

Comprendre le poumon agressé. Actes du séminaire de recherche translationnelle de la Société de Réanimation de Langue Française (6 décembre 2016)

Understanding Acute Lung Injury. Translational Research Meeting of the French Intensive Care Society (December 6th, 2016)

A. Guillon · S. Gibot · H. Ait-Oufella · F. Uhel · G. Monneret · T. Sharshar · F.S. Taccone · J. Textoris · F. Tamion · L. Zafrani · N. de Prost · F. Pène pour la Commission de Recherche Translationnelle de la Société de Réanimation de Langue Française

Reçu le 10 avril 2017 ; accepté le 11 avril 2017
© SRLF et Lavoisier SAS 2017

Résumé Le séminaire de recherche translationnelle 2016 organisé par la Société de Réanimation de Langue Française s'est focalisé sur les mécanismes de réponse à l'agression et de réparation pulmonaire. Le poumon représente une interface essentielle entre l'hôte et son environnement et est à ce titre soumis à des agressions constantes et multiples. La réanimation s'est en grande partie construite autour de la prise en charge de la défaillance respiratoire. Au-delà du traitement étiologique et du support ventilatoire, se pose la problématique récurrente du développement de thérapeutiques adjuvantes à visée immunomodulatrice. Le développement de telles thérapeutiques innovantes est conditionné par les avancées dans la compréhension de la physiopathologie de

l'agression pulmonaire aiguë, ainsi que par la validation au lit du patient d'outils d'évaluation permettant de quantifier l'effet des interventions thérapeutiques.

Mots clés Épithélium · Plaquette · Immuno-modulation · Fibrocyte · NETose · Tomographie par émission de positrons

Abstract The 2016 translational research meeting of the French Intensive Care Society was focused on lung defense and repair. The lung represents a crucial interface between the host and the environment, and is therefore constantly prone to various insults. The development of critical care

A. Guillon (✉)
Service de médecine intensive - réanimation, CHU de Tours,
F-37000 Tours, France
e-mail : antoine.guillon@univ-tours.fr

S. Gibot
Service de réanimation médicale, hôpital central, CHU de Nancy,
F-54000 Nancy, France

H. Ait-Oufella
Service de réanimation médicale, hôpital Saint-Antoine, APHP,
F-75012 Paris, France

F. Uhel
CHU de Rennes, hôpital Pontchaillou,
service de réanimation médicale et infectieuse

G. Monneret
Laboratoire d'immunologie, hôpital Édouard-Herriot,
CHU de Lyon, F-69003 Lyon, France

T. Sharshar
Service de réanimation médicale, hôpital Raymond-Poincaré,
APHP, F-92380 Garches, France

F.S. Taccone
Service de soins intensifs et réanimation, hôpital Erasme,
1070 Bruxelles, Belgique

J. Textoris
Hospices Civils de Lyon, département d'anesthésie-réanimation,
hôpital Édouard-Herriot, CHU de Lyon,
F-69003 Lyon, France

F. Tamion
Service de réanimation médicale, hôpital Charles-Nicolle,
CHU de Rouen, F-76000 Rouen, France

L. Zafrani
CHU Saint-Louis, service de réanimation médicale

N. de Prost
Service de réanimation médicale, hôpital Henri Mondor,
F-94010 Créteil, France

F. Pène pour la Commission de Recherche Translationnelle
de la Société de Réanimation de Langue Française
CHU Cochin – service de réanimation médicale & université
Paris Descartes

medicine was largely linked to the management of acute respiratory failure. Beyond etiological treatments and ventilatory support, the potentially harmful effects of unleashed pulmonary inflammation in critically ill patients led researchers to assess the benefits of adjuvant immunomodulatory therapies. The development of such innovative treatments not only depends on a better understanding of the pathophysiology of acute lung injury, but also required the validation of dynamic assessment tools to be used at the bedside.

Keywords Epithelium · Platelet · Immuno-modulation · Fibrocyte · NETose · Positron emission tomography

Introduction

La Société de Réanimation de Langue Française est engagée dans la promotion de la recherche fondamentale et translationnelle en réanimation. À ce titre, la Commission de Recherche Translationnelle organise un séminaire annuel qui vise à réunir des cliniciens et des chercheurs autour d'une thématique d'intérêt de la discipline. Le séminaire 2016 s'est focalisé sur les mécanismes de réponse à l'agression et de réparation pulmonaire. Les premières interventions ont porté sur les différents acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans les mécanismes de l'inflammation pulmonaire et dans les processus de réparation, en réponse notamment à des agressions infectieuses bactériennes et virales. La seconde partie a permis d'appréhender les techniques d'imagerie émergentes permettant de visualiser l'inflammation pulmonaire. Enfin, des perspectives thérapeutiques basées sur des approches pharmacologiques ou technologiques ont été évoquées.

Réponse épithéliale à l'agression pulmonaire

(D'après la communication de Mustapha Si Tahar, Inserm U1100, CEPR - centre d'étude des pathologies respiratoires, Tours)

Les cellules épithéliales sont des acteurs majeurs de l'immunité de la muqueuse respiratoire. Leur rôle dans la mise en place d'un ascenseur mucociliaire est bien connu. Il fait intervenir les cellules épithéliales ciliées et les cellules sécrétrices de mucus qui permettent l'élimination mécanique de la majorité des particules nocives et des microorganismes inhalés (bactéries, virus, champignons). Cependant, une très grande variété d'autres mécanismes de défense de l'hôte sont également mis en jeu par l'épithélium respiratoire. Les cellules épithéliales régulent les réponses immunitaires innées et adaptatives grâce à la production de médiateurs spécifiques. La réponse immunitaire innée met en jeu des récepteurs spécifiques, les PRRs (*Pattern Recognition Receptors*)

qui reconnaissent des « signaux de danger » : soit des motifs associés aux micro-organismes, les PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*), soit des signaux endogènes dérivés de cellules endommagées, les DAMPS (*Damage Associated Molecular Patterns*). Les cellules épithéliales sont donc pourvues de PRRs qui peuvent être classés en quatre grandes catégories : les récepteurs de type *toll-like receptors* (TLRs), les récepteurs de type *NOD-like receptors* (NLRs), les *retinoid acid-inducible gene-1* (RIG-I) - *like receptors* (RLRs) et un groupe plus récemment découvert de senseurs intracytosoliques d'ADN et d'ARN [1]. Une meilleure compréhension de ces voies de signalisation a permis de mettre en évidence le rôle immunorégulateur de la cellule épithéliale respiratoire au cours de l'infection grippale. En effet, les conséquences cliniques de la grippe résultent surtout de l'inflammation dérégulée du tissu pulmonaire (*cytokine storm*), qui peut provoquer des lésions sévères, voire mortelles. Ainsi, il a été montré que la réponse inflammatoire à une infection grippale (virus influenza A, H3N2) dépendait de l'activation de TLR3 et de RIG-I [2-4]. Finalement, M. Si-Tahar et son équipe se sont interrogés sur le rôle bénéfique ou délétère de ces voies de signalisation dans ce contexte. Ils ont finalement pu démontrer, dans un modèle murin d'infection respiratoire par le virus H3N2, que la délétion homozygote du gène codant pour TLR-3 était un facteur protecteur (40 % de décès à 20 jours post-infection chez les souris TLR-3^{-/-} contre 100 % de mortalité chez les souris contrôles) [4]. De façon extrêmement intéressante, ce résultat était associé à une réponse inflammatoire plus faible dans les poumons des souris TLR-3^{-/-} alors même que la charge virale pulmonaire était supérieure à celle des souris contrôles (TLR-3^{+/+}). De façon similaire, il a été démontré que l'inhibition de RIG-I (par la surexpression de LGP-2) avait un effet protecteur lors d'une infection respiratoire par le virus de la grippe [5].

Finalement, l'ensemble de ces travaux, confirmés par d'autres équipes, a conduit à proposer le ciblage pharmacologique de la cellule épithéliale respiratoire pour prévenir les dérégulations inflammatoires délétères lors d'une infection grippale. Les calpaïnes (calpaïne 1 et calpaïne 2) sont des enzymes exprimées de manière ubiquitaire dans l'organisme et impliquées dans la cascade inflammatoire, selon un mécanisme calcium-dépendant. Or, le virus de la grippe accroît le calcium dans la cellule et la réponse inflammatoire. M. Si-Tahar et son équipe ont montré que l'inhibition de ces enzymes réduisait la capacité du virus à se répliquer dans les cellules épithéliales respiratoires, inhibait l'intensité de la réponse inflammatoire et accroissait ainsi le taux de survie de l'hôte infecté [6]. Ces résultats apportent de nouvelles perspectives dans la lutte contre la grippe : le blocage de la machinerie des cellules de l'hôte serait en effet une alternative intéressante car il limiterait la pression sélective des traitements antigrippaux et donc l'émergence de souches virales

résistantes. Le potentiel thérapeutique des calpaïnes reste à étudier dans les gripes graves des patients de réanimation.

Rôle des plaquettes au cours de l'infection pulmonaire

(D'après la communication de Béatrice Riteau, Inserm UMRS 1062, Aix-Marseille Université)

Les gripes sévères sont liées à une inflammation pulmonaire majeure avec des dommages tissulaires dont la physiopathologie demeure imparfaitement comprise. Si les cellules épithéliales constituent la cible primaire du virus *Influenzae*, les lésions pulmonaires de la pneumopathie grippale font intervenir d'autres acteurs cellulaires comme les cellules endothéliales et les polynucléaires neutrophiles [7] et, de manière plus inattendue, les plaquettes auxquelles plusieurs travaux récents attribuent des propriétés inflammatoires et immunitaires susceptibles de moduler la réponse à l'infection.

Dans un modèle murin d'infection à virus Influenza A, une augmentation du nombre de plaquettes est observée dans les lavages broncho-alvéolaires de souris infectées. De plus, des agrégats de plaquettes (marquées par le CD41) et de polynucléaires neutrophiles ont été objectivés lors d'analyses histologiques et immunohistochimiques des zones sous-endothéliales pulmonaires. Par ailleurs, la présence du virus H1N1 induit une activation plaquettaire mise en évidence par l'expression membranaire de P-sélectine ainsi que la production de marqueurs d'activation (sérotonine et P-sélectine soluble) chez les souris infectées [8].

Deux approches expérimentales ont permis d'évaluer le rôle des plaquettes dans l'infection grippale. Premièrement, l'utilisation de souris déficientes pour la GPIII (GPIII^{-/-}) et infectées par la grippe a permis de montrer qu'un défaut d'activation plaquettaire était un facteur protecteur lors de l'infection. Deuxièmement et de façon réciproque, l'activation plaquettaire induite par un agoniste d'un récepteur, *protease-activated receptor* (PAR)-4, (AYPGKF-NH2) était associée à une augmentation de mortalité. Les coupes pulmonaires des animaux traités par l'agoniste de PAR-4 démontraient une infiltration sous-endothéliale majeure par des agrégats de plaquettes et de polynucléaires neutrophiles dans les zones sous-endothéliales, mais sans impact sur la clairance virale. Ces résultats suggèrent qu'une activation plaquettaire joue un rôle délétère dans l'infection grippale sévère par le biais d'une exacerbation de la réponse inflammatoire pulmonaire [9,10].

Au-delà de leurs classiques fonctions hémostatiques, il a été démontré des propriétés immunomodulatrices des plaquettes dans des situations d'infections aiguës – propriétés jusqu'à très récemment inconnues. La mise en évidence du rôle des plaquettes dans la pathogénie de l'infection grippale permet

d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques par modulation de la réponse inflammatoire pulmonaire. Ainsi, dans un modèle expérimental, l'eptifibatide (antiagrégant plaquettaire inhibiteur des récepteurs des glycoprotéines IIb/IIIa) améliorerait la survie d'animaux infectés par le virus grippal [10]. Ce type d'approche, qui cible une protéine de l'hôte et non pas un composant microbien, présente l'intérêt majeur de s'affranchir des mécanismes d'échappement du pathogène après exposition à des médicaments antiviraux.

Mécanismes de réparation pulmonaire

(D'après la communication de Bruno Crestani et Marc Garnier, service de pneumologie, hôpital Bichat, Paris, Inserm U1152)

Les agressions pulmonaires conduisent à une réaction inflammatoire locale ainsi qu'à des lésions de l'épithélium et de la membrane basale, et ont potentiellement pour conséquence clinique le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). La réponse à ces agressions inclut un processus de réparation, caractérisé par des phénomènes exsudatifs et prolifératifs [11]. La profondeur des lésions épithéliales et de la membrane basale ainsi qu'une dérégulation des mécanismes de réparation peuvent toutefois conduire à une évolution fibrosante irréversible. La réaction inflammatoire au cours des agressions pulmonaires induit initialement un recrutement de polynucléaires neutrophiles et une migration de cellules mésenchymateuses locales ou circulantes sous l'effet de médiateurs inflammatoires et de chimiokines. Dans un second temps, la réparation tissulaire nécessite la résorption de l'exsudat inflammatoire, l'apoptose des cellules mésenchymateuses et la prolifération des cellules épithéliales. Le succès de ce processus dépend essentiellement de la survie des pneumocytes de type 2 et des remaniements de la matrice extracellulaire [12]. Plusieurs médiateurs solubles jouent un rôle essentiel. Le KGF (*Keratinocyte Growth Factor*) produit par les cellules mésenchymateuses ou encore l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) produit par les polynucléaires neutrophiles sanguins et alvéolaires permettent une prolifération des pneumocytes de type 2 [13,14]. Secondairement, les macrophages recrutés dans les alvéoles peuvent également, à travers la production d'interleukine 1, stimuler la production d'HGF et de KGF par les cellules mésenchymateuses [15]. Au-delà de leurs propriétés pro-inflammatoires, ces cellules immunitaires peuvent ainsi jouer un rôle dans la réparation pulmonaire.

Si les cellules mésenchymateuses sont essentielles à la réparation pulmonaire physiologique, la persistance d'un nombre important de fibroblastes pourrait toutefois conduire à une évolution vers la fibrose et participer à la mortalité au cours du SDRA. Ces fibroblastes proviennent essentiellement d'une amplification du pool local, et dans une moindre

mesure du recrutement de précurseurs circulants. La migration des fibroblastes dans les zones d'agression pulmonaire est une étape déterminante du processus fibro-prolifératif. Ainsi, dans des modèles murins d'agression pulmonaire, l'inhibition de la migration des fibroblastes diminue les lésions de fibrose et améliore la survie [16]. Chez les patients atteints de SDRA, la capacité de migration des fibroblastes est corrélée à la sévérité de l'atteinte alvéolaire et associée à un mauvais pronostic. Elle est régulée par les concentrations respectives de PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et de son récepteur soluble PDGF-R α [17]. Les fibrocytes sont des cellules mésenchymateuses circulantes dérivées des monocytes. Ils ont la capacité de se différencier en fibroblastes, d'interagir avec les autres cellules mésenchymateuses par la production de TGF β (*Transforming Growth Factor β*) et de produire des protéines de la matrice extracellulaire. Ils sont nécessaires à la cicatrisation normale mais leur recrutement excessif ou inadapté pourrait participer au processus fibrosant. Ainsi, dans les modèles murins d'agression pulmonaire à la bléomycine, l'inhibition du recrutement ou de la différenciation des fibrocytes prévient le développement de la fibrose [18]. Chez les patients atteints de SDRA, le nombre de fibrocytes dans le LBA est proportionnel au degré d'agression pulmonaire et constitue un facteur de risque indépendant de mortalité [19]. L'inhibition de la différenciation ou du recrutement de ces cellules pourrait ainsi avoir un effet bénéfique au cours des agressions pulmonaires. La protéine SAP (*Serum Amyloid P*) pourrait en particulier jouer un rôle bénéfique en inhibant la différenciation des monocytes en fibrocytes [20].

Plusieurs essais thérapeutiques visant à favoriser la réparation pulmonaire tout en limitant la fibrose sont actuellement en cours. Les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse produisent du KGF et de nombreux facteurs de croissance épithéliaux. Suite à de premiers résultats encourageants, elles font actuellement l'objet d'un essai de phase 2 chez les patients atteints de SDRA [21]. Dans un modèle humain d'agression pulmonaire par LPS inhalé, l'administration préalable de KGF augmentait les concentrations alvéolaires de protéines du surfactant, de cytokine anti-inflammatoire IL-1Ra et de GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) [22]. Un essai clinique est également en cours chez les patients atteints de SDRA [23].

NETose, nouvelle facette de l'immunité innée pulmonaire ?

(D'après la communication de Sylvie Chollet-Martin, hôpital Bichat INSERM UMR 996, université Paris-Sud)

Les NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) sont des filaments de chromatine associés à des protéines nucléaires,

cytoplasmiques et granulaires, issus des polynucléaires neutrophiles activés [24]. La NETose est un phénomène actif, très différent de l'apoptose ou la nécrose qui nécessite la citrullination des histones (par l'enzyme PAD4 - peptidylarginine deiminase 4 -) avec décondensation de la chromatine et explosion oxydative. La désintégration de la membrane nucléaire permet à la chromatine de fixer différentes protéines cytoplasmiques et granulaires parmi lesquelles des enzymes et des molécules microbicides. L'étape finale consiste en l'expulsion de la chromatine dans le milieu extracellulaire et la libération des NETs. En immunofluorescence, les NETs peuvent être mis en évidence par des marqueurs de l'ADN et des anticorps dirigés contre les histones H3 citrullinées, la lactoferrine ou l'élastase.

Les NETs peuvent avoir des rôles bénéfiques et délétères selon le contexte pathologique. Au cours des infections, ils permettent de piéger et contenir les pathogènes et de les détruire grâce aux composants microbicides présents à leur surface [25]. La NETose est particulièrement utile pour les pathogènes de grande taille dont la phagocytose est impossible pour le neutrophile. Cependant, les NETs induisent et entretiennent des réactions auto-immunes (lupus, polyarthrite rhumatoïde, vascularites à ANCA), activent la coagulation de façon pathologique, et peuvent être toxiques pour les tissus environnants, via les substances microbicides fixées sur la chromatine (histones, protéases). Par exemple, le rôle pathogène de NETs circulants a été démontré dans la polyarthrite rhumatoïde.

Plusieurs données de la littérature sont en faveur d'une toxicité pulmonaire des NETs. En transplantation pulmonaire, les NETs sont d'autant plus présents sur les greffons pulmonaires que la durée d'ischémie a été longue. Dans la mucoviscidose, des données récentes suggèrent que certains composants des NETs pourraient induire une auto-immunité en plus de leur effet toxique direct. Dans le SDRA, il existe une compartimentalisation sang/poumon des NETs avec une augmentation des NETs au niveau alvéolaire qui semble corrélée à la sévérité du SDRA. Les NETs circulants dans le sang ne semblent, à l'inverse, pas corrélés à la sévérité de l'atteinte respiratoire. Dans les SDRA post-traumatiques, les histones circulantes ont une toxicité propre et vont participer aux lésions alvéolaires. Les NETs sont présents dans les bronches des patients ayant un asthme allergique et sont corrélés à la sévérité de l'asthme. Les NETs peuvent modifier la maturation des cellules dendritiques et induire une polarisation Th2 qui joue un rôle majeur dans la maladie asthmatique.

Enfin, si la recherche s'est beaucoup concentrée sur les neutrophiles, d'autres sous-populations leucocytaires peuvent sécréter des équivalents de NETs, comme les éosinophiles (eosinoETs), les basophiles (basoETs) ou les monocytes (monoETs). Plusieurs stratégies thérapeutiques sont actuellement à l'étude pour moduler les NETs : la DNase, capable

de dégrader l'ADN extracellulaire, les inhibiteurs de PAD4 qui inhibent la citrullination des histones, les inhibiteurs de l'IFN α produits en excès par les cellules dendritiques en réponse aux NETs (sifilimumab) ou les inhibiteurs de C5 (eculizumab) qui empêchent l'activation des neutrophiles et l'induction de NETose.

Inflammation pulmonaire induite par la ventilation mécanique

(D'après la communication de Nicolas de Prost, service de réanimation médicale, hôpital Henri Mondor, Créteil)

La survenue des lésions pulmonaires induites par la ventilation mécanique ou *Ventilator-induced lung injury* (VILI) est déterminée essentiellement par des paramètres mécaniques: hauts volumes télé-inspiratoires et bas volumes télé-expiratoires, associés aux phénomènes d'ouverture-fermeture répétés des voies aériennes distales et à l'atelectrauma [26]. L'observation, dans des modèles animaux de VILI sur poumons initialement sains, d'une infiltration massive des poumons par des polynucléaires neutrophiles et la mise en évidence par Tremblay et al. en 1997 d'une production massive de cytokines par le poumon agressé [27] ont suggéré qu'une réaction inflammatoire pulmonaire, appelée biotrauma, pourrait être délétère par elle-même et contribuer au développement de ces lésions induites par la ventilation mécanique. Plusieurs modèles expérimentaux d'agressions pulmonaires multiples (*multiple hit injury*) ont non seulement confirmé que le poumon pouvait être le siège d'une réponse inflammatoire intense, mais ont également mis en évidence une réponse inflammatoire synergique lorsque l'agression mécanique survenait sur un poumon préalablement lésé [28].

L'inflammation pulmonaire est un marqueur précoce de VILI et a une distribution pulmonaire hétérogène. L'utilisation de l'imagerie pulmonaire par tomographie par émission de positrons (TEP) utilisant le 18F-fluoro-deoxyglucose (18F-FDG) comme traceur a permis de mettre en évidence dans un modèle de VILI chez la brebis l'existence d'une augmentation précoce du métabolisme pulmonaire, reflétant l'infiltration du poumon par des polynucléaires neutrophiles activés [29]. De manière intéressante, cette augmentation de métabolisme pulmonaire survenait avant même l'apparition d'une altération de la densité pulmonaire. Dans des modèles associant agression pulmonaire mécanique et endotoxémie, il a été mis en évidence l'existence d'un gradient ventrodorsal de fixation du 18F-FDG, les régions postéro-basales étant le siège d'une réaction inflammatoire plus intense. De manière intéressante, une analyse voxel par voxel démontrait que la fixation

du traceur était dépendante de la perfusion et de la perte d'aération régionale [30]. Dans un modèle de ventilation mécanique prolongée (24h) chez la brebis exposée à l'endotoxine bactérienne, l'hétérogénéité de la réponse inflammatoire pulmonaire était non seulement confirmée, les régions dépendantes du poumon fixant plus le traceur que les régions non-dépendantes, mais une expression régionale différentielle de certaines cytokines était mise en évidence, les régions dépendantes exprimant plus certaines cytokines (ex CXCL-1) que les régions non-dépendantes [31].

Plusieurs essais thérapeutiques ont été conduits pour tester l'efficacité d'une modulation de la réponse inflammatoire pulmonaire au cours du SDRA. À l'exception de quelques essais ayant évalué l'effet d'une corticothérapie qui ne seront pas discutés ici, toutes les autres interventions se sont avérées négatives. L'une des tentatives les plus récentes portait sur l'administration de statines au cours du SDRA, sans effet sur la mortalité ni sur aucun des critères de jugement cliniques prédéfinis [32]. Il semble donc illusoire de moduler la réponse inflammatoire pulmonaire en bloquant une voie de signalisation cellulaire particulière et ce à cause de la complexité de la physiopathologie du SDRA et de la multitude des voies de signalisation impliquées. Cependant, une application prometteuse de l'étude de la réponse inflammatoire pulmonaire pourrait être l'identification de sous-groupes de patients ayant des pronostics différents et des réponses différentes à des interventions thérapeutiques. Ainsi, Calfee et al. ont récemment utilisé une méthode d'analyse statistique dite en « classe latente » pour séparer deux groupes de patients ayant un SDRA en fonction de l'expression d'un certain nombre de variables cliniques, mais aussi biologiques, intégrant en particulier l'expression de cytokines pro- et anti-inflammatoires [33]. Parmi les deux phénotypes identifiés, les patients ayant un phénotype « hyperinflammatoire » avaient une mortalité nettement supérieure aux autres et une mortalité plus élevée lorsque soumis à une stratégie de remplissage vasculaire « libérale » [34].

En conclusion, les modèles animaux nous ont appris l'existence : 1) d'un biotrauma, dont la relation de cause à effet avec la survenue de lésions secondaires n'est pas bien établie ; et 2) d'une réaction inflammatoire pulmonaire qui précède la constitution de l'œdème pulmonaire induit par la ventilation mécanique lorsque plusieurs agressions sont combinées. Les données cliniques chez les patients atteints de SDRA ont mis en évidence que : 1) les interventions thérapeutiques directes visant à contrecarrer la réponse inflammatoire pulmonaire n'ont pas fait la preuve de leur efficacité ; 2) l'individualisation de phénotypes de réponse inflammatoire permet de distinguer des groupes de patients ayant des pronostics et des réponses différentes à des interventions thérapeutiques.

Imagerie pulmonaire de l'inflammation

(D'après la communication de Jean-Christophe Richard – réanimation médicale, hôpital de la Croix-Rousse, Lyon)

L'imagerie pulmonaire permet d'étudier l'inflammation en appréciant à la fois son hétérogénéité spatiale et son évolutivité au cours du temps. Trois techniques d'imagerie sont actuellement utilisées dans cette indication : l'imagerie isotopique, l'imagerie optique et l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

L'imagerie isotopique par tomographie par émission de positon (TEP) ou par tomographie monophotonique (SPECT) a l'avantage d'être une des techniques les plus sensibles. Elle peut détecter jusqu'à 10-12 mol.L⁻¹ de traceur et quantifier de façon absolue sa concentration dans les tissus biologiques. L'étude du poumon en imagerie isotopique est toutefois gênée par trois phénomènes justifiant des corrections spécifiques : l'hétérogénéité spatiale de la densité pulmonaire, les mouvements respiratoires, et le volume sanguin régional très élevé et prédominant dans les régions postérieures. En TEP, le 18F-FDG a été beaucoup utilisé pour imager l'inflammation pulmonaire, mais n'en est pas spécifique puisqu'il quantifie l'activité métabolique cellulaire en ciblant glut-1 : une protéine transporteur du glucose dans les cellules. D'autres traceurs (comme le 11C-PK111-95 ou de 18F-FEDAC) ciblant la protéine de translocation exprimée sur les mitochondries lors du *burst* oxydatif ont montré des performances prometteuses pour tracer l'activation macrophagique pulmonaire. L'activation cholinergique paracrine lymphocytaire impliquée dans l'immunomodulation peut aussi être détectée par des traceurs ciblant l'acétylcholinestérase ou le transporteur à l'acétylcholine. Enfin, le développement du DOTA (un chélateur du Gallium-68) a récemment ouvert la possibilité de cibler n'importe quelle voie métabolique impliquée dans l'inflammation.

L'imagerie optique par bioluminescence ou tomographie moléculaire par fluorescence détecte les photons émis par une sonde optiquement neutre, mais activée par un processus physiologique. L'imagerie par bioluminescence utilise un gène rapporteur contrôlé par un facteur de transcription de la voie métabolique qu'on souhaite étudier. L'activation du gène va aboutir à la synthèse d'une protéine rapporteuse capable d'activer la bioluminescence d'un substrat (historiquement le couple luciférase (protéine rapporteur)-luciférine (substrat)). La tomographie moléculaire par fluorescence utilise des sondes moléculaires injectées par voie intraveineuse, dont la fluorescence est activée par l'interaction avec le processus physiologique que l'on souhaite explorer. La performance de ces techniques a été récemment accrue par l'utilisation de sondes émettant dans le proche infra-rouge

considérablement moins absorbée dans les tissus biologiques, et permettant de détecter jusqu'à 10-17 mol.L⁻¹ de traceur. Les limites de l'imagerie optique sont : 1) une résolution spatiale médiocre ; 2) son utilisation limitée au petit animal en raison de l'absorption de la lumière dans les tissus biologiques ; 3) la réponse immunitaire de l'hôte aux sondes utilisées.

L'IRM est maintenant également proposée comme une nouvelle technique d'imagerie pulmonaire de l'inflammation. Cependant, les défis technologiques inhérents à l'imagerie du poumon sont importants pour l'IRM : faible densité pulmonaire en protons, mouvements respiratoires, inhomogénéité du champ magnétique régional liée aux interfaces air-tissu. Par conséquent, la sensibilité est relativement faible (de l'ordre de 10-6 mol.L⁻¹ de traceur). Deux stratégies ont été développées pour imager l'inflammation en IRM : l'injection de particules d'oxyde de fer avec une très forte affinité pour le système monocyte-macrophage, et l'utilisation de produits de contraste fluorés permettant d'augmenter le rapport signal sur bruit, dans la mesure où il n'existe pas de signal à l'état de base (les atomes de fluor contenus dans l'os et les dents ont des temps de relation T2 très courts non visibles en IRM conventionnelle). Les perfluorocarbones sont ainsi particulièrement intéressants pour détecter l'inflammation en IRM en raison de leur forte concentration en fluor. Ils sont biochimiquement inertes et phagocytés par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles: le signal IRM obtenu est ainsi spécifique de l'inflammation.

En conclusion, les développements technologiques continus ont permis le développement de techniques non invasives de l'inflammation. De nouvelles perspectives sont offertes par l'arrivée de l'imagerie moléculaire au scanner en utilisant comme produit de contraste des nanoparticules d'or ou de bismuth et par l'arrivée du scanner spectral ou des méthodes d'imagerie combinée (PET-IRM, SPECT-IRM).

De la transcriptomique pulmonaire au traitement

(D'après la communication de Julien Textoris, BioMérieux, Lyon)

Ces dernières décennies ont été marquées par l'émergence de virus responsables d'épidémies plus ou moins sévères. Les stratégies préventives (vaccination, ...) sont prises à défaut, et l'arsenal antiviral curatif est limité. Par ailleurs, le développement de nouvelles molécules nécessite un délai incompatible avec la réponse rapide nécessaire lors d'une épidémie d'envergure ou d'une pandémie. C'est la raison pour laquelle de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires. Un concept novateur est le repositionnement

de molécules déjà sur le marché en exploitant leur capacité à inverser la réponse transcriptomique cellulaire de l'hôte infecté. En identifiant des molécules qui visent l'hôte et non le virus, cette stratégie permet d'avoir un large spectre d'action et d'être potentiellement actif sur de nouveaux variants. Le succès de telles stratégies repose en grande partie sur la capacité à caractériser davantage la biologie cellulaire de ces virus respiratoires et leurs interactions moléculaires et fonctionnelles avec l'hôte. L'exploitation des profils d'expression des gènes modulés en réponse à l'infection par des virus Influenza a posé le postulat d'un état cellulaire globalement favorable à leur réplication. De fait, des molécules associées à une signature cellulaire transcriptomique inverse pourraient induire un état cellulaire globalement défavorable à l'infection.

Les premiers travaux ont permis de caractériser des signatures *in vitro* spécifiques de l'infection par différents virus Influenza humains et aviaires [35]. Une méthodologie d'analyse bioinformatique de criblage *in silico* a permis de sélectionner des molécules sur la base de leur signature cellulaire anti-corrélée à celle de l'infection. Cette analyse repose notamment sur l'exploitation de la base de données Connectivity Map [36], qui recense les profils transcriptomiques cellulaires obtenus après traitement par 1309 molécules différentes, la plupart possédant une autorisation de mise sur le marché. Parmi les dix molécules sélectionnées, la présence de la ribavirine, connue pour son activité antivirale [37], a ainsi constitué une première validation de la stratégie de criblage non conventionnelle. À l'issue de leur évaluation dans différents tests *in vitro* cellulaires spécifiques, quatre de ces molécules ont été caractérisées pour leur propriété anti-antivirale à large spectre contre plusieurs virus *Influenza* humains et aviaires. Ces résultats d'efficacité constituaient ainsi une seconde validation de la stratégie de criblage et de repositionnement de médicaments.

Parmi les molécules identifiées, la midodrine, un agoniste des récepteurs alpha-1 adrénergique, présentait la meilleure activité antivirale à dose non cytotoxique contre tous les virus testés *in vitro*. Un essai clinique multicentrique et randomisé avait pour but d'évaluer l'activité antivirale *in vivo* de cette molécule dans la prise en charge des gripes ambulatoires, donc non sévères. L'objectif principal de l'essai était d'atteindre une efficacité antivirale significative 48h après le traitement dans le bras midodrine, en comparaison du bras placebo. Les analyses de cet essai actuellement terminé sont en cours.

Cette stratégie a été optimisée dans le cadre du projet FLUNEXT en exploitant des échantillons de patients hospitalisés afin d'établir une signature transcriptomique *in vivo* de l'infection par le virus H1N1 pdm09. L'analyse de la signature d'infection *in vivo* et l'exploitation de la base de données *Connectivity Map* a permis d'identifier 34 composés candidats. La détermination *in vitro* de leur CC50 (con-

centration cytotoxique médiane) et IC50 (concentration inhibitrice médiane) a révélé des activités antivirales plus importantes que celles des molécules identifiées dans l'étude pilote FLUMED, validant la valeur ajoutée de la signature physiologique de l'infection. Les dix meilleures molécules ont fait l'objet d'une évaluation *in vivo* dans un modèle murin. Deux molécules, déjà sur le marché pour d'autres indications thérapeutiques, se sont révélées particulièrement performantes et plus efficaces que l'oseltamivir. En traitement pré-challenge, la mortalité viro-induite passe ainsi de 60 % dans le groupe contrôle et 40 % dans le groupe oseltamivir, à 30 et 10 % respectivement pour le diltiazem et l'étiléfrine. De plus, la combinaison de ces deux molécules avec l'oseltamivir présente un effet additif en termes de survie, y compris dans des conditions de traitement post-infection.

Sur la base de ces résultats et grâce à l'obtention d'un financement, un nouvel essai clinique labellisé par le réseau TRIal Group for Global Evaluation and Research in SEPs (Triggersep) est prévu pour évaluer les propriétés antivirales des deux molécules candidates en combinaison avec l'oseltamivir chez des patients hospitalisés en réanimation pour prise en charge d'une grippe grave. Cette étude prospective multicentrique randomisée en double aveugle comptera trois bras parallèles, afin de comparer l'efficacité de l'association de chacune des molécules à l'oseltamivir, contre l'oseltamivir seul.

Cette stratégie innovante de criblage de molécules antivirales ciblant la cellule plutôt que le virus, est bien adaptée aux infections aiguës par des virus respiratoires. Celle-ci s'inscrit dans une démarche de repositionnement thérapeutique. Outre les perspectives de limiter l'émergence de résistances, les avantages réglementaires et financiers de cette stratégie sont évidents par rapport au processus long et coûteux du développement de molécules de novo. En perspective, il est tout à fait envisageable que cette stratégie puisse permettre de puiser dans la pharmacopée existante pour constituer une force de réaction rapide en cas de pandémie, ou d'émergence de nouveaux virus.

Réhabilitation *ex vivo* du greffon pulmonaire

(D'après la communication de J De Wolf – hôpital Foch, Suresnes)

La pénurie des greffons limite largement l'utilisation de la transplantation pulmonaire [38]. À titre d'exemple, la Fédération des Associations pour le Don d'Organes et de Tissus humains en France rapportait en 2015 que 345 patients avaient pu être greffés du poumon mais que 154 patients figuraient encore sur la liste d'attente pour la prise en charge d'une insuffisance respiratoire terminale. En effet, un greffon pulmonaire ne peut être prélevé que dans 15 % des

prélèvements d'organes issus de donneurs décédés de mort encéphalique. Les infections précoces, la réanimation liquidienne du donneur et l'ischémie prolongée du poumon explanté (>8 heures) réduisent significativement la qualité des greffons potentiels et contre-indiquent leur utilisation. En 2003, les critères relatifs aux donneurs avaient déjà été élargis par l'ISHLT (The International Society for Heart and Lung Transplantation) pour permettre une augmentation du nombre d'organes disponibles [39]. Ainsi, pouvaient-être considérés comme éligibles les greffons issus de donneurs entre 56 et 70 ans, avec un rapport PaO₂/FiO₂ entre 200 et 400, une radiographie du thorax anormale et/ou inhalation du contenu gastrique.

Ces greffons à critères élargis constituent environ 30 % des greffons proposés aux équipes de transplantation pulmonaire en France, mais 28 % d'entre eux sont toujours considérés comme « non transplantables ».

Depuis quelques années, la recherche dans le domaine de la transplantation pulmonaire vise à augmenter le nombre de greffons disponibles en réhabilitant ex vivo des poumons de qualité initialement insuffisante pour une greffe. Initialement développée au Canada, cette méthode de préservation et de reconditionnement pulmonaire ex vivo a été pratiquée avec succès par l'équipe de transplantation pulmonaire de l'hôpital Foch (Suresnes) qui a réalisée avec succès 45 transplantations avec greffons pulmonaires réhabilités sur un total de 53 procédures de reconditionnement ex vivo. Dans une étude prospective bicentrique (2011-2013), qui utilisait un appareil de reconditionnement ex vivo de ventilation et perfusion de greffons en normothermie (Organ Care System), 32 greffons de donneurs à critères élargis, initialement rejetés par les onze équipes françaises de transplantation pulmonaire, ont été réhabilités ex vivo. Sur les 32 greffons réhabilités, 31 avaient une fonction satisfaisante (PaO₂/FiO₂ >500) et ont été transplantés par la suite. Cette cohorte de patients a été comparée avec 81 transplantations pulmonaires réalisées avec des greffons conventionnels dans la même période. L'incidence de défaillance primaire sévère du greffon (grade III) à 72 heures était de 6,5 % dans le groupe reconditionnement ex vivo et de 8,5 % dans le groupe contrôle. La mortalité, la durée de séjour hospitalière et la survie à un an étaient également similaires entre les deux groupes [40]. Des résultats similaires avaient déjà été publiés par l'équipe de Toronto dans une étude incluant 20 transplantations pulmonaires issues de greffons réhabilités ex vivo [41] et sur une cohorte de sept patients en Italie [42]. La réhabilitation ex vivo ouvre également d'autres perspectives. Elle permet d'affiner l'évaluation de la qualité fonctionnelle des greffons. La durée de la préservation peut aussi être prolongée pour des receveurs hyperimmunisés afin d'approfondir les tests de comptabilité donneurs / receveur et de réduire les risques de rejet sans compromettre la qualité du greffon [43].

Conclusions

Le poumon est au centre des préoccupations des réanimateurs. Les études expérimentales permettent maintenant d'appréhender l'extraordinaire plasticité de cet organe envers la diversité des agressions auxquelles il est constamment soumis. Les avancées physiopathologiques permettent d'envisager des perspectives réalistes de modulation de l'inflammation pulmonaire. Soulignons qu'une telle démarche a déjà abouti en pratique clinique courante, avec l'application généralisée de la ventilation dite protectrice visant à limiter l'aggravation iatrogène des lésions pulmonaires.

Remerciements Les auteurs remercient Chantal Sevens et son équipe pour leur aide précieuse dans l'organisation du séminaire au sein de la Maison de la Réanimation. Les auteurs remercient également chaleureusement les orateurs pour la qualité de leurs présentations: M. Si-Tahar, B. Riteau, B. Crestani et M. Garnier, S. Chollet-Martin, N. de Prost, J.C. Richard, J. Textoris, J. De Wolf.

Liens d'intérêts : le séminaire de recherche translationnelle a été financé grâce à un soutien des laboratoires BioMérieux, Lunginnov, Air de Bretagne. J. Textoris est salarié de la société BioMérieux. Les autres auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

Références

1. Jouan Y, Si-Tahar M, Guillon A, (2017) Immunité de la muqueuse respiratoire : physiologie et implications en réanimation. Méd Intensive Réa 26: 11–20
2. Guillot L, Le Goffic R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, Si-Tahar M, (2005) Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus. J Biol Chem 280: 5571–5580
3. Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M, Si-Tahar M, (2007) Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. J Immunol 178: 3368–3372
4. Le Goffic R, Balloy V, Lagranderie M, Fujita T, Meurs E, Chignard M, Si-Tahar M, (2006) Detrimental contribution of the Toll-like receptor (TLR)3 to influenza A virus-induced acute pneumonia. PLoS Pathog 2: e53
5. Si-Tahar M, Blanc F, Furio L, Choppy D, Balloy V, Lafon M, Chignard M, Fiette L, Langa F, Charneau P, Pothlichet J, (2014) Protective role of LGP2 in influenza virus pathogenesis. J Infect Dis 210: 214–223
6. Blanc F, Furio L, Moisy D, Yen HL, Chignard M, Letavernier E, Naffakh N, Mok CK, Si-Tahar M, (2016) Targeting host calpain proteases decreases influenza A virus infection. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 310: L689–699
7. Teijaro JR, Walsh KB, Cahalan S, Fremgen DM, Roberts E, Scott F, Martinborough E, Peach R, Oldstone MB, Rosen H, (2011) Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. Cell 146: 980–991

8. Boilard E, Paré G, Rousseau M, Cloutier N, Dubuc I, Lévesque T, Borgeat P, Flamand L, (2014) Influenza virus H1N1 activates platelets through FcγRIIA signaling and thrombin generation. *Blood* 123: 2854–2863
9. Khoufache K, Berri F, Nacken W, Vogel AB, Delenne M, Camerer E, Coughlin SR, Carmeliet P, Lina B, Rimmelzwaan GF, Planz O, Ludwig S, Riteau B, (2013) PAR1 contributes to influenza A virus pathogenicity in mice. *J Clin Invest* 123: 206–214
10. Lê VB, Schneider JG, Boergeling Y, Boergeling Y, Berri F, Ducaitez M, Guerin JL, Adrian I, Errazuriz-Cerda E, Frasquilho S, Antunes L, Lina B, Bordet JC, Jandrot-Perrus M, Ludwig S, Riteau B, (2015) Platelet activation and aggregation promote lung inflammation and influenza virus pathogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* 191: 804–819
11. Thille AW, Esteban A, Fernández-Segoviano P, Rodriguez JM, Aramburu JA, Vargas-Errazuriz P, Martín-Pellicer A, Lorente JA, Frutos-Vivar F, (2013) Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies. *Lancet Respir Med* 1: 395–401
12. Selman M, King TE, Pardo A, American Thoracic Society; European Respiratory Society; American College of Chest Physicians, (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 134: 136–151
13. Jaffré S, Dehoux M, Paugam C, Grenier A, Chollet-Martin S, Stern JB, Mantz J, Aubier M, Crestani B, (2002) Hepatocyte growth factor is produced by blood and alveolar neutrophils in acute respiratory failure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L310–315
14. Ulich TR, Yi ES, Longmuir K, Yin S, Biltz R, Morris CF, Housley RM, Pierce GF, (1994) Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. *J Clin Invest* 93: 1298–1306
15. Quesnel C, Marchand-Adam S, Fabre A, Marchal-Somme J, Philip I, Lasocki S, Leçon V, Crestani B, Dehoux M, (2008) Regulation of hepatocyte growth factor secretion by fibroblasts in patients with acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: L334–343
16. Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, Polosukhin V, Wain J, Karimi-Shah BA, Kim ND, Hart WK, Pardo A, Blackwell TS, Xu Y, Chun J, Luster AD, (2008) The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med* 14: 45–54
17. Piednoir P, Quesnel C, Nardelli L, Leçon V, Bouadma L, Lasocki S, Philip I, Mailleux A, Soler P, Crestani B, Dehoux M, (2012) Alveolar fluid in acute respiratory distress syndrome promotes fibroblast migration: role of platelet-derived growth factor pathway. *Crit Care Med* 40: 2041–2049
18. Pilling D, Roife D, Wang M, Ronkainen SD, Crawford JR, Travis EL, Gomer RH, (2007) Reduction of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by serum amyloid P. *J Immunol* 179: 4035–4044
19. Quesnel C, Piednoir P, Gelly J, Nardelli L, Garnier M, Leçon V, Lasocki S, Bouadma L, Philip I, Elbim C, Mentré F, Soler P, Crestani B, Dehoux M, (2012) Alveolar fibrocyte percentage is an independent predictor of poor outcome in patients with acute lung injury. *Crit Care Med* 40: 21–28
20. Garnier M, Mailleux AA, Besnard V, Abback PS, Leçon V, Neuville M, Gouel A, Crestani B, Dehoux M, Quesnel C, (2016) Serum Amyloid P Contained in Alveolar Fluid From Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome Mediates the Inhibition of Monocyte Differentiation into Fibrocyte. *Crit Care Med* 44: e563–573
21. Wilson JG, Liu KD, Zhuo H, Caballero L, McMillan M, Fang X, Cosgrove K, Vojnik R, Calfee CS, Lee JW, Rogers AJ, Levitt J, Wiener-Kronish J, Bajwa EK, Leavitt A, McKenna D, Thompson BT, Matthay MA, (2015) Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: a phase 1 clinical trial. *Lancet Respir Med* 3: 24–32
22. Shyamsundar M, McAuley DF, Ingram RJ, Gibson DS, O’Kane D, McKeown ST, Edwards A, Taggart C, Elborn JS, Calfee CS, Matthay MA, O’Kane CM, (2014) Keratinocyte growth factor promotes epithelial survival and resolution in a human model of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 189: 1520–1529
23. Cross LJM, O’Kane CM, McDowell C, Elborn JJ, Matthay MA, McAuley DF, (2013) Keratinocyte growth factor in acute lung injury to reduce pulmonary dysfunction—a randomised placebo-controlled trial (KARE): study protocol. *Trials* 14: 51
24. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A, (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532–1535
25. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S, (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11: 519–531
26. Prost N de, Ricard JD, Saumon G, Dreyfuss D, (2011) Ventilator-induced lung injury: historical perspectives and clinical implications. *Ann Intensive Care* 1: 28
27. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS, (1997) Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 99: 944–952
28. Bouadma L, Dreyfuss D, Ricard J-D, Martet G, Saumon G, (2007) Mechanical ventilation and hemorrhagic shock-resuscitation interact to increase inflammatory cytokine release in rats. *Crit Care Med* 35: 2601–2606
29. Musch G, Venegas JG, Bellani G, Winkler T, Schroeder T, Petersen B, Harris RS, Melo MF, (2007) Regional gas exchange and cellular metabolic activity in ventilator-induced lung injury. *Anesthesiology* 106: 723–735
30. Costa EL, Musch G, Winkler T, Schroeder T, Harris RS, Jones HA, Venegas JG, Vidal Melo MF, (2010) Mild endotoxemia during mechanical ventilation produces spatially heterogeneous pulmonary neutrophilic inflammation in sheep. *Anesthesiology* 112: 658–669
31. Wellman TJ, Prost N de, Tucci M, Winkler T, Baron RM, Filipczak P, Raby B, Chu JH, Harris RS, Musch G, Dos Reis Falcao LF, Capelozzi V, Venegas JG, Vidal Melo MF, (2016) Lung Metabolic Activation as an Early Biomarker of Acute Respiratory Distress Syndrome and Local Gene Expression Heterogeneity. *Anesthesiology* 125: 992–1004
32. McAuley DF, Laffey JG, O’Kane CM, Perkins GD, Mullan B, Trinder TJ, Johnston P, Hopkins PA, Johnston AJ, McDowell C, McNally C; HARP-2 Investigators; Irish Critical Care Trials Group, (2014) Simvastatin in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 371: 1695–1703
33. Calfee CS, Delucchi K, Parsons PE, Thompson BT, Ware LB, Matthay MA; NHLBI ARDS Network, (2014) Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: latent class analysis of data from two randomised controlled trials. *Lancet Respir Med* 2: 611–620
34. Famous KR, Delucchi K, Ware LB, Kangelaris KN, Liu KD, Thompson BT, Calfee CS; ARDS Network, (2017) Acute Respiratory Distress Syndrome Subphenotypes Respond Differently to Randomized Fluid Management Strategy. *Am J Respir Crit Care Med* 195: 331–338
35. Josset L, Textoris J, Loriod B, Ferraris O, Moules V, Lina B, N’guyen C, Diaz JJ, Rosa-Calatrava M, (2010) Gene expression signature-based screening identifies new broadly effective influenza A antivirals. *PLoS One* 5: e13169
36. Lamb J, (2007) The Connectivity Map: a new tool for biomedical research. *Nat Rev Cancer* 7: 54–60

37. Gilbert BE, McLeay MT, (2008) MegaRibavirin aerosol for the treatment of influenza A virus infections in mice. *Antiviral Res* 78: 223–229
38. Adegunsoye A, Streck ME, Garrity E, Guzy R, Bag R, (2016) Comprehensive Care of the Lung Transplant Patient. *Chest* [in press]
39. Orens JB, Boehler A, Perrot M de, Estenne M, Glanville AR, Keshavjee S, Kotloff R, Morton J, Studer SM, Van Raemdonck D, Waddell T, Snell GI; Pulmonary Council, International Society for Heart and Lung Transplantation, (2003) A review of lung transplant donor acceptability criteria. *J Heart Lung Transplant* 22: 1183–1200
40. Sage E, Mussot S, Trebbia G, Puyo P, Stern M, Dartevielle P, Chapelier A, Fischler M; Foch Lung Transplant Group, (2014) Lung transplantation from initially rejected donors after ex vivo lung reconditioning: the French experience. *Eur J CardioThorac Surg* 46: 794–799
41. Cypel M, Yeung JC, Liu M, Anraku M, Chen F, Karolak W, Sato M, Laratta J, Azad S, Madonik M, Chow CW, Chaparro C, Hutcheon M, Singer LG, Slutsky AS, Yasufuku K, de Perrot M, Pierre AF, Waddell TK, Keshavjee S, (2011) Normothermic ex vivo lung perfusion in clinical lung transplantation. *N Engl J Med* 364: 1431–1440
42. Valenza F, Rosso L, Coppola S, Froio S, Palleschi A, Tosi D, Mendogni P, Salice V, Ruggeri GM, Fumagalli J, Villa A, Nosotti M, Santambrogio L, Gattinoni L, (2014) Ex vivo lung perfusion to improve donor lung function and increase the number of organs available for transplantation. *Transpl Int* 27: 553–561
43. De Wolf J, Puyo P, Bonnet P, Roux A, Le Guen M, Parquin F, Chapelier A, Sage E, (2016) Logistic ex Vivo Lung Perfusion for Hyperimmunized Patients. *Ann Thorac Surg* 102: e205–206