis formation during induction of general anesthesia*. Anesth Analg, 2003. **97**(6): p. 1835-9.
152. Rothen, H.U., et al., *Dynamics of re-expansion of atelectasis during general anaesthesia*. Br J Anaesth, 1999. **82**(4): p. 551-6.
153. Rothen, H.U., et al., *Re-expansion of atelectasis during general anaesthesia: a computed tomography study (Summary)*. Br J Anaesth, 1993. **71**(6): p. 788-95.
154. Tusman, G., et al., *'Alveolar recruitment strategy' improves arterial oxygenation during general anaesthesia*. Br J Anaesth, 1999. **82**(1): p. 8-13.
155. Iannuzzi, M., et al., *Different patterns of lung recruitment maneuvers in primary acute respiratory distress syndrome: effects on oxygenation and central hemodynamics*. Minerva Anesthesiol, 2010. **76**(9): p. 692-8.
156. Orfanos, S.E., et al., *Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill*. Intensive Care Med, 2004. **30**(9): p. 1702-14.
157. Amato, M.B., et al., *Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 1998. **338**(6): p. 347-54.
158. Badet, M., et al., *Comparison of optimal positive end-expiratory pressure and recruitment maneuvers during lung-protective mechanical ventilation in patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome*. Respir Care, 2009. **54**(7): p. 847-54.
159. Gernoth, C., et al., *Respiratory and haemodynamic changes during decremental open lung positive end-expiratory pressure titration in patients with acute respiratory distress syndrome*. Crit Care, 2009. **13**(2): p. R59.
160. Del Sorbo, L., A. Goffi, and V.M. Ranieri, *Mechanical ventilation during acute lung injury: current recommendations and new concepts*. Presse Med, 2011. **40**(12 Pt 2): p. e569-83.
161. Guerin, C., et al., *Efficacy and safety of recruitment maneuvers in acute respiratory distress syndrome*. Ann Intensive Care, 2011. **1**(1): p. 9.

162. Meade, M.O., et al., *A study of the physiologic responses to a lung recruitment maneuver in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome*. *Respir Care*, 2008. **53**(11): p. 1441-9. 212
163. Meade, M.O., et al., *Ventilation strategy using low tidal volumes, recruitment maneuvers, and high positive end-expiratory pressure for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2008. **299**(6): p. 637-45.
164. Nielsen, J., et al., *Lung recruitment maneuver depresses central hemodynamics in patients following cardiac surgery*. *Intensive Care Med*, 2005. **31**(9): p. 1189-94.
165. Jardin, F., et al., *Influence of positive end-expiratory pressure on left ventricular performance*. *N Engl J Med*, 1981. **304**(7): p. 387-92.
166. Daudel, F., et al., *Effects of lung recruitment maneuvers on splanchnic organ perfusion during endotoxin-induced pulmonary arterial hypertension*. *Shock*, 2010. **34**(5): p. 488-94.
167. Fischer, L.G., H. Van Aken, and H. Burkle, *Management of pulmonary hypertension: physiological and pharmacological considerations for anesthesiologists*. *Anesth Analg*, 2003. **96**(6): p. 1603-16.
168. Biondi, J.W., et al., *The effect of incremental positive end-expiratory pressure on right ventricular hemodynamics and ejection fraction*. *Anesth Analg*, 1988. **67**(2): p. 144-51.
169. Tomashefski, J.F., Jr., et al., *The pulmonary vascular lesions of the adult respiratory distress syndrome*. *Am J Pathol*, 1983. **112**(1): p. 112-26.
170. Price, L.C., et al., *Pathophysiology of pulmonary hypertension in acute lung injury*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012. **302**(9): p. L803-15.
171. Takeuchi, M., et al., *Recruitment maneuver and high positive end-expiratory pressure improve hypoxemia in patients after pulmonary thromboendarterectomy for chronic pulmonary thromboembolism*. *Crit Care Med*, 2005. **33**(9): p. 2010-4.
172. Gunaydin, S., et al., *The effects of vasoactive intestinal peptide on monocrotaline induced pulmonary hypertensive rabbits following cardiopulmonary bypass: a comparative study with isoproterenol and nitroglycerine*. *Cardiovasc Surg*, 2002. **10**(2): p. 138-45.
173. Lai, Y.L., J.W. Olson, and M.N. Gillespie, *Ventilatory dysfunction precedes pulmonary vascular changes in monocrotaline-treated rats*. *J Appl Physiol*, 1991. **70**(2): p. 561-6.
174. Meyrick, B., W. Gamble, and L. Reid, *Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study*. *Am J Physiol*, 1980. **239**(5): p. H692-702.
175. Gomez-Arroyo, J.G., et al., *The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012. **302**(4): p. L363-9.
176. Stenmark, K.R., et al., *Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. **297**(6): p. L1013-32.
177. Jardin, F. and A. Vieillard-Baron, *Is there a safe plateau pressure in ARDS? The right heart only knows*. *Intensive Care Med*, 2007. **33**(3): p. 444-7.
178. Habre, W., et al., *Measuring end-expiratory lung volume and pulmonary mechanics to detect early lung function impairment in rabbits*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2006. **152**(1): p. 72-82.
179. Habre, W., et al., *Role of endogenous histamine in altered lung mechanics in rabbits*. *Anesthesiology*, 2002. **96**(2): p. 409-15.
180. Hantos, Z., et al., *Input impedance and peripheral inhomogeneity of dog lungs*. *J Appl Physiol* (1985), 1992. **72**(1): p. 168-78.
181. Force, A.D.T., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. *JAMA*, 2012. **307**(23): p. 2526-33.
182. Rosenberg, H.C. and M. Rabinovitch, *Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension*. *Am J Physiol*, 1988. **255**(6 Pt 2): p. H1484-91.
183. Lee, J., et al., *Golgi, trafficking, and mitosis dysfunctions in pulmonary arterial endothelial cells exposed to monocrotaline pyrrole and NO scavenging*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. **297**(4): p. L715-28.

184. Huang, J., et al., *Progressive endothelial cell damage in an inflammatory model of pulmonary hypertension*. Exp Lung Res, 2010. **36**(1): p. 57-66.
185. Petak, F., et al., *Impact of microvascular circulation on peripheral lung stability*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(4): p. L879-89.
186. Petak, F., et al., *Lung mechanical and vascular changes during positive- and negative-pressure lung inflations: importance of reference pressures in the pulmonary vasculature*. J Appl Physiol (1985), 2009. **106**(3): p. 935-42.
187. Kornecki, A., et al., *Vascular remodeling protects against ventilator-induced lung injury in the in vivo rat*. Anesthesiology, 2008. **108**(6): p. 1047-54.
188. Wang, B., et al., *Force control of endothelium permeability in mechanically stressed pulmonary micro-vascular endothelial cells*. Biomed Mater Eng, 2012. **22**(1-3): p. 163-70.
189. Vion, A.C., et al., *Mechanical forces stimulate endothelial microparticle generation via caspase-dependent apoptosis-independent mechanism*. Pulm Circ, 2013. **3**(1): p. 95-9.
190. Amorim, E.D., et al., *Alveolar recruitment manoeuvre is safe in children prone to pulmonary hypertensive crises following open heart surgery: a pilot study*. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2014.
191. Severgnini, P., et al., *Protective mechanical ventilation during general anesthesia for open abdominal surgery improves postoperative pulmonary function*. Anesthesiology, 2013. **118**(6): p. 1307-21.

Résumé/ Abstract:

L'arbre bronchique constitue une large interface avec le milieu extérieur ce qui en fait notamment une sentinelle immunologique de l'organisme. Par ailleurs, il est soumis à de multiples contraintes physiques (variation de pressions lors du cycle ventilatoire) avec le développement de pathologies lorsque la réponse à ces contraintes est inadaptée : cas de l'hyperréactivité bronchique. Or les études expérimentales sont peu nombreuses concernant cet organe. Nous avons donc essayé de caractériser la réponse bronchique des voies aériennes distales à partir d'un modèle isolé de bronche humaine qui était soumis à l'application d'un stretch unique ou cyclique tel qu'il est généré lors de la ventilation mécanique. D'un point de vue fonctionnel, le stretch unique ou cyclique s'accompagne d'une modification significative du tonus basal de la bronche avec deux étapes : l'une précoce apparaît au cours de l'exposition même des variations de tension pariétale, l'autre est tardive et apparaît à l'arrêt de l'étirement. Concernant l'étape précoce, elle se révèle robuste car aucun pré-traitement et particulièrement l'abrasion de l'épithélium ne la supprime totalement. La caractérisation de cette réponse implique notamment la voie des NO synthases et des Rho-A kinase. La réponse tardive fait quant à elle intervenir l'épithélium ainsi que la voie des NO-synthase suggérant un rôle prépondérant du NO. Par contre, ces modifications de force au repos sont indépendantes de la sécrétion de médiateurs inflammatoires. Enfin, l'affinité à l'acétylcholine est stable au cours du temps de la bronche quelle que soient les conditions. L'approche génétique renforce par contre le rôle du tissu de soutien bronchique puisque l'application d'un stretch active la synthèse de molécules intervenant dans la production ou la qualité du collagène : MMP-9... Au total, l'application d'une contrainte cyclique renforce la bronchoconstriction par inhibition principale de la voie des NO synthases et mécanotransduction. L'étude in-vivo de cette réponse est requise pour établir sa force et envisager des thérapies adaptées.

The tracheo-bronchial tree is a true immunologic sentinel related to the huge interface with the external environment. Moreover, it is submitted to variable physical strains (tidal ventilation and variation in pressure) and an excessive response leads to the genesis of some pathology as bronchial hyper-responsiveness. Experimental studies about bronchial organ are scarce and the aim of this work on an isolated organ model was to characterize the human bronchial response to a single or repetitive and physiological stretch as observed during mechanical ventilation. From a functional perspective, a single strain or a cyclic stretch significantly increased the basal tone of the human bronchus with a two-step response: the early response appears during cycling and the delayed after the stretch has ceased. The early response is robust then no pre-treatment and especially epithelial removal totally inhibits it. This response implies NO synthase and Rho-A kinase pathway with a reduction of the developed basal tone with these inhibitors. As it concerns the late response, it involved epithelium and NO synthase suggesting a prominent action of NO. Inflammatory mediators are not directly involved in the rise of basal tone because stretch-induced secretion as detected with ELISA is very low. At last, affinity for acetylcholine does not change during this physiological experiment. Genomic approach was quite disappointed because applying stretch only transiently activates transcription genes for MMP-9, involved in the collagen production and consequently in the support tissue of the bronchial. As a conclusion, cyclic stretch enhances bronchoconstriction by inhibition of the NO-synthase pathway and probable thermodynamic interaction. Further in-vivo analysis are required to confirm its powerful and test some therapeutics.