



HAL
open science

Contribution à l'étude des modifications chimiques du revêtement alvéolaire chez l'animal et l'homme au cours de quelques agressions pulmonaires

Jacques Pré

► **To cite this version:**

Jacques Pré. Contribution à l'étude des modifications chimiques du revêtement alvéolaire chez l'animal et l'homme au cours de quelques agressions pulmonaires. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1979. Français. NNT : 1979METZ012S . tel-01775617

HAL Id: tel-01775617

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775617>

Submitted on 24 Apr 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

TEXTU

S/MZ

79/12

T H E S E

présentée à l' UNIVERSITE de METZ

en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR d'ETAT ES-SCIENCES

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19790235
Cote	S/Mz 79/12
Loc	

par

Jacques PRE

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MODIFICATIONS CHIMIQUES
DU REVETEMENT ALVEOLAIRE CHEZ L'ANIMAL ET L'HOMME
AU COURS DE QUELQUES AGRESSIONS PULMONAIRES**

soutenue le 1979 devant la commission d'examen

- | | | |
|------------------|----------------|-------------------|
| Messieurs | J.-M. JOUANY | Président |
| | J.-P. BATTESTI | Rapporteur |
| | J. BELEGAUD | Rapporteur |
| Madame | D. CAGNIANT | |
| Messieurs | P. CORNILLOT | Examineurs |
| | J.-M. PRESLES | |

A toute ma famille et particulièrement

A Marguerite,

Françoise,

et Grégoire...

A tous mes amis...

A la mémoire de Monsieur le Professeur
M.-F. JAYLE, en modeste témoignage de
notre fidèle souvenir.

A Monsieur **J.-M. JOUANY**, Professeur
d'Ecotoxicologie à l'U.E.R. d'Ecologie
de l'Université de Metz, qui nous a
confié ce travail auquel il a contribué
par ses critiques constructives.

A Monsieur **J.-P. BATTESTI**, Professeur
de Pneumologie à l'UER de Médecine de
Paris XIII, qui nous a apporté son aide
totale et nous a fait bénéficier de sa
grande expérience en pneumopathologie
des nuisances.

A Monsieur **C. BOUDENE**, Professeur
de Toxicologie à l'Université de Paris XI
qui, en nous accueillant dans son
laboratoire, nous a facilité la plus
grande partie de l'expérimentation
animale.

A Monsieur **P. CORNILLOT**, Directeur de
l'UER de Médecine de Paris XIII,
Professeur de Biochimie, qui a encouragé
et soutenu activement ce travail de
recherche bioclinique interdisciplinaire.

A Monsieur **J. BELEGAUD**, Professeur
de Toxicologie à l'Université d'Amiens
et Madame **D. CAGNIANT**, Professeur
de Chimie organique à l'U. E. R. de
Sciences exactes et naturelles de Metz,
qui ont bien voulu juger ce travail.

A Monsieur le Pharmacien Chimiste en
chef **J.-M. PRESLES** qui nous a témoigné
au titre de la Direction des Recherches,
Etudes et Techniques des Armées, de
l'intérêt qu'il portait à ce thème de
recherche.

A Monsieur le Professeur **J. AMOUROUX**,
Madame le Docteur **C. MAHE**, Messieurs
les Docteurs **D. BLADIER** et **P. TURBIE**,
Monsieur **G. PERRET** pour les discussions
enrichissantes que nous avons eues.

A Mademoiselle **P. KAZMIERCZIAK** et
Monsieur **R. VASSY** pour leurs colla-
borations techniques.

A Mademoiselle **Y. HUGUENIN** pour la
dactylographie de ce travail,

A Monsieur **A. DUPRE** et son équipe, pour
son impression.

SOMMAIRE

INTRODUCTION		1
I. BIOLOGIE STRUCTURALE DE LA BARRIERE ALVEOLO-CAPILLAIRE		3
A. LE FILM LIQUIDIEN ENDO-ALVEOLAIRE		5
B. L'EPITHELIUM ALVEOLAIRE		8
C. LE SURFACTANT		11
1. Historique		11
2. Participation du surfactant à la mécanique respiratoire		11
3. Localisation cellulaire de la synthèse du surfactant lipidique		13
4. Métabolisme du surfactant lipidique		14
D. L'INTERSTITIUM ALVEOLAIRE		18
- Le collagène		19
- L'élastine		26
- Les protéoglycannes		27
- Les glycoprotéines de structure		29
E. LES CAPILLAIRES ALVEOLAIRES		30
II. MECANISMES DE DEFENSE ALVEOLAIRE		31
1. Eléments cellulaires de protection		33
1.1 Les macrophages alvéolaires		33
1.2 Les éléments lymphocytaires		34
2. Elimination des particules inertes et des bactéries tuées		37
3. Bactéricidie		37

III. TECHNOLOGIE DU LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE	40
1. Technique du lavage broncho-alvéolaire chez l'homme	42
2. Technique du lavage broncho-alvéolaire chez la souris, le rat et le lapin	44
3. Validité des protocoles de lavage proposés	49
IV. CHIMIE CLINIQUE ANALYTIQUE DU LIQUIDE DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE	
- Méthodologies originales et adaptations technologiques	53
- Protocole de concentration des liquides de lavage	55
- Lipides et dérivés	57
A. DOSAGE DES LECITHINES TOTALES	58
B. DOSAGE DES LECITHINES SATUREES	64
C. DOSAGE DU CHOLESTEROL ET DES TRIGLYCERIDES	66
D. DOSAGE DU MALONALDEHYDE	67
- Protéines et dérivés	71
A. DOSAGE DES PROTEINES TOTALES	72
A.I METHODE DE LOWRY	75
A.II METHODE AU VIOLET SULFO	77
B. DOSAGE DE L'ALBUMINE ET DES IMMUNOGLOBULINES (Ig G, Ig A et Ig M) PAR IMMUNONEPHELEMETRIE LASER	80
C. RECHERCHE ET DOSAGE DE L'HYDROXY-PROLINE PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE	88
- Oses et dérivés	91
A. DOSAGE DES OSES NEUTRES TOTAUX	92
B. DOSAGE DU FUCOSE	96
C. DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE	98
D. DOSAGE DES ACIDES URONIQUES	100

V. JUSTIFICATION DU CHOIX, DANS LES LIQUIDES DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE DES PARAMETRES CHIMIQUES LES PLUS APTES A RENDRE COMPTE DE L'ETAT DE LA BARRIERE ALVEOLO-CAPILLAIRE 102

A. RAPPORT DES CONCENTRATIONS EN LECITHINES ET PROTEINES (L/P) 104

B. DOSAGE DE L'ALBUMINE ET DES IMMUNOGLOBULINES G et A 110

C. CONCENTRATION EN K⁺ 111

VI. LE RAPPORT L/P DANS LES LIQUIDES DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE CHEZ LE RAT ET LE LAPIN AU COURS D'AGRES-SIONS AIGUES PAR INHALATION DE TOXIQUES GAZEUX MA- JEURS (CO, HCN, HCl) ET AU COURS D'HYPOXIES 112

A. METHODOLOGIES 115

B. INCIDENCE DE LA VENTILATION ARTIFICIELLE CONTROLEE SOUS TRACHEOTOMIE SUR LA COMPOSITION DES LIQUIDES DE LAVAGE PULMONAIRE 117

C. ACTION DU MONOXYDE DE CARBONE 119

 1. Chez le rat trachéotomisé en ventilation contrôlée 119

 2. Chez le lapin trachéotomisé en ventilation contrôlée 124

 3. Conclusion 128

D. ACTION DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE 129

 1. Chez le rat trachéotomisé sous ventilation contrôlée 129

 2. Chez le lapin trachéotomisé sous ventilation contrôlée 131

 3. Conclusion 131

E. ACTION DE L'ACIDE CHLORHYDRIQUE 133

 1. Chez le rat trachéotomisé sous ventilation contrôlée 133

 2. Chez le lapin trachéotomisé sous ventilation contrôlée 140

 3. Conclusion 141

F.	ACTION DU MANQUE D'OXYGENE	142
	1. Hypoxie par hypoventilation alvéolaire (hypoxie hypercarboxique)	142
	2. Hypoxie par inhalation d'air dilué dans l'azote (hypoxie normo-carboxique)	144
	3. Conclusion	146
G.	CONCLUSION GENERALE	147
VII.	LE RAPPORT L/P DANS LES LIQUIDES DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE CHEZ LA SOURIS AU COURS D'AGRESSIONS PAR VOIE ENDOGENE	149
A.	MATERIEL ET METHODES	151
	1. Modalités d'administration des composés étudiés	151
	2. Conditions du lavage pulmonaire	152
B.	RESULTATS	153
	1. Témoins	153
	2. Alcool éthylique	153
	3. Acétazolamide	155
	4. Cyclophosphamide	156
C.	CONCLUSION	158
VIII.	LE LIQUIDE DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE DANS DES CAS DE TABAGISME, D'ASBESTOSE ET DE SILICOSE CHEZ L'HOMME	160
VIII.	1. Le liquide de lavage broncho-alvéolaire chez des adultes sains non fumeurs et fumeurs	162
	A. SUJETS ETUDIES	166
	B. MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES	168
	C. MODIFICATIONS CYTOLOGIQUES	179
	D. COMPARAISON AVEC LES DONNEES TIREES DE LA LITTÉRATURE	182
	E. CONCLUSION	185

VIII. 2. Le liquide de lavage broncho-alvéolaire dans quelques cas d'asbestose et de silicose chez l'homme	186
A. SUJETS ETUDIES	187
B. EMPOUSSIERES NON FUMEURS	188
1. Modifications biochimiques	188
2. Modifications cytologiques	191
C. EMPOUSSIERES FUMEURS	193
1. Modifications biochimiques	193
2. Modifications cytologiques	196
D. CONCLUSION	198
RESUME - CONCLUSION	199
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	224

INTRODUCTION

- * Toxicologues, pneumologues et écologistes, par l'intermédiaire des "mass media" s'attachent à sensibiliser l'opinion publique vis-à-vis de la pollution atmosphérique et de sa très importante incidence sur la santé publique.

- * **Les aérocontaminants** sont en effet responsables :
 - **d'une pathologie aiguë** liée aux inhalations accidentelles de fumées ou de vapeurs toxiques qui sont à l'origine soit **d'œdème aigu du poumon** soit, dans les cas moins dramatiques, de **trachéobronchites d'irritation**

 - **d'une pathologie chronique** particulièrement préoccupante et ce, d'autant qu'elle est fortement **potentialisée par l'autopollution tabagique**. Dans le cadre de cette pneumopathologie des nuisances se rencontrent des affections aussi diverses que la **bronchite chronique**, véritable fléau socio-économique, les **cancers bronchiques** et les **pneumoconioses** (asbestose, silicose), maladies résultant de l'inhalation de poussières minérales (amiante, silice) liée à un contexte professionnel.

- * En tant qu'organe cible de la pollution atmosphérique, le poumon a été l'objet de nombreux travaux portant essentiellement sur la mécanique ventilatoire. Par contre, les modifications biochimiques du film liquidien endo-alvéolaire lors des agressions par les aérocontaminants n'ont été que très rarement étudiées, et ce, de façon très fragmentaire.

* Dans ce travail, nous nous sommes donc attachés à étudier, chez l'animal et l'homme, ces modifications au niveau des liquides de lavage broncho-alvéolaire, au cours d'agressions pulmonaires qu'elles soient d'origine exogène (aérocontaminants) ou endogène (ingestion ou injection, durant un temps plus ou moins long, à des fins thérapeutiques ou non, de différents composés).

Au cours de cette étude, nous avons été amenés à décrire des protocoles de lavage broncho-alvéolaire, des techniques de dosage adaptées à ce matériel particulier qu'est le liquide de lavage qui correspond à une dilution importante du film liquidien endo-alvéolaire. Le rapport des concentrations en lécithines et protéines a été privilégié en tant que paramètre particulièrement apte à rendre compte de l'état, à un instant donné, de la barrière alvéolo-capillaire. Il a été tout particulièrement étudié :

- chez le rat et le lapin au cours d'agressions aiguës par inhalation de toxiques gazeux majeurs (CO, HCN, HCl) et au cours d'hypoxies
- chez la souris au cours d'agressions par voie endogène (éthanol, acétazolamide, cyclophosphamide),
- chez l'homme dans des cas de tabagisme, d'asbestose et de silicose.



* La réalisation de ce travail a exigé la mise en œuvre de techniques très variées, illustrant bien le caractère pluridisciplinaire de cette nouvelle discipline des sciences de l'environnement qu'est l'Ecotoxicologie.

- I -

**BIOLOGIE STRUCTURALE
DE LA BARRIERE ALVEOLO-CAPILLAIRE**

* La barrière alvéolo-capillaire au travers de laquelle s'effectuent les échanges gazeux respiratoires comporte à partir de la phase gazeuse alvéolaire :

- . Un film liquidien endo-alvéolaire de constitution complexe
- . Une couche épithéliale alvéolaire
- . Une membrane basale sous-tendant l'épithélium alvéolaire
- . Une lame de tissu conjonctif (interstitium alvéolaire)
- . Une membrane basale sous-tendant l'endothélium capillaire
- . L'endothélium capillaire dont les cellules très plates présentent une grande analogie de structure avec les pneumocytes de type I de l'épithélium alvéolaire.

* Son épaisseur est de l'ordre de 200 à 300 nm, les capillaires étant presque au contact de l'air alvéolaire (NAGAISHI, 1972).

* Si le rôle majeur de la barrière alvéolo-capillaire est d'être le site de l'hématose, il ne faut oublier pour autant qu'elle est une zone de filtration liquidienne où l'eau, les ions et les molécules dissoutes, passant des capillaires vers la surface épithéliale selon des mécanismes mal connus, participent à l'humidification et au maintien de l'intégrité du film endo-alvéolaire.

A. - LE FILM LIQUIDIEN ENDO-ALVEOLAIRE

* Le film liquidien endo-alvéolaire, de par ses propriétés tensio-actives, joue un rôle capital dans la mécanique ventilatoire (BOLANDE et KLAUS, 1964). Il tend à lisser la surface alvéolaire en comblant les plicatures et les irrégularités. A bas volume pulmonaire, il obstrue les pores qui interrompent par endroits la continuité de l'épithélium alvéolaire permettant ainsi les échanges liquidiens entre l'alvéole et l'interstitium.

En microscopie électronique, ce film particulièrement mince (10-20 nm), (100 à 200 Å) comporte les trois couches suivantes qui sont retrouvées chez l'homme par fixation intrabronchique post-mortem. (KAPANCI, TOSCO, EGGERMANN, 1972) :

- Le **cell Coat** (ou glycocalyx) qui renferme plus particulièrement des glycoprotéines tapissant la membrane externe des cellules épithéliales alvéolaires. Ces glycoprotéines très riches en sucre (NIR et PEASE, 1976) jouent un rôle très important dans les processus de reconnaissance, d'adhésivité et de mobilité cellulaire. A ce niveau se rencontrent aussi des IgA sécrétoires (COLACICCO, RAY, HENRICKSON et coll., 1976) et des phospholipases (SCARPELLI, CONDORELLI, COLACICCO et coll., 1975).

Récemment, ont été isolées de la surface des pneumocytes à laquelle elles sont faiblement liées, les **alvéolines** - (BHATTACHARYYA, PASSERO, DI AUGUSTINE et coll., 1975 - BHATTACHARYYA, ROSE, LYNN et coll., 1976 - LYNN, SAHU et BHATTACHARYYA, 1979).

Ce sont des glycoprotéines ayant pour particularité de présenter des séquences glycine – proline – hydroxyproline dispersées sur toute l'étendue de leur chaîne polypeptidique sur laquelle sont branchées, au niveau de résidus d'asparagine (BHATTACHARYYA et LYNN, 1977), des structures oligosaccharidiques. Secrétées par les pneumocytes de type II, les alvéolines sont généralement insolubles dans l'eau.

Leur production, particulièrement importante dans la protéinose alvéolaire (SAHU, DI AUGUSTINE et LYNN, 1976) entraîne un grave déficit des échanges gazeux au niveau de la barrière alvéolo-capillaire justifiant l'intérêt thérapeutique des lavages alvéolaires visant à éliminer cette gangue de glycoprotéines insolubles.

• **L'hypophase** (ou couche basale)

C'est une couche aqueuse intermédiaire entre le cell coat et le film externe de surfactant.

Riche en phospholipoprotéines et corps lamellaires osmiophiles, elle contient par ailleurs des protéines plasmatiques (Albumine IgG, IgA, orosomucoïde transferrine, etc.), des glycoprotéines différentes de celles du glycocalyx. Les alvéolines y peuvent être mises en évidence.

• **Le film tensioactif de surfactant**

Ce film osmiophile lamellaire qui constitue l'interface entre l'hypophase et l'air alvéolaire est composé de lécithines dont la dipalmitoyl phosphatidyl choline est le constituant majoritaire.

* Les deux fonctions essentielles du film endo-alvéolaire sont :

- . le maintien des pneumocytes dans une ambiance humide grâce au gel glycoprotéique de l'hypophase et ce, en dépit d'une ventilation importante.
- . l'abaissement de la tension superficielle de l'interface gaz-liquide grâce aux propriétés tensio-actives des lipoprotéines de surface (surfactant) apparaissant dans l'hypophase sous forme de structures myéliniques tubulaires, dans les pneumocytes de type II sous forme de corps lamellaires.

il s'agit donc de lipoprotéine

ou complexe
 combinaison de
 protéines
 cholestérol libre ou lié
 triglycérides
 phospholipides
 acides gras libres

B. - L'EPITHELIUM ALVEOLAIRE

1) La mise en évidence et l'étude de l'épithélium alvéolaire sont relativement récentes (LOW et DANIELS, 1952 - LOW, 1961 - KARRER, 1956 a, b, c) la quasi totalité de la surface alvéolaire étant constituée de cellules visibles seulement en microscopie électronique (Pneumocytes de type I). Cet épithélium est formé de 2 types de cellules endodermiques. Il prolonge directement l'épithélium cubique des bronchioles.

Sa surface dépend du nombre d'alvéoles qui est lui-même fonction de la taille du sujet.

WEIBEL et GOMEZ (1962) estime ce nombre à $296.10^6 \pm 13.10^6$ (n = 8). A partir d'un échantillonnage plus important (n = 42), ANGUS et THURLBECK (1972) indiquent une valeur moyenne de ce nombre nettement plus élevée 375.10^6 (valeurs extrêmes 212.10^6 et 605.10^6). Chez un adulte sain, pour un nombre moyen d'alvéoles de 300.10^6 dont le diamètre est compris entre 200 et 250 μ , on admet que la surface totale d'échange est de 70 m^2 (WEIBEL 1963 - THURLBECK et WILLIAM, 1967). $4 \pi r^2 \times N$

2) La surface épithéliale alvéolaire est occupée à 95 % par de grandes cellules très minces dépourvues d'organelles cytoplasmiques : les **Pneumocytes de type I** encore appelés **Pneumocytes membraneux** (MEYRICK et REID, 1970).

Pourvus d'expansions cytoplasmiques particulièrement minces (0,1 à 0,3 μ) et étendues, ils apparaissent comme des cellules d'échange et ce, d'autant plus qu'à leur niveau, l'interstitium est très peu abondant et se limite à quelques fibres élastiques.

On leur attribue un rôle privilégié dans la diffusion gazeuse alvéolo-capillaire (NAGAISHI, 1972). La mise en évidence, par microscopie électronique, dans leur cytoplasme, de nombreuses vésicules de pinocytose semble confirmer leur rôle dans le transfert, du plasma vers l'alvéole, de protéines, notamment l'albumine et les immunoglobulines (BIGNON, JAURAND, JAUBERT et coll., 1976 – BIGNON, JAURAND, PINCHON et coll., 1976).

Particulièrement fragiles, les pneumocytes de type I sont très sensibles aux agressions.

3) **Les Pneumocytes de type II** appelés aussi **cellules septales** ou **pneumocytes granuleux** à l'inverse des pneumocytes de type I présentent une intense activité métabolique : leur cytoplasme est riche en mitochondries, en réticulum endoplasmique, en corps lamellaires osmiophiles (MACKLIN, 1954). Généralement situés dans des dépressions du septum alvéolaire ils sont en grande partie recouverts par les extensions cytoplasmiques des pneumocytes de type I. Ainsi, bien que représentant environ 60 % des cellules de l'épithélium alvéolaire, ils ne constituent que 5 % de la surface alvéolaire.

- . Les pneumocytes de type II sont reconnus pour être le site principal de la synthèse du surfactant (DERMER, 1970 – ASKIN et KUHN, 1971). A leur niveau, l'épaisseur du film liquidien est généralement plus important.
- . Les corps lamellaires osmiophiles présents dans leur cytoplasme sont des structures lipoprotéiniques donnant naissance, par extension, à des tubules myéliniques qui, en s'étalant en couche mince sur la paroi alvéolaire, forme le film tensio-actif.

Il a été démontré une identité de composition lipidique entre structures lamellaires et surfactant isolé des liquides de lavage alvéolaire (PAGE-ROBERTS, 1972 – GIL et REISS, 1973).

Les pneumocytes de type II résistent beaucoup mieux aux agressions que les pneumocytes de type I. Il semble actuellement bien établi qu'ils soient le point de départ de la régénération de l'épithélium alvéolaire lors d'agressions lésant en premier les fragiles cellules de type I (EVANS, CABRAL, SPEHENS et coll., 1973 – STEPHENS, SLOAN, EVANS et coll., 1973).

- 4) Un certain nombre de **macrophages** affleurent à la surface alvéolaire où ils sont plus ou moins recouverts par les prolongements cytoplasmiques des pneumocytes de type I.

A l'inverse des pneumocytes de type I et II, les macrophages présentent une intense activité phagocytaire. Ainsi jouent-ils un rôle très actif dans la défense de l'épithélium alvéolaire contre les agressions par les particules et les micro-organismes ainsi que dans la résorption du surfactant. Ils renferment de nombreuses enzymes hydrolytiques telles que les phospholipases A₁ et A₂ (FANSON et WAITE, 1973), l'élastase (JANOFF, 1972).

C. – LE SURFACTANT

1. Historique

Bien que l'existence de propriétés tensio-actives au niveau de la bordure alvéolaire soit connue depuis 50 ans (VON NEERGAARD, 1929). C'est PATTLE qui en 1958, à partir d'observations cliniques, est conduit à admettre l'existence dans le film liquidien recouvrant l'alvéole d'un ou plusieurs facteurs tensio-actifs auxquels il donne le nom général de **surfactant** (PATTLE, 1958). Les nouveau-nés atteints de l'affection dite de la "membrane hyaline" décèdent rapidement par anoxie. Les nécropsies montrent que le non-déploiement des alvéoles est lié à une anomalie de la bordure alvéolaire, les propriétés élastiques du tissu pulmonaire restant normales (PATTLE, CLAIREAUX, DAVIES et coll., 1962).

2. Participation du surfactant à la mécanique respiratoire

2.1 Depuis les travaux de VON NEERGAARD (1929), il faut considérer que la **compliance** – correspondant au rapport d'augmentation de volume du poumon en fonction de l'augmentation de pression et exprimant par là même les possibilités d'ouverture des alvéoles – n'est pas due uniquement à l'élasticité du tissu pulmonaire mais aussi à l'existence des propriétés tensio-actives de l'interface air liquide que constitue la paroi alvéolaire.

VON NEERGAARD a gonflé des poumons de chats avec de l'air jusqu'à ce qu'ils occupent un volume maximum V_m et a noté la pression. Après avoir chassé cet air, il a injecté dans le poumon le même volume d'eau physiologique et a observé une pression moitié de celle observée avec l'air. Inversement, pour une même pression finale, le volume introduit était 2 fois plus grand lorsque le poumon était rempli de liquide que lorsqu'il était rempli d'air. Selon cet auteur chacun des alvéoles présente une surface de séparation gaz/liquide tendant à se rétracter.

Cette force de rétraction (pression de Laplace), dirigée vers l'intérieur de l'alvéole, est inversement proportionnelle au rayon de ce dernier et proportionnelle à la tension superficielle (γ) $P = 2 \gamma / r$.

2.2 La stabilité intra-alvéolaire implique le maintien du calibre des alvéoles les uns par rapport aux autres et l'équilibre des échanges liquidiens à travers la paroi alvéolo-capillaire.

Les alvéoles étant assimilés à des bulles, la pression est plus faible dans les plus grands que dans les petits. Comme ils communiquent entre eux, les petits devraient disparaître au profit des plus gros, aboutissant à la formation d'une immense bulle unique au milieu d'un parenchyme collabé.

La coexistence d'alvéoles de diamètres différents n'est donc concevable que si la pression est la même dans tous. (CLEMENTS, BROWN et JOHNSON, 1958 – BROWN, JOHNSON, CLEMENTS, 1959 – CLEMENTS, HUSTEAD, JOHNSON et coll., 1961).

Ainsi, est-on conduit à admettre que la tension superficielle (γ) varie dans le même sens que le rayon de l'alvéole ou, ce qui revient au même, que la surface alvéolaire. (CLEMENTS, 1956). La tension superficielle du film liquidien est minimale lorsque sa surface est elle-même minimale. Cette tension est maximale lorsque l'alvéole est gonflé d'air, situation dans laquelle la surface du film est maximale.

Ainsi, le surfactant contenu dans le film liquidien alvéolaire permet de compenser l'effet des variations de la surface des alvéoles au cours de la ventilation (PATTLE, 1960, 1963, 1965).

Le caractère tensio-actif de ce film provient de ce qu'il est constitué d'une couche de molécules polaires de lécithines – plus particulièrement de dipalmitoyl phosphatidyl choline – se positionnant au niveau de l'interface air-liquide. La partie polaire hydrophile est liée à l'hypophase hydrique, la partie hydrophobe est orientée vers la phase gazeuse.

3. Localisation cellulaire de la synthèse du surfactant lipidique.

3.1 Comme nous venons de le voir, ce sont les lécithines saturées – et plus particulièrement la **dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC)** – qui sont responsables des propriétés tensio-actives du film liquidien endo-alvéolaire. Cette prédominance de DPPC est très particulière au surfactant (KING, CLEMENTS, 1972) qui, de ce fait, est particulièrement bien adapté à l'environnement alvéolaire riche en oxygène.

A côté de la DPPC (qui représente de 70 à 80 % des lécithines), le film liquidien endo-alvéolaire renferme un autre composé saturé à fortes propriétés tensio-actives : le **phosphatidyl glycerol** qui ne représente que 5 à 10 % des lécithines (HENDERSON, PFLEGER, 1972 – PFLEGER, HENDERSON, WAIDE, 1972 – GODINEZ, SANDERS, LONGMORE, 1975).

3.2 On admet actuellement que les lipides du surfactant sont sous forme de lipoprotéines spécifiques dont la reconstitution a pu être réalisée à partir de lipides et protéines extraites des liquides de lavage (SAWADA, OKAJIMA, HAYASHI et coll., 1977).

3.3 L'utilisation de précurseurs marqués des phospholipides a permis de montrer que la biosynthèse du surfactant lipidique (DPPC) s'effectue dans les **pneumocytes de type II** (CHEVALIER et COLLET, 1972).

Les corps lamellaires observés dans leur cytoplasme sont des formes de stockage des molécules tensio-actives. Leur tensio-activité est comparable à celle du surfactant du film liquidien (GIL et REISS, 1973). Ils sont essentiellement constitués de lécithines à acides gras saturés en C₁₆. (ROONEY, PAGE-ROBERTS, MOTOYAMA, 1975). Leur excrétion mérocrine dans la lumière alvéolaire a été observée en microscopie électronique (RYAN, RYAN et SMITH, 1975). Par ailleurs, au niveau de ces structures lamellaires, des activités enzymatiques indispensables à la synthèse des lécithines ont été mises en évidence : choline kinase (GRAY, LIAN, STAHLMAN et coll., 1974), acyltransferase (ENGLE, DANSERS et LONGMORE, 1976). Ces constatations autorisent l'hypothèse selon laquelle les corps lamellaires pourraient être un site de biosynthèse de certaines lécithines tensio-actives (SPITZER, RICE, McDONALD et coll., 1975). Il semble que les faibles quantités de protéines présentes dans les corps lamellaires soient synthétisées dans le réticulum granuleux et l'appareil de Golgi (GOERKE, 1974).

4. Métabolisme du surfactant lipidique

- 4.1 Les précurseurs de la biosynthèse des lécithines pulmonaires sont les acides gras (essentiellement l'acide palmitique) et le glycerophosphate.

Bien qu'ils puissent être fournis par synthèse de novo à partir de l'acetyl-CoA (GROSS et WARSHAW, 1974), les acides gras sont essentiellement d'origine exogène. Ils sont apportés aux poumons soit sous forme d'acides gras libres fixés à l'albumine, soit sous forme de triglycérides incorporés dans les chylomicrons ou les lipomicrons desquels ils sont libérés par une lipoprotéine lipase pulmonaire insensible au jeûne (HAMOSH et HAMOSH, 1975) dont l'action est complétée par celle d'une monoglycéride lipase (WANG et MENG, 1975).

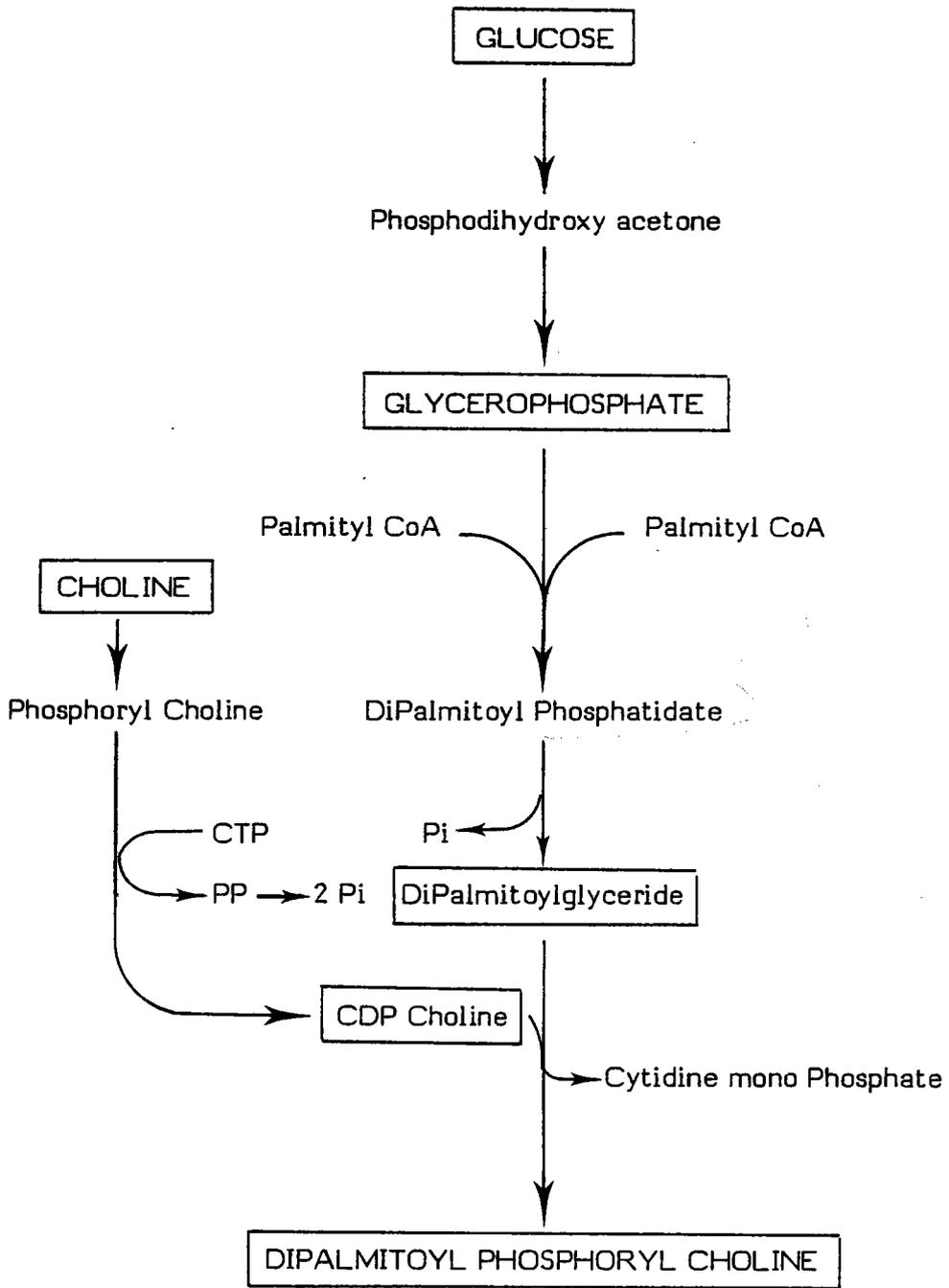


Fig. I-1.

Voie principale de synthèse de novo de la Dipalmitoyl phosphorylcholine (DPPC)

Le glycerophosphate dérive tout naturellement du glucose par réduction de la phosphodihydroxy acetone (VAN GOLDE, 1976).

Les Acyl-CoA – essentiellement, le palmityl CoA (JOBÉ, 1979) – et le glycerophosphate se condensent en acides Phosphatidiques (essentiellement en dipalmitoyl phosphatidate) sous l'action d'une acyl-transferase (HENDRY et POSSMAYER, 1974).

Le phosphatidate obtenu est hydrolysé par une phosphatidate phosphatase (MEBAN, 1972 – DELAHUNTY, SPITZER, JIMENEZ et coll., 1979) en un **diglyceride (dipalmitoyl glyceride)** au niveau duquel est greffé par une phosphoryl-choline-glyceride transferase (ZACHMAN, 1973) un groupement phosphoryl-choline aboutissant au surfactant lipidique (DPPC).

L'activation préalable de la choline en phosphoryl-choline puis cytidine-diphosphocholine (CDP choline) est réalisée grâce à la choline-kinase (ZACHMAN, 1971) et la phosphorylcholine-cytidyl-transferase (THOM et ZACHMAN, 1975).

Cette condensation de la CDP-choline avec un diglyceride (Fig. I-1) constitue la voie principale de biosynthèse du surfactant lipidique. D'autres voies, très mineures, ont été mises en évidence comme la méthylation des phosphatidyl ethanolamines et l'acylation des lysophosphatidylcholine.

4.2 Après passage dans l'espace alvéolaire, le surfactant lipidique est en partie résorbé localement soit après phagocytose et digestion par les macrophages (NICHOLS, 1976) qui sont dotés de phospholipases lysosomiales très actives, soit par traversée de la barrière air/sang vers le secteur capillaire.

On ne connaît pas la part de chacune de ces formes de résorption, qui ont été confirmées par l'administration d'aérosols de DPPC marquée au tritium (GEIGER, GALLAGHER et HEDLEY WHYTE, 1975).

4.3 Le renouvellement du surfactant lipidique du film endo-alvéolaire est rapide et différent de celui des lécithines du tissu pulmonaire (YOUNG et TIERNEY, 1972). Chez les petits animaux, sa demi-vie est normalement inférieure à 15 heures (TIERNEY, CLEMENTS et TRAHAN, 1967). Chez l'homme, elle est inférieure à 2 jours (CLEMENTS, 1970) et généralement estimée à environ 30 heures.

D. – L'INTERSTITIUM ALVEOLAIRE

1. Charpente conjonctive du poumon, l'interstitium comble l'espace compris entre l'alvéole et les vaisseaux capillaires. Il s'agit d'une structure élastique, siège des échanges gazeux et liquidiens, assurant par ailleurs des fonctions nutritionnelles pour les cellules fixes ou migratrices (macrophages, cellules épithéliales).

2. Dans les très nombreuses zones où les capillaires affleurent à la surface alvéolaire, l'interstitium est particulièrement réduit, les membranes basales endothéliales et épithéliales étant très proches voire fusionnées. A ce niveau, la paroi alvéolaire peut être comparée à une lame à double paroi entre les feuillets de laquelle circule un flux sanguin en nappe (FUNG et SOBIN, 1969).

3. L'interstitium est plus développé dans les espaces intercapillaires au niveau desquels on observe :
 - de nombreuses cellules interstitielles ayant d'une part les caractères des fibroblastes, assurant la synthèse des fibrilles de collagène et d'élastine ; d'autre part, ceux de cellules contractiles riches en filaments d'actine.
 - des fibres de collagène
 - des fibres d'élastine
 - différentes cellules de défense : macrophages, monocytes, lymphocytes, polynucléaires ; l'interstitium alvéolaire est le lieu de passage et de maturation (BOWDEN et ADAMSON, 1972) des macrophages alvéolaires issus de la moëlle osseuse et apportés par le courant sanguin. Réservoir de lymphocytes et de polynucléaires, l'interstitium apparaît ainsi comme le site où prennent naissance des réactions de défense aux agressions d'origine endogène ou exogène.

4. Quatre types de structures macromoléculaires sont décrits au niveau de l'interstitium :

- deux protéines fibreuses, le **collagène** et l'**élastine** qui participent au maintien de l'architecture pulmonaire, limitent sa distensibilité, contribuent à son élasticité.
- les **protéoglycannes** (ou protéo-glycosamino-glycuro-glycannes) qui constituent la substance fondamentale, comportent de longues chaînes polysaccharidiques (glycosamino-glycuroglycannes anciennement appelés mucopolysaccharides) liées covalentiellement à un squelette protéique mineur.
- les **glycoprotéines de structure** qui sont les glycoprotéines des membranes.

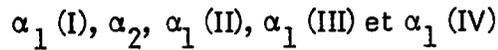
4.1 Le collagène

Représentant chez l'homme adulte 15 à 20 % de la masse tissulaire pulmonaire et 60 à 70 % de la masse conjonctive pulmonaire (HANCE et CRYSTAL, 1975), le collagène apparaît comme la principale protéine du tissu conjonctif.

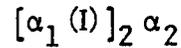
La microscopie électronique montre l'existence de 2 types de collagène. L'un, amorphe, est un élément constitutif des membranes basales supportant l'épithélium alvéolaire et l'endothélium vasculaire. L'autre, fibrillaire, correspond à la réticuline vue en microscopie optique.

Le collagène est une macromolécule fibreuse hélicoïdale dont l'unité fondamentale est le **tropocollagène** lui-même constitué de 3 chaînes polypeptidiques .

On reconnaît 5 chaînes α différentes :



entrant dans la constitution de 4 types de tropocollagène. Le type I, formé de deux chaînes α_1 (I) et 1 chaîne α_2 , correspond à la formule :



Les types II, III et IV sont composés de 3 chaînes identiques :

- Type II $[\alpha_1 \text{ (II)}]_3$
- Type III $[\alpha_1 \text{ (III)}]_3$
- Type IV $[\alpha_1 \text{ (IV)}]_3$

Chacune des chaînes α comporte 1.050 à 1.100 amino acides dont plus de 1.000 se retrouvent dans des triplets répétitifs de forme $(\text{gly-X-Y})_n$. X et Y sont le plus souvent la proline, la lysine, l'hydroxyproline et l'hydroxylysine (GALLOP, BLUMENFELD, SEIFTER, 1972). Ces deux derniers amino-acides sont spécifiques du collagène : sur 1.000 résidus amino-acides, 10 environ reviennent à l'hydroxylysine, 145 à l'hydroxyproline (BRADLEY, Mc CONNELL-BREUL, CRYSTAL, 1975). Le glycolle représente à lui seul de 30 à 35 % des amino-acides présents.

Ce motif (gly-X-Y) ne se retrouve pas au niveau des 20 derniers amino-acides N et C terminaux constituant les séquences téléopeptidiques qui ne participent pas à la formation de l'hélice, mais jouent un rôle important dans la réticulation des molécules de tropocollagène (BORNSTEIN, 1974).

La synthèse du collagène est un processus très complexe qui peut être schématisé de la façon suivante. Au niveau des fibroblastes des gènes de structure commandent la synthèse des 3 chaînes α qui s'associent en une structure trihélicoïdale appelée le protropocollagène.

Le maintien de cet édifice macromoléculaire est lié à l'existence de ponts disulfures interchaînes situés dans la zone peptidique N terminale dite de coordination (UITTO, JIMENEZ, DEHM et coll., 1972) et de nombreuses liaisons de faible énergie (interactions de VAN DER WAALS, liaisons hydrogène).

Dans le fibroblaste, le protropocollagène subit les trois transformations suivantes aboutissant au tropocollagène qui est secrété :

- Hydroxylation de certains résidus prolyl par une hydroxylase spécifique (CUTRONEO, GUZMAN, SHARAWY, 1974).

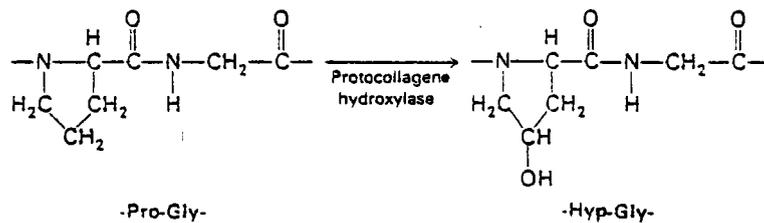


Fig. I.2

**Hydroxylation des résidus prolyl du collagène
par la protocollagène hydroxylase**

Les Prolines engagées dans les séquences gly-X-pro-gly sont hydroxylées en 4 (GALLOP, BLUMENFELD, SEIFTER, 1972), celles incluses dans les motifs gly-pro-Y-gly pourraient être hydroxylées en 3.

- Hydroxylation en C₅ de certains résidus lysyl par une hydroxylase spécifique requerrant les mêmes cofacteurs que la proline-hydroxylase, à savoir O₂, Fe⁺⁺, α-cetoglutarate et acide ascorbique (GRANT, PROCKOP, 1972).

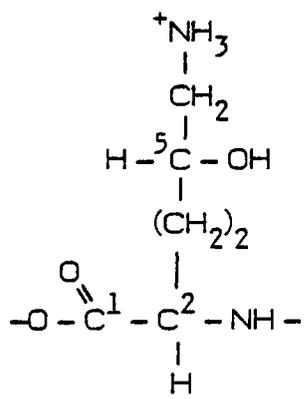


Fig. I.3
Résidu 5 OH lysyl

- Glycosylation de certains résidus 5 hydroxylysyl : les unités glucidiques fixées à l'hydroxyle de l'OH-lysine sont soit la molécule de galactose soit un résidu galactosyl substitué en C₂ par un glucose formant ainsi un diholoside du type isolactose ; cette biosynthèse est réalisée par deux transglycosylases spécifiques : l'UDP hydroxylysine galactose transglycosylase (GRANT, KEFALIDES, PROCKOP, 1972) et l'UDP hydroxylysine glucose transglycosylase (GRANT, PROCKOP, 1972).

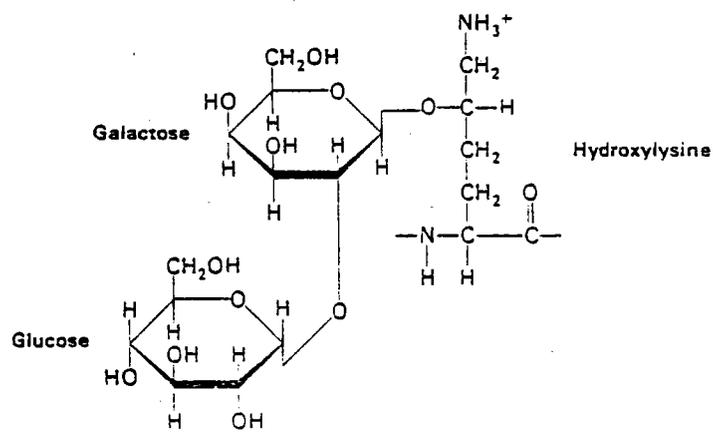


Fig. I.4
Glycosylation de l'hydroxylysine

Le nombre d'unités glucidiques fixées varie suivant le type de collagène. Celui de type IV rencontré dans la membrane basale alvéolaire en renferme le plus. Une compétition existe au niveau des hydroxyles de l'hydroxylysine entre la fixation d'unités glucidiques et la formation de certaines liaisons croisées. Ainsi, plus un collagène contient de glucides moins il est réticulé. Le collagène de type IV des membranes basales dont l'hydroxylysine est glycosylée à 80 % par le glucosyl-galactose, forme des fibres très fines contrastant avec les collagènes pauvres en glucides qui sont ramifiés et forment des faisceaux épais (tendons) (SPIRO, 1969 – ROBERT et ROBERT, 1970).

Les molécules de protropocollagène ainsi hydroxylées et glycosylées, après action d'une procollagène-peptidase éliminant la zone peptidique N terminale de coordination, sont transformées en protocollagène qui est secrété hors du fibroblaste.

Ainsi, comme bien d'autres protéines, le tropocollagène est synthétisé sous la forme d'un précurseur secondairement raccourci par protéolyse.

L'association réversible de molécules de tropocollagène, par des liaisons de faible énergie, aboutit à la formation de collagène soluble. Pour que les fibres deviennent solides, il faut que les molécules de tropocollagène qui les constituent soient liées covalentiellement entre elles. Cette réticulation se fait au niveau des résidus de lysine ou d'hydroxylysine dont la fonction ϵ -aminée est transformée en fonction aldéhydique par une amine-oxydase spécifique, la lysyl-oxydase, aboutissant respectivement à la formation de lysine-aldehyde (ou allysine) et d'hydroxyallysine (SIEGEL, PINNELL et MARTIN, 1970). Les liaisons intermoléculaires les plus fréquentes résultent de la condensation, sous forme de base de SCHIFF, d'une lysine ou d'une allysine avec une hydroxylysine, d'une hydroxyallysine avec une lysine (DAVIS et BAILEY, 1971 – MILLER et ROBERTSON, 1973 – TANZER, 1973).

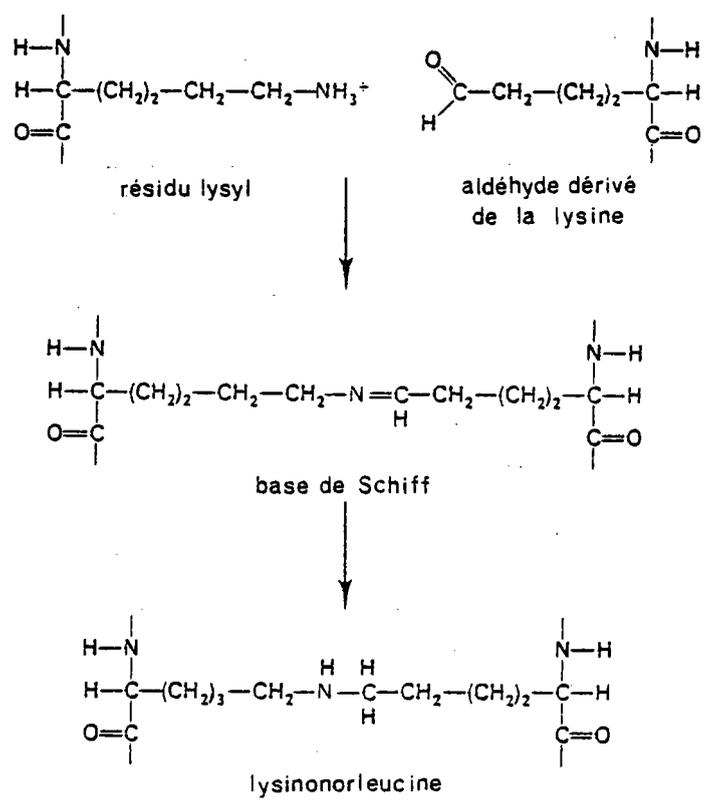


Fig. I.5

Exemple de réticulation du collagène ou de l'élastine par formation de lysinonorleucine

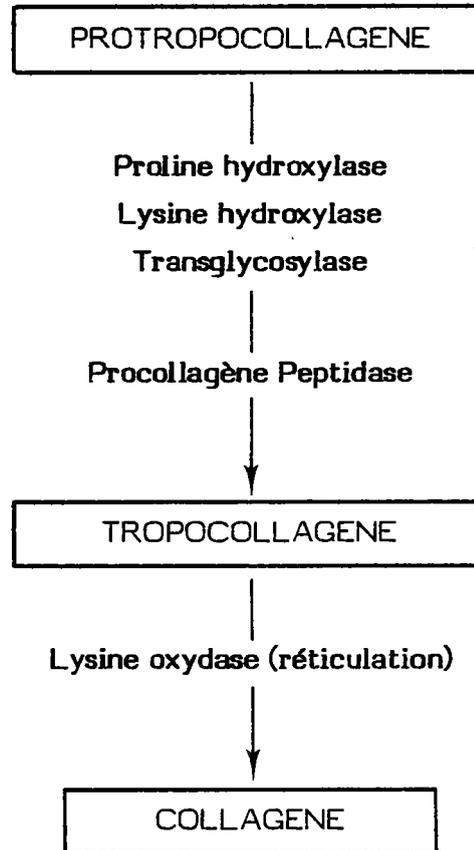
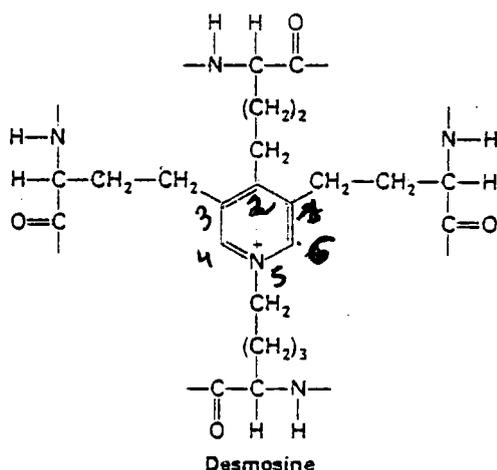


Fig. I.6

Séquence enzymatique aboutissant à la formation du collagène

4.2 L'élastine est un constituant important de l'interstitium alvéolaire. Elle est secrétée sous forme d'un précurseur de structure hélicoïdale, la tropoélastine, dont la composition en amino-acides est proche de celle du tropocollagène (JOHN et THOMAS, 1972) mais s'en distingue essentiellement par l'absence d'hydroxylysine et un beaucoup plus faible pourcentage d'hydroxyproline. En dehors des cellules mésenchymateuses sécrétrices, la tropoélastine est l'objet de pontages lui conférant ses propriétés remarquables d'extensibilité. Ces pontages résultent de l'action de la lysyl-oxydase (SIEGEL, PINNELL et MARTIN, 1970) transformant des groupements ϵ -aminés de lysine en groupements aldéhydiques qui, en se condensant à des restes lysylés aboutissent à la formation d'un hétérocycle hexacyclique, la **desmosine**, liant covalentiellement 4 molécules d'élastine (ROBERT, SZIGETTI, DEROUETTE et coll., 1971).



isodesmosine
 Todd
 f. 1328

Fig. 1.7

Réticulation par la desmosine dans l'élastine



chaîne 1, 3, 4, 5 desmosine
 chaîne 1, 2, 3, 5 iso —

4.3 Les Protéoglycannes

4.3.1 Les protéoglycannes ou protéo-glycosamino-glycuro-glycannes présentent un squelette polypeptidique sur lequel sont greffées des chaînes polysaccharidiques (ex. : mucopolysaccharides). Ils sont reliés en agrégats supermoléculaires par des glycoprotéines de liaison proches des glycoprotéines de structure.

4.3.2 Selon le type de polysaccharides, l'unité disaccharidique de polymérisation est constituée d'une molécule d'hexosamine et généralement d'une molécule d'un acide uronique qui est le plus souvent l'acide glucuronique. L'hexosamine est toujours N-acétylée. Le polymère est souvent porteur de groupements sulfatés accroissant d'autant son caractère polyanionique. Ces structures sont liées à la séquence polypeptidique porteuse au niveau d'un groupement hydroxylé de serine, ou threonine, généralement à l'aide du triplet glucidique intermédiaire xylose-galactose-galactose.

4.3.3 Les glycosaminoglycannes représentent environ 0,50 % du poids sec du poumon humain (LAROS, KUYPER et JANSSEN, 1972) qui est particulièrement riche en dermatan sulfate, heparan sulfate et heparine.

GLYCOSAMINOGLYCANNE	HEXOSAMINE	ACIDE URONIQUE	NOMBRE D'UNITES DISACCHARIDIQUES
Dermatan Sulfate	N-acetyl Galactosamine 4 ou 6 sulfate	Acide iduronique	40 – 60
Heparan sulfate	N-sulfamido glucosamine ou N-acetyl glucosamine 6 sulfate	Acide glucuronique ou iduronique	10 – 20
Heparine	N-Sulfamido glucosamine 6 sulfate	id.	10 – 20
Acide Hyaluronique	N-acetylglucosamine	Acide glucuronique	500 – 2500

Tableau I.1

UNITE DISACCHARIDIQUE DES PRINCIPAUX PROTEOGLYCANES PULMONAIRES
(HANCE et CRYSTAL, 1975)

4.3.4 Les protéoglycannes interviennent dans la limitation de la diffusion des molécules (LAURENT et OBRINK, 1972 – PRESTON, OBRINK et LAURENT, 1973) et associés au collagène et à l'élastine, participent à l'élasticité pulmonaire (LAROS, 1972).

4.3.5 Une très grande différence de structure existe entre les protéoglycannes et les mucines qui sont des glycoprotéines se caractérisant par des chaînes osidiques plus courtes, ne présentant pas d'acides uroniques mais étant par contre beaucoup plus riches en N-acetylglucosamine, glucose, galactose et fucose.

YEAGER (1971) a montré que les mucines contenues dans les lavages bronchiques sont des glycoprotéines neutres présentant de courtes chaînes osidiques et des sialo-glycoprotéines.

4.4 Glycoprotéines de structure

Avec le collagène, l'élastine et les protéoglycannes, les glycoprotéines de structures constituent le quatrième type de macromolécules de la matrice intercellulaire.

Il s'agit de protéines dimériques de faible poids moléculaire (35 000) présentant des ponts disulfures interchaînes. Leur partie glucidique contient des hexosamines (essentiellement glucosamine), des hexoses, de l'acide sialique, du fucose en petite quantité (ROBERT et ROBERT, 1974).

Les membranes basales seraient un agencement macromoléculaire de collagène et de glycoprotéines de structure (ROBERT, 1971).

E. – LES CAPILLAIRES ALVEOLAIRES

Les capillaires sont limités par un endothélium reposant sur une basale continue. Les **cellules endothéliales**, analogues aux pneumocytes de type I, présentent de longs prolongements cytoplasmiques pauvres en organelles mais par contre riches en vésicules d'endocytose (SMITH et RYAN, 1973) participant au transport des macromolécules. Elles sont unies par des jonctions moins serrées que celles des cellules épithéliales.

Par ces jonctions intercellulaires, représentant une surface totale de 30 à 40 cm², s'effectuent les transferts d'eau, d'électrolytes et de molécules hydrosolubles dont le poids moléculaire est inférieur à 40.000.

Les cellules endothéliales présentent de nombreux myofilaments (KAPANCI, ASSIMACOPOULOS et IRLE, 1974). Elles seraient susceptibles de se contracter sous l'influence de l'histamine, de la serotonine et de la bradykinine, entraînant ainsi un élargissement des ouvertures de jonction et par là-même, un accroissement de la perméabilité capillaire.

- II -

MECANISMES DE DEFENSE ALVEOLAIRE

Chez l'homme, dont l'activité ventilatoire quotidienne est de l'ordre de 10 m^3 , le poids de l'environnement est particulièrement important au niveau des 70 m^2 de la surface alvéolaire totale d'échange.

Dans cette zone, particulièrement vulnérable aux agressions provoquées par les poussières et les bactéries inhalées, coexistent deux mécanismes de défense indispensables au maintien de la stérilité et de l'intégrité de l'alvéole, d'abord l'activité macrophagique, puis un système spécifique de défense immunitaire qui la renforce. La réalité de cette coopération est actuellement bien établie : le liquide de lavage alvéolaire contient des substances capables de stimuler, *in vitro*, l'activité bactéricide des macrophages alvéolaires (LAFORCE, KELLY et HUBER, 1973) et des immunoglobulines G (Ig G) dont l'action opsonisante augmente l'efficacité de l'intervention macrophagique (REYNOLDS et THOMPSON, 1973). A ce niveau, où cohabitent lymphocytes et macrophages (WALDMAN et GANGULY, 1974 - KALTREIDER, 1976), interviennent aussi les processus d'immunité à médiation cellulaire.

L'efficacité de ces mécanismes de défense ne saurait faire oublier la nécessité d'une fonction mucociliaire satisfaisante assurant une bonne épuration mécanique des voies respiratoires supérieures.

Bien qu'au cours de ces dernières années, les mécanismes de défense pulmonaire aient été particulièrement étudiés (GREEN, 1970 - KALTREIDER et SALMON, 1973, 1974 - COHEN et GOLD, 1975 - DANIELE, ALTOSE et ROWLANDS, 1975 - KALTREIDER, 1976 - NEWHOUSE, SANCHIS et BIENENSTOCK, 1976 - GREEN, JAKAB, LOW et DAVIS, 1977 - KAZMIEROWSKI, ADUAN et REYNOLDS, 1977), de nombreux points restent encore obscurs notamment au niveau de la réponse immunitaire (REYNOLDS, 1979).

1. Éléments cellulaires de protection

Dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire de sujets normaux, on rencontre de 70 à 80 % de macrophages, de 15 à 20 % de lymphocytes et seulement de 1 à 5 % de polynucléaires. Cette répartition souligne l'importance des macrophages et des lymphocytes dans les mécanismes physiologiques de protection (REYNOLDS, NEWBALL, 1974).

1.1 Les macrophages alvéolaires

* Cellules d'origine médullaire, les macrophages sont des éléments du système histio-monocytaire. Ils adhèrent facilement aux parois de verre et de plastique (FEDORKO et HIRSH, 1970) sur lesquelles on peut les cultiver durant 3 à 6 semaines, ce qui permet l'étude de leur métabolisme et de leur pouvoir phagocytaire (COHEN et CLINE, 1971). Ils sont particulièrement bien pourvus en lysosomes ainsi qu'en mitochondries qui reflètent l'intensité de leur métabolisme aérobie. Ils possèdent de nombreux phagosomes (BOWDEN, 1971) contenant des débris cellulaires, des particules minérales, des inclusions lipidiques et parfois des structures myéliniques provenant du surfactant. Les lysosomes peuvent fusionner avec les phagosomes, accélérant ainsi la lyse des éléments phagocytés, aussi bien qu'avec la membrane cytoplasmique au niveau de laquelle ils se vident de leur contenu enzymatique.

* Les macrophages pulmonaires de l'homme peuvent se reproduire localement dans l'interstitium (GOLDE, BYERS et FINLEY, 1974) lors de traitements antinéoplasiques, alors que les monocytes sont pratiquement absents du sang depuis plus de 50 jours ; le nombre et les qualités fonctionnelles des macrophages des liquides de lavage broncho-alvéolaires sont normaux (GOLDE, FINLEY et CLINE, 1974).

* La présence de récepteurs membranaires pour les Ig G et le composé C_3 du complément (REYNOLDS, ATKINSON, NEWBALL et coll., 1974-1975) indique que les macrophages, bien qu'éléments essentiels du système aspécifique de défense, participent efficacement aux processus immunitaires de protection.

* Ainsi, les antigènes apportés par voie aérienne dans l'alvéole sont l'objet de deux processus différents d'élimination. Dans l'un, les macrophages, après avoir phagocyté et éventuellement plus ou moins dégradé l'antigène, quittent l'alvéole, soit par l'appareil muco-ciliaire, soit par migration à travers l'interstitium vers les vaisseaux lymphatiques.

Dans l'autre, l'antigène peut être absorbé directement à partir de la surface alvéolaire puis transféré dans les canaux lymphatiques. Il en est de même des antigènes solubles ou particuliers parvenant au parenchyme pulmonaire par la voie circulatoire.

1.2 Les éléments lymphocytaires

Le tissu lymphoïde est présent tout au long de l'arbre respiratoire. Au niveau des jonctions broncho-alvéolaires, on observe la présence d'agrégats lymphoïdes (NAGAISHI, 1972).

Il s'agit d'un tissu lymphoïde associé à l'épithélium bronchique (BALT = Bronchus Associated Lymphoïd Tissue) que l'on considère comme un organe lympho-épithélial proche de celui rencontré dans l'intestin (GALT = Gut Associated Lymphoïd Tissue) et différent des autres organes lymphoïdes périphériques. Ce tissu participe à la différenciation des cellules B et T dont les proportions dans les liquides de lavage broncho-alvéolaires sont comparables à celles rencontrées dans le sang (DANIELE, ALTOSE, ROWLANDS, 1975 – REYLNOLDS, NEWBALL, 1976).

Les cellules T sont à l'origine d'autres cellules produisant soit des cytotoxines à fort pouvoir bactéricide direct soit des lymphokines activant les fonctions phagocytaire et bactéricide des macrophages (KALTREIDER, 1976). Les cellules β sont à l'origine de la production d'immunoglobulines dont le pouvoir opsonisant direct ou non, facilite la phagocytose.

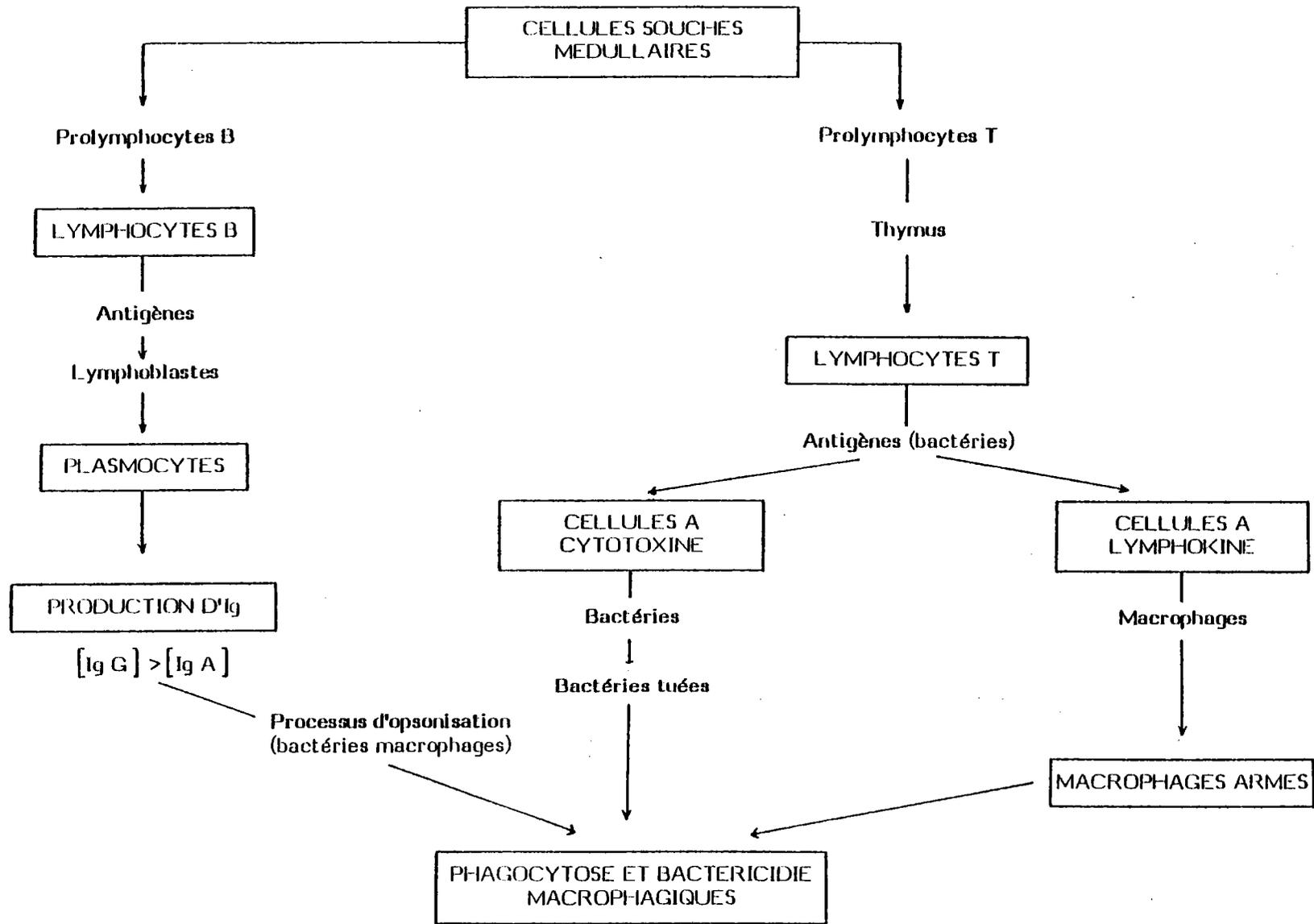


Fig. II.1

Schématisation des mécanismes immunitaires de protection de l'alvéole

2. Elimination des particules inertes et des bactéries tuées

Les poussières sont captées par les macrophages qui sont ensuite rejetés de l'alvéole vers l'"escalator" mucociliaire. Il en est de même des bactéries tuées par les cytotoxines.

3. Bactéricidie

3.1 Dans les conditions physiologiques, la stérilité alvéolaire découle essentiellement de l'activité phagocytaire macrophagique, (GOLDSTEIN et BARTLEMA, 1977), le flux transseptal des polynucléaires n'intervenant en fait que dans certaines situations pathologiques (ARNOUX, FRITSCH et coll., 1977). Les macrophages, armés par l'action des lymphokines, phagocytent les bactéries puis les tuent (GOLDSTEIN, LIPPERT et WARSHANER, 1974). Ce processus est fortement amplifié par l'action opsonisante des Ig G dont on sait la double origine locale et plasmatique (REYNOLDS, KAZMIEROWSKI et NEWBALL, 1975).

Les immunoglobulines A (Ig A) sécrétatoires ne présentent pas d'action opsonisante directe mais jouent par contre un rôle très important, essentiellement dans les voies hautes en tant qu'agents d'agglutination des bactéries (REYNOLDS, THOMPSON, 1973) qu'elles empêchent par ailleurs d'adhérer à l'épithélium alvéolaire (WILLIAMS et GIBBON, 1972).

Les immunoglobulines M (Ig M) n'apparaissent en quantité notable qu'au cours des processus inflammatoires aigus. Leur rôle reste mal compris, les macrophages ne présentant pas de sites membranaires pour ce type d'immunoglobulines (REYNOLDS, NEWBALL, 1974 - REYNOLDS, ATKINSON, NEWBALL et coll., 1975).

3.2 Il apparaît donc que les immunoglobulines impliquées dans la défense alvéolaire proviennent d'un compartiment local : le système immunitaire sécrétoire et du compartiment systémique de l'immunité (BOUSQUET et MICHEL, 1978). Dans le film liquidien alvéolaire, les immunoglobulines prépondérantes sont les Ig G (REYNOLDS, NEWBALL, 1974 – KALTREIDER, CHAN, 1976) alors que dans les voies pulmonaires supérieures, ce sont les Ig A sécrétoires qui prédominent (TOMASI, 1972). Ainsi, ces dernières ont-elles un rôle étroitement lié au moyen de défense mécanique qu'est l'escalator muco-ciliaire.

3.3 La mise à mort, dans le macrophage des bactéries phagocytées met en jeu une machinerie complexe faisant intervenir simultanément :

- l'action du lysozyme qui détruit les parois polysaccharidiques bactériennes (COHN et WIENER, 1963).
- le pH relativement bas (3,5) des phagolysosomes (STOSSEL, 1974 – KLEBANOFF, HAMON, 1975).
- la formation de peroxydes lipidiques (KLEBANOFF, HAMON, 1975 – KIM, GOLSTEIN, LEWIS et coll., 1976).

Le pouvoir bactéricide du macrophage ne semblerait pas lié à la production d'anion superoxyde (De CHATELET, MULLIKIN et Mc CALL, 1975) qui est pourtant reconnu comme le principal agent bactéricide des polynucléaires (BABIOR, KIPNESS et CORNETTE, 1973) dont l'intervention est particulièrement importante lors des processus infectieux.

3.4 Au cours des infections bactériennes, les polynucléaires sont l'objet d'une brusque augmentation de leur consommation d' O_2 au cours de laquelle apparaissent des intermédiaires de réduction (anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$, O_2H_2 , radical hydroxyle OH^{\cdot}) particulièrement toxiques pour les cellules et les bactéries.

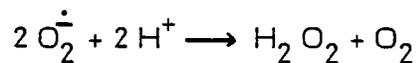
Non inhibés par les cyanures, ces processus de réduction ne sont pas liés à la chaîne de transport des e^- . Ils consistent en l'action d'une NADPH oxydase membranaire et de la myeloperoxydase dont les produits d'action sont secrétés à l'intérieur du phagosome (FRIDOVICH, 1976).

Tout porte à penser que l'anion superoxyde est le composé le plus bactéricide. Les sujets atteints de granulomatose septique maligne n'en produisent pas et meurent généralement très jeunes au cours d'infections dues à des microbes banaux de notre environnement.

Par ailleurs, les sujets atteints de déficit congénital en myéloperoxydase ne présentent pas toujours de prédisposition particulière aux infections bactériennes.

La toxicité de cet anion s'explique par ses propriétés peroxydantes vis-à-vis des lipides membranaires, et clivantes vis-à-vis des molécules d'ADN. Elle résulte de l'anion lui-même, mais aussi des composés qu'il engendre (PAINE, 1978) :

- O_2H_2 par dismutation catalysée par la super oxyde dismutase



- Groupements hydroxylés par action sur $O_2 H_2$



L'anion superoxyde joue, par ailleurs, un rôle essentiel dans la réaction inflammatoire (OYANAGUI, 1978) qui pourrait être fortement atténuée par l'utilisation de la superoxyde dismutase dont l'action anti-inflammatoire est actuellement étudiée chez l'animal (SIMON, LIN, THEODORE et coll., 1977 – MICHELSON et Mc CORD, 1977).

- III -

**TECHNOLOGIE
DU LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE**

En expérimentation animale pulmonaire, les lavages broncho-alvéolaires sont fréquemment utilisés. Les liquides de lavage, permettent, en effet, d'étudier les modifications du revêtement endo-alvéolaire – ainsi récupérés plus ou moins dilués – lors d'agressions par les aéro-contaminants particuliers ou non.

La plupart des études ainsi effectuées sont consacrées à la réponse macrophagique. Nous citons pour exemple, les deux travaux suivants, l'un portant sur les effets toxiques des microparticules de cadmium sur le système respiratoire (BOULEY, DUBREUIL et coll., 1977), l'autre sur l'action des gaz d'échappement de moteur à essence, dilués dans l'air, sur la capacité immunologique du rat et de la souris (BOULEY, PRUBIERE et RIOTTE, 1971).

Du fait, sans doute, de la relative complexité de leur abord analytique, les constituants chimiques ne sont l'objet que d'un petit nombre de travaux qui, par ailleurs, ne concernent que les phospholipides (ARNER, RHOADES, 1973 – PREVOST, LEVY, BOURBON et coll., 1975 – LE MESURIER, STEWART, O'CONNELL et coll., 1979).

En pneumologie humaine, le lavage broncho-alvéolaire apparaît actuellement comme une toute nouvelle technique permettant l'exploration du poumon profond. L'étude cytologique et biochimique des liquides de lavage est particulièrement intéressante dans les pneumopathies interstitielles diffuses, quelqu'en soit l'origine. Elle permet une meilleure compréhension des conflits immunologiques et des mécanismes de défense se développant au niveau de l'alvéole lors des très diverses agressions dont ~~il~~ est l'objet.

elle

elle qui

1. Technique du lavage broncho-alvéolaire chez l'homme

- 1.1 Les protocoles de lavage actuellement décrits (FINLEY, SWENSON et CURRAM, 1967 – REYNOLDS et NEWBALL, 1974 – LOW, DAVIS et GIANCOLA, 1978), se différencient par les modalités de prémédication du patient, le choix de l'anesthésique local et les volumes utilisés. Le fibroscope est introduit dans l'arbre trachéo-bronchique et poussé en cathétérisme bloqué dans une bronche sous-segmentaire afin d'isoler un territoire pulmonaire précis. On injecte ensuite, par l'intermédiaire du canal de fonction de l'appareil, le soluté salé isotonique qui irrigue les extrémités bronchiques et les groupes alvéolaires en dépendant. Le liquide de lavage est récupéré soit par aspiration douce, soit par siphonage.

- 1.2 Les modalités de lavage adoptées dans ce travail sont les suivantes : après blocage du fibro-bronchoscope (Olympus) dans une bronche sous-segmentaire de la lingula ou de la lobaire moyenne, 5 instillations successives de 50 ml de soluté physiologique (NaCl 9 g/l) préalablement tiédi sont réalisées ; après chaque instillation, le liquide est recueilli, sous vide, dans des flacons en matière plastique ou siliconés afin d'éviter l'adhérence des cellules aux parois. L'imprégnation du fibroscope par un gel de lidocaïne à 2 % (Xylocaïne visqueuse) permet sa meilleure acceptation par la muqueuse, favorisant ainsi son blocage au cours de l'épreuve.

- 1.3 L'examen est généralement très bien supporté, les patients étant l'objet d'une prémédication anxiolytique à base de chlorazepate dipotassique (Tranxène). La veille au soir, le sujet absorbe une gélule de Tranxène à 5 ou 10 mg ; 15 minutes avant le début de l'épreuve, on injecte par voie intraveineuse, selon le poids et l'état d'anxiété, 50 ou 100 mg de Tranxène et 1 mg de sulfate d'atropine rendant inefficace l'excitation des terminaisons centrifuges du vague dans les bronches dont la lumière s'élargit par distension des fibres lisses.

L'anesthésie des voies supérieures à la seringue laryngée est obtenue par l'instillation de 10 à 20 ml de xylocaïne à 2 %.

1.4 Dans les heures suivant le lavage, on observe fréquemment une discrète image radiologique disparaissant en 24 à 48 heures. Dans environ 5 % des cas apparaît une poussée fébrile transitoire. Par ailleurs, cette épreuve abaisse de 5 à 10 mm de mercure la pression partielle d'oxygène du sang. De ces observations, il ressort que le lavage broncho-alvéolaire est contre-indiqué :

- dans l'infection bronchique qui pourrait être étendue au poumon profond,
- dans l'insuffisance respiratoire avec hypoxie sévère.

1.5 Nous estimons qu'au cours d'un lavage de 250 ml ainsi fractionné en 5 fois 50 ml, le liquide recueilli après instillation des premiers 50 ml (1er flacon) correspond au rinçage des ramifications bronchiques et bronchiolaires. Les fractions suivantes correspondent au lavage alvéolaire proprement dit. Pour 6 lavages pratiqués chez des témoins volontaires normaux, nous avons observé un pourcentage plus élevé de cellules bronchiques dans le premier flacon de recueil (moyenne 7,2 % valeurs extrêmes 4,1 % - 10,3 %) alors que dans le pool constitué par les 4 derniers flacons, ce pourcentage est 4 fois plus faible (moyenne 1,8 % valeurs extrêmes 0 - 4,3 %).

Afin d'écartier au maximum l'incidence bronchique des lavages, que nous souhaitons le plus possible alvéolaires, nous éliminons systématiquement le 1er flacon correspondant à l'instillation des 50 premiers ml et ne travaillons que sur le pool des recueils correspondant aux 4 instillations suivantes. Après élimination des cellules par une centrifugation de 10 minutes à 800 g, les liquides surnageants sont stockés à - 20°C en vue de leur étude biochimique.

1.6 Dans la mesure où, chez un même sujet, il est impossible de répéter les lavages un nombre de fois suffisant, l'étude de la reproductibilité du protocole ne peut être envisagée qu'indirectement à partir de sujets sains de même tranche d'âge, ne fumant pas. Par ailleurs, nous pensons que la validité de cette approche implique que soient pris en considération des paramètres aussi différents que le pourcentage de récupération liquidien, les concentrations en K^+ (déterminées par photométrie de flamme), les protéines totales (LOWRY et coll.) et les lécithines (méthode originale au Noir Amide).

n = 6 24 ans \pm 1	% de récupération du liquide de lavage	Nombre de cellules par mm ³	K^+ mEq/l	Protéines μ g/ml	Lécithines μ g/ml
MOYENNE	68,0	95,3	0,29	136,6	20,6
ECART-TYPE (σ)	13,1	13,6	0,08	34,4	7,0
COEFFICIENT DE VARIATION	0,19	0,14	0,27	0,25	0,33

Tableau III.1

ETUDE INDIRECTE DE LA REPRODUCTIBILITE
DU PROTOCOLE DE LAVAGE ADOPTE

Malgré le caractère approximatif de cette étude on peut remarquer que le protocole de lavage retenu présente une reproductibilité cliniquement satisfaisante, surtout si l'on considère la valeur du coefficient de variation du nombre de cellules par mm³ (0,14).

2. Technique du lavage broncho-alvéolaire chez la souris, le rat et le lapin

2.1 Bien que la méthode par perfusion d'un ensemble cœur-poumon (VOGEL, KRETZ, SCHMAR, IWAINSKY et coll., 1970) soit très élégante dans son principe, nous lui avons préféré le lavage broncho-alvéolaire de réalisation plus simple, et de ce fait mieux adapté aux petites séries que nous avons à traiter.

Chez les souris, rats et lapins, les lavages broncho-alvéolaires sont pratiqués juxta post-mortem, sans isolement préalable des poumons. Il s'agit de rinçages avec du soluté salé isotonique effectués à la seringue par voie endotrachéale. Chaque opération de rinçage comporte une série de cycles successifs dont chacun se décompose en la séquence suivante : instillation d'un aliquot du volume total de lavage (20 secondes), repos (30 secondes), aspiration (30 secondes).

2.2 Sur chacune des 6 souris congéniques Agouti CBA, nous avons effectué 6 cycles de lavage de 0,5 ml afin d'étudier l'évolution de la concentration des lécithines dans les liquides recueillis. En vue d'obtenir des volumes de travail suffisants, les liquides issus de chacun des cycles ont été poolés 2 par 2 permettant ainsi d'obtenir 3 pools A, B et C pour chaque cycle (ex. : cycle n° 1 pool A : souris 1 + 2 - pool B souris 3 + 4 - pool C souris 5 + 6). Dans le premier cycle de lavage, le taux moyen de lécithines en $\mu\text{g/ml}$ était de $155 \mu\text{g}$ (± 28). A partir du quatrième cycle, il était minimal et constant ($19 \mu\text{g} \pm 6$) (fig. III.1).

Au cours des 4 premiers cycles, on recueille 89,3 % de la quantité de lécithines retirée au cours des 6 cycles.

2.3 Sur un lot de 10 rats Wistar (Charles RIVERS) d'un poids moyen de $249 \text{ g} \pm 33 \text{ g}$, nous avons effectué une étude de même type que celle réalisée sur les souris. Tenant compte du fait que ces rats ont un poids moyen 10 fois supérieur à celui des souris ($22 \text{ g} \pm 4 \text{ g}$), nous avons effectué 6 cycles de lavage de 5 ml. De $128 \mu\text{g/ml} \pm 21$ dans le liquide issu du premier cycle, la concentration moyenne en lécithines s'abaisse à $10 \mu\text{g/ml} (\pm 3)$ dans celui des 3ème, 4ème, 5ème et 6ème (fig. III.1). La quantité de lécithines retirée au cours des 3 premiers cycles représente 87,6 % de celle contenue dans l'ensemble des 6 cycles.

2.4 Pour rester dans des conditions de lavage semblables à celles retenues pour les souris et les rats, il faudrait, chez des lapins, dont le poids moyen est de l'ordre de 2,5 kg, effectuer 6 cycles de 50 ml ou, pour éviter toute distension alvéolaire, 15 cycles de 20 ml. En effectuant sur 3 lapins Fauve de Bourgogne (2 620 g \pm 515 g) 15 cycles de 20 ml, la quantité de lécithines recueillie dans la totalité des liquides de lavage est du même ordre de grandeur (13 208 μ g \pm 1 520 μ g) que celle obtenue (12 275 μ g \pm 1 480) avec 3 autres animaux de poids sensiblement identiques (2 700 g \pm 680 g) pour lesquels la séquence suivante a été observée :

15 ml + 15 ml + 10 ml + 10 ml + 10 ml

Au cours de chaque cycle, les étapes "aspiration/repos" ont été répétées 5 fois successives avec le même liquide au lieu d'une fois.

Dans ces conditions, à partir du 5^{ème} cycle, la concentration en lécithine reste pratiquement constante et minimale (fig. III.1).

2.5 Les concentrations minimales et constantes des lécithines observées au cours des derniers cycles de lavage sont vraisemblablement la conséquence de la distension de l'alvéole au cours de l'instillation du liquide de lavage, distension qui entraîne une sortie de surfactant dans la lumière alvéolaire (FARIDY, 1976).

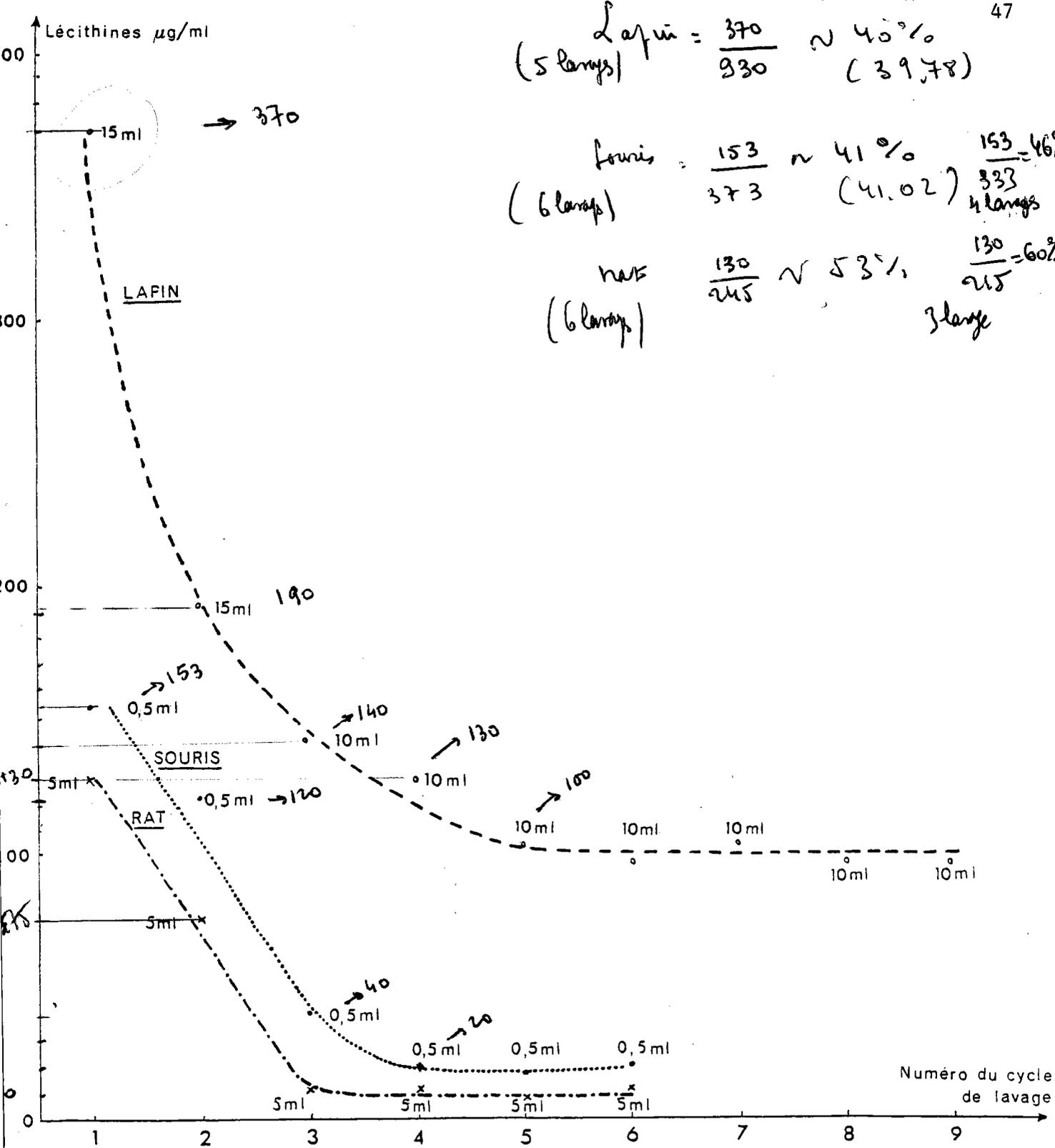


Fig. III.1

Evolution de la concentration des lécithines au cours des cycles de lavage

2.6. Protocoles retenus

2.6-1 Souris :

Après avoir sacrifié les souris en leur injectant par voie intra-péritonéale 0,5 ml d'une solution de pentobarbital (Nembutal) à 6 g %, nous procédons à 4 cycles successifs de lavage de 0,5 ml de soluté physiologique.

2.6-2 Rats :

Ils sont sacrifiés par une injection intrapéritonéale de 1 ml de pentobarbital à 6 g %. Nous effectuons 3 cycles de lavage de chacun 5 ml.

2.6-3 Lapins :

Ils sont sacrifiés par une injection intraveineuse de 1 ml de pentobarbital à 6 g % dans la veine marginale de l'oreille. Au cours des 5 cycles successifs suivants (15 ml + 15 ml + 10 ml + 10 ml), les étapes aspiration/repos sont répétées 5 fois.

210 1201

2.7 Les modalités que nous avons retenues permettent un recueil rapide et efficace des liquides de lavage. Les pourcentages de liquide récupéré ont été de 83,4 % \pm 3,7 % pour les souris (n = 6), 84,8 % \pm 5,1 % pour les rats (n= 10) et 87,3 % \pm 5,5 % pour les lapins (n = 6). Il faut remarquer qu'au cours du 1er cycle, le volume recueilli est toujours inférieur d'environ 30 % à celui obtenu au cours des cycles suivants pour lesquels le rendement est toujours compris entre 85 et 100 %. Le liquide recueilli au cours du dernier cycle présente une concentration minimale en lécithines. Pour des animaux de même espèce et de même poids, sains et placés dans des conditions physiologiques normales, les quantités totales de lécithines retirées sont du même ordre de grandeur, ce qui est en faveur d'une reproductibilité satisfaisante des protocoles adoptés (tableau III.2).

	n	Moyenne	Ecart-type	Coefficient de variation
SOURIS (Swiss)	8	176,6	49,0	0,27
RATS (Wistar)	8	1 033,4	307,4	0,29
LAPIN (Fauve de Bourgogne)	3	12 320,0	2 760,2	0,22

Tableau III.2

ETUDE INDIRECTE DE LA REPRODUCTIBILITE DES PROTOCOLES DE LAVAGE CHEZ LA SOURIS, LE RAT ET LE LAPIN A PARTIR DE LA QUANTITE TOTALE DE LECITHINES RECUPEREE EXPRIMEE EN μg

3. Validité des protocoles de lavage proposés

3.1 Nous nous sommes attachés à vérifier que la quantité de lécithines contenue dans la totalité des liquides de lavage était compatible avec l'existence d'un film monomoléculaire continu sur l'ensemble de la surface alvéolaire.

Nous avons pris comme référence les données récentes de GAIL, STEINKAMP et MASSARO (1978) : ces auteurs – s'appuyant sur le travail de WATKINS (1968) relatif aux propriétés de surface in vitro des lécithines et sur celui de BROWN, JOHNSON et CLEMENTS (1959) concernant les surfaces alvéolaires de différentes espèces en fin d'expiration – ont calculé la quantité minimum de dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) nécessaire au recouvrement lamellaire monomoléculaire de la surface alvéolaire en fin d'expiration. Ils indiquent une valeur de 0,06 mg pour la souris (surface alvéolaire = $0,08 \text{ m}^2$ pour 25 g), 0,54 mg pour le rat (surface alvéolaire : $0,6 \text{ m}^2$ pour 240 g) et 8,10 mg pour le lapin (surface alvéolaire : $7,3 \text{ m}^2$ pour 2,7 kg).

* Après destruction dans les extraits lipidiques des lécithines insaturées par oxydation osmique (MASON, NELLENBOGEN et CLEMENTS, 1976), nous avons dosés par chromatographie sur couche mince selon un protocole original décrit plus loin, les lécithines saturées recueillies dans la totalité des lavages. Les quantités trouvées respectivement chez la souris, le rat et le lapin sont : 0,11 mg (n = 8, pourcentage de saturation 65 %), 0,62 mg (n = 8 pourcentage de saturation 60 %) et 8,37 mg (n = 3 pourcentage de saturation 68 %).

* Il apparaît donc que les quantités de lécithines saturées recueillies sont, pour chacune des espèces étudiées, toujours supérieures à celles nécessaires à l'existence d'un film monomoléculaire sur la surface alvéolaire.

Les valeurs rencontrées dans les lavages humains sont elles aussi, compatibles avec l'existence de ce film monomoléculaire. Pour une surface alvéolaire d'environ 70 m^2 soit 10 fois celle du lapin, il faudra de 80 à 85 mg de lécithines saturées pour permettre ce recouvrement.

Chez 6 sujets jeunes (23 ans \pm 3,5 ans) non fumeurs et bien portants, nous avons trouvé un taux moyen de lécithines de $20,6 \mu\text{g/ml}$. En admettant que le liquide piégé dans le poumon présente une concentration sensiblement égale à celle du liquide recueilli, la quantité de lécithines contenue dans les 250 ml instillés sera de 5 150 μg .

A partir de données anatomiques, on considère que, chez les sujets normaux le lavage broncho-alvéolaire concerne le 1/15 environ (voire le 1/20) du poumon, soit le 1/30 de la surface alvéolaire totale. Ainsi, pour nos 6 témoins, on peut estimer à 154,5 mg la quantité totale de lécithines ce qui, pour le pourcentage de saturation trouvé à 61 %, correspond à 94,2 mg de lécithines saturées.

pourcentage de saturation 61 %

Cette quantité est donc tout à fait compatible avec l'existence d'un film monomoléculaire.

3.2 Nos données expérimentales font apparaître :

- * Une corrélation "inter-espèce" linéaire directe entre le ln du poids corporel (exprimé en g) et le ln de la quantité de lécithines (exprimée en μg) saturées (LS) ou totales (LT) issues des lavages (fig. III.2)

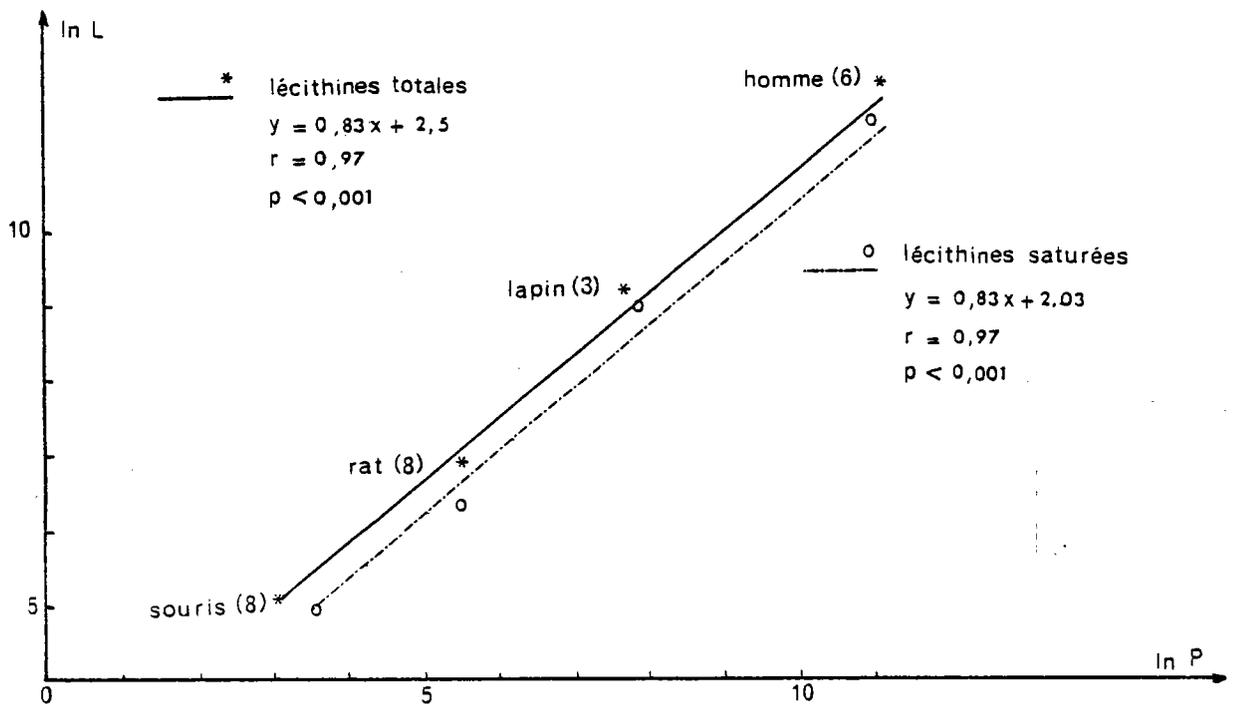


Fig. III.2

Corrélation linéaire directe entre le ln de la quantité de lécithines (totales et saturées) contenues dans le lavage et le ln du poids corporel (P)

- * Deux corrélations "inter-espèce" de même type trouvées entre les quantités de lécithines et les capacités totales indiquées par le Biological Handbook (0,74 ml pour une souris de 20 g, 8,3 ml pour un rat de 250 g, 170 ml pour un lapin de 2,5 kg et 5 500 ml pour un homme de 65 kg) ainsi qu'entre les lécithines totales et le volume/minute (20 ml pour la souris, 70 ml pour le rat, 620 ml pour le lapin, 7 400 ml pour l'homme).

* Correlation entre le ln de la quantité de lécithines et le ln de la capacité totale :

- Lécithines totales :

$$y = 0,73 x + 3,7 \quad r = 0,96 \quad p < 0,001$$

- Lécithines saturées :

$$y = 0,77 x + 3,2 \quad r = 0,97 \quad p < 0,001$$

* Correlation entre le ln de la quantité de lécithines et le ln du volume minute

- Lécithines totales :

$$y = 0,99 x + 2,20 \quad r = 0,98 \quad p < 0,001$$

- Lécithines saturées :

$$y = 1,12 x + 1,45 \quad r = 0,98 \quad p < 0,001$$

* Le rapport de la quantité de lécithines saturées contenue dans la totalité du liquide de lavage pulmonaire à celle nécessaire au recouvrement moléculaire de la surface alvéolaire est particulièrement élevé (1,83) chez la souris qui est l'animal dont la fréquence respiratoire est la plus grande (160). Pour les autres espèces, ce rapport est peu différent de 1,10.

- IV -

CHIMIE CLINIQUE ANALYTIQUE
DU LIQUIDE DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE :
Méthodologies originales et adaptations technologiques

Le liquide de lavage alvéolaire est un milieu qui se caractérise par les faibles concentrations de ses constituants dont les déterminations – dans le cadre d'une exploration bioclinique – impliquent l'utilisation de méthodes particulières dont la simplicité technique ne doit pas compromettre la fiabilité.

C'est dans cet esprit et à la lumière de la structure biochimique du film alvéolaire et de l'interstitium que nous décrivons ici des techniques de dosage de différents composés – les plus facilement accessibles par les méthodes de la chimie clinique analytique – existants ou pouvant apparaître, lors de certaines agressions, dans les liquides de lavage.

PROTOCOLE DE CONCENTRATION DES LIQUIDES DE LAVAGE

- * Pour le dosage de certains constituants présents dans les liquides de lavage à des taux très faibles, une concentration préalable s'avère très utile (ex. : fucose) voire nécessaire (ex : Ig M). Bien que dans notre méthode d'étude des lécithines nous ne procédions pas à une concentration préalable des liquides de lavage, ce sont elles qui cependant nous ont servi de témoin dans le choix d'un protocole de concentration. Ainsi, avons-nous comparé les taux de lécithines (déterminés selon une méthode originale décrite plus loin) obtenus avant et après concentration.

- * Le fait d'observer, à partir de lyophilisats, des taux de lécithines beaucoup plus faibles (de 60 à 80 %) que ceux obtenus par extraction directe nous a incité à écarter ce mode de concentration. Cette anomalie semble résulter de la difficulté qu'il y a à solubiliser le lyophilisat et peut être d'une dénaturation des lécithines. D'ailleurs, les auteurs qui utilisent ce mode de concentration s'aident des ultrasons pour solubiliser le lyophilisat et extraire les lipides (LOW, DAWIS et GIANCOLA, 1978).

Des essais peu satisfaisants nous ont fait écarter l'emploi du concentrateur Minicon B 15 Amicon basé sur la diffusion osmotique. Nous avons en effet, observé qu'avec ce système, la concentration de solution d'albumine (20 mg %) et d'Ig A (10 mg %), de 10 fois s'effectuait avec des pertes importantes, respectivement de l'ordre de 35 et 58 %, qui semblent dues pour une part à la nature du support mais aussi à la surface d'échange.

* Ainsi avons-nous adopté l'appareil "Sélectron" Schleicher et Schull à ultragaines dont les rendements sont très satisfaisants (> 90 %). Dans cet appareil, la concentration s'effectue par ultrafiltration sous vide obtenu par une trompe à eau, à travers une membrane sélective sur laquelle le produit à isoler ne semble pas être adsorbé de façon notable.

LIPIDES ET DERIVES

- A/ LECITHINES TOTALES
- B/ LECITHINES SATUREES
- C/ CHOLESTEROL ET TRIGLYCERIDES
- D/ MALONALDEHYDE

*phosphores -
à dire quoi?
est ce q'on
ait au
vant - cellz.*

lipides en general + - - -

A. - DOSAGE DES LÉCITHINES TOTALES

les phospholipides sont-ils liés ou associés aux protéines ?

Un protocole simple de dosage des lécithines peut être décrit, permettant d'éviter les étapes habituellement pratiquées et néanmoins fastidieuses que sont la concentration des liquides de lavage et le dosage du phosphore dans la tache de lécithines repérée par les vapeurs d'iode et récupérée par grattage de la couche siliceuse (FRUCHART, PONTHEU, PORCHET et coll., 1977 - LOW, DAVIS et GIANCOLA, 1978).

1. Principe

Les lipides sont extraits des liquides de lavage par un mélange méthanol chloroforme (FOLCH, LEES et SLOANE-STANLEY, 1957). Les lécithines sont isolées par chromatographie en couche mince sur gel de silice. Après révélation par le Noir Amide et décoloration du support par l'eau, les taches correspondant aux lécithines sont éluées par le diméthyl-formamide. Elles sont dosées par spectrophotométrie des éluats à 610 nm.

2. Matériel et réactifs

* Plaques de gel de silice sur support plastique (20 cm x 20 cm) Schleicher et Schull (Silicagel F 1500, réf. 335 100).

* R.I. : Mélange pour extraction

Méthanol	1 vol.
Chloroforme	2 vol.

que donner les protéines & acis ce solvant -

* R. II: Phase mobile pour migration chromatographique

Chloroforme anesthésique	65 vol.
Methanol	25 vol.
Eau	4 vol.

* **R.III** : Solution étalon de dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC)

Préparée extemporanément, cette solution chloroformique de DPPC est à 2 mg/ml.

* **R.IV** : Réactif de révélation :

Noir Amide 5 g

Eau distillée 500 ml

Acide acétique 200 ml

Eau distillée q.s.p. 1000 ml

* **R.V.** : Réactif de décoloration du fond de plaque

Eau de ville

* **R.VI** : Réactif d'élution

Diméthylformamide

3. Protocole

3.1 Prélèvement

Le liquide de lavage broncho-alvéolaire, dans un délai inférieur à 1 heure suivant son recueil, est centrifugé à 600 g pendant 10 minutes, afin d'éliminer les éléments cellulaires. S'il n'est pas traité immédiatement, le surnageant peut être conservé à - 20°C.

3.2 Extraction des lipides

Un volume de liquide (1 ou 2 ml) est extrait par 5 volumes du mélange chloroforme/méthanol (R I). Après une agitation vigoureuse durant 3 minutes, le déphasage est obtenu par une centrifugation de 10 minutes à 1200 g. La couche surnageante est éliminée au maximum. A l'aide d'une pipette Pasteur, on recueille la couche inférieure chloroformique qui est évaporée à sec dans une capsule à 50°C.

3.3 Séparation chromatographique des lécithines

Le résidu d'évaporation resolubilisé dans 0,2 ml de chloroforme est déposé en totalité sur la plaque de gel de silice en un trait continu de 1 cm.

De même, on dépose 5, 10 et 20 μl de la solution étalon de DPPC correspondant respectivement à 10, 20 et 40 μg . La chromatographie ascendante est arrêtée lorsque le front du solvant est à environ 2 cm du bord supérieur de la plaque.

3.4 Révélation du chromatogramme

Après séchage à l'air libre ou par un passage de 5 minutes à l'étuve à 70°C, la plaque est immergée durant une minute dans la solution colorante de Noir Amide (R IV). La décoloration du fond de la plaque s'effectue dans l'eau éventuellement tiède. Les phospholipides apparaissent en bleu sur fond blanc.

en général

3.5 Quantification des lécithines

Après un léger essorage entre deux feuilles de papier filtre, les taches correspondant aux lécithines sont découpées et éluées par 3 ml de diméthylformamide (R VI). Les D.O. des éluats sont lues à 610 nm. Le taux de lécithines en $\mu\text{g/ml}$ de liquide est obtenu à partir de la courbe d'étalonnage.

Si la D.O. de l'éluat correspondant au liquide de lavage est inférieure à celle du point de gamme le plus bas (c'est-à-dire 10 μg) on recommence l'extraction lipidique sur un volume plus important. Inversement, si elle est supérieure au point de gamme le plus élevé (40 μg), l'extraction est opérée sur un volume plus faible.

4. Justifications

4.1 Conservation des surnageants de centrifugation

Le taux des lécithines dans les surnageants de centrifugation des liquides de lavage broncho-alvéolaire est stable au moins un mois, lorsqu'ils sont conservés à -20°C .

4.2 Révélation et quantification du chromatogramme

* Le Noir Amide en milieu acétique permet d'obtenir une révélation très efficace et très rapide (immersion d'une minute) des phospholipides et notamment des lécithines. Des temps supérieurs (5, 10 et 15 minutes) d'immersion dans ce réactif n'améliorent pas la sensibilité de la technique, les densités optiques des éluats n'étant pas significativement différentes de celles obtenues par un temps de coloration d'une minute.

* La décoloration du support de silice est très rapidement et complètement obtenue par immersion dans l'eau. Les taches bleues de lécithines sur le fond parfaitement blanc du support peuvent ainsi être découpées sans ambiguïté.

* La quantification des lécithines se fait à partir de mesure de la densité optique des éluats des taches dans le diméthylformamide. Ce réactif permet à la fois d'obtenir très rapidement (en moins de 30 minutes) une élution complète des taches et de ne pas dissocier le gel de silice de son support plastique, l'éluat étant ainsi toujours parfaitement limpide.

4.3 Colorimétrie

* La densité optique (D.O.) des éluats présente un maximum à 610 nm retenu pour les lectures qui sont effectuées en cuve de 1 cm de trajet optique.

- * La coloration des éluats est stable au moins 12 heures.
- * La gamme d'étalonnage (10, 20, 40 μg) est linéaire.

4.4 Sensibilité

Pour 10 μg de DPPC, la D.O. des éluats est de l'ordre de 0,080. Elle varie en fonction de la façon dont on a mené le processus de décoloration. C'est pourquoi il est indispensable d'inclure sur une même plaque, les étalons et les extraits à doser.

4.5 Reproductibilité

Sur un liquide de lavage, nous avons effectué 20 déterminations du taux de lécithines à partir de 20 extractions. Les résultats suivants ont été obtenus :

$$m = 13,8 \mu\text{g/ml}, \quad \sigma = 0,7 \quad \text{CV} = 5,1 \%$$

4.6 Comparaison avec une méthode basée sur le dosage du phosphore

Sur 15 liquides de lavage de lapin préalablement concentrés de 8 à 15 fois contre du polyvinylpyrrolidone en poudre, les lécithines après repérage par les vapeurs d'iode, ont été dosées après élimination de ces dernières à partir de la teneur en phosphore (BARTLETT, 1959) de la zone siliceuse récupérée par grattage. Les lécithines de ces mêmes liquides ont été simultanément dosées par la méthode décrite.

Les résultats comparatifs obtenus indiquent une corrélation satisfaisante entre les deux méthodes :

* Moyennes des déterminations :

- . Technique proposée : 180,2 $\mu\text{g/ml}$
- . Technique prise comme référence : 170,7 $\mu\text{g/ml}$

Quelle est la cause de cette différence ?

- * Equation de la droite de régression y (référence) = $0,76 x + 34$
- * Coefficient de corrélation : 0,846
- * $p < 0,001$

B. – DOSAGE DES LECITHINES SATUREES

1. Principe

La méthode que nous proposons est basée sur l'action oxydante de l'oxyde d'osmium ($Os O_4$) qui élimine les lipides insaturés (STOEKENIUS et MAHR, 1965 – MASON, NELLENBOGEN et CLEMENTS, 1976). Après oxydation de l'extrait lipidique, les lécithines saturées sont dosées selon le protocole décrit pour les lécithines totales, les composés issus de l'oxydation n'interférant pas dans la séparation chromatographique.

2. Réactifs

Nous n'indiquons que les réactifs nécessaires au protocole d'oxydation :

- * R I Tétrachlorure de carbone
- * R II Solution oxydante d'oxyde d'osmium à 15 mg/ml dans le tétrachlorure de carbone.

3. Protocole

Sur le résidu sec de l'extraction chloroformo-méthanolique correspondant à 1 ou 2 ml de liquide de lavage qui a été solubilisé dans 0,5 ml de CCl_4 , on ajoute 10 μ l de solution osmique (R II).

Après mélange, l'oxydation est effectuée durant 20 minutes à la température ambiante. Après évaporation à sec, le résidu est resolubilisé dans 0,2 ml de chloroforme et la totalité du volume est déposé sur la plaque de gel de silice. Les étapes suivantes sont identiques à celles décrites pour le dosage des lécithines totales.

4. Justifications

4.1 A l'aide de dioleoyl phosphatidyl choline, nous avons vérifié que l'oxydation était complète en 20 minutes.

4.2 La dipalmitoyl phosphatidyl choline, dans ces conditions opératoires, n'est pas altérée.

4.3 La reproductibilité de ce protocole est satisfaisante. Sur un liquide de lavage humain, 10 déterminations du taux des lécithines saturées ont été effectuées à partir de 10 extractions. Les résultats suivants ont été obtenus :

$$m = 8,03 \mu\text{g/ml} \quad \sigma = 0,44 \quad \text{CV} = 0,055$$

4.4 Cette méthode fournit des résultats très proche de ceux obtenus par oxydation iodo-permanganique (SHIMOJO, ABE et OHTA, 1974). Cette dernière nécessite une reprise de l'extrait lipidique dans l'acide acétique avant l'oxydation pratiquée en milieu aqueux durant 45 minutes ; elle impose par ailleurs une extraction chloroformo-methanolique supplémentaire.

Les résultats comparatifs obtenus à partir de 15 liquides de lavage humains indiquent une corrélation satisfaisante entre ces deux méthodes.

- Moyennes des déterminations

- . Technique à l'oxyde d'osmium : 7,18 $\mu\text{g/ml}$
- . Technique iodo-permanganique : 7,63 $\mu\text{g/ml}$
(prise comme référence)

- Equation de la droite de régression

$$y \text{ (référence)} = 1,1 x - 0,4$$

- Coefficient de corrélation : $r = 0,924$

- $p < 0,001$

libre

C. - DOSAGE DU CHOLESTEROL ET DES TRIGLYCERIDES

- * Le protocole utilisé est identique à celui adopté pour les lécithines.

- * La phase mobile pour migration chromatographique présente la constitution suivante :
 - éther de pétrole 90 vol.
 - éther éthylique 10 vol.
 - acide acétique 1 vol.

- * L'étalonnage est réalisé à partir d'une solution chloroformique à 1 mg par ml de tripalmitine et 1 mg/ml de cholestérol préparée extemporanément. On dépose 5, 10 et 20 μ l.

et puis

100 mg/l

100 mg/l

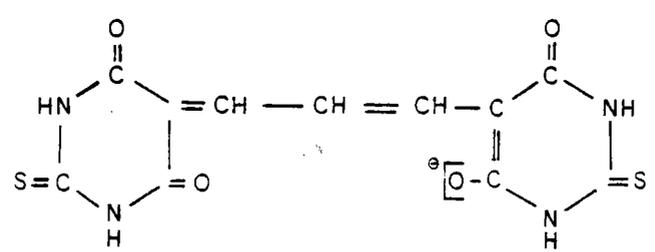
100 mg/l

D. - DOSAGE DU MALONALDEHYDE

1. Principe

Nous avons adapté au liquide de lavage la réaction thiobarbiturique initialement décrite par BERHEIM et coll. (BERHEIM, BERNHEIM et WILBUR, 1948). Le malonaldehyde (MDA) - issu de l'oxydation des acides gras polyinsaturés - réagit sur l'acide thiobarbiturique (TBA) en milieu acide et à chaud. Il se forme un chromogène rose présentant un maximum d'absorption à 532 nm (BARBER et BERHEIM, 1967) que nous extrayons par le butanol 1.

Selon SCHMIDT (1959a et b), il s'agirait d'un composé acide polaire provenant de la condensation d'une molécule de malonaldehyde avec 2 molécules d'acide thiobarbiturique et pour lequel la formule suivante a été proposée :



acide thiobarbiturique
malonaldehyde
condensation

Fig. IV.1

Formule du chromogène issu de la condensation en milieu acide, du malonaldehyde sur l'Ac. thiobarbiturique

2. Réactifs

- R I H₂ SO₄ N/12
- R II Solution saturée de Na₂SO₄ anhydre (#2 M)
- R III Acide thiobarbiturique à 0,2 % dans R II

R IV Solutions d'étalonnage :

Elles sont préparées extemporanément à partir du malondialdehyde-tetraethylacetal (Merck, référence 805 797).

- Solution MDA M/100
MDA 0,24 ml
Eau distillée qsp 100 ml
- Solution MDA M/10 000
Dilution au 1/100 de la précédente
- Solution MDA M/1 000 000
Dilution au 1/100 de la précédente.

Cette solution renfermant 1 nMole par ml est diluée au demi pour obtenir le point de gamme à 0,5 nMole/ml

R V Butanol-1

3. Protocole

- * A 1ml d'échantillon, on ajoute 1 ml de H_2SO_4 N/12 puis 2 ml de R III. Après avoir bien mélangé, on porte au bain-marie à 100°C durant 30minutes.
- * On refroidit dans l'eau glacée et extrait aussitôt par 2 ml de butanol
- * Sur l'extrait butanolique centrifugé durant 15 minutes à 10 000 g, une lecture spectrophotométrique est effectuée à 532 nm, dans une cuve de 1 cm de trajet optique contre un blanc "réaction" dans ^elaquel R III est remplacé par R II.

4. Justifications

- 4.1 L'extraction butanolique permet d'écartier l'interférence dans la mesure spectrophotométrique d'une possible opalescence du milieu aqueux.

4.2 La forte concentration du milieu réactionnel en Na_2SO_4 facilite grandement l'extraction butanolique du chromogène et permet d'éviter les émulsions. L'utilisation de la solution thiobarbiturique dans le sulfate de sodium anhydre à saturation au lieu de 0,5 M se traduit par un gain de l'ordre de 30 % dans l'intensité de la coloration.

4.3 C'est au bout de 30 minutes à 100°C que la coloration est maximale. Des incubations de 45 et 60 minutes montrent une diminution de son intensité.

4.4 Dans le butanol 1, le chromogène conserve son maximum d'absorption à 532 nm (fig. IV.2).

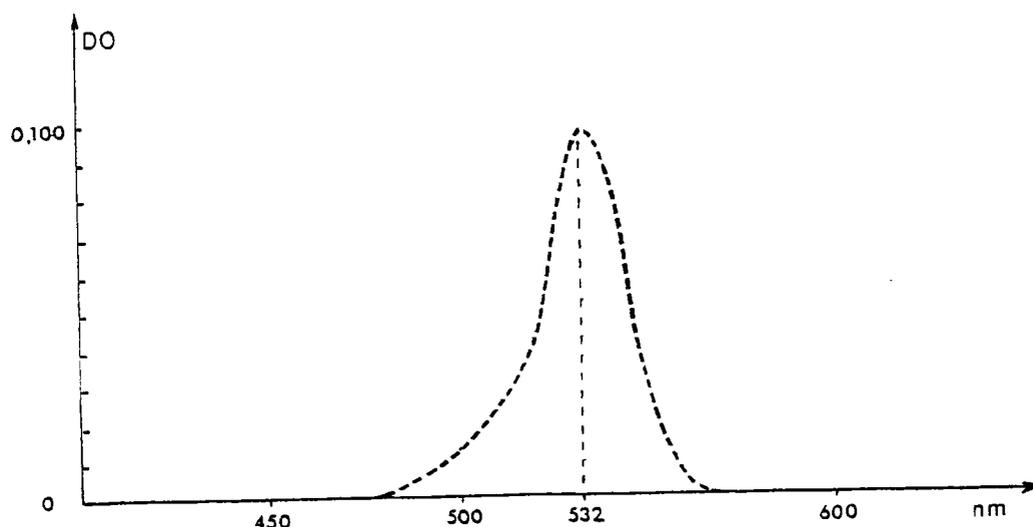


Fig. IV.2

Spectre du chromogène du MDA dans le butanol (1 nMole/ml)

4.5 La stabilité du chromogène dans le butanol est d'au moins 30 minutes après l'extraction.

4.6 Nous avons vérifié que la linéarité est respectée de 0 à 10 nm/ml. Le pourcentage de récupération des surcharges effectuées sur les liquides de lavage est de 97,8 % ($\sigma = 1,4\%$ pour une surcharge de 2 nMole/ml sur 5 échantillons différents).

ajms

4.7 L'étude de la reproductibilité effectuée sur un liquide de lavage se traduit par les résultats :

$$n = 10 \quad m = 1,19 \text{ nm/ml} \quad \sigma = 0,05 \quad CV = 0,045$$

4.8 Nous avons recherché si, dans les conditions du dosage certains oses et leurs dérivés pouvaient interférer. Les solutions à 100 µg/ml d'acide N-acétylneuraminique, glucose, mannose, galactose, fucose, glucosamine, acide glucuronique fournissent une très faible coloration correspondant respectivement à 0,35 – 0,25 – 0,51 – 0,40 – 0,31 – 0,44 et 0,47 nMole/ml de MDA.

Il apparaît que les oses et leurs dérivés dont les concentrations dans les liquides de lavage sont beaucoup plus faibles ne sont pas interférants d'autant que le milieu peu acide n'est pas favorable à leur libération des structures dans lesquelles ils sont engagées.

PROTEINES ET DERIVES

A/ PROTEINES TOTALES

A - I Lowry

A - II Violet sulfo

B/ ALBUMINE ET IMMUNOGLOBULINES PAR IMMUNONEPHELEMETRIE
LASER

C/ HYDROXYPROLINE

A. – DOSAGE DES PROTEINES TOTALES

La détermination des faibles concentrations protéiques rencontrées dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire devrait impliquer l'utilisation de méthodes à la fois sensibles et spécifiques.

Il faut malheureusement reconnaître que celles qui sont les plus spécifiques (opacimétrie par précipitation sulfo-salicylique ou trichloracétique, colorimétrie par la réaction du biuret) sont peu précises dans la zone des concentrations observées. Inversement, celles qui sont les plus sensibles (spectrocolorimétrie directe dans l'ultra-violet lointain) peuvent être l'objet de nombreuses interférences.

Les méthodes spectrophotométriques directes, particulièrement sensibles, sont basées sur les caractéristiques spectrales des protéines dans l'ultraviolet lointain (WADDELL et HILL, 1956 – KALB et BERNLOHR, 1977). Elles reposent sur le fait que les liaisons peptidiques sont responsables de l'augmentation très importante du coefficient d'absorption des protéines entre 240 et 220 nm et de son maximum à 190 nm (GOLDFARB, SAIDEL et MOSOVICH, 1951).

Mais nous avons été obligés de rejeter ce type de technique du fait de l'utilisation, dans le cas des lavages pratiqués chez l'homme, d'anesthésiques locaux instillés en plus ou moins grande quantité pour faciliter la mise en place et le maintien du fibrobronchoscope.

La solution de xylocaïne à 2 % qui est très largement utilisée, présente une très forte absorption dans l'ultraviolet lointain qui est encore très importante même après une dilution au 1/500 (fig. IV.3).

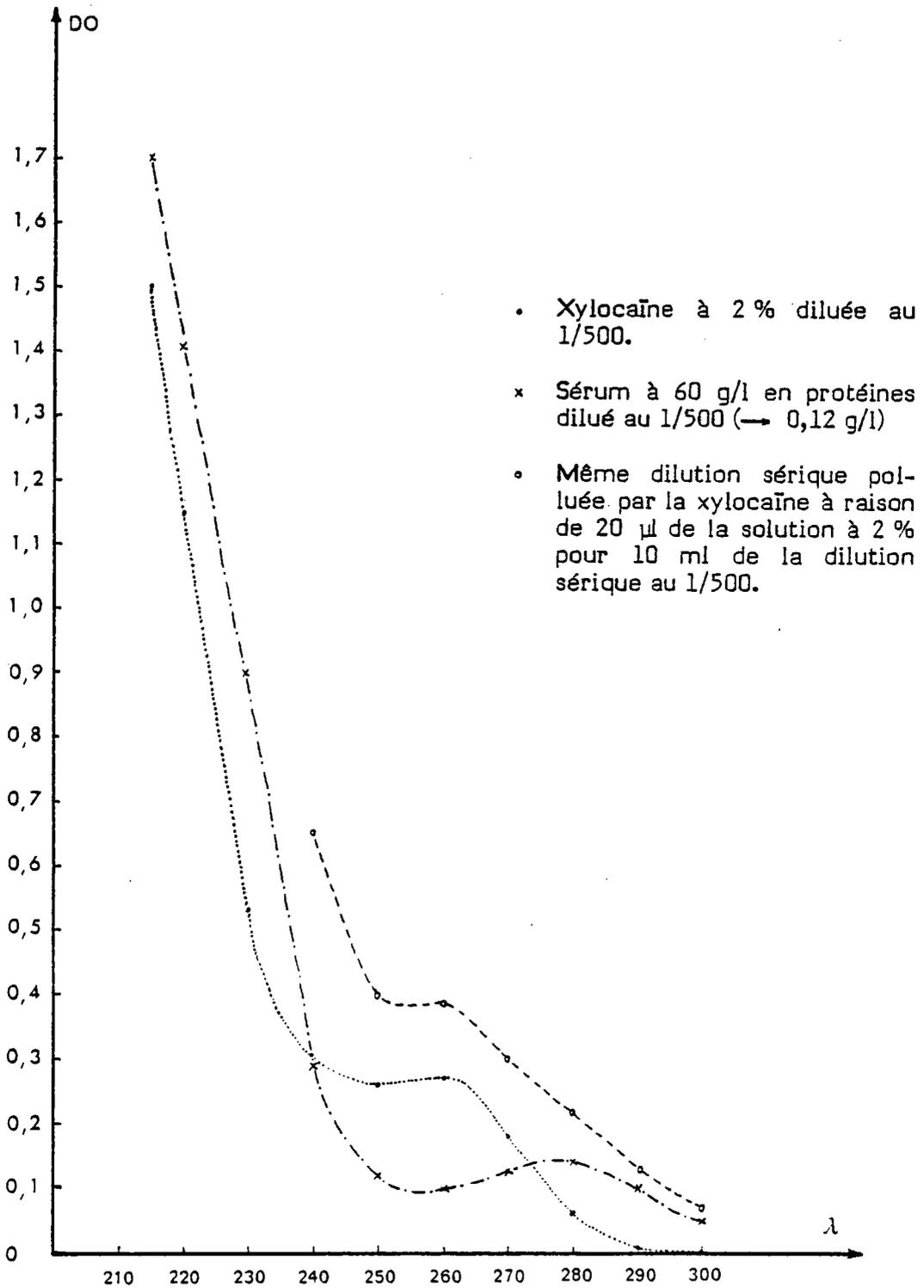


Fig. IV.3

Spectre ultraviolet d'une dilution au 1/500 de la xylocaïne à 2 % et d'un sérum à 60 g/l en protéines pollué ou non par la xylocaïne

Bien que le liquide recueilli après la première instillation soit rejeté, une pollution par la xylocaïne est encore observée au niveau des recueils suivants et ce, d'autant plus si, au cours de l'épreuve, des instillations supplémentaires de cet anesthésique ont été nécessaires.

	1	2	3	4	5	6
UV WADDELL et coll. (1956) (DO 215 nm – 225 nm)	0,63	1,24	0,89	0,83	0,49	0,32
LOWRY et coll. (1951)	0,22	0,17	0,21	0,12	0,10	0,17

Tableau IV.1

**Mise en évidence d'erreurs par excès dans le dosage des protéines
par spectrophotométrie ultraviolette (expression en g/l)**

La présence de xylocaïne dans les liquides de lavage s'objective par l'aspect caractéristique de leurs spectres UV (entre 240 et 290 nm) qui ne présentent plus de minimum d'absorption à 260 nm (fig. IV.3). Dans cette situation, le rapport des absorbances 260 nm/290 nm est supérieur à 1,20.

A. - I METHODE DE LOWRY

1. Principe

La réaction entre ions cuivriques et liaisons peptidiques est associée à la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu par les hydroxyles tyrosiniques et les thiols cystéiniques des protéines (LOWRY, ROSEBROUGH, FARR et RANDALL, 1951).

2. Réactifs

R I Solution de Na_2CO_3 anhydre à 2 % dans OH Na 0,1 N

R II Solution cupro-tartrique

CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,50 g
Tartrate double Na K 4 H ₂ O	1,34 g
Eau distillée qsp	100 ml

R III Mélange extemporané de 1 volume de R II à 50 volumes de R I.

R IV Réactif des phénols de Folin-Ciocalteu dilué au demi dans l'eau distillée.

R V Solutions protéiques d'étalonnage.

Solutions d'albumine bovine cristallisée à 0,40 g/l – 0,20 g/l et 0,10 g/l dans du soluté salé isotonique (NaCl 9 g ‰).

3. Protocole

Liquide de lavage (ou dilution appropriée)	0,4 ml
Etalons	
R III	2 ml

Laisser 10 minutes à la température ambiante, puis ajouter 0,2 ml de R IV.

Effectuer au bout de 30 minutes à température ambiante, une lecture spectrophotométrique à 700 nm en cuve de 1 cm de trajet optique contre un blanc "réactifs".

4. Observations

- 4.1 Dans le cas d'échantillons légèrement opalescents, il est préférable d'effectuer la lecture spectrophotométrique à 500 nm contre un blanc "réaction" dans lequel R III et R IV sont remplacés par 2,2 ml de R I.
- 4.2 Cette méthode – 100 fois plus sensible que la réaction du biuret – n'est pas à l'abri d'erreurs par excès (de l'ordre de 0,05 à 0,15 g/l) observées lorsque des quantités importantes de xylocaïne sont instillées et que les volumes recueillis sont faibles. Ces erreurs, visualisées par la méthode au violet sulfo, résultent de la présence d'un agent de conservation phénolique (le parahydroxybenzoate de méthyle) qui est à la concentration de 0,1 g % dans la solution de xylocaïne. La dilution aqueuse au 1/10 de la solution de xylocaïne à 2 % développe au Lowry une coloration équivalente à 0,15 g/l de protéines.

A. – II METHODE AU VIOLET SULFO

Les faibles volumes liquidiens recueillis lors des lavages pratiqués chez les souris nous ont incité à mettre au point une ultramicrométhode permettant la détermination des faibles concentrations protéiques contenues dans ces milieux.

1. Principe

Les protéines fixées sur un support cellulosique sont colorées par le violet sulfo puis éluées par une solution détergente dont on mesure l'absorption à 600 nm.

2. Réactifs

R I Réactif de coloration

Solution de violet sulfo (RAL) à 5 g ‰ dans l'acide acétique à 200 ml ‰ dans l'eau distillée.

R II Réactif de décoloration du support

Solution aqueuse d'acide acétique à 200 ml ‰.

R III Réactif d'éluion

Solution de bromure de cétyl-triméthyl-ammonium dans R II.

R IV Solutions d'étalonnage

Solutions d'albumine bovine cristallisée à 0,10 – 0,30 et 0,6 g/l dans du soluté salé isotonique (Na Cl 9 g ‰).

3. Protocole

Après fixation par la chaleur (5 minutes à 100°C) des protéines de la prise d'essai (50 µl) sur une feuille de papier pour chromatographie (Schleicher et Schull, réf. 2043 B) la tache protéique est colorée par immersion de la feuille, 5 minutes à température ambiante, dans le réactif de coloration (R I). Le support est décoloré dans l'eau acétique à 200 ml ‰, épongé entre deux doubles de papier filtre puis séché à 37°C.

Le découpage des taches, échantillons et étalons, leur élution dans 2,5 ml de réactif d'élution (R III) et la lecture de la D.O. des éluats à 600 nm, en cuves de 1 cm de trajet optique, contre le réactif d'élution, permet une détermination quantitative.

4. Justifications

4.1 Nous avons choisi le violet sulfo pour la sensibilité qu'il permettait d'obtenir au niveau du dosage et pour sa facilité d'élimination du support cellulosique par l'eau acétique.

4.2 La fixation du colorant sur les protéines est rapide. Nous avons vérifié que des temps de coloration supérieurs à 5 minutes n'améliorent pas la sensibilité de la technique. Le colorant dilué dans le liquide d'élution en présence ou non de protéines, présente un maximum d'absorption à 600 nm, ce qui atteste l'absence d'un "effet albumine". La coloration des éluats est stable pendant au moins 12 heures.

Son intensité est proportionnelle aux concentrations protéiques jusqu'à 0,60 g/l au moins. Pour une concentration de 0,10 g/l (soit 5 µg de protéines sous 2,5 ml), la D.O. de l'éluat est de l'ordre de 0,100. Ceci permet au mieux de visualiser des concentrations de l'ordre de 0,02 g/l, voire de 0,01 g/l. Ainsi, ce protocole s'avère plus sensible que celui de LOWRY d'environ 3 à 4 fois.

4.3 Nous avons observé que la xylocaïne n'interférait pas. Le colorant qu'elle fixe est totalement éliminé au cours de l'étape de décoloration du support par l'eau acétique à 200 ml %.

B. – DOSAGE DE L'ALBUMINE ET DES IMMUNOGLOBULINES (Ig G, Ig A et Ig M) PAR IMMUNONEPHELEMETRIE LASER

1. Principe

1.1 D'une manière générale, le dosage spécifique des protéines par immunonéphé-
lémétrie repose sur des mesures soit de **lumière transmise** (néphélémétrie
d'absorption ou turbidimétrie) soit de **lumière diffusée** (néphélémétrie de
diffusion) réalisées sur les suspensions de complexes immuns formés en
présence d'un excès d'anticorps monospécifiques. Les dosages spécifiques
d'Albumine, d'Ig G, d'Ig A et d'Ig M ont été effectués par **néphélémétrie de
diffusion** en utilisant comme **lumière incidente un rayon laser** (DEATON,
MAXWELL, SMITH et coll., 1976 – SIEBER et GROSS, 1976) émis par le laser
gaz néphélémètre Behring ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$).

ondes électromagnétiques

1.2 Le faisceau laser constitué de vibrations lumineuses simultanées, en phase et
ayant même fréquence est dit **cohérent**. Il s'agit d'un rayonnement pouvant
être considéré comme **monochromatique**. Les ondes élémentaires de la source
se superposent pour donner des rayons parfaitement parallèles. Le faisceau
laser est beaucoup moins diffracté par un orifice percé dans un écran, qu'un
faisceau de lumière naturelle, ainsi peut-on obtenir des faisceaux peu
divergents et de très faible diamètre.

1.3 La dispersion du faisceau incident au contact des particules d'immuns
complexes est fonction de leur taille et de la longueur d'onde de ce faisceau.
La répartition de l'intensité de la lumière dispersée se fait selon des figures
caractéristiques qui varient suivant que le diamètre des particules est
inférieur (**dispersion Rayleigh**) ou supérieur (**dispersion Mie**) à la longueur
d'onde (fig. IV.4). Dans une certaine zone de concentrations en particules
**l'intensité de la lumière dispersée représente la somme des intensités de
dispersion pour chaque particule.**

Dans les conditions opératoires, la dispersion Mie est particulièrement adaptée à l'immunoanalyse, la taille des complexes immuns étant supérieure à la longueur du faisceau incident utilisé ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$).

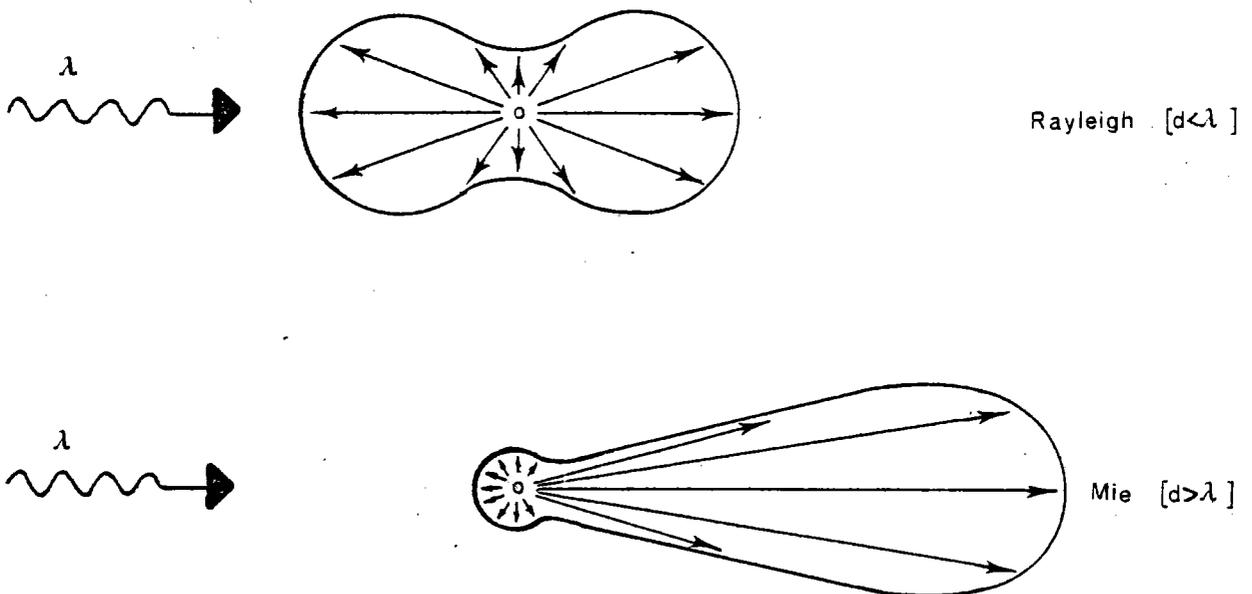


Fig. IV.4

Distribution de l'intensité de la lumière dispersée
en fonction de la longueur d'onde et du diamètre des particules

(la longueur de chaque flèche est proportionnelle à l'intensité
de la dispersion lumineuse dans cette direction)

1.4 Le faisceau laser étant d'une très grande stabilité, la validité de cette méthode dépend essentiellement de la bonne reproductibilité des caractéristiques granulométriques des complexes immuns en fonction du temps. Afin de minimiser la durée du dosage et d'éviter tout début de sédimentation, les mesures de lumière diffusée sont effectuées au bout de 30 minutes.

Comme il ne s'agit pas d'une mesure au "point final" et que les agrégats d'immun-complexes, en se développant en réseaux, voient leur taille évoluer en fonction du temps, il est nécessaire de respecter rigoureusement ce temps de lecture et de toujours se référer à un étalonnage effectué dans les mêmes conditions.

2. Matériel

2.1 Laser néphélémètre Behring

* Le laser néphélémètre Behring utilise le principe des lasers-gaz. Le tube générateur du rayon laser contient un mélange gazeux hélium-néon à basse pression. Deux électrodes, alimentées par un courant alternatif stabilisé, créent une décharge électrique à l'intérieur du tube laser. La source d'énergie initiale est donc l'accélération des électrons par le champ électrique développé entre les électrodes. Sous l'impact des électrons, les atomes d'hélium parviennent à un niveau énergétique métastable.

Les atomes d'hélium excités transmettent leur énergie à des atomes de néon qui atteignent alors différents niveaux énergétiques métastables. Le retour à l'état initial entraîne l'émission d'une lumière monochromatique ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) d'une puissance de 4,5 mW.

* Le rayon laser émis est collimaté par deux diaphragmes avant de traverser la semi-microcuve où s'est développée la réaction antigène-anticorps.

Le rayon direct est capté par un piège à lumière. En effet, cette lumière directe (angle de dispersion 0°) n'est pas mesurable, car la lumière d'excitation résiduelle se superpose à elle.

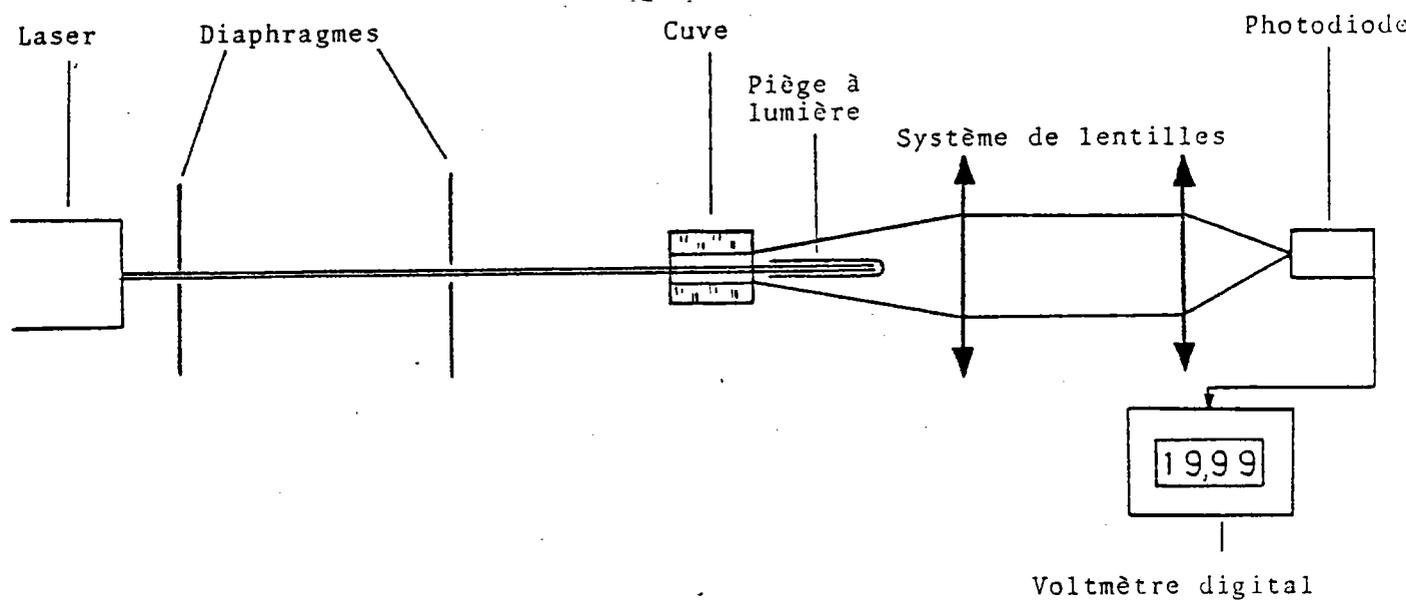


Fig. IV.5

Laser néphélémètre Behring

Le cône de lumière dispersée est focalisé par un couple de lentilles sur une photodiode (fig. IV.5).

Le signal électrique de ce photodétecteur, directement proportionnel à l'énergie du cône de lumière dispersée est mesuré par un voltmètre digital qui fonctionne pour des valeurs allant de 0 à 19,99 volts.

2.2 Cuves de lecture

Les lectures sont réalisées dans des cuves plastiques à usage unique spécialement adaptées à la néphélemétrie laser (cuves LN Behring)

3. Réactifs

3.1 Standard protéique LN Behring

Il s'agit d'un pool stabilisé de sérums humains d'adultes sains. Le lot utilisé renfermait 40 g/l d'Albumine, 10,87 g/l d'Ig G, 1,82 g/l d'Ig A et 0,88 g/l d'Ig M.

3.2 Antisérums monospécifiques

Nous utilisons les antisérums monospécifiques LN Behring spécialement mis au point pour l'immuno-néphélemétrie laser.

3.3 Soluté de Na Cl à 9 g %_p

Ce soluté aqueux doit être exempt de particules. Il est filtré avant usage sur filtre Millipore (0,45 μ m). On peut utiliser sans filtration préalable des flacons – ouverts extemporanément – de soluté injectable de chlorure de sodium à 9 g/l.

4. Protocole

4.1 Préparation des liquides de lavage et des antisérums

Les aliquots de liquide de lavage – éventuellement préalablement concentrés – conservés à -20°C sont décongelés et filtrés dans une seringue à laquelle est adapté un support filtre (Millipore Swinnex) pourvu d'un filtre Millipore (Type HAWP, diamètre de pore $0,45\ \mu\text{m}$).

Cette filtration est effectuée sur les dilutions au 1/5 dans le soluté physiologique des antisérums et des liquides de lavage sur lesquels on dose l'albumine.

4.2 Dilution du sérum standard

Elles sont effectuées dans le soluté physiologique et varient en fonction du dosage envisagé.

- * Pour l'albumine, on utilise les dilutions suivantes 1/1600, 1/3200, 1/6400 qui correspondent respectivement pour l'étalon sérique utilisé à 25 mg/l, 12,5 mg/l, 6,25 mg/l.
- * Pour les Ig G, les dilutions au 1/100 (108 mg/l), 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 (6,8 mg/l) sont retenues.
- * Pour les Ig A, on effectue les dilutions au 1/50 (36,4 mg/l), 1/100, 1/200 et 1/400 (4,5 mg/l).
- * Pour les Ig M : 1/50 (17,6 mg/l) 1/100 1/200 (4,4 mg/l)

4.3 Répartition des volumes et conditions de mesure photométrique

Dans une microcuve en plastique, à $100\ \mu\text{l}$ de liquide de lavage ou de dilution du sérum standard, on ajoute $200\ \mu\text{l}$ de la dilution d'antisérum monospécifique. Après une agitation circulaire douce d'environ 30 secondes sur le plan de travail, on laisse reposer 30 minutes puis procède aussitôt à la mesure de la lumière diffusée en évitant toute agitation qui alors perturbe la lecture.

5. Justifications

5.1 Blancs cuve

Ils sont très faibles (de l'ordre de 0,05 V) et très homogènes ($n = 20$, $m = 5,42 \cdot 10^{-2} V$ $\sigma = 0,53 \cdot 10^{-2} V$ $CV = 9,7 \%$). Ils peuvent être négligés dans les calculs des concentrations protéiques.

5.2 Temps de réaction

Avec les réactifs utilisés, le temps de lecture le plus satisfaisant est de 30 minutes. Nous n'avons pas noté de variation de l'intensité lumineuse entre 30 et 35 minutes.

5.3 Excès d'antigènes

Le voltmètre digital s'éteint pour toute valeur supérieure à 19,99 V.

5.4 Diluant

Dans les conditions opératoires, l'addition de polyéthylène glycol est sans intérêt.

5.5 Reproductibilité en série (n = 20)

Albumine	$m = 36,0 \text{ mg/l}$	$\sigma = 1,6$	$CV = 4,4 \%$
Ig G	$m = 8,8 \text{ mg/l}$	$\sigma = 0,47$	$CV = 5,3 \%$
Ig A	$m = 5,2 \text{ mg/l}$	$\sigma = 0,34$	$CV = 6,5 \%$
Ig M	$m = 3,2 \text{ mg/l}$	$\sigma = 0,22$	$CV = 6,9 \%$

5.6 Conservation des protéines par congélation à - 20°C

Les protéines des surnageants de centrifugation des liquides de lavage alvéolaires se conservent parfaitement au moins 30 jours à - 20°C.

	Albumine	Ig G	Ig A
J	41 - 42 - 40 m = 41	7,5 7,0 7,3 m = 7,2	6,3 6,4 6,5 m = 6,4
J + 30	42 - 40 - 40 m = 40,7	7,4 7,2 7,3 m = 7,3	6,3 6,2 6,5 m = 6,3

Tableau IV.2

INCIDENCE D'UNE CONGELATION D'UN MOIS A - 20°C
DU LIQUIDE DE LAVAGE SUR LE DOSAGE DE L'ALBUMINE DES Ig G ET DES Ig A (mg/l)

C. – RECHERCHE ET DOSAGE DE L'HYDROXY-PROLINE
PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

1. Principe

L'hydroxy-proline, issue de l'hydrolyse des protéines du liquide de lavage, est séparée par un passage sur une colonne cationique. Eluée par un tampon acide (pH 2,85), elle est dosée spectrophotométriquement à 440 nm par un mélange ninhydrine/hydrindantine sous azote.

2. Préparation de l'échantillon

* L'hydrolyse des protéines est effectuée sous vide léger en milieu HCl 6N durant 20 h à 110°C.

Dans une ampoule, on introduit 1 ml de liquide de lavage et 1 ml de HCl concentré 12 N (d = 1,19). On branche sur la trompe à eau durant 3 minutes avant de sceller l'ampoule.

* L'hydrolysate évaporé à sec est repris dans 1 ml de KCl 0,01 N puis centrifugé 10 minutes à 10 000 g.

3. Matériel

* Analyseur d'acides-amino Liquimat III Kontron.

* Colonne chromatographique de 0,4 cm de diamètre lestée avec une résine cationique DC 6 A (hauteur du lit de résine : 29 cm).

4. Réactifs

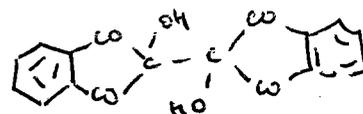
* Tampon d'éluion (pH 2,85)

Citrate de sodium 5,5 H ₂ O	21,4 g
Thiodiglycol	3 ml
Brij. 35	10 ml
OHNa 2 N	25 ml
Complexon III	1 g
Acide caprylique	5 gouttes
Eau distillée qsp	900 ml

Ajuster à pH 2,85 avec HCl concentré et faire qsp 1.000 ml avec eau distillée.

* Réactif de révélation

Ninhydrine	20 g
Hydrindantine	1,5 g
Diméthylsulfoxyde	750 ml
Tampon acétate de lithium 4 M (pH 5,2)	250 ml



5. Conditions opératoires

* Colonne thermostatée à 25°C

Débit tampon d'éluion : 20 ml/heure

Débit réactif de révélation : 10 ml/heure

Lecture spectrophotométrique à 440 nm

Enregistreur au maximum d'amplification.

* Injection de 100 µl d'une solution aqueuse renfermant 950 pico moles d'hydroxy-proline (0,124 µg). Cette solution étalon est préparée par dilution au 1/40 d'une solution mère à 0,38 µMole/ml conservée à - 20°C.

Dans les conditions opératoires indiquées, l'hydroxy-proline sort à la 22ème minute. On injecte 100 ou 200 μ l de la solution HCl 0,01 N de reprise de l'hydrolysat.

- * La quantification s'effectue par mesure de la surface du pic par rapport au standard.
- * La colonne est régénérée par OHNa 0,33 N durant 10 minutes. Sa rééquilibration se fait dans le tampon d'élution durant 30 minutes.

OSSES ET DERIVES

- A/ OSSES NEUTRES TOTAUX
- B/ FUCOSE
- C/ ACIDE SIALIQUE
- D/ ACIDES URONIQUES

A. – DOSAGE DES OSES NEUTRES TOTAUX

1. Principe du dosage

Il s'agit de la réaction à l'orcinol sulfurique. Initialement décrite par TILLMANS et PHILIPPI en 1929 (Biochem J 215 36). Cette réaction est à l'origine de nombreux protocoles (MARSHALL et NEUBERGER, 1972) se différenciant les uns des autres par les concentrations en acide sulfurique et orcinol, la température, le temps de chauffage, la longueur d'onde de la lecture spectrophotométrique.

Les oses neutres en milieu sulfurique à chaud et en présence d'orcinol développent une coloration dont le maximum d'absorption est à 420 nm. Cette réaction résulte de la condensation de l'orcinol avec des dérivés du furfural.

2. Protocole utilisé

Il s'agit d'une adaptation à l'auto-analyseur en flux continu d'un protocole dérivé de celui décrit par FRANCOIS, MARSHALL et NEUBERGER (Biochem J 1962 83 335). La lecture spectrocoulométrique est effectuée à 420 nm au lieu de 505 nm qui est celle proposée par ces auteurs.

* Réactifs

R I Acide sulfurique (Merck Suprapur d 1,84 - art 714) à 60 ml % dans l'eau distillée.

R II Solution aqueuse extemporanée d'Orcinol (dihydroxy 3-5 Toluène mono hydraté Merck - art 7093) à 1,60 g %.

R III Réactif de coloration

Mélanger extemporanément dans la glace, 7,5 volumes de R I avec 1 volume de R II. Au cours du dosage, ce réactif est maintenu à 0°C dans un ultrathermostat Haake NK22.

R IV Etalons

- Solution mère à 500 $\mu\text{g/ml}$ renfermant 250 $\mu\text{g/ml}$ de galactose et de mannose. Cette solution aqueuse est préparée dans de l'eau distillée saturée d'acide benzoïque. Elle est conservée congelée à -20°C .
- Gamme d'étalonnage : elle est préparée extemporanément par dilution de la solution mère au 1/5, 1/10, 1/20 et 1/50 dans de l'eau distillée, ce qui aboutit aux concentrations suivantes 100, 50, 25 et 10 $\mu\text{g/ml}$

* Manifold

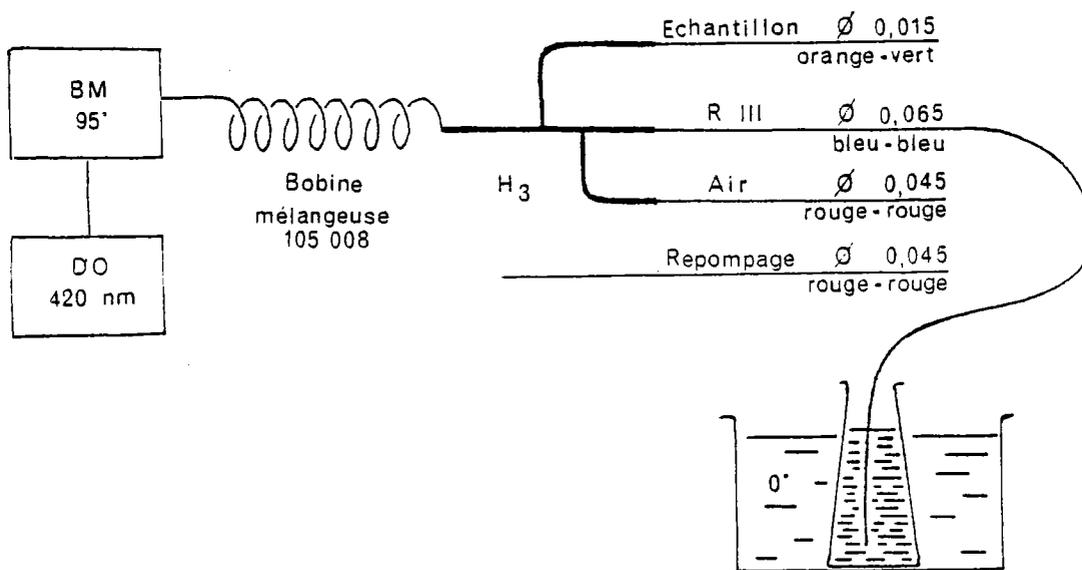


Fig. IV.6

Manifold de dosage des oses neutres totaux

- Les temps de pompage et de rinçage sont respectivement de 25 et 45 secondes, ce qui permet de traiter 50 échantillons par heure. La durée de l'incubation à 95°C est de 15 minutes.

Dans les conditions opératoires décrites, chaque dosage nécessite 40 μ l d'échantillon et 0,65 ml de réactif, les tubes de prélèvement de l'échantillon et du réactif ayant des débits/minute respectivement de 0,1 ml et 1,60 ml.

- . Il est souhaitable d'utiliser des tubes acidflex pour les différentes jonctions. Afin de préserver au maximum les tubes tygon de pompage d'une attaque par l'acide sulfurique à 60 %, pouvant entraîner une pollution du circuit, il est nécessaire en fin de dosage d'effectuer les 2 rinçages successifs suivants de chacun 15 minutes : le premier avec de l'acide sulfurique à 20 %, le deuxième avec de l'eau distillée. Le système analytique est ensuite séché durant 15 minutes par l'air.
- . Au cours du dosage, les échantillons successifs présentant un $\Delta DO \geq 0,30$ sont systématiquement repassés, séparés par un godet d'eau.
- . Les liquides de lavage présentant une concentration d'oses neutres $> 100 \mu\text{g/ml}$ sont dilués dans le soluté salé isotonique.

3. Justifications

3.1 Reproductibilité

Deux liquides de lavage (A et B) ont été l'objet de 10 déterminations successives et ont fourni les résultats suivants :

A : m = 48,0 $\mu\text{g/ml}$ $\sigma = 1,5$ CV = 0,031

B : m = 7,5 $\mu\text{g/ml}$ $\sigma = 0,5$ CV = 0,066

Il faut souligner l'intérêt de l'automatisation dans ce type de protocole où la viscosité de la solution sulfurique à 60 % obère la reproductibilité des méthodes manuelles.

autre
VQ

3.2 Spécificité

- * Les osamines (glucosamine, galactosamine) et l'acide sialique ne développent pas de coloration (concentrations testées 50 et 100 $\mu\text{g/ml}$).
- * A partir de solutions à 50 $\mu\text{g/ml}$ de mannose, galactose, fucose, glucose anhydres et de glucuronate de sodium monohydraté, on observe que les rapports de coloration sont respectivement : 1,18, 1,06, 1,06, 1 et 0,40. Il apparaît donc que les chromogènes des différents oses neutres testés présentent des coefficients d'absorption molaire très voisins (écart maximum 0,18).

Ce faible écart maximum a justifié l'adoption de la lecture spectrophotométrique à 420 nm. En effet, à 505 nm, FRANCOIS et coll. indiquent un écart maximum plus important d'environ 2 fois (0,30). Bien que non signalée dans la littérature, l'interférence de l'acide glucuronique mérite d'être soulignée. Il n'empêche qu'au niveau des liquides de lavage, cette interférence n'est pas préoccupante.

- * Nous recherchons systématiquement la présence de glucose libre au niveau de chaque échantillon de liquide de lavage à l'aide d'une bandelette imprégnée de glucose-oxydase, de peroxydase et d'ortholidine ("Clinistix" Ames). Nous apprécions semi-quantitativement l'éventuelle présence de glucose en comparant la couleur développée au bout d'une minute à celle obtenue avec une solution de glucose à 50 $\mu\text{g/ml}$. Ainsi, peut-on grossièrement corriger la valeur fournie par l'orcinol en présence de traces de glucose de l'ordre de 0,05 g %.

Normalement, par ce protocole, le glucose est absent des liquides de lavage.

Handwritten notes:
 10/10/70
 C. M.

B. – DOSAGE DU FUCOSE

Le dosage du fucose est effectué selon le protocole de DISCHE et SHETTLES (1948), de préférence sur le liquide de lavage préalablement concentré de 5 à 10 fois.

1. Réactifs

R I Réactif sulfurique

H_2SO_4 Suprapur Merck (d 1,84) 6 vol.

Eau distillée 1 vol.

R II Solution aqueuse extemporanée de Chl de cystéine à 3 g %.

R III Solutions d'étalonnage

Elles sont préparées à partir d'une solution mère de fucose à 100 $\mu\text{g/ml}$ dans l'eau distillée saturée d'Ac. benzoïque, conservée à -20°C . Les dilutions extemporanées au 1/20, 1/10 et 1/5 dans l'eau distillée fournissent les points de gamme à 5, 10 et 20 $\mu\text{g/ml}$.

2. Protocole

- * En refroidissant dans la glace, on ajoute à 1 ml de liquide de lavage préalablement concentré 4,5 ml de réactif sulfurique (R I).
- * On porte au bain-marie à 100°C durant 10 minutes exactement.
- * On refroidit dans la glace et ajoute 0,1 ml de solution de Chl de cystéine (R II).
- * Après un repos de 90 minutes à l'obscurité, on procède à une double lecture spectrophotométrique (396 nm et 430 nm) du blanc réactif, des étalons et des échantillons en cuve de 1 cm de trajet optique.

Pour la détermination de la concentration de fucose, on retient la différence : (D.O. corrigée) = (DO 396 réaction – DO 430 réaction).

Pour l'étalon à 5 $\mu\text{g/ml}$, la DO corrigée est d'environ 0,010.

C. – DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE

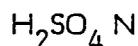
Le dosage de l'acide sialique (Acide N-acétyl et N-glycolyl-neuraminique) est effectué selon le protocole de Warren (1959) sur les liquides de lavage préalablement concentrés de 5 à 10 fois.

1. Principe

L'acide sialique, libéré par une hydrolyse acide, est oxydé par l'acide périodique. L'Acide β -formyl-pyruvique, formé au cours de cette oxydation, est condensé avec l'acide thiobarbiturique en un chromogène rose qui, après passage dans la cyclohexanone, fait l'objet d'une mesure spectrophotométrique à 549 nm.

2. Réactifs

R I Réactif de libération de l'Ac. Sialique



R II Solution oxydante

Meta-periodate de sodium 0,2 M dans l'acide phosphorique 9 N

R III Solution réductrice

Arsenite de sodium à 10 % dans une solution aqueuse 0,5 M en sulfate de sodium et 0,1 en H_2SO_4

R IV Réactif de coloration

Acide thiobarbiturique à 0,6 % dans une solution aqueuse de sulfate de sodium 0,5 M

R V Solutions d'étalonnage

- . solution mère d'acide N-acétyl-neuraminique à 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ conservée à -20°C .
- . Par dilution extemporanée de la solution-mère au 1/50, 1/20 et au 1/10 dans l'eau distillée, on obtient les points de gamme suivants 2, 5 et 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

R VI Cyclohexanone.

2. Protocole

- * A 1 ml de liquide de lavage préalablement concentré de 5 à 10 fois, on ajoute 0,1 ml de H_2SO_4 N (R I). On porte 1 heure au bain-marie à 80°C.
- * Après refroidissement, on ajoute 0,2 ml de solution oxydante (R II) et incube 30 minutes à 37°C.
- * L'excès de solution oxydante est éliminé par l'addition de 1 ml de solution réductrice (R III). Agiter jusqu'à disparition de la coloration jaune apparue au début de l'adjonction de ce réactif.
- * Introduire 3 ml de solution d'acide thiobarbiturique (R IV) et incuber 15 minutes à 100°C.
- * Après refroidissement, le chromogène est extrait par 3 ml de cyclohexanone. Centrifuger 5 minutes à 3.000 g puis faire une lecture spectrocoulométrique à 549 nm en cuve de 1 cm de trajet optique.
- * Le blanc réactif et les étalons sont traités de la même façon.

D. – DOSAGE DES ACIDES URONIQUES

Pour le dosage des acides uroniques totaux, nous avons adopté la technique de BLUMENKRANTZ et ASBOE-HANSEN (1973). Nous opérons à partir de liquides de lavage préalablement concentrés d'environ 5 fois.

1. Principe

Les acides uroniques libérés à chaud en milieu sulfurique concentré se combinent à froid au méta-phenyl-phenol en formant un chromogène présentant un maximum d'absorption à 520 nm.

2. Réactifs

R I Solution 0,0125 M de tétraborate de sodium dans l'acide sulfurique concentré.

R II Meta-Phenyl-Phenol à 0,15 g % dans une solution aqueuse de OHNa à 0,5 %. Conservation 1 mois à l'obscurité à + 4°C.

R III Solutions d'étalonnage :

* Solution mère de glucuronate de sodium mono-hydraté à 12 mg % dans l'eau distillée. Conservation à -20°C. Cette solution correspond à 100 µg/ml d'acide glucuronique.

* Par dilution extemporanée au 1/20, 1/10 et 1/5 de la solution mère dans l'eau distillée, on obtient les étalons à 5, 10 et 20 µg/ml.

3. Protocole

* A 0,4 ml d'échantillon on ajoute en refroidissant dans la glace 2,4 ml de réactif tetraboro-sulfurique (R I). On agite au Vortex et place 5 minutes à 100°C.

Après refroidissement dans l'eau glacée, on introduit 40 μ l de la solution de méta-phényl-phénol (R II). On agite et effectue dans un délai de 5 minutes une lecture spectrophotométrique à 520 nm.

- * Dans les blancs "réaction" on n'introduit pas le méta-phényl-phénol. Lus contre un blanc "réactif", sans méta-phényl-phénol, ils permettent d'obtenir la DO blanc. Les tubes de réaction sont lus contre un blanc réactif comportant le méta-phényl-phénol, ce qui permet d'obtenir la DO réaction.



- V -

JUSTIFICATION DU CHOIX, DANS LES
LIQUIDES DE LAVAGE BRONCHO-AL-
VEOLAIRE DES PARAMETRES CHIMI-
QUES LES PLUS APTES A RENDRE
COMPTE DE L'ETAT DE LA BARRIERE
ALVEOLO-CAPILLAIRE

L'exploration biochimique des liquides de lavage broncho-alvéolaire est d'un grand intérêt dans la mesure où elle fournit un "instantané" fiable et sensible de l'état de la barrière alvéolo-capillaire. Ce but peut, nous semble-t-il, être atteint par le choix d'un nombre restreint de paramètres facilement dosables pouvant même prétendre à la mise en évidence **d'un stade infraclinique lors de certaines agressions chroniques** comme nous l'avons observé dans le tabagisme. Le bilan que nous proposons – rapport des concentrations en lécithines et protéines, dosage de l'albumine, des Ig G, des Ig A et de K^+ – semble devoir répondre aux objectifs fixés.

A. – RAPPORT DES CONCENTRATIONS EN LECITHINES ET PROTEINES

(L/P)

Des considérations biocliniques nous ont incité à privilégier le rapport L/P compte tenu d'observations que nous avons faites en pathologie interstitielle diffuse (PRE, BLADIER, GEORGES et coll., 1979) mais aussi du fait que tout accroissement de la teneur en protéines du surfactant entraîne une baisse de ses propriétés tensioactives (BALIS, SHELLEY, Mc CUE et coll., 1971 – COLACICCO et BASU, 1978).

1. Il est remarquable d'observer que l'installation d'une **fibrose pulmonaire interstitielle diffuse** (FID) n'est pas le fait exclusif de maladies pulmonaires telles que les collagenoses ou la sarcoïdose. Les agressions pulmonaires, qu'elles soient d'origine exogène (inhalations d'aéro-contaminants) ou endogène (ingestion de composés toxiques, effets secondaires indésirables de médicaments utilisés au long cours) peuvent aussi être à l'origine de FID qui sont des maladies de la paroi alvéolaire et de l'interstitium pulmonaire au niveau desquels se développent des altérations exsudatives d'évolution plus ou moins fibrogène. Au cours de ces agressions, en fonction des observations cliniques, il convient d'opposer deux tableaux, l'un aigu, l'autre chronique.

- 1.1 Le **tableau aigu** correspondant à une fibrose foudroyante, évoluant vers la mort dans un tableau de cyanose, s'observe au cours d'intoxications très diverses :

- 1.1-1 **Inhalations massives de vapeur ou de gaz** comme par exemple :

* **L'oxygène** (BOWDEN et ADAMSON, 1971 – COALSON, BELLER et GREENFIELD, 1971 – CLARK et LAMBERTSEN, 1971).

* **Le chlore** (KOWITZ, REBA, PARKER et coll., 1967 – WEILL, GEORGE, SCHWARTZ et coll., 1969)

* **Le tétrachlorure de carbone** (GOULD et SMUCKLER, 1971)

1.1-2 Ingestion d'un herbicide, tel le paraquat (dérivé diméthylé du bipyridylum) qui apporte la preuve qu'un produit absorbé per os peut provoquer une atteinte élective de type fibrosant du parenchyme pulmonaire (VIJEYARATNAM et CORBIN, 1971 – FISHER, CLEMENTS et WRIGHT, 1973 – ROUJEAU, NOGUES et LECLERC, 1974).

1.2 Le tableau chronique se caractérise par une phase d'installation très souvent muette sur le plan clinique et dont l'évolution vers la fibrose est parfois très lente (quelques mois à plusieurs années).

1.2-1 Certains médicaments possèdent cette action fibrosante pulmonaire ; c'est le cas :

* **du busulphan** (dimethane sulfonyl oxybutane), antimétabolite utilisé dans le traitement des leucémies myéloïdes chroniques (OLINER, SCHWARTZ et RUBIO, 1961 – LEAKE et SMITH, 1963 – BOYLES, 1969 – KIRSCHNER et ESTERLY, 1971).

* **du méthylsergide** (Desernil) : antimigraineux antagoniste puissant de la sérotonine (HINDLE, POSNER, SWEETNAM et coll., 1970)

* **la bléomycine** (FLEISCHMAN, BAKER, THOMPSON et coll., 1971 – McCULLOUGH, COLLINS, JOHANSON et coll., 1978 – SNIDER, CELLI, GOLDSTEIN et coll., 1978) utilisé dans le traitement des épithéliomas malpighiens.

* **de la cyclophosphamide** (Endoxan) (TOPILOW TOTHEMBRY et COTRELL, 1973) qui est un antinéoplasique.

1.2-2 Certains polluants gazeux atmosphériques sont aussi à l'origine de processus fibrinogènes. C'est le cas notamment des **vapeurs de pétrole** dont l'action sur l'alvéole a récemment été étudiée (LYKKE, STEWART, O'CONNELL et coll., 1979).

1.2-3 L'inhalation permanente de certaines particules minérales peut aboutir au développement d'une fibrose interstitielle diffuse. C'est ainsi que l'**asbestose** apparaît comme la pneumoconiose de beaucoup la plus sclérogène (WONG, BARRY, STONE et coll., 1979), la silicose et la beryllose l'étant à un degré moindre.

1.2-4 Certaines poussières organiques végétales (actinomycètes) et animales (antigènes aviaires) ont au niveau du poumon profond, une action fibrinogène très marquée.

2. Mécanisme d'installation des fibroses interstitielles diffuses (FID)

2.1 L'**étape initiale** consiste en l'apparition d'un œdème de **type lésionnel** (EVEN, CANBARRERE, DUROUX et coll., 1973) ainsi qu'en témoigne l'absence de cardiopathie et la richesse en protides du liquide recueilli par aspiration trachéale (HARARI, LEMAIRE, VOLTER et coll., 1974). Pour cet œdème exsudatif, on évoque une **augmentation de la perméabilité capillaire** avec ou sans altération de l'endothélium ainsi qu'une **destruction** plus ou moins étendue des **minces et fragiles prolongements cytoplasmiques** des **pneumocytes de type I**. Dans l'intoxication par l'oxygène, ce serait l'endothélium vasculaire qui serait lésé en premier alors que dans celle au paraquat, ou aux vapeurs de mercure, il semblerait que ce soit l'épithélium alvéolaire.

* Au cours des intoxications aiguës, dans la mesure où les membranes basales sont intactes, les capacités de réparation sont très importantes. Par contre, il n'en est plus de même lorsque de nombreux capillaires ont été détruits.

L'œdème initial évolue de façon très variable vers la fibrose. Au cours d'agressions particulièrement insidieuses, c'est la constatation tardive d'une fibrose déjà bien installée qui permet d'affirmer l'existence antérieure d'un stade initial exsudatif non perçu cliniquement (HOMASSON, BOISSINOT, ROUILLER et coll., 1974).

2.2 Lorsque la fraction aqueuse de l'exsudat réintègre les capillaires interstitiels un abondant **amas fibrineux** enserrant des **cellules nécrotiques** reste dans l'alvéole, donnant des **aspects de membranes hyalines** plaquées sur la basale épithéliale mise à nu lors de la lésion. L'absence de destruction de ce matériel fibrineux serait à l'origine de l'évolution fibrogène.

On observe simultanément une infiltration massive des parois alvéolaires essentiellement par des macrophages et des lymphocytes, et une induction importante de la synthèse des fibres de collagène et d'élastine (STARCHER, KUHN et OVERTON, 1978). A la surface de l'alvéole, on assiste à une prolifération de grandes cellules atypiques s'incorporant aux membranes hyalines. Il apparaît donc que l'épaississement de la **barrière alvéolaire** provient non seulement des **phénomènes septaux** (fibromyomatose des cloisons alvéolaires) mais aussi de la **réorganisation concomitante** de la **surface alvéolaire** (processus métaplasiques épithéliaux).

2.3 Au cours de la phase terminale de cette évolution, les cellules du revêtement épithélial dédifférencié n'assurent plus que la formation d'un surfactant plus ou moins réduit dont l'inactivation serait liée à l'exsudation plasmatique primitive (LEVITSKY, ANNABLE, PARK et coll., 1971) et peut être, pour une plus large part à son incorporation dans les membranes hyalines (BALIS, SHELLEY, Mc CUE, 1971). Cette situation tragique aboutit à une diminution plus ou moins importante de l'élasticité pulmonaire, des échanges gazeux et de la capacité fonctionnelle résiduelle (HOPEWELL et MURRAY, 1976 – MURRAY et HOPEWELL, 1977).

3. De ce rappel pathologique, il ressort que, malgré leur diversité d'origine les FID présentent les mêmes aspects cliniques radiologiques et fonctionnels respiratoires. Au niveau du film liquidien alvéolaire, on assiste à une augmentation plus ou moins importante du taux des protéines liée au processus exsudatif, entraînant une diminution du rapport L/P, le taux des lécithines n'étant le plus souvent que légèrement diminué. Nous pensons que ce **rapport** peut être un **témoin de l'état de la barrière alvéolo-capillaire à un moment donné**. Il permet de visualiser un processus exsudatif discret pouvant être **cliniquement et radiologiquement muet**, ce qui est d'un **grand intérêt en pathologie de l'environnement ou l'agression est très souvent insidieuse**.

La validité, du choix de ce rapport – en tant qu'élément essentiel de l'exploration des liquides de lavage broncho-alvéolaire – nous est apparue lors d'une étude effectuée chez dix patients atteints de pneumopathies interstitielles diffuses montrant l'existence d'une corrélation ($r = 0,77$ $p < 0,01$) entre le **rapport L/P** et la **capacité de transfert alvéolo-capillaire du CO** (T_{CO}) exprimé en % de la valeur normale établie en fonction de l'âge, de la taille et du sexe. La mesure de ce paramètre fonctionnel respiratoire (T_{CO}) est basée sur la disparition du CO alvéolaire décrite par l'équation de Krogh (1914). Après expiration complète, le sujet inhale sa capacité vitale d'une dilution de CO à 0,2 % dans l'air, puis se met en apnée pendant 10 secondes. On détermine ensuite, dans l'air expiré la concentration résiduelle en CO ce qui permet d'apprécier la diffusion alvéolo-capillaire du CO (OGILVIE, FORSTER, BLAKEMORE et coll., 1957). Cette épreuve d'exploration de la fonction respiratoire permet la mise en évidence d'un déficit des échanges gazeux

- soit par épaissement anormal de la barrière alvéolo-capillaire comme c'est le cas lors de la phase œdémateuse exsudative,
- soit par différenciation de structure lors du processus fibrogène.

L'interprétation du rapport L/P appelle quelques remarques. La représentativité et la reproductibilité du protocole de lavage étant satisfaisantes, nous pensons que dans la quasi totalité des cas, il convient aussi d'interpréter individuellement les concentrations de protéines et plus particulièrement de lécithines. En effet, dans certaines situations, l'existence d'un rapport normal ne doit pas faire éliminer pour autant l'existence d'un processus pathologique : les pneumocytes de type II, étant reconnus comme le point de départ de la régénération épithéliale alvéolaire (STEPHENS, SLOAN et EVANS, 1973), peuvent être à l'origine d'une augmentation du taux des lécithines compensant plus ou moins celle du taux des protéines.

pour ce faire il faudrait être sûr de leur
exactitude et de ce que cela représente.
Exactement -

B. - DOSAGE DE L'ALBUMINE ET DES IMMUNOGLOBULINES G ET A

1. La présence d'**albumine** – protéine non synthétisée par l'alvéole – dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire de sujets normaux (REYNOLDS et NEWBALL, 1974) témoigne d'un passage des protéines du secteur vasculaire vers l'alvéole qui se ferait exclusivement par pinocytose (BIGNON, JAURAND, PINCHON et coll., 1976). Lors des agressions alvéolo-capillaires, l'augmentation de sa concentration dans les liquides de lavage, reflète l'importance de l'œdème exsudatif. Dans cette situation pathologique, sa filtration accrue dans l'alvéole et celle beaucoup moins importante des globulines seraient liées essentiellement à un élargissement des pores inter endothéliaux et non pas à une exacerbation de la pinocytose.
2. Le dosage des Ig G et des Ig A fournit une précieuse indication sur le niveau d'adaptation des défenses immunitaires locales. Rappelons que dans les conditions physiologiques normales, **au niveau de l'alvéole, les immunoglobulines prédominantes sont les Ig G** dont l'origine est à la fois locale et plasmatique. **Les Ig A présentes proviennent essentiellement du secteur vasculaire par pinocytose.**

Les Ig A de type sécrétoire sont peu abondantes à ce niveau. Il n'en est pas de même dans les voies hautes où elles jouent un rôle particulièrement efficace d'agglutinant bactérien et supplantent quantitativement les Ig G.

C. - CONCENTRATION EN K^+

La concentration en K^+ des liquides de lavage broncho-alvéolaire peut, lorsqu'elle est augmentée, donner lieu à deux interprétations différentes n'excluant pas pour autant l'intérêt de cette détermination.

Il peut s'agir en effet soit d'une souffrance – voire d'une lyse – de certaines cellules de la paroi alvéolaire, soit d'une augmentation de la filtration de cet élément au niveau des pores inter-endothéliaux.

La mise en évidence, chez les fumeurs, de concentrations en K^+ plus élevées que chez les non fumeurs pourrait résulter soit d'une souffrance au niveau des fragiles prolongements cytoplasmiques des pneumocytes de type I, soit d'un état "subœdémateux" insuffisant pour entraîner une filtration protéique par les pores mais entraînant un accroissement de la filtration du K^+ qui d'ailleurs s'effectue exclusivement par eux.



Il convient de souligner que ce bilan biochimique d'exploration des liquides de lavage broncho-alvéolaire ne saurait être dissocié de leur étude cytologique (comptage et formule cellulaire) qui fournit une indication sur les modalités cellulaires de réponse de l'alvéole aux agressions et son intensité.

- VI -

LE RAPPORT L/P DANS LES LIQUIDES
DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE
CHEZ LE RAT ET LE LAPIN AU COURS
D'AGRESSIONS AIGUES PAR INHALA-
TION DE TOXIQUES GAZEUX MAJEURS
(CO, HCN, HCl) ET AU COURS D'HYP-
OXIES

* Lors des incendies, l'inhalation des gaz toxiques issus de la thermolyse de matériaux très divers, exerce très rapidement d'importants désordres au niveau des grands systèmes organiques qui ont été minutieusement étudiés, de façon originale, à partir de modèles de feu et de modèles animaux (TRUHAUT, BOUDENE, JOUANY, 1975 - JOUANY, TRUHAUT, BOUDENE, 1977 - BOUDENE, JOUANY, TRUHAUT, 1978) à l'aide d'une représentation graphique particulière : **le physiogramme** (TRUHAUT, BOUDENE, JOUANY, DUCASTEL, 1969) permettant de suivre, en fonction des temps d'intoxication et de récupération, l'état de l'animal par une représentation graphique en portant en abscisse la fréquence de l'EEG, en ordonnées, le pouls et la pression artérielle.

Ces travaux permettent d'individualiser une **toxicologie clinique du feu** dont l'oxyde de carbone (issu des combustions incomplètes), l'acide chlorhydrique gazeux et l'acide cyanhydrique gazeux - issus respectivement de dégradations thermiques de chlorures de polyvinyle et de polyuréthanes - sont les toxiques majeurs.

Lors des phases aiguës d'intoxication, ces composés sont à l'origine de détresses respiratoires sous tendues par un œdème pulmonaire d'importance variable, fonction de la nature du toxique et de la durée d'exposition.

A partir des modèles expérimentaux décrits par TRUHAUT, BOUDENE et JOUANY (1975), nous avons étudié l'action de ces toxiques majeurs sur le film alvéolaire à l'aide des lavages broncho-alvéolaires.

Dans ces agressions aiguës, nous avons retenu les paramètres suivants qui nous paraissent fondamentaux :

117

- le taux de protéines permettant d'apprécier l'importance de l'œdème lié à l'atteinte de la barrière alvéolo-capillaire

- le taux de lécithines permettant d'établir le rapport L/P qui présente l'avantage de ne pas être perturbé par des différences d'efficacité dans les lavages pulmonaires.

A. – METHODOLOGIES

1. Préparation des atmosphères

Les atmosphères ont été préparées dans des ballons en Saran de 60 l à partir d'obus de gaz pur dilué avec de l'air pur et sec. Les concentrations en CO (de 1 000 à 15 000 ppm) des atmosphères ainsi préparées sont vérifiées à l'aide de l'appareil COSMA (absorption sélective dans l'infra-rouge).

Les concentrations en HCN (de 80 à 400 ppm) et HCl (de 2300 à 10 000 ppm) sont contrôlées, après barbotage d'un volume connu d'atmosphère dans une solution de Ag NO₃, par une méthode potentiométrique.

2. Préparation et intoxication des animaux

2.1 Elle est pratiquée par **ventilation artificielle contrôlée**. Le toxique est administré par voie endo-trachéale par l'intermédiaire d'une pompe à ventilation artificielle du type Bird. Par ce procédé, le toxique atteint obligatoirement l'alvéole pulmonaire et pénètre dans la circulation artérielle. Il permet par ailleurs d'assurer durant l'intoxication – dont les conditions sont parfaitement connues – une ventilation régulière. Cette assistance ventilatoire pratiquée durant les 30 minutes de la période d'intoxication est maintenue durant les 60 minutes de la période de récupération.

2.2 Les animaux utilisés sont des **rats de souche Wistar** et des **lapins de la race fauve de Bourgogne** dont les poids moyens sont respectivement 220 g et 2,5 kg.

2.3 Trachéotomie :

Elle est réalisée au quatrième anneau de la trachée en partant du larynx. La longueur du tube sortant de la trachée et reliant l'animal à la pompe Bird est choisie de telle sorte que l'espace mort imposé à l'animal soit à peu près physiologique.

Elle est établie pour un matériel de diamètre donné, en fonction de la plus faible baisse de la valeur de la réserve alcaline, soit environ 8 cm pour le lapin (tube de 3,5 mm de diamètre), 2 cm pour le rat (tube de 1,5 mm de diamètre).

Dans le cas du lapin, après avoir placé l'animal en décubitus dorsal, la trachéotomie est réalisée sous anesthésie locale avec la procaïne à 1 %. Lorsque la ventilation artificielle est assurée, l'animal est alors curarisé par 1 ml de triiodo éthylate de gallamine à 2 % (Flaxedil) injecté par voie intraveineuse.

Dans le cas du rat, l'animal, après avoir été soumis à une anesthésie légère par l'éther, est placé en décubitus dorsal puis trachéotomisé. Lorsque la ventilation est installée, il est curarisé par injection intra-péritonéale de 1 ml de triiodo éthylate de gallamine à 2 %.

2.4 Les caractéristiques de la ventilation artificielle sont les suivantes :

- Rat 20 litres/heure, fréquence 18 ± 2
- Lapin 80 litres/heure, fréquence 18 ± 2

2.5 Les prélèvements sanguins sont effectués par canulation de la carotide.

B. - INCIDENCE DE LA VENTILATION ARTIFICIELLE CONTROLÉE SOUS TRACHEOTOMIE
SUR LA COMPOSITION DES LIQUIDES DE LAVAGE PULMONAIRE

* Nous avons comparé les concentrations en lécithines, protéines et oses neutres ainsi que le rapport L/P de liquides de lavage broncho-alvéolaire de rats et de lapins sacrifiés dès leur sortie de cage, de rats et de lapins trachéotomisés sous ventilation contrôlée.

* Un groupe témoin (A) constitué de 5 rats, pesant de 200 à 240 g, sacrifiés dès leur sortie de cage par une injection intra-péritonéale de 1ml de solution de pentobarbital à 6 g %, a été comparé à un deuxième groupe (B) constitué de 4 rats de même tranche de poids, trachéotomisés et sous ventilation contrôlée (air) durant 120 minutes. L'analyse statistique des résultats obtenus ne fait pas ressortir de différences significatives comme le montre le tableau VI.1.

	A (n = 5) m ± SEM (valeurs extrêmes)	B (n = 4) m ± SEM (valeurs extrêmes)	P
PROTEINES µg/ml	160 ± 19,6 (140 - 180)	183,7 ± 30,0 (165 - 210)	NS
LECITHINES µg/ml	73,4 ± 8,4 (68 - 81)	78,7 ± 12,5 (69 - 87)	NS
L/P	0,459 ± 0,026 (0,433 - 0,506)	0,429 ± 0,058 (0,395 - 0,483)	NS
OSSES NEUTRES µg/ml	16,6 ± 4,8 (13 - 21)	20,2 ± 9,2 (14 - 28)	NS

Tableau VI.1

COMPOSITION DE LIQUIDES DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE DE RATS SACRIFIES A LEUR SORTIE DE CAGE (A) ET DE RATS TRACHEOTOMISES APRES 120 mn DE VENTILATION CONTROLÉE (B)

* Des résultats de même type sont obtenus chez le lapin (Tableau VI.2)

	A (n = 3) m ± SEM (valeurs extrêmes)	B (n = 3) m ± SEM (valeurs extrêmes)	P
PROTEINES µg/ml	363 ± 141 (300 - 410)	470 ± 227 (370 - 550)	NS
LECITHINES µg/ml	178 ± 73,9 (144 - 200)	210 ± 65,4 (180 - 230)	NS
L/P	0,489 ± 0,037 (0,480 - 0,500)	0,447 ± 0,111 (0,400 - 0,486)	NS
OSÉS NEUTRES µg/ml	16,3 ± 3,8 (15 - 18)	17,3 ± 7,4 (14 - 20)	NS

Tableau VI.2

COMPOSITION DE LIQUIDES DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE DE LAPIN SACRIFIÉS A LEUR SORTIE DE CAGE (A) ET DE LAPINS TRACHEOTOMISÉS SACRIFIÉS APRES 90 mn DE VENTILATION CONTRÔLÉE (B)

* Dans nos conditions opératoires, il apparaît que la ventilation contrôlée n'a pas d'incidence particulière sur la composition des liquides de lavage.

C. - ACTION DU MONOXYDE DE CARBONE

1. Chez le rat trachéotomisé en ventilation contrôlée

1.1 Pour des mélanges contenant jusqu'à 3 000 ppm de CO, les taux de protéines, lécithines, oses neutres, acide sialique, fucose, ainsi que le rapport L/P ne sont pas significativement différents, dans les liquides de lavage pulmonaires, de ceux des témoins trachéotomisés inhalant de l'air (Tableau VI.3)

	Protéines ($\mu\text{g/ml}$)	Lécithines ($\mu\text{g/ml}$)	L/P	Oses neutres ($\mu\text{g/ml}$)	Acide Sialique ($\mu\text{g/ml}$)	Fucose ($\mu\text{g/ml}$)	K^+ (mEq/l)
TEMOINS (n = 4)	183,7	78,7	0,429	20,2	3,5	2,9	0,4
CO 1 000 ppm (n = 3)	175,1	80,3	0,458	22,0	3,2	2,8	0,35
2 000 ppm (n = 3)	170,2	76,4	0,448	19,2	3,5	2,8	0,3
3 000 ppm (n = 3)	180,5	74,1	0,410	20,9	3,1	2,6	0,4
5 000 ppm (n = 3)	295,0	83,1	0,281	28,5	4,0	3,4	0,45

Tableau VI.3

EVOLUTION DE LA COMPOSITION DU LIQUIDE DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE
CHEZ LE RAT EN FONCTION DE LA TENEUR EN CO DANS L'AIR INHALE
APRES 60 mn DE RECUPERATION

* A 5 000 ppm on observe une forte augmentation (+ 60 %) de la concentration en protéines, seule responsable de la chute (- 34 %) du rapport L/P, étant donné la relative stabilité de celle en lécithines.

* Chez le rat il semblerait que la sensibilité du rapport L/P pour CO, passerait par un seuil se situant entre 3 000 et 3 500 ppm (fig. VI.1)

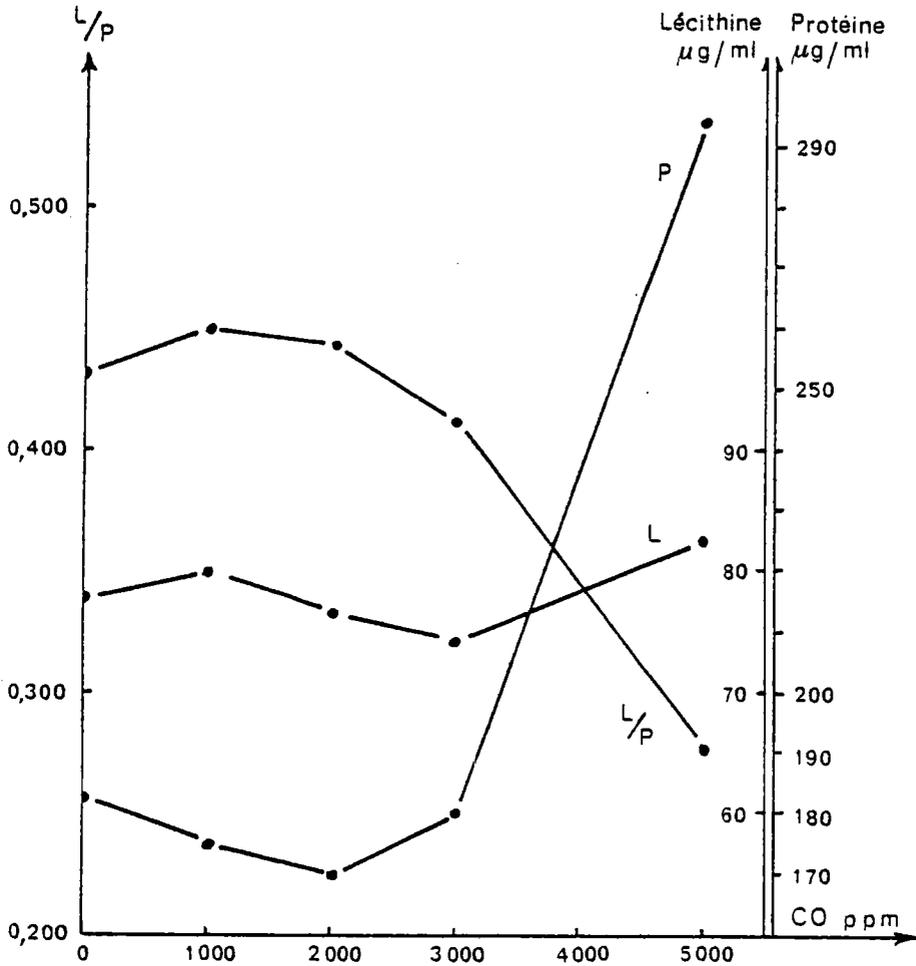


Fig. VI.1

Schéma visualisant, chez le rat, le seuil d'effondrement du rapport L/P

* Ce n'est qu'à 5 000 ppm que l'on note une tendance à l'augmentation des concentrations en oses, qui, cependant, n'est pas statistiquement significative et témoigne de l'action peu irritante de ce gaz sur les muqueuses bronchique et alvéolaire.

1.2 Au cours de ces intoxications expérimentales, nous avons observé des **hyperglycémies particulièrement élevées (5 à 7 g/l)** et **indépendantes des concentrations en CO de l'air inhalé**. Il faut en voir l'origine dans l'état de choc opératoire, particulièrement important où se trouve l'animal trachéotomisé, comme en témoignent l'augmentation du taux de l'urée plasmatique – alors que celui de la créatinine reste normal – ainsi que l'**hypercorticotéronémie**.

Il faut en effet souligner l'absence plasmatique de cortisol chez le rat et la présence exclusive de corticostérone qui a été dosée par fluorescence en milieu alcool-sulfurique (VAN DER VIES, 1961).

1.2-1 Dans le tableau VI.4, nous indiquons les constantes plasmatiques observées chez des rats non trachéotomisés (témoins "absolus"), trachéotomisés avec ou sans inhalation de CO.

* Le groupe "Témoins absolus" comprend 8 rats qui ont été sacrifiés dès leur sortie de cage par une injection intra-péritonéale de pentobarbital. Les glycémies de ce groupe sont, toutes, largement supérieures à 1,50 g/l. Il faut en voir la raison dans la méthode de sacrifice utilisée. Il est bien connu que l'électrocution dans une cage électrique, en éliminant quasi complètement le stress, permet d'obtenir des valeurs plus basses de l'ordre de 1 g/l.

	Urée g/l	Créatinine mg/l	Glycémie g/l	Na ⁺ mEq/l	K ⁺ mEq/l	Protides g/l	Osmolarité mosm/l	Cortico- stérone µg %
GRUPE "TEMOINS" ABSOLUS (n = 8)	0,39 (0,30-0,68)	6,5 (6-8)	2,38 (1,80-2,90)	141,1 (137-146)	4,4 (3,9-5,3)	52,0 (49-58)	311,8 (303-320)	25,2 (18-38)
TEMOINS TRACHEO- TOMISES SOUS AIR (n = 4)	0,59 (0,56-0,65)	6 (5,5-7,5)	6,30 (5,10-7,80)	140,8 (138-145)	4,3 (3,9-4,6)	53,1 (49-55)	340,3 (336-349)	83 (71-94)
RATS TRACHEO- TOMISES SOUS CO + AIR (n = 4)	0,67 (0,60-0,80)	6,5 (5-8)	5,95 (5,10-7,10)	142,7 (140-147)	4,0 (3,8-4,5)	53,5 (51-56)	339,2 (330-348)	78,5 (74-83)

Tableau VI.4

CONSTANTES PLASMATIQUES CHEZ DES RATS NON TRACHEOTOMISES ET TRACHEOTOMISES
INHALANT SOIT DE L'AIR, SOIT UN MELANGE AIR/CO

* Les rats trachéotomisés ont été sacrifiés à la 90ème minute après avoir inhalé soit de l'air (groupe témoin n = 4) soit pendant 30 minutes un mélange air/CO à 3 000 ppm (n = 2) ou à 5 000 ppm (n = 2)

* Les constantes biologiques des rats trachéotomisés inhalant ou n'inhalant pas de CO ne sont pas significativement différentes. Les taux d'urée, de glucose et de corticostérone sont, par rapport au groupe des témoins absolus, augmentés respectivement de 1,5, 2,5 et 3,5 fois. On observe par ailleurs pour ces 2 derniers groupes, une hyperosmolarité relativement importante.

1.2-2 Nous avons étudié l'évolution de la glycémie et de la corticostéronémie, en fonction du temps, chez 3 rats trachéotomisés sous ventilation contrôlée sur l'air et présentant des glycémies de base peu différentes ($m = 1,90 \text{ g/l} \pm 0,10$). L'hypercorticostéronémie apparaît très rapidement (dès la 10ème minute) alors que l'installation de l'hyperglycémie est plus progressive (fig. VI.2). Une corrélation linéaire directe est observée entre la corticostérone et le ln de la glycémie ($r = 0,95$)

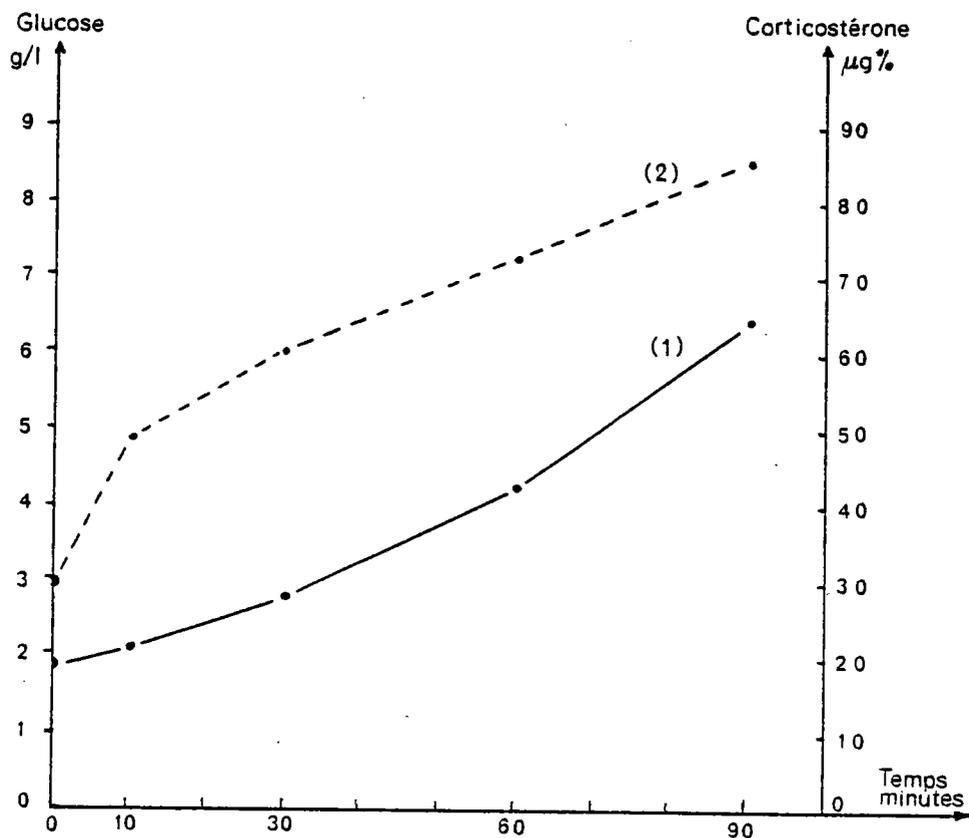


Fig. VI.2

Evolution de la glycémie (1) et de la corticostéronémie (2) chez le rat trachéotomisé sous ventilation contrôlée sur l'air.

2. Chez le lapin trachéotomisé en ventilation contrôlée

2.1 Si l'on considère les valeurs du rapport L/P en fonction des concentrations en CO de l'air inhalé, le lapin apparaît moins sensible que le rat à ce toxique. Pour une concentration en CO de 8 600 ppm nous avons obtenu pour 3 lapins, les valeurs moyennes suivantes :

Lécithines	215 µg/ml	(200 - 245)
Protéines	600 µg/ml	(500 - 700)
L/P	0,358	(0,333 - 0,400)

Cette valeur (0,358) du rapport L/P correspond à une baisse de seulement 20 % par rapport à la normale (0,447) alors que chez le rat pour 5 000 ppm on observe une chute de 34 % (0,429 → 0,281).

Cette valeur (0,358) se retrouve chez le rat pour des concentrations en CO comprises entre 3 000 (0,410) et 5 000 ppm (0,281). Ceci indique que, chez le rat, la réponse du rapport L/P à l'intoxication oxycarbonée, est environ deux fois plus sensible que celle du lapin (tableau VI.5).

Ces résultats sont en accord avec ceux de TRUHAUT, BOUDENE et JOUANY (1975) qui, à l'aide des physiogrammes ont montré l'existence d'une plus grande sensibilité au CO, du rat (CI_{50} 4 100 ppm) par rapport au lapin (CI_{50} 10 500 ppm).

	Lécithines µg/ml	Protéines µg/ml	L/P
RATS TEMOINS	78,7	183,7	0,429
RATS CO 5 000 ppm	83,1	295,0	0,281 (- 34 %)
LAPINS TEMOINS	210	470	0,447
LAPINS CO 8 600 ppm	215	600	0,358 (- 20 %)

Tableau VI.5

Sensibilité du rapport L/P à l'intoxication par CO chez le rat et le lapin

* Le lapin peut d'ailleurs supporter une concentration en CO de 15 000 ppm, pour laquelle, cependant, les perturbations biologiques sont particulièrement importantes : à la fin de la période d'intoxication le pourcentage d'Hb CO est de 56 % ; au cours de l'expérience, l'hypoxie indirecte créée par CO entraîne une acidose et une augmentation de la pO_2 reflétant la moindre utilisation de l'oxygène par l'animal (fig. VI.3).

A la fin de la période de récupération, par rapport à la normale, la diminution (- 47 %) du taux des lécithines (210 $\mu\text{g/ml}$ \rightarrow 110 $\mu\text{g/ml}$) accompagnée d'un accroissement (+ 38 %) de celui des protéines (470 $\mu\text{g/ml}$ \rightarrow 650 $\mu\text{g/ml}$) aboutit à une diminution importante (- 62 %) du rapport L/P (0,448 \rightarrow 0,169).

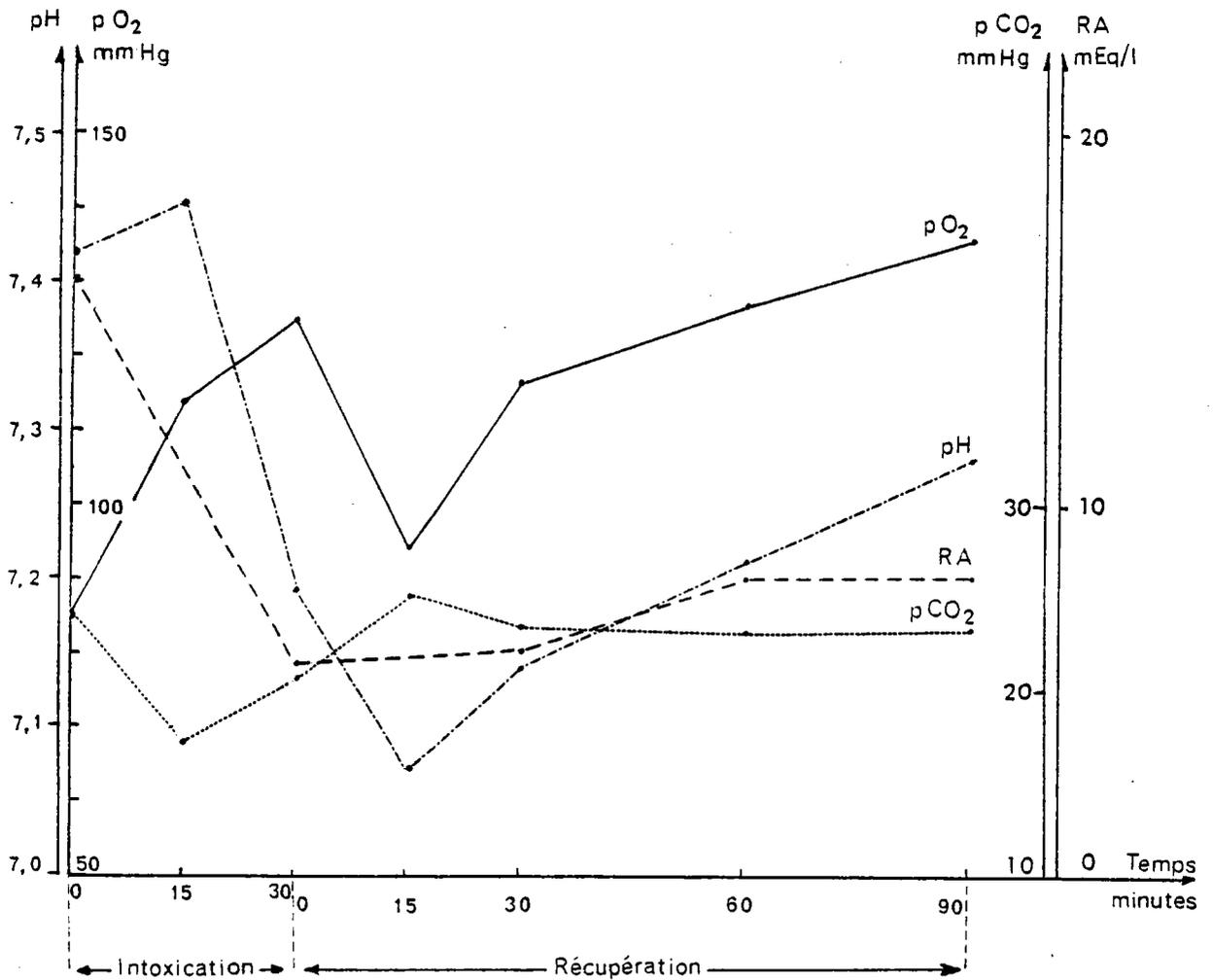


Fig. VI.3

pH, PO₂, pCO₂ et réserve alcaline (RA) chez le lapin trachéotomisé sous ventilation contrôlée (CO 15 000 ppm)

2.2 Alors que chez le rat l'importance de la réponse au stress opératoire semble masquer l'hyperglycémie propre à l'intoxication oxycarbonée, chez le lapin, il n'en est pas de même, l'incidence du stress étant modeste si l'on en juge par la non augmentation du taux de l'urée plasmatique (fig. VI.4).

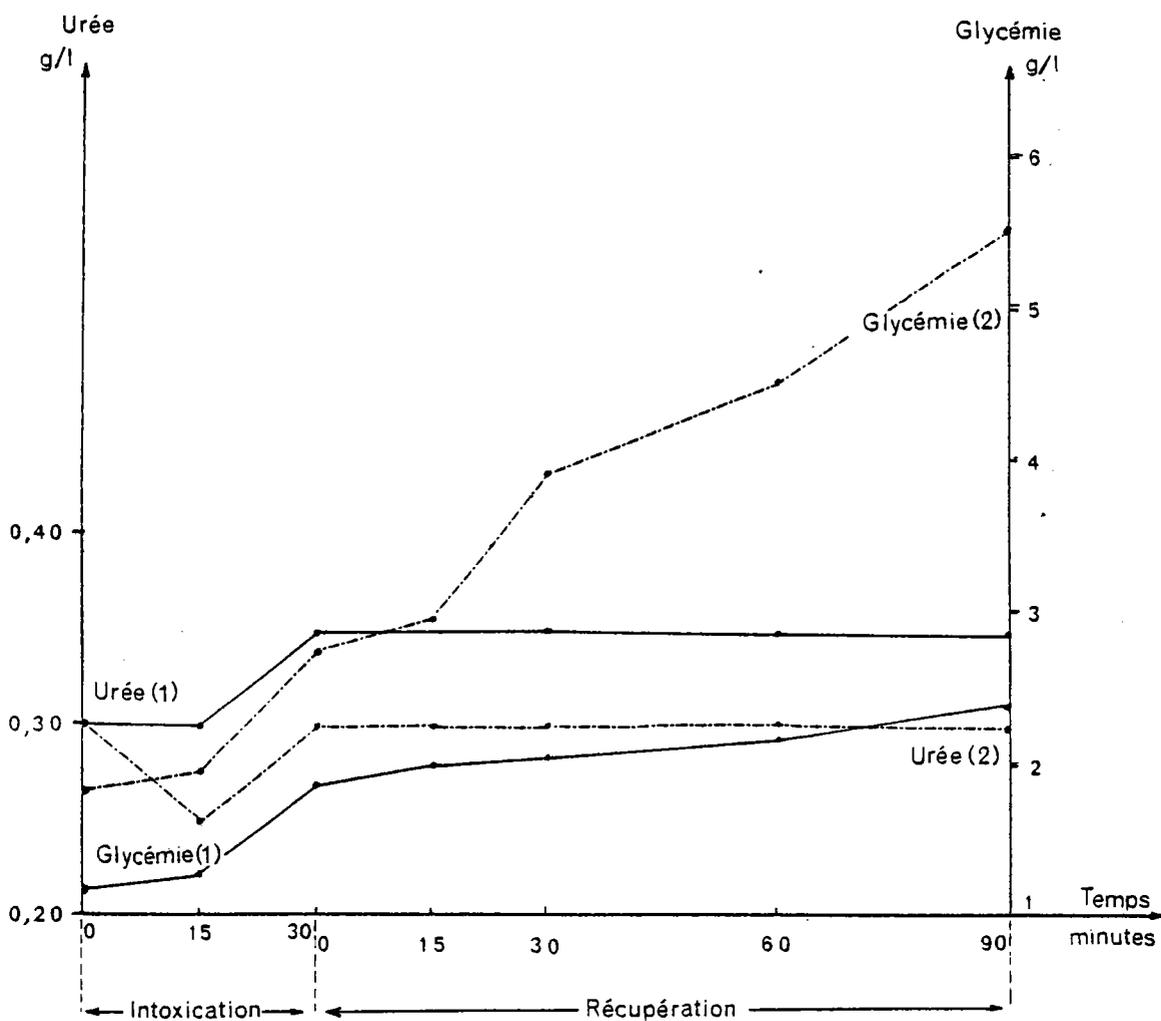


Fig. VI.4

Urée et glycémie plasmatiques chez le lapin trachéotomisé sous ventilation contrôlée sur air (1) et sur 15 000 ppm de CO (2)

3. Conclusion

- * Dans les agressions aiguës par CO, on observe une baisse du rapport L/P liée exclusivement à une augmentation du taux des protéines dont il faut sans doute voir l'origine dans un accroissement de la filtration des protéines du secteur vasculaire vers la lumière alvéolaire du fait de l'existence éventuelle d'un sub-œdème lésionnel.

- * Chez le rat, la réponse du rapport L/P à l'intoxication oxycarbonée, est plus sensible d'environ deux fois à celle observée chez le lapin.

- * L'hypoxie indirecte créée par CO, étudiée chez le lapin pour une concentration de 15 000 ppm entraîne au niveau sanguin, une augmentation importante, du pH et de la pO_2 .

- * La non augmentation des concentrations en oses dans les liquides de lavage indique le caractère non irritant de CO pour les muqueuses.

D. - ACTION DE L'ACIDE CYANHYDRIQUE

I. Chez le rat trachéotomisé en ventilation contrôlée

* HCN gazeux est un toxique particulièrement puissant. A la concentration de 80 ppm, on note déjà une diminution remarquable (- 43 %) du rapport L/P (0,429 → 0,241) liée uniquement à l'accroissement important (+ 70 %) du taux des protéines (183,7 µg/ml → 315 µg/ml) dont il faut, là encore, voir l'origine dans une augmentation de la transsudation des protéines du secteur vasculaire. Les concentrations en protéines totales des liquides de lavage pulmonaires sont d'ailleurs proportionnelles à celles d'HCN (de 80 à 400 ppm) dans les atmosphères inhalées (fig. VI.5).

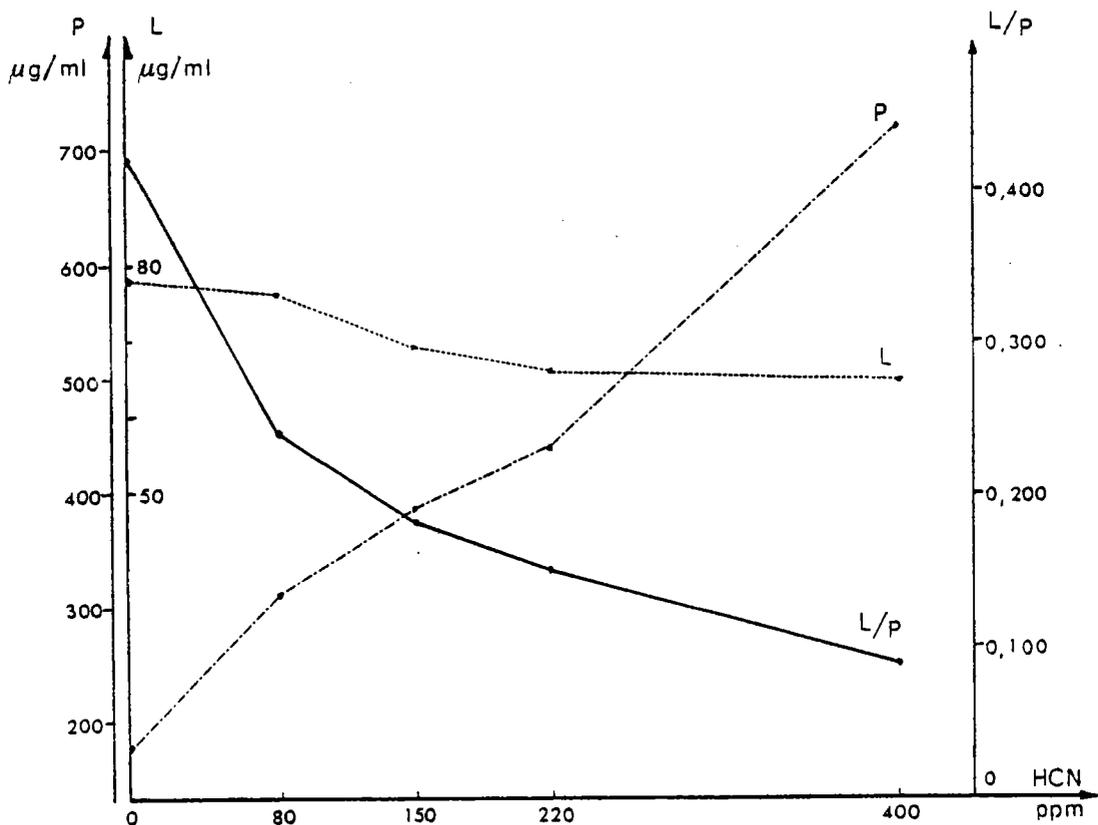


Fig. VI.5

Evolution chez le rat des concentrations (µg/ml) en Protéines (P) et lécithines (L) du rapport L/P dans les liquides de lavage en fonction de la teneur en HCN de l'air inhalé

* Il semble que l'action irritante d'HCN sur la muqueuse bronchique soit relativement modérée. En effet, ce n'est qu'à partir de 150 ppm que l'on note une nette augmentation des concentrations en oses neutres, acide sialique et fucose dans les liquides de lavage pulmonaire (fig. VI.6)

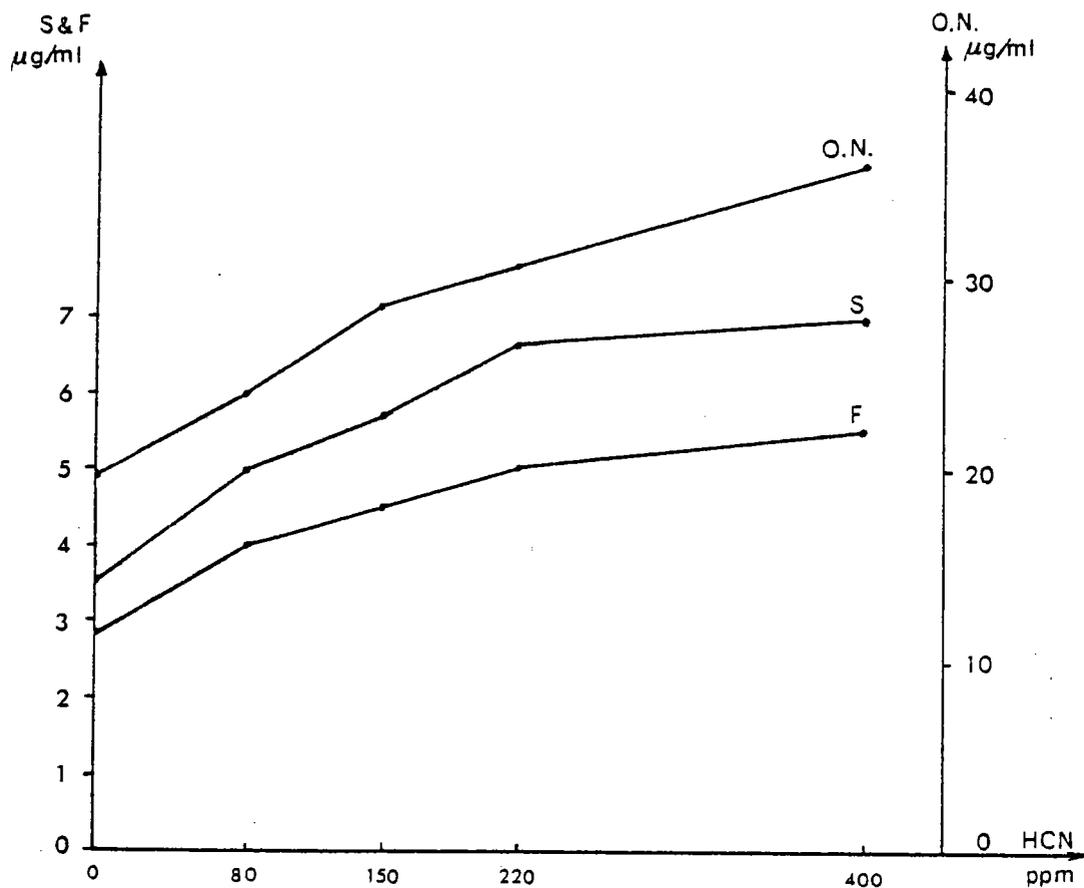


Fig. VI.6

Evolution, chez le rat, des concentrations ($\mu\text{g/ml}$) en oses neutres (O.N.), Ac. sialique (S) et fucose (F) dans les liquides de lavage pulmonaire en fonction de la concentration en HCN dans l'air inhalé

2. Chez le lapin trachéotomisé en ventilation contrôlée

L'atteinte du film alvéolaire par HCN chez le lapin est semblable à celle observée chez le rat : pas d'effet sur la teneur en lécithines, forte augmentation de la concentration en protéines. En se référant à la normale, pour 135 et 190 ppm d'HCN, on note respectivement un abaissement de 40 % (0,447 → 0,266) et 49 % (0,447 → 0,226) du rapport L/P. Chez le rat, un abaissement de même ordre de grandeur (- 43 %) est obtenu à partir d'une concentration beaucoup plus faible (80 ppm) en HCN (tableau VI.6). Il apparaît donc que pour cet animal, la réponse du rapport L/P à l'intoxication par HCN est environ 1,5 fois plus sensible que celle du lapin. Ce résultat est analogue à celui observé pour CO avec les mêmes espèces.

	Lécithines µg/ml	Protéines µg/ml	L/P
RATS TEMOINS	78,7	183,7	0,429
<i>HCN</i> RATS CNH 80 ppm	76	315	0,241 (- 43 %)
LAPINS TEMOINS	210	470	0,447
<i>HCN</i> LAPINS CNH 135 ppm	192	720	0,266 (- 40 %)

Tableau VI.6

SENSIBILITE DU RAPPORT L/P A L'INTOXICATION PAR HCN GAZEUX
CHEZ LE RAT ET LE LAPIN

3. Conclusion

L'intoxication aiguë par HCN gazeux se traduit au niveau du liquide de lavage pulmonaire par des modifications analogues à celles observées avec CO :

- Baisse du rapport L/P liée à l'augmentation de la concentration en protéines, celle en lécithines restant relativement stable.
- Plus grande sensibilité de réponse du rapport L/P à cette intoxication chez le rat par rapport au lapin

Une action légèrement irritante d'HCN pour la muqueuse bronchique peut être notée à partir de 150 ppm.

E. - ACTION DE L'ACIDE CHLORHYDRIQUE

1. Chez le rat trachéotomisé en ventilation contrôlée

1.1 HCl, Toxique majeur des produits de thermolyse du polychlorure de vinyle (CORNISH, ABAR, 1969) est un gaz hydrosoluble, donc rapidement absorbé par les voies respiratoires supérieures où il exerce son action irritante. Inhalé en quantité massive, comme ce peut être le cas au cours des incendies, il engendre des détresses respiratoires particulièrement graves dont la rémission, lorsqu'elle a lieu, s'accompagne de l'installation progressive d'une fibrose pulmonaire.

Alors que la toxicité de CO et d'HCN s'explique par leur impact sur les mécanismes intimes de la respiration cellulaire, celle de HCl reste obscure et ne saurait se résumer à sa seule action corrosive.

1.2 L'agression par HCl se singularise par une nette augmentation (m \neq 30 %) dans les liquides de lavage de la concentration en lécithines (tableau VI.7) pouvant provenir, sous l'action corrosive de ce gaz, de cellules lésées et d'une extrusion plus importante des corps lamellaires. Malgré cela, au cours de cette agression, la très importante transsudation albumineuse est responsable de l'effondrement du rapport L/P. L'augmentation des concentrations en oses neutres, acide sialique et fucose est le reflet de l'importante action irritante d'HCl, notamment à partir de 6 000 ppm. Pour ce qui est des oses neutres totaux, il faut en accepter avec réserve les taux observés pour des concentrations élevées de HCl (\geq 6 000 ppm) dans la mesure où la transsudation protéique est accompagnée d'un passage de glucose libre, et ce d'autant plus que les animaux présentent des glycémies particulièrement fortes (6 à 7 g/l) du fait du choc opératoire.

L'augmentation des concentrations en acide sialique et fucose provient essentiellement de l'hypersécrétion réactionnelle de mucines au niveau des voies pulmonaires hautes. L'électrophorèse de liquides de lavage concentrés de 10 à 20 fois montre que l'augmentation de la concentration en protéines est pour plus de 75 % le fait de l'albumine qui, rappelons-le, est une protéine non synthétisée par l'épithélium alvéolaire et ne renfermant ni acide sialique, ni fucose mais seulement 0,05 % d'oses (SCHULTZE, HEREMANS, 1961).

L'augmentation de la concentration en K^+ des liquides de lavage dès 2 300 ppm peut résulter de deux actions du toxique éventuellement simultanées : atteinte cellulaire, notamment au niveau des fins prolongements cytoplasmiques des pneumocytes de type I dont on sait la fragilité ; augmentation du flux de K^+ vers l'alvéole par altération des pores inter-endothéliaux.

albumine

	Protéines ($\mu\text{g/ml}$)	Lécithines ($\mu\text{g/ml}$)	L/P	Oses neutres ($\mu\text{g/ml}$)	Acide sialique ($\mu\text{g/ml}$)	Fucose ($\mu\text{g/ml}$)	K^+ (mEq/l)
TEMOINS (n = 4)	183,7	78,7	0,429	20,2	3,5	2,9	0,4
HCl 2300 ppm (n = 4)	220	111	0,504	50	3,3	3,1	0,9
HCl 4 500 ppm (n = 4)	282	107	0,382	52	3,4	4,9	1,2
HCl 6 000 ppm (n = 3)	621	119	0,191	168	9,5	8,4	1,3
HCl 7 500 ppm n = 3	950	92	0,096	290	10,8	11,7	1,5
HCl 10 000 ppm n = 3	1 543	94	0,061	688	16,4	12,2	1,5

Tableau VI.7

EVOLUTION DE LA COMPOSITION DU LIQUIDE DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE CHEZ LE RAT EN FONCTION DE LA TENEUR EN HCl DE L'AIR INHALE ET APRES 60 mn DE RECUPERATION

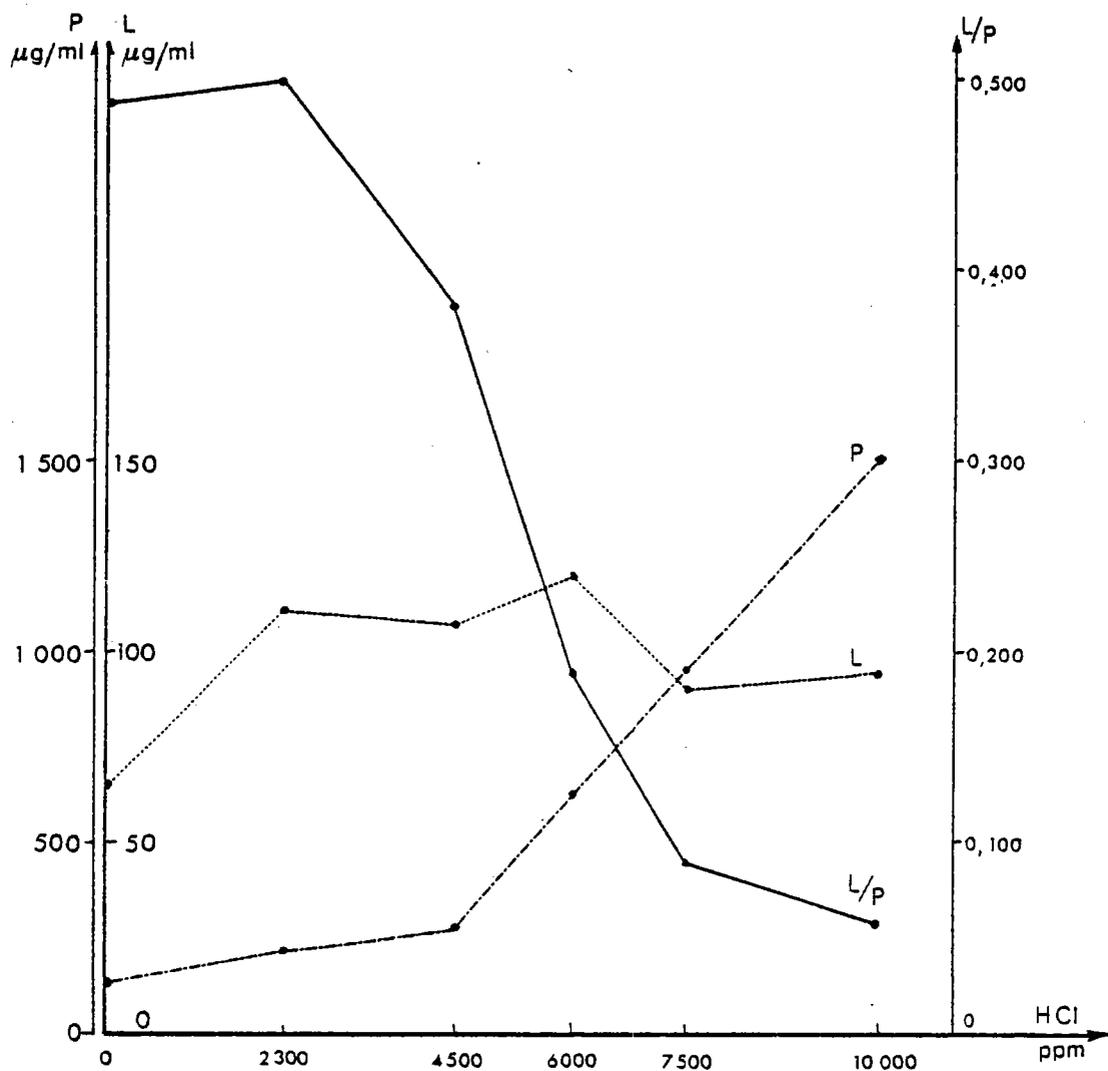


Fig. VI.7

Evolution chez le rat des taux ($\mu\text{g/ml}$) de Protéines (P), de lécithines (L) et du rapport L/P dans les liquides de lavage pulmonaire en fonction de la concentration en HCl de l'air inhalé

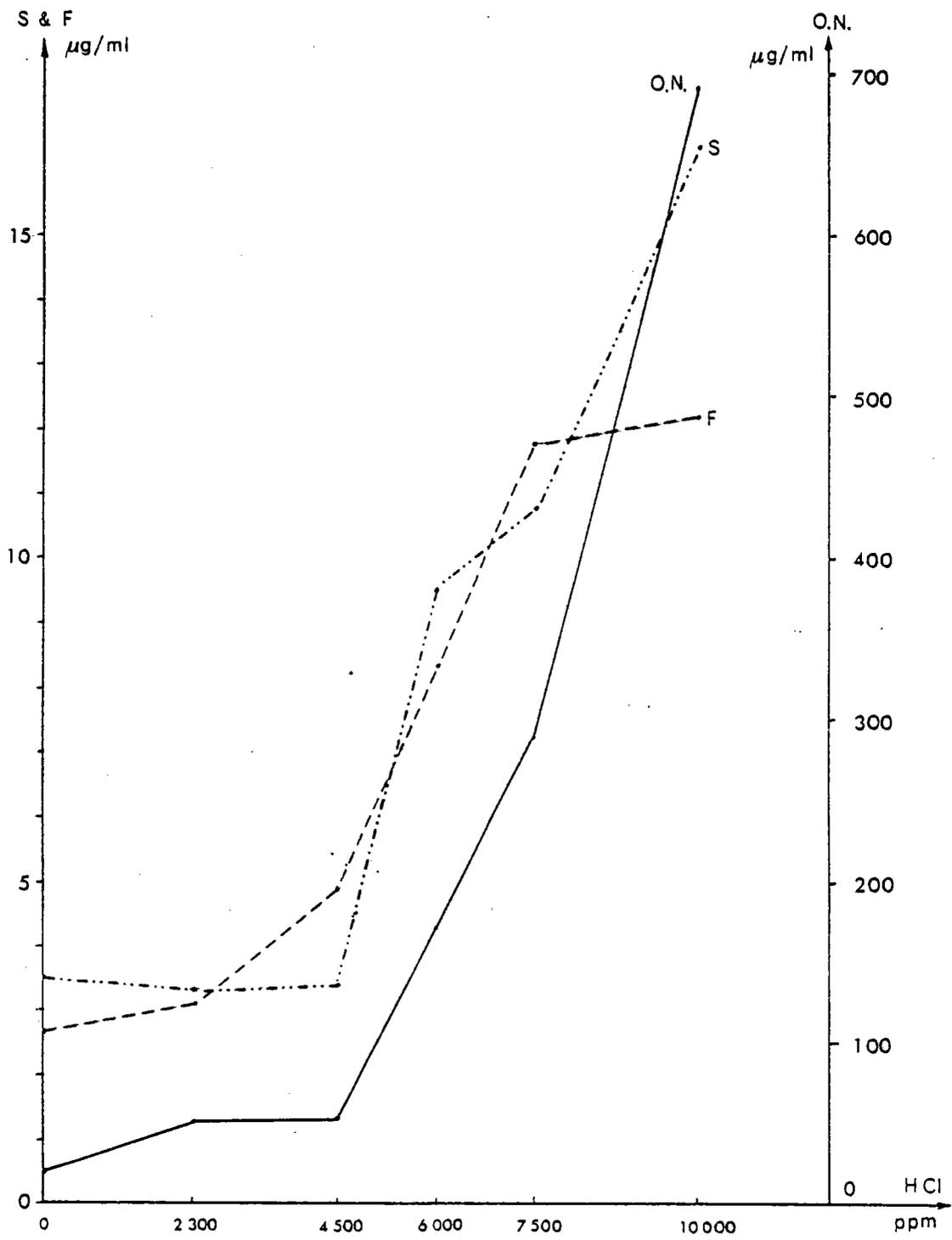


Fig. VI.8

Evolution chez le rat des concentrations ($\mu\text{g/ml}$) en oses neutres (O.N.), acide sialique (S) et fucose (F) en fonction du taux d'HCl dans l'air inhalé

Du tableau VI.7 et des figures VI.7 et VI.8, il ressort que l'agression par le gaz chlorhydrique est assez bien supportée par le rat jusqu'à 4 500 ppm. A l'autopsie, les rats traités par des concentrations de HCl de 2 300 et 4 500 ppm, ont des poumons d'aspect normal. Par contre, pour 6 000, 7 500 et 10 000 ppm, on note un aspect blanchâtre plus ou moins prononcé de l'ensemble du système pulmonaire.

Nous n'avons pas observé d'œdème aigu pulmonaire pour 2 300 et 4 500 ppm. Par contre, dans chacun des groupes de 4 animaux soumis à des concentrations en HCl de 6 000, 7 500 et 10 000 ppm, un sujet est mort par œdème aigu pulmonaire.

1.3 Absent des liquides de lavage des animaux témoins et de ceux inhalant des atmosphères à 2 300, 4 500, 6 000 et 7 500 ppm d'HCl, l'acide hyaluronique est détecté à la concentration moyenne de 11 $\mu\text{g/ml}$ chez ceux inhalant un mélange de 10 000 ppm. Il en a été de même pour l'hydroxyproline où pour 10 000 ppm de HCl, le liquide de lavage pulmonaire renferme 95 nMoles/mg de Protéines. Ces résultats témoignent de la très grande agressivité du HCl gazeux à forte concentration dans l'atmosphère inhalée.

1.4 La très nette amplification de l'effet toxique du HCl à partir de 4 500 ppm nous semble relever d'un dépassement du pouvoir tampon du film liquidien alvéolaire. Cette hypothèse semble vérifiée par l'étude que nous avons effectuée, pour des raisons pratiques, chez la souris, afin de montrer l'incidence de l'acidité du liquide de lavage sur la valeur du rapport L/P.

Nous avons pratiqué des lavages broncho-alvéolaires, à l'aide d'eau physiologique (NaCl 9 g ‰) et de dilutions d'acide chlorhydrique dans l'eau physiologique, chez des souris congéniques mâles (C_3H) de 20 g, sacrifiées par une injection intra-péritonéale de pentobarbital.

L'utilisation de solutions isotoniques de HCl permet d'apprécier l'effet propre de cet acide qui ne peut être dissocié de celui des H⁺.

Au cours de ces lavages, à différents pH, les taux de lécithines n'ont pas été significativement modifiés. Par contre, les ln des concentrations protéiques sont négativement corrélés avec les pH des liquides de lavage récupérés.

$$(y_{\text{pH}} = -4,39 \times x_{\text{Prot}} + 27,7 \quad r = -0,968$$

* Chez ces souris de 20 g, l'acidité apportée par les 2 ml (4 fois 0,5 ml) de la solution de lavage HCl 10⁻³N (soit 2 μEq H⁺) suffit pour dépasser le pouvoir tampon du film endoalvéolaire, le pH du liquide de lavage récupéré n'est que de 3,2. La concentration protéique qui est accrue de 58 % par rapport aux témoins (tableau VI.8) (fig. VI.9) rendent compte d'une plus grande perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire, aux protéines sous l'influence des H⁺.

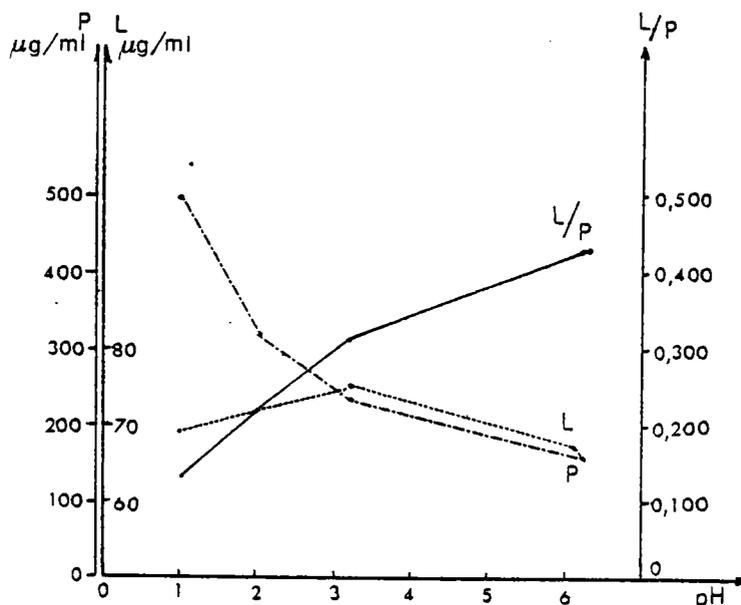


Fig. VI.9

Evolution de la concentration (μg/ml) des Protéines (P), Lécithines (L) et du rapport L/P dans les liquides de lavage pulmonaire chez la souris en fonction du pH du liquide de lavage récupéré

Sinus

	pH liquide lavage récupéré	Lécithines $\mu\text{g/ml}$	Protéines $\mu\text{g/ml}$	L/P	Poumon (aspect)
TEMOINS (n = 5) Lavage eau physiologique	6,2	65	152	0,427	Normal
CIH 10^{-4}N (n = 5)	6,1	67	155	0,432	Normal
CIH 10^{-3}N (n = 5)	3,2	75	240	0,312	Normal
CIH 10^{-2}N (n = 5)	2,0	72	320	0,225	Blanchâtre
CIH 10^{-1}N (n = 5)	1,0	69	500	0,138	Blanchâtre

Tableau VI.8

EFFET DE L'ACIDITE SUR LA BARRIERE ALVEOLO-CAPILLAIRE

2. Chez le lapin trachéotomisé en ventilation contrôlée

2.1 Pour 3 000 ppm d'HCl, sur un échantillonnage réduit ($n = 3$), nous avons obtenu dans les liquides de lavage les valeurs moyennes suivantes :

- Lécithines	180 $\mu\text{g/ml}$
- Protéines	466 $\mu\text{g/ml}$
- L/P	0,386

Elles semblent indiquer une similitude de réponse entre le lapin et le rat pour cet ordre de concentration. En effet, par rapport aux témoins, chez le rat, pour 4 500 ppm d'HCl, le rapport L/P ne s'abaisse que de 11 % (0,429 \rightarrow 0,382), chez le lapin pour 3 000 ppm, l'abaissement observé est de 13 % (0,447 \rightarrow 0,386).

Ainsi, chez le lapin, dans ces conditions, les paramètres étudiés ne sont que peu modifiés. D'ailleurs, au niveau sanguin, le pH passe de 7,43 au temps zéro à 7,45 après 30 minutes d'intoxication puis à 7,43, 7,42 et 7,39 après respectivement 30, 60 et 90 minutes de récupération.

2.2 Pour 7 000 ppm, chez un lapin décédé à la 50^{ème} minute de récupération à la suite d'une hypotension et dont la trachée et les poumons étaient très altérés, nous avons noté un taux accru de protéines (900 $\mu\text{g/ml}$) associé à une baisse d'environ 3 fois de celui des lécithines (210 \rightarrow 68 $\mu\text{g/ml}$). Bien que par chromatographie en couche mince nous n'ayons pas mis en évidence de produits d'hydrolyse des lécithines, nous n'écartons pas pour autant la possibilité de leur hydrolyse partielle par ClH et ce, d'autant que le pH du liquide de lavage récupéré était à 2. L'évolution du pH sanguin est elle aussi assez paradoxale.

hel

Ce dernier était respectivement de 7,46, 7,43 et 7,32 en début d'expérience, à la fin de la période d'intoxication et au moment de la mort. La glycémie, qui, habituellement, et contrairement à l'urée plasmatique, est l'objet d'une augmentation progressive plus ou moins importante, est dans ce cas particulier restée stable à $2 \text{ g} \pm 0,20$ durant toute la durée de l'expérience. Nous avons vérifié la stabilité du taux de l'urée plasmatique $0,35 \text{ g/l} \pm 0,05$. Cette observation fait entrevoir l'hétérogénéité des réponses biologiques à l'intoxication par HCl gazeux.

3. Conclusion

Dans l'intoxication aiguë par ce gaz très corrosif qu'est HCl gazeux, on observe :

- un effondrement du rapport L/P, et ce, malgré une nette augmentation des lécithines, pouvant provenir de cellules lésées ou de l'extrusion accentuée de corps lamellaires.
- une similitude de réponse du rapport L/P à cette agression chez le rat et le lapin.
- une action particulièrement irritante se traduisant à partir de 6 000 ppm par une augmentation très importante des concentrations en oses neutres, acide sialique et fucose, et à 10 000 ppm par une atteinte conjonctive comme en témoigne la présence d'hydroxyproline.

F. – ACTION DU MANQUE D'OXYGENE

Nous avons testé la sensibilité du rapport L/P dans quelques états d'hypoxie observés chez le lapin.

1. Hypoxie par hypoventilation alvéolaire (hypoxie hypercarboxique)

1.1 Deux lapins ont été soumis durant 30 minutes à une hypoventilation sévère (20 l/heure, 13 pulsations/min. au lieu de 80 l/heure, 18 pulsations/min.) suivie d'une période de récupération de 90 minutes, au terme de laquelle ils ont été sacrifiés par injection IV, dans la veine marginale de l'oreille, de 1 ml de pentobarbital à 6 %.

On constate, au niveau des liquides de lavage broncho-alvéolaire, une baisse très importante de l'ordre de 80 % du rapport L/P résultant à la fois d'un **abaissement** d'environ 75 % de la concentration en **lécithines** et d'une forte **augmentation de celle des protéines**. Les pH des liquides de lavage étant proches de la neutralité, on ne saurait exclure l'action hydrolytique de phospholipases provenant de macrophages altérés par l'anoxie.

	Lécithines ($\mu\text{g/ml}$)	Protéines ($\mu\text{g/ml}$)	L/P
TEMOINS	210	470	0,447
LAPIN 1	46 (- 78 %)	850	0,054
LAPIN 2	54 (- 74 %)	1 000	0,054 (- 88 %)

Tableau VI.9

LECITHINES, PROTEINES ET L/P DANS L'HYPOXIE HYPERCARBOXIQUE
CHEZ LE LAPIN

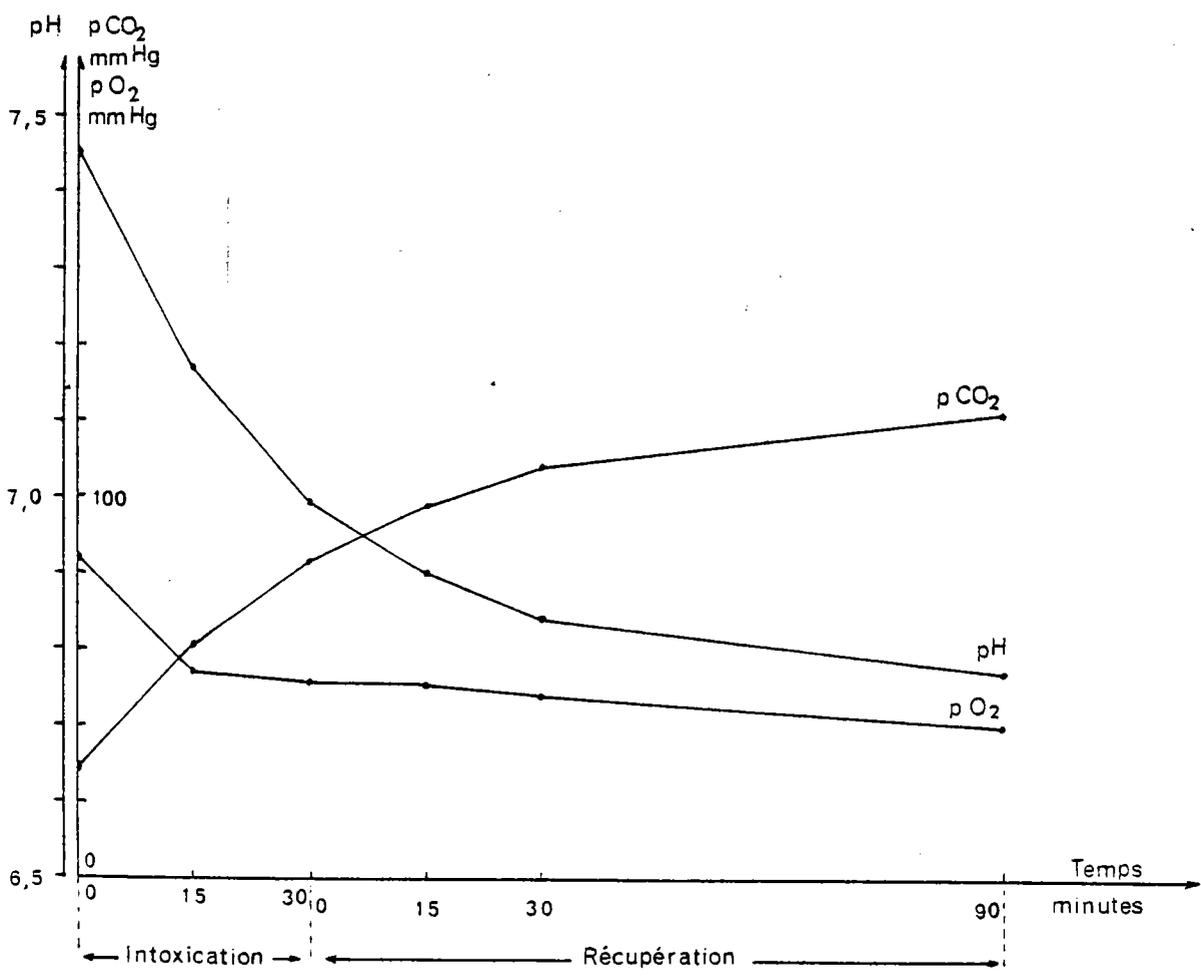
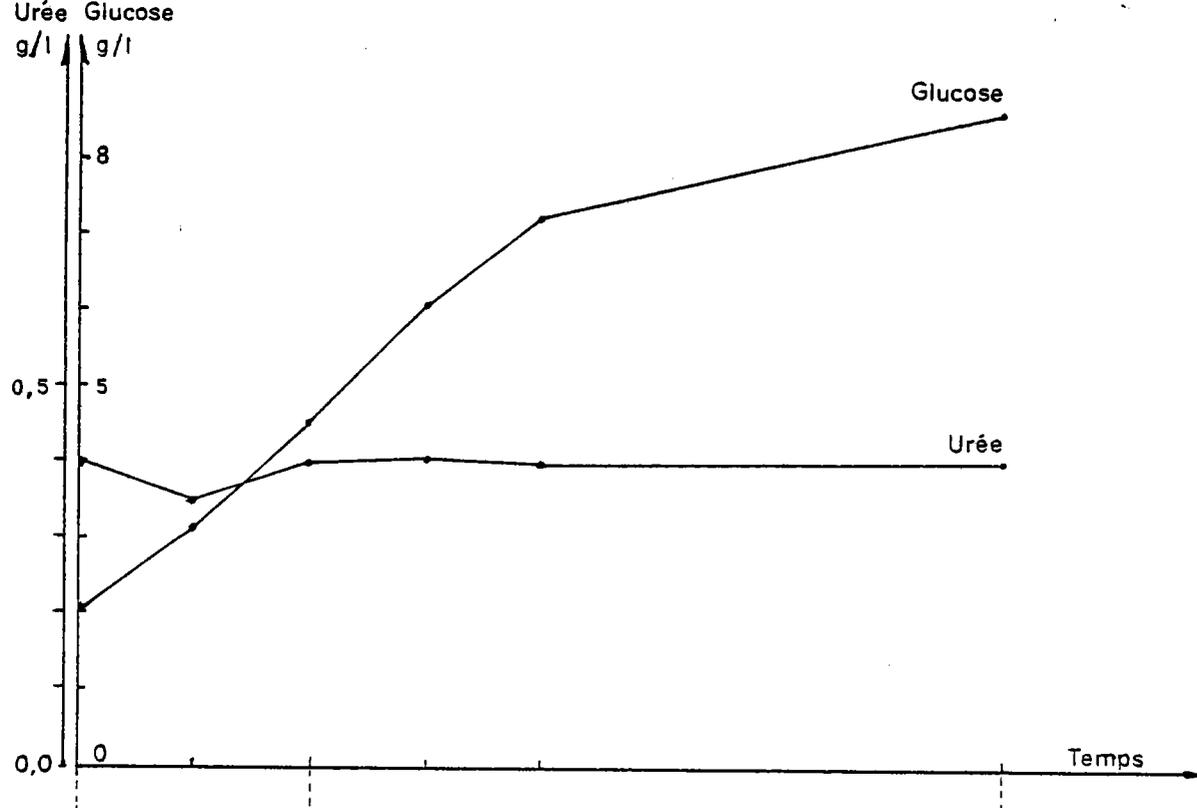


Fig. VI.10

Evolution de certains paramètres sanguins dans l'hypoxie hypercarboxique chez le lapin

1.2 Au niveau sanguin, alors que le taux d'urée reste constant et normal ($0,35 \pm 0,05$) tout au long de l'expérience, celui du glucose croît jusqu'à environ 8 g %₀ (fig. VI.10). On note une importante acidose (pH artériels inférieur à 7) associée à une forte hypercapnie ($p\text{CO}_2 > 100$ mmHg après 90 minutes de récupération). La $p\text{O}_2$ s'abaisse de moitié en moins de 30 minutes et se stabilise à cette valeur (fig. VI.10).

2. Hypoxie par inhalation d'air dilué dans l'azote (hypoxie normocarboxique)

2.1 En diluant de l'air avec de l'azote, nous avons constitué une atmosphère renfermant 8,5 % d' O_2 que 3 lapins ont respiré durant 30 minutes. Au niveau du liquide de lavage broncho-alvéolaire, le taux de lécithine est abaissé de 2 à 2,5 fois (82 $\mu\text{g}/\text{ml}$), celui des protéines très largement augmenté (1 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Le rapport L/P est très abaissé (0,068).

2.2 Au niveau sanguin, la glycémie et l'urée plasmatique restent sensiblement normales. La $p\text{O}_2$ diminue très nettement dans les quinze premières minutes de la phase d'intoxication à la fin de laquelle s'amorce la remontée de ce paramètre qui se confirme au cours de la phase de récupération où d'ailleurs il dépasse ses valeurs de départ. Le pH et la $p\text{CO}_2$ ne sont que peu affectés (fig. VI.11).

Ces perturbations sanguines modérées contrastent avec l'effondrement du rapport L/P témoignant de l'existence de désordres importants au niveau de la barrière alvéolo-capillaire.

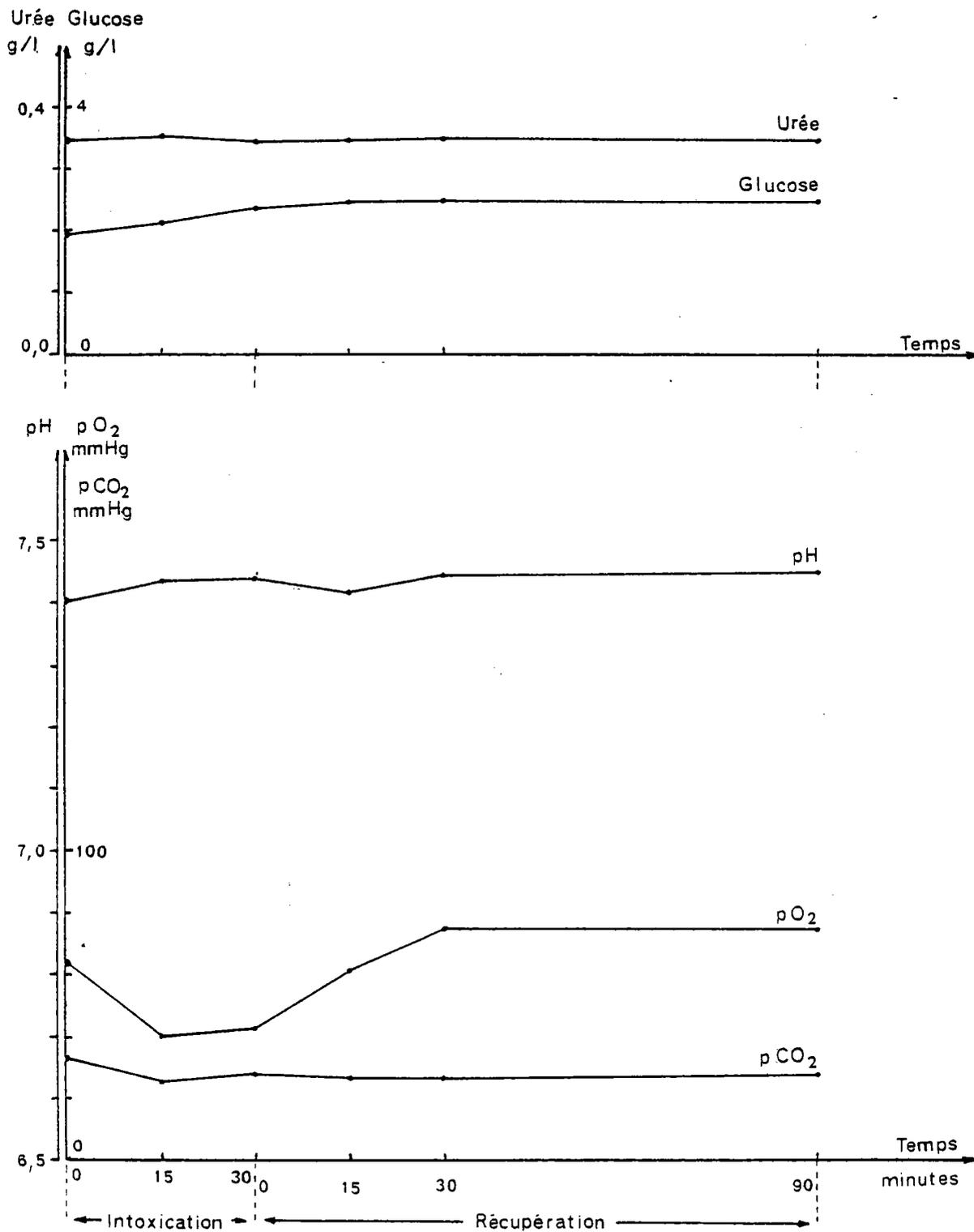


Fig. VI.11

Evolution de certains paramètres sanguins dans l'hypoxie normocarboxique chez le lapin

3. Conclusion

Dans les hypoxies, on observe une baisse importante du rapport L/P résultant à la fois de l'augmentation des concentrations de protéines et d'une forte baisse de celles des lécithines qui est plus marquée dans l'hypoxie hypercarboxique.

Au reflet sanguin modéré de l'hypoxie normocarboxique s'oppose celui, très marqué, de l'hypoxie hypercarboxique qui, en dehors de l'hypercapnie très prononcée, se traduit par l'installation simultanée d'une forte acidose et d'une importante hyperglycémie.

G. – CONCLUSION GENERALE

Dans les agressions aiguës par CO, HCN et HCl gazeux, le rapport L/P des liquides de lavage broncho-alvéolaire s'avère être un paramètre particulièrement sensible dont la diminution apparaît dès le stade infraclinique. La baisse de ce rapport est fonction de l'importance d'un œdème lésionnel qui constitue l'étape initiale de l'agression. L'exsudation des protéines plasmatiques (essentiellement l'albumine) qui en résulte est la cause essentielle de l'altération de ce paramètre, les taux de lécithines restant normaux ou subnormaux, voire nettement augmentés comme c'est le cas avec HCl gazeux.

- * La réponse de ce rapport dans les agressions par CO et HCN est deux fois plus sensible chez le rat que chez le lapin, alors qu'avec HCl, on observe une similitude de réponse.

- * Le caractère très corrosif d'HCl gazeux se traduit par
 - une augmentation très importante, à partir de 6 000 ppm, des concentrations en oses neutres, acide sialique et fucose,

 - une nette augmentation de la concentration en lécithines, ne permettant pas de compenser l'effet de l'exsudation protéique sur le rapport L/P.

- * Dans les hypoxies, l'abaissement important du rapport L/P résulte de la conjugaison d'une augmentation de la concentration en protéines – reflet de la souffrance alvéolo-capillaire – et d'un abaissement du taux des lécithines pour lequel on peut invoquer une action hydrolytique phospholipasique provenant de macrophages altérés par l'anoxie.

* Au cours de toutes ces agressions, il ne faut pas oublier, en dehors de l'action propre au toxique, la réponse générale et plus particulièrement pulmonaire à l'installation d'un état de choc qui se traduit elle aussi par une perméabilité accrue des capillaires.

- VII -

LE RAPPORT L/P DANS LES LIQUIDES
DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE
CHEZ LA SOURIS AU COURS D'AGRES-
SIONS PAR VOIE ENDOGENE

Bien que les aérocontaminants soient les principaux agresseurs de la barrière alvéolo-capillaire, il ne faut pas méconnaître pour autant l'action néfaste, par voie endogène, de nombreux composés à visée thérapeutique ou non.

Ainsi avons-nous étudié chez la souris – pour des raisons de commodité – les modifications du rapport L/P sous l'influence de divers agents :

* **L'alcool éthylique** qui apparaît avec le tabac comme le principal "auto-polluant" délibérément choisi par l'homme.

* **L'acétazolamide** (Diamox*) qui est utilisée de façon discontinue comme diurétique anti-œdémateux favorisant l'excrétion du Na^+ et du K^+ , de façon continue comme sédatif central dans l'épilepsie et le glaucome. C'est un inhibiteur spécifique de l'anhydrase carbonique qui, au niveau des poumons favorise la dissociation de l'acide carbonique en CO_2 et H_2O .

La mise en évidence d'une baisse importante du rapport L/P lors d'hypoxies hypercarboxiques est à l'origine du choix de ce médicament qui induit – de façon quasi-constante lors de traitement prolongés – une acidose métabolique hypercarboxique.

* **La cyclophosphamide** (Endoxan*) qui est un antinéoplasique présentant une action fibrosante dont les conséquences pulmonaires sont d'autant plus marquées que les traitements sont prolongés.

A. – MATERIEL ET METHODES

1. Modalités d'administration des composés étudiés

Nous avons utilisé 40 souris mâles Swiss pesant environ 30 g (± 3) qui ont été réparties en 8 lots (de 5 animaux chacun) dont 2 ont servi de témoins. Aux autres lots, nous avons injecté durant 5 jours consécutifs, par voie intrapéritonéale, les composés suivants :

* **Alcool éthylique :**

5 ml/kg d'éthanol absolu administré en 2 volumes égaux à 9 heures et 18 heures, sous forme d'alcool à 20 % obtenu par dilution de l'éthanol dans le soluté isotonique de NaCl à 9 g ‰.

Cette dose correspond chez l'homme à une consommation quotidienne d'environ 3,5 litres de vin à 10°.

* **Acétazolamide (Diamox^{*})**

La quantité injectée (120 mg/kg) correspond, chez l'homme, à une dose plus forte d'environ 4 fois à celle pouvant être employée en thérapeutique.

Le soluté injectable est préparé à partir d'un flacon de 500 mg de Diamox lyophilisé (Laboratoire Théraplix) solubilisé dans un volume adéquat d'eau distillée.

* **Cyclophosphamide (Endoxan^{*})**

La quantité injectée (200 mg/kg) est couramment employée chez la souris qui est particulièrement résistante à cette antimétabolite. Cette dose est mortelle pour l'homme chez qui on ne dépasse pas 50 mg/kg à raison d'une seule injection par semaine.

Le soluté injectable est préparé à partir d'ampoules d'Endoxan (Laboratoire Lucien) dosées à 100 mg.

2. Conditions du lavage pulmonaire

2.1 * Il a été pratiqué dans 2 conditions expérimentales. Pour chaque composé, nous avons opéré sur 2 groupes de 5 souris dont un seul est l'objet, 5 minutes avant le lavage, d'une **déplétion sanguine importante**.

Cette dernière est obtenue par ponction à vue de la veine cave inférieure de l'animal anesthésié par le nembutal et laparotomisé. 0,6 ml de sang sont ponctionnés, ce qui représente de 20 à 25 % de la masse sanguine normalement estimée à 7,5 % du poids vif.

* Nous avons pensé que cette déplétion brusque pouvait visualiser de façon plus sensible – par l'intermédiaire du rapport L/P – l'action de certaines substances sur la barrière alvéolo-capillaire, qui peut ne pas être révélée en l'absence de déplétion.

* Ainsi, dans le cas d'une fragilisation discrète de la barrière, alors que les mécanismes de compensation ne sont pas encore installés, cette déplétion engendrerait, selon nous, un gradient de pression favorable à la fuite du film liquidien endoalvéolaire vers l'interstitium et le système capillaire.

2.2 Les animaux sont sacrifiés le 5^{ème} jour une heure après la dernière injection du composé étudié, par administration intra-péritonéale de 0,5 ml d'une solution de pentobarbital à 6 g %.

2.3 Les lavages pulmonaires sont effectués dans les conditions habituelles par 4 fois 0,5 ml de soluté isotonique de NaCl à 9 g %.

B. - RESULTATS

1. Témoins

* Chez les souris témoins, non traitées, les liquides de lavage obtenus en l'absence de déplétion sanguine présentent des concentrations en lécithines et protéines et des valeurs du rapport L/P qui ne diffèrent pas significativement de ceux observés dans les liquides recueillis après déplétion (tableau VII.1).

2. Alcool éthylique

2.1 * Les souris s'adaptent très rapidement à l'éthanol. L'état d'ébriété jugé par l'observation de leur comportement, est important lors de la première injection, encore marqué à la deuxième et n'est plus apparent au cours des injections suivantes.

* Il faut peut-être en voir, en partie, l'explication dans une élimination très rapide du toxique par voie pulmonaire du fait de l'installation d'une hyperventilation particulièrement importante.

* Nous avons dosé, dans le sang et le liquide de lavage des souris sacrifiées, l'éthanol par spectrophotométrie à 340 nm en présence d'alcool déshydrogénase et de NAD (BONNISCHEN, 1965). Les concentrations en éthanol des liquides de lavage ($m = 0,53$ g/l valeurs extrêmes 0,45 - 0,70 g/l) sont plus élevées - d'environ 4 à 5 fois - que celles observées dans le sang ($m = 0,12$ g/l, valeurs extrêmes 0,09 - 0,13 g/l). Ces résultats confirment l'importance de l'élimination pulmonaire.

Nous avons vérifié, par cette technique, l'absence d'éthanol dans le sang ($< 0,01$ g/l) et le liquide de lavage des souris témoins.

m (Valeurs extrêmes)	Lécithines µg/ml	Protéines µg/ml	L/P
SOURIS TEMOINS DS - (n = 5)	81,4 (80 - 85)	157,0 (150 - 170)	0,519 (0,470 - 0,548)
ETHANOL DS - (n = 5)	78,8 (60 - 92)	208 (160 - 290)	0,394 (0,262 - 0,550)
ACETAZOLAMIDE DS - (n = 5)	98,2 (70 - 109)	152,6 (135 - 169)	0,651 (0,414 - 0,789)
CYCLOPHOSPHAMIDE DS - (n = 5)	297,6 (238 - 395)	402 (250 - 550)	0,791 (0,525 - 1,067)
SOURIS TEMOINS DS + (n = 5)	82,6 (73 - 90)	153,0 (150 - 165)	0,540 (0,520 - 0,561)
ETHANOL DS + (n = 5)	87,6 (85 - 91)	160 (120 - 220)	0,580 (0,413 - 0,708)
ACETAZOLAMIDE DS + (n = 5)	55,8 (42 - 72)	141,4 (113 - 203)	0,404 (0,305 - 0,553)
CYCLOPHOSPHAMIDE DS + (n = 5)	158,4 (110 - 277)	498,0 (260 - 1 010)	0,379 (0,130 - 0,492)

Tableau VII.1

Concentrations en lécithines, protéines et valeur du rapport L/P des liquides de lavage pulmonaire de souris témoins et des souris traitées par l'éthanol, l'acétazolamide et la cyclophosphamide en l'absence de déplétion sanguine (DS-) et après déplétion sanguine (DS+)

2.2 * Chez la souris au cours d'une intoxication subaiguë, prolongée durant 5 jours, les liquides de lavage après déplétion sanguine ou en son absence, ne présentent pas des concentrations en lécithines et protéines ainsi que des valeurs du rapport L/P significativement différentes de celles observées dans les liquides de lavage des témoins correspondants (tableau VII.1).

Ces résultats sont en accord avec ceux de WAGNER et HEINEMANN (1975) qui n'observent pas, dans le tissu pulmonaire, de différences significatives dans les concentrations en phosphore lipidique entre rats témoins et rats soumis à une ingestion d'éthanol (3,2 g/kg/jour d'éthanol à 40 %) durant 3 jours consécutifs.

Il faut souligner que ces résultats obtenus à la suite d'une intoxication alcoolique subaiguë ne sauraient être extrapolés à des situations d'alcoolisme chronique dans lesquelles un déficit d'incorporation de l'acide palmitique dans les phospholipides – déjà observé par WAGNER et HEINEMANN (1975) – aboutirait, après épuisement progressif des réserves en DPPC des pneumocytes de type II, à l'apparition d'une insuffisance plus ou moins prononcée de surfactant lipidique expliquant notamment, chez l'homme, la diminution de la capacité vitale (EMIRGIL, SOBOL et coll., 1974).

3. Acétazolamide

3.1 A la dose d'acétazolamide utilisée, les souris n'ont présenté qu'une très discrète diminution du pH ($7,43 \pm 0,02 \rightarrow 7,38 \pm 0,015$) et une légère augmentation de la $p\text{CO}_2$ veineuse ($60 \pm 3,5 \rightarrow 69 \pm 4$ mm de Hg).

3.2 Dans les liquides de lavage, en l'absence de déplétion sanguine préalable, les concentrations en lécithines et le rapport L/P ont tendance à croître mais les variations observées ne sont pas statistiquement significatives. Les taux de protéines sont inchangés.

3.3 Après déplétion sanguine, on observe une importante diminution de la concentration en lécithines (- 43 %) seule responsable de l'abaissement significatif ($p < 0,05$) du rapport L/P tableau VII.1).

3.4 Ces résultats indiquent l'existence d'une atteinte de la barrière alvéolo-capillaire par l'acétazolamide - même à dose thérapeutique - qui n'est révélée au niveau du liquide de lavage, par le rapport L/P, qu'après avoir effectué une déplétion sanguine sensibilisatrice. L'action toxique de l'acétazolamide au niveau du poumon a été signalée chez le cobaye après absorption per os durant 8 jours consécutifs d'une dose élevée non thérapeutique (300 mg/kg) entraînant une forte acidose (pH 7,10) au niveau sanguin et une baisse de 36 % des lécithines totales du poumon (MOTLES, VERGARA, OYARZUN et coll., 1971).

4. Cyclophosphamide

4.1 Le nombre très abaissé des leucocytes (- 62 %) et des plaquettes (- 50 %) chez les souris traitées à l'Endoxan atteste de l'efficacité de la dose injectée (tableau VII.2).

	Hématies n. $10^6/\text{mm}^3$	Leucocytes n. $10^3/\text{mm}^3$	Plaquettes n. $10^3/\text{m}^3$
SOURIS TEMOINS	7,80 $\pm 0,16$	5,5 $\pm 0,5$	6,0 $\pm 0,4$
SOURIS Endoxan	7,17 $\pm 0,14$	2,1 $\pm 0,3$	3,1 $\pm 0,1$

Tableau VII.2

PROFIL CYTOLOGIQUE SANGUIN DES SOURIS TEMOINS
ET DES SOURIS TRAITEES PAR L'ENDOXAN

4.2 Dans les liquides de lavage pulmonaire des souris traitées par la cyclophosphamide en l'absence de déplétion sanguine, on observe une forte augmentation des concentrations en protéines (+ 156 %) et plus fortes encore en lécithines (+ 265 %) entraînant une augmentation du rapport L/P (+ 52 %). Il semble que ce tableau biologique soit le reflet de l'action toxique de ce composé sur les fragiles pneumocytes de type I qui sont remplacés par une prolifération de pneumocytes II plus résistants et dont on sait qu'ils produisent la DPPC.

4.3 Après déplétion sanguine, la concentration en lécithines est encore augmentée par rapport au témoin (+ 92 %) mais dans une moindre proportion que dans le cas précédent, alors que l'élévation du taux de protéines est supérieure (+ 225 %). En conséquence, le rapport L/P se trouve nettement abaissé (- 30 %). Cette forte augmentation de la concentration protéique traduit certainement une atteinte importante de la barrière alvéolo-capillaire que la déplétion sanguine exacerbe.

Le phénomène d'aspiration vers l'interstitium et les capillaires que semble réaliser cette manœuvre, limite logiquement les concentrations de lécithines dans les liquides de lavage. Ce n'est pas le cas des protéines dont on ne peut que constater pour l'instant, le comportement différent.

C. - CONCLUSION

1. L'agression de la barrière alvéolo-capillaire par des substances apportées par voie endogène mérite une attention toute particulière. En effet, ROSENOW (1976) indique que tout une série de composés sont susceptibles d'être à l'origine de manifestations pulmonaires. Il s'agit de composés très variés tels que des **stupéfiants** comme l'héroïne et le haschisch, des **contraceptifs oraux** ainsi que des **médicaments** d'utilisation fréquente :

- * **Antibiotiques** : pénicilline, streptomycine, néomycine, gentamycine,
- * **Analgésiques** : aspirine, indométhacine, méthadone
- * **Stéroïdes hormonaux** : corticostéroïdes,
- * **Composés à effets neuro-vasculaires** : diphenylhydantoïne, hexaméthonium, propranolol.

Si, pour la plupart de ces composés, des réactions d'hypersensibilité au niveau pulmonaire ont été invoquées, elles n'ont été que rarement démontrées (ROSENOW, 1976). Cela conduit donc à envisager la possibilité d'une action moléculaire directe de ces composés au niveau même des structures alvéolo-capillaires.

Bien que la fragilisation de cette barrière d'échanges puisse être directement observable dans certains cas, par l'étude du rapport L/P dans les liquides de lavage de poumons d'animaux sacrifiés sans préparation, la **déplétion sanguine** préalable de l'animal a le **grand intérêt de sensibiliser** le phénomène et de révéler des **pathologies respiratoires iatrogènes plus discrètes**.

2. Dans l'intoxication alcoolique subaiguë, de courte durée (5 jours), l'étude des liquides de lavage obtenus, qu'il y ait eu déplétion sanguine ou non, ne permet pas d'envisager une fragilisation de la barrière alvéolo-capillaire, le rapport L/P restant normal.

- * Dans le cas de l'acétazolamide par contre la déplétion sanguine est nécessaire pour visualiser une atteinte intime de cette structure.

- * En ce qui concerne la cyclophosphamide, l'importance des effets de l'agression ne nécessite pas pour porter le diagnostic, la mise en œuvre de la déplétion sanguine préalable au lavage pulmonaire qui ne garde alors son intérêt qu'à titre de confirmation.

- VIII -

LE LIQUIDE DE LAVAGE BRONCHO-
ALVEOLAIRE DANS DES CAS DE
TABAGISME, D'ASBESTOSE ET DE
SILICOSE CHEZ L'HOMME

* Dans cette partie de notre travail, nous établissons chez l'homme, à partir de 6 adultes volontaires, le profil biologique normal du liquide de lavage broncho-alvéolaire en fonction du protocole de lavage et des paramètres que nous avons retenus. Nous indiquons les modifications de ce profil observées dans des cas de tabagisme (9 adultes volontaires) d'asbestose (n = 6) et de silicose (n = 6).

* Mise à part la difficulté de pouvoir disposer de sujets témoins, cette étude implique une parfaite coopération des sujets étudiés en ce qui concerne l'enquête indispensable visant à préciser les modalités de l'imprégnation tabagique ou de l'empoussièrage.

- VIII-1 -

**LE LIQUIDE DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE
CHEZ DES ADULTES SAINS NON FUMEURS
ET FUMEURS**

* **L'aérosol tabagique est un aéropolluant majeur** de composition particulièrement complexe. Il renferme environ 3 000 substances dont un grand nombre sont mutagènes et/ou carcinogènes. A côté du constituant principal qu'est **l'oxyde de carbone** on y rencontre **l'acroléine** – aldehyde se fixant sur les ac. nucléiques en les altérant de façon irréversible – ainsi que des hydrocarbures polycycliques comme le **benzo 3-4 pyrène** dont l'action carcinogène est synergisée par la nicotine (WEBER, COON et TRIOLO, 1974) qui est un inhibiteur de la benzopyrène hydroxylase pulmonaire, hépatique et grêlique.

* **L'aérosol tabagique** constitue donc un **ensemble complexe d'agression** dont la variabilité et l'intensité d'action sont liés :

- à la nature du tabac,
- aux modalités de consommation (cigarette, cigare, pipe, inhalation ou non de l'aérosol, utilisation ou non d'un filtre),
- à l'importance de la consommation,
- à l'action synergisante – importante en milieu urbain – d'autres aérocontaminants majeurs, notamment SO_2 ,
- à l'existence de facteurs héréditaires individuels de tolérance (WEBSTER, LORIMER, MAN et coll., 1979)

* **L'action pathogène des fumées de tabac se manifeste**

- au niveau du système respiratoire où l'on observe que la bronchite chronique est huit fois plus fréquente chez les adultes fumeurs que chez les non-fumeurs,
- au niveau du système cardio-vasculaire où sont accélérés les processus athérogènes.

Elle intervient, par ailleurs, de façon très significative dans l'induction de certains cancers (carcinomes broncho-pulmonaires).

* **L'imprégnation tabagique**, chez l'homme, est évaluée en "**paquet-année**" (P.A.). Ce mode d'expression, utilisé en cancérologie, est basé sur le fait que la probabilité de survenue d'un processus tumoral pulmonaire est liée à la quantité totale de tabac consommé. Cet indice cumulatif d'imprégnation tabagique correspond au produit de la consommation quotidienne par la durée d'imprégnation.

Dans les études expérimentales, la nécessité d'objectiver le niveau de l'agression tabagique implique le recours à des paramètres plus fiables que cet indice.

Bien que la **nicotémie sanguine** soit le témoin le plus spécifique de cette agression, c'est au pourcentage de **carboxy-hémoglobine dans le sang** (% HbCO) que l'on se réfère du fait de sa facile détermination. Nous l'avons déterminé par une méthode spectrophotométrique différentielle (COMMINS et LAWATHER, 1965) : une dilution de sang (0,01 ml) dans l'ammoniaque à 0,04 % est divisée en deux parties aliquotes. On fait barboter de l'oxygène dans l'un des sous-échantillons de manière à convertir COHb en O₂Hb. On compare à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau (de préférence) les spectres du sous-échantillon non traité et du sous-échantillon privé de COHb, les différences de densités optiques à 419,3 nm (maximum d'absorption très sensible de COHb) étant d'autant plus importantes que le pourcentage de COHb est élevé.

Par cette méthode, chez les sujets non fumeurs, le pourcentage d'HbCO a toujours été inférieur à 0,80 %.

A. – SUJETS ETUDIÉS

1. Les lavages broncho-alvéolaires ont été réalisés chez 15 adultes sains, volontaires se répartissant comme suit :

* 6 non fumeurs (4 hommes et 2 femmes) âgés de 23 à 25 ans, ne présentant aucune symptomatologie fonctionnelle respiratoire et dont les radiographies thoraciques sont normales, qui constituent le groupe "Témoins non fumeurs".

* 2 sujets fumant moins de 4 cigarettes par jour : il s'agit de 2 femmes âgées de 23 ans.

* 2 anciens fumeurs

L'un âgé de 50 ans présente une imprégnation tabagique de 66 P.A. et ne fume plus depuis 18 mois.

L'autre âgé de 21 ans a cessé de fumer depuis 2,5 mois et présente une imprégnation tabagique de 6,5 P.A.

* 5 fumeurs dont l'imprégnation tabagique est comprise entre 9 et 20 P.A. ($m = 15,4$) constituent le groupe "Témoins Fumeurs".

2. Les fumeurs étudiés présentent au moment de l'exploration un pourcentage sanguin d'HbCO ($m = 1,36$ % valeurs extrêmes 1,20 – 1,60) supérieur d'environ 2 fois à celui des non fumeurs ($m = 0,65$ % valeurs extrêmes 0,45 – 0,80). Soulignons que les fumeurs se sont abstenus 8 à 12 heures avant l'épreuve et qu'aucun d'entre eux n'était polyglobulique.

Les deux sujets ayant cessé de fumer présentent des pourcentages d'HbCO normaux (0,55 et 0,75 %) alors que ceux des sujets fumant moins de 4 cigarettes par jour étaient faiblement augmentés (0,85 et 0,95 %).

* Chez les non-fumeurs, le pourcentage de récupération des liquides de lavage est de 68 %. (Valeurs extrêmes 50 – 85 %). Il est abaissé d'environ 50 % chez les fumeurs ($m = 33,4\%$ valeurs extrêmes 25 – 60 %). Des pourcentages normaux (50 à 55 %) de récupération sont notés chez les fumeurs ayant cessé de fumer et les petits fumeurs.

B. - MODIFICATIONS BIOCHIMIQUES

1. Nous allons envisager tout d'abord l'incidence du tabagisme sur les paramètres majeurs suivants reflétant :

- * la perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire (Albumine, K^+)
- * l'état global du film endo-alvéolaire (lécithines, protéines, rapport L/P)
- * le niveau d'adaptation des défenses immunitaires locales (Ig G, Ig A)

1.1 Paramètres de perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire (tableau VIII.1)

1.1-1 N'étant pas synthétisée par l'alvéole, l'albumine rencontrée dans les liquides de lavage provient exclusivement du secteur vasculaire. Sa concentration dans les liquides de lavage est le témoin le plus sûr de la transsudation protéique. Bien que dans la majorité des cas le taux de protéines fournisse une approche très satisfaisante de ce phénomène, on ne saurait oublier pour autant qu'il globalise les deux processus indépendants que sont cette filtration protéique et la synthèse au niveau de l'alvéole d'immunoglobulines (Ig G essentiellement), témoin des défenses immunitaires locales.

Les concentrations en albumine des liquides de lavage des fumeurs et des non-fumeurs ne sont pas significativement différentes. On peut donc en conclure que dans l'agression tabagique, la filtration pinocytaire n'est pas activée et qu'il ne doit pas, localement, y avoir de lésion capillaire suffisante pour entraîner un passage de cette protéine par les pores.

1.1-2 La filtration du K^+ est amplifiée d'environ 2 fois chez les fumeurs. Chez le sujet n° 1 ayant cessé de fumer depuis 18 mois, le taux élevé de K^+ peut être considéré comme une séquelle de son importante imprégnation tabagique antérieure (66 P.A.)

	Non fumeurs n = 6 m Valeurs extrêmes	Fumeurs ayant cessé de fumer n = 2	Petits fumeurs n = 2	Fumeurs n = 5	P
ALBUMINE µg/ml	53,8 (23 - 75)	n° 1 30 n° 2 70	n° 1 90 n° 2 45	82,6 (48 - 115)	NS
K ⁺ mEq/l	0,29 (0,20 - 0,45)	n° 1 0,60 n° 2 0,20	n° 1 0,40 n° 2 0,45	0,65 (0,40 - 0,85)	< 0,001
INDICE ^{JAL} ALBUMINO- POTASSIQUE	14,8 (5,7 - 17,5)	n° 1 18 n° 2 14	n° 1 36 n° 2 20,2	54,7 (19,2 - 69)	< 0,001
LECITHINES µg/ml	20,6 (15,2 - 33,6)	n° 1 10 n° 2 18,1	n° 1 19,7 n° 2 19,5	10,7 (9,1 - 11,7)	< 0,001
PROTEINES TOTALES µg/ml	136,6 (90 - 150)	n° 1 110 n° 2 160	n° 1 150 n° 2 230	148,0 (90 - 170)	NS
L/P	0,149 (0,126 - 0,176)	n° 1 0,091 n° 2 0,113	n° 1 0,131 n° 2 0,084	0,075 (0,061 - 0,101)	< 0,001

Tableau VII.1

PERMABILITE ET ETAT GLOBAL DE LA BARRIERE ALVEOLO-CAPILLAIRE
CHEZ LES NON-FUMEURS ET FUMEURS

lecithines 20,6 µg/ml
deux 200 = 4120 µg = 4,120 mg pour 2,5 m²
 → 1,65 mg/m²
proteines 136,6 µg/ml
deux 200 → 27320 µg → 27,32 mg
 27,32 / 2,5 = 10,93

L'inexistence de corrélation entre les taux de K^+ et d'albumine n'est pas surprenante dans la mesure où l'on sait que ces deux composés ont des mécanismes différents de filtration : passage du K^+ par les pores inter-endothéliaux, de l'albumine par pinocytose et par les pores distendus lors des œdèmes exsudatifs.

1.1-3 A partir de ces données et en admettant que la présence de K^+ dans le liquide alvéolaire provienne essentiellement de la filtration à travers la barrière alvéolo-capillaire, nous proposons un **indice de perméabilité albumino-potassique** (I_{AP}) correspondant au produit des concentrations d'Albumine (en $\mu\text{g/ml}$) et de K^+ (en mEq/l). De 14,8 (valeurs extrêmes 5,7 – 17,5) chez les non fumeurs, cet indice est significativement augmenté chez les fumeurs (54,7 valeurs extrêmes 19,2 – 69). Chez les petits fumeurs, son augmentation bien que moins considérable (30 et 20,2) n'en est pas moins, elle aussi, significative.

1.2 Le rapport des concentrations en lécithines et protéines

Il constitue le paramètre central de l'exploration chimique des liquides de lavage. Il permet d'apprécier la charge en surfactant lipidique, la filtration protéique et l'état de la barrière alvéolo-capillaire, étant donné sa corrélation avec le test de diffusion du CO .

* Alors que les concentrations en protéines ne présentent pas de différences significatives entre fumeurs et non fumeurs, celles en lécithines sont par contre très significativement abaissées chez les fumeurs, et ce, d'environ 50 % ($m = 10,7 \mu\text{g/ml}$, valeurs extrêmes 9,1 – 11,7).

il faudrait mû c q il y avait des fumeurs N° 1

par et m
des concentrations
à fumeurs
causent

* Le rapport L/P des fumeurs ($m = 0,075$ valeurs extrêmes $0,061 - 0,101$) est significativement plus bas que celui des non fumeurs ($m = 0,149$ valeurs extrêmes $0,126 - 0,176$) (tableau VIII.1). Sa diminution chez le fumeur résulte essentiellement de l'effondrement du taux des lécithines qui peut être la conséquence soit d'une réduction de leur synthèse ou plus vraisemblablement - du fait de l'amplification de la phagocytose (FINLEY et LADMAN, 1972) - d'une élimination accrue par les macrophages qui sont beaucoup plus nombreux (tableau VIII.7).

* Le choix de ce paramètre se justifie par :



- sa sensibilité satisfaisante (L/P non fumeurs / L/P fumeurs $\neq 2$)
- par la relativement faible valeur de son coefficient de variation ($0,126$ chez les non fumeurs, $0,200$ chez les fumeurs)
- par le caractère global de l'information qu'il fournit sur l'état de la barrière alvéolo-capillaire. Il a en effet été montré que chez les fumeurs, le degré d'emphysème était négativement corrélié avec la capacité de transfert du CO (BEREND, WOOLCOCK et MARLIN, 1979) elle-même, comme nous l'avons vu, corréliée avec le rapport L/P.

* Nous n'avons pas retenu le rapport L/I_{AP} qui, bien qu'étant de 6 à 7 fois plus sensible ($1,55$ chez les non fumeurs, $0,23$ chez les fumeurs) que le rapport L/P, est plus limité dans l'information qu'il apporte et présente un coefficient de variation beaucoup plus important ($0,45$ pour les non fumeurs, $0,56$ pour les fumeurs).

indice alvéolaire

	Non fumeurs n = 6 m (Valeurs extrêmes)	Fumeurs ayant cessé de fumer n = 2	Petits fumeurs n = 2	Fumeurs n = 5	P
Ig G µg/ml	7,6 (6 - 12)	n° 1 11 n° 2 19	n° 1 9 n° 2 12	28,8 (9 - 55)	< 0,05
Ig A µg/ml	5,4 (4 - 10)	n° 1 7 n° 2 6,5	n° 1 5 n° 2 6	8,9 (4 - 22)	NS
Ig G/PROTEINES	0,056 (0,040 - 0,077)	n° 1 0,100 n° 2 0,118	n° 1 0,060 n° 2 0,052	0,184 (0,100 - 0,323)	< 0,001
Ig A/PROTEINES	0,038 (0,026 - 0,052)	n° 1 0,063 n° 2 0,040	n° 1 0,033 n° 2 0,026	0,057 (0,035 - 0,129)	NS
Ig G/Ig A	1,45 (1,20 - 1,75)	n° 1 1,57 n° 2 2,92	n° 1 1,8 n° 2 2	3,51 (2,25 - 6,15)	< 0,001

Tableau VIII.2

DEFENSE IMMUNITAIRE ALVEOLAIRE DANS LE TABAGISME

1.3 Les paramètres retenus pour visualiser le niveau de la défense immunitaire alvéolaire sont les taux d'Ig G et d'Ig A, ainsi que les rapports Ig G/Protéines et Ig A/Protéines (Tableau VIII.2)

1.3-1 L'agression tabagique entraîne au niveau alvéolaire, une réaction de défense immunitaire dans laquelle ne sont impliquées que les Ig G dont les concentrations et les rapports Ig G/Protéines sont très significativement augmentés. Chez les petits fumeurs, ces 2 paramètres ont des valeurs qui se situent à la limite supérieure de la normale. Chez les sujets ayant cessé de fumer, les rapports Ig G/Protéines tout comme les nombres de cellules par mm^3 , restent augmentés (tableau VIII.7) et apparaissent comme les témoins d'un passé tabagique.

1.3-2 Les Ig A ne donnent lieu à aucune variation statistiquement significative. Il en résulte que le rapport Ig G/Ig A qui authentifie le caractère plus alvéolaire que bronchiolaire du lavage – est significativement augmenté (non fumeurs $m = 1,45$ valeurs extrêmes 1,20 – 1,75 ; fumeurs $m = 3,51$ valeurs extrêmes 2,25 – 6,15).

1.3-3 Entre fumeurs et non fumeurs, nous n'avons pas observé, dans le sérum, de différence significative du taux des protéines totales, de l'albumine, des Ig G et des Ig A (tableau VIII.3)

(g/l)	Protéines totales m (valeurs extrêmes)	Albumine	Ig G	Ig A
NON FUMEURS ($n = 6$)	68,7 (63 – 76)	40,3 (36 – 45)	12,2 (9,8 – 12,9)	1,82 (1,25 – 2,12)
FUMEURS ($n = 5$)	69,3 (62 – 75)	41,0 (37,5 – 44,5)	11,9 (9,3 – 12,6)	1,74 (1,12 – 1,96)

Tableau VIII.3

SIMILITUDE DES PROFILS PROTEIQUES SÉRIFIQUES
DES SUJETS NON FUMEURS ET NON FUMEURS

* Le fait que le rapport Ig G/Albumine dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire des fumeurs ($m = 0,348$) soit supérieur d'environ 2,5 fois à celui des non-fumeurs ($m = 0,141$) est en faveur d'une production locale d'Ig G au cours de l'agression tabagique. Cela est d'autant plus vrai que les taux d'albumine et de protéines dans les lavages ne sont pas significativement différents (excluant ainsi la présence d'un processus exsudatif) non plus que les rapports Ig G/Albumine dans le sérum.

* De la comparaison des rapports sériques et alvéolaires Ig A/Albumine – dont on sait qu'ils ne sont pas modifiés dans le tabagisme (tableau VIII.2 et 3) – il ressort que la production d'Ig A ne peut être que locale, le rapport alvéolaire étant 2,5 fois plus élevé que celui noté dans le sérum (tableau VIII.4).

	Sérum		Liquide de lavage alvéolaire	
	<u>Ig G</u> ALBUMINE	<u>Ig A</u> ALBUMINE	<u>Ig G</u> ALBUMINE	<u>Ig A</u> ALBUMINE
NON FUMEURS (n = 6)	0,302	0,045	0,141	0,100
FUMEURS (n = 5)	0,290	0,042	0,348	0,107

Tableau VIII.4

RAPPORTS SERIQUES ET ALVEOLAIRES Ig G/ALBUMINE ET Ig A/ALBUMINE

2. Paramètres complémentaires

* A côté des paramètres précédemment envisagés, considérés comme majeurs du fait de l'importance de l'information bioclinique qu'ils apportent, nous pensons qu'une place doit être faite – dans le cadre d'une exploration approfondie – à certains paramètres complémentaires permettant, éventuellement, de mieux mettre en évidence des situations pathologiques infra-cliniques qui sont l'une des caractéristiques de la pathologie de l'environnement. La très grande diversité des paramètres ainsi envisageables (α_1 -anti trypsine, lactoferrine, enzyme de conversion, cholestérol, triglycérides, hydroxyproline, etc...) implique des choix étayés par un faisceau de données environnementales cliniques, radiologiques et biologiques.

* Dans le cadre du tabagisme, nous en avons envisagé quelques-uns dont l'intérêt est très variable et fait une place particulière à l'**hydroxyproline**.

2.1 Le pourcentage de lécithines saturées par rapport aux lécithines totales, les concentrations en cholestérol libre, triglycérides et malonaldehyde ne sont pas l'objet de variations significatives (tableau VIII.5)

m (Valeurs extrêmes)	Pourcentage des Lécithines saturées	Cholestérol libre ($\mu\text{g/ml}$)	Triglycérides ($\mu\text{g/ml}$)	Malonaldehyde nMole/ml
NON FUMEURS	57,6 (45,1 – 65,0)	6,9 (3,8 – 8,9)	8,1 (3,1 – 18,5)	0,41 (0,20 – 0,70)
FUMEURS	50,3 (44,4 – 64,8)	6,5 (4,3 – 10,5)	5,4 (2,8 – 7,8)	0,46 (0,22 – 0,80)

Tableau VIII.5

PARAMETRES LIPIDIQUES MINEURS ET MALONALDEHYDE
DANS LES LIQUIDES DE LAVAGE DE FUMEURS ET NON FUMEURS

Une remarque doit être faite à propos des dosages de malonaldehyde qui nous sont apparus assez décevants dans la mesure où nous pensions y voir un témoin, au niveau du film alvéolaire, de l'oxydation des lipides et de son imprégnation par l'acroléine ($\text{CH}_2 = \text{CH} - \text{CHO}$) qui est un constituant des aérosols tabagiques. En effet, si l'oxydation des doubles liaisons non conjuguées (systèmes maloniques $-\text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} = \text{CH} -$) des acides gras poly insaturés peut aboutir à la formation de MDA réagissant avec l'acide thiobarbiturique, il n'empêche que d'autres aldehydes et plus particulièrement l'acroléine peuvent donner lieu au même type de réaction aboutissant à la formation d'un chromogène dont le maximum d'absorption est lui aussi à 532 nm (SCHMIDT, 1959a).

2.2 * La présence des Ig M est inconstante que ce soit chez les fumeurs et les non-fumeurs. Les taux retrouvés correspondent à des traces de l'ordre de 0,5 à 1 mg/l.

* Pouvant être considérée comme absente des liquides de lavage de sujets non fumeurs (0 ou $< 0,5$ nMole/mg de Protéines), l'hydroxyproline y a été mise en évidence à la concentration de 8,3 nMoles/mg de protéines chez une femme de 25 ans fumant 30 à 40 cigarettes par jour. Cette femme présentait un rapport Ig G/Protéines (0,250) et un nombre de cellules par mm^3 (2010) particulièrement élevés témoignant de l'importance du tabagisme. Cette présence d'hydroxyproline peut être la conséquence de l'association ou non, d'une hypersécrétion réactionnelle d'alvéolines et d'une atteinte interstitielle résultant de la libération de collagenase et d'élastase à partir de cellules altérées par l'agression (plus particulièrement les macrophages et les leucocytes).

La perte progressive de l'élasticité alvéolaire par atteinte de l'interstitium alvéolaire, est à l'origine de l'emphysème qui se traduit par une dilatation exagérée et permanente des alvéoles pulmonaires pouvant aller jusqu'à la rupture. La fumée de cigarette est reconnue comme étant un facteur favorisant le développement de l'emphysème pulmonaire chez l'homme (AUERBACH, HAMMOND, GARFINKEL et coll., 1972). Ainsi a-t-on été amené à rechercher le mécanisme par lequel la fumée de cigarette peut favoriser l'excès d'activités protéasiques libres dans le poumon. JANOFF et CARP (1977) ont étudié in vitro la levée de l'inhibition des élastases leucocytaires par l' α_1 -antitrypsine, le sérum et les liquides de lavage pulmonaire sous l'action des produits de condensation des fumées de cigarettes qui par ailleurs sont incapables de lever l'inhibition par la chloro méthylcétone inactivateur spécifique de l'élastase.

L'acroléine et la nicotine n'ayant pas été reconnues responsables de cette levée d'inhibition pouvant, selon nous, justifier la présence d'hydroxyproline dans les liquides de lavage pulmonaires des grands fumeurs, nous avons pensé à l'éventualité d'une action du malonaldehyde pouvant résulter de l'action oxydante des composés NOx contenus dans les aérosols tabagiques. Cette hypothèse semble infirmée par l'inexistence de différences significatives entre les taux de malonaldehyde des liquides de lavage alvéolaire de fumeurs et non-fumeurs (Tableau VIII.5). D'autres constituants de l'aérosol tels que l'acide cyanhydrique, les composés NOx, les ions cadmiques mériteraient d'être testés vis-à-vis de cette levée de l'inhibition antiprotéasique bien qu'actuellement certains pensent que la rupture de l'équilibre protéase/antiprotéase soit le fait d'une activation phagocytaire aboutissant à une élaboration accrue d'enzymes protéolytiques et plus particulièrement d'élastase (BRAIN, GOLDE, GREEN et coll., 1978).

Ainsi, la présence d'hydroxyproline dans les liquides de lavage pulmonaire pourrait être le témoin d'un déséquilibre de la balance protéase/antiprotéase alvéolaire.

2.3 Au niveau des paramètres glucidiques, l'augmentation significative de la concentration en oses neutres totaux dans les liquides de lavage de fumeurs (tableau VII.6) est la conséquence, à l'étage bronchiolaire, d'une hyperproduction réactionnelle de mucines qui a été particulièrement bien étudié très récemment sur les plans histochimique (HAYASHI, SORNBERGER, HUBER et coll., 1979) et biochimique (HAMOSH, SHECHTER et HAMOSH, 1979).

Considérant la technologie de lavage pulmonaire adoptée, dans laquelle les 50 premiers ml récupérés sont éliminés du fait de leur caractère plus bronchiolaire qu'alvéolaire, nos concentrations en oses neutres, acide sialique et fucose sont très certainement entachées d'erreurs par défaut.

*or que dit
de l'erreur!*

m (µg/ml) (Valeurs extrêmes)	NON FUMEURS (n = 6)	FUMEURS (n = 5)	p
OSSES NEUTRES	6,5 (4 - 15)	27,4 (15 - 47)	< 0,02
ACIDE SIALIQUE	0,73 (0,4 - 1,0)	2,03 (0,55 - 6,10)	NS
FUCOSE	1,65 (0,80 - 3,7)	1,99 (0,60 - 3,85)	NS

Tableau VII.6

OSSES NEUTRES TOTAUX, ACIDE SIALIQUE ET FUCOSE
DANS LES LIQUIDES DE LAVAGE DE FUMEURS ET DE NON FUMEURS

C. - MODIFICATIONS CYTOLOGIQUES

Chez les fumeurs, on observe un accroissement particulièrement important du nombre de cellules par mm^3 concernant essentiellement les macrophages et de façon plus modeste les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes (tableau VIII.7).

- * Nous avons préféré l'expression en éléments par mm^3 qui visualise parfaitement la grande variabilité des résultats à celle en pourcentage pour laquelle macrophages, lymphocytes et polynucléaires neutrophiles, chez les fumeurs et les non fumeurs ne sont pas significativement différents.

- * L'importance de la réaction macrophagique signe la pénétration dans l'alvéole de la phase particulaire fine de l'aérosol tabagique. Le macrophage, cellule fondamentale de la défense alvéolaire (GREEN, JAKAB et LOW, 1977) apparaît comme la cellule cible sur laquelle cet aérosol exerce une action toxique élective qui aboutit à des modifications morphologiques (PRATT, FINLEY, SMITH et coll., 1969 - CHRETIEN, THIEBLEMONT, MASSE et coll., 1975 - BRODY et CRAIGHEAD, 1975). Ainsi observe-t-on des supermacrophages parfois multinuclées, présentant un réticulum endoplasmique hypertrophié et des mitochondries aux crêtes épaisses.

- * La présence inconstante (2 cas sur 5) dans les liquides de lavage de fumeurs de polynucléaires éosinophiles témoigne de la possibilité du développement d'un **processus immunoallergique** dans le tabagisme.

- * Nous avons remarqué que la réponse cellulaire à l'agression tabagique était particulièrement sensible et durable. En effet, elle est déjà notable chez les petits fumeurs et encore importante chez les fumeurs ayant cessé de fumer où elle apparaît comme une séquelle de l'imprégnation tabagique.

Dans une étude épidémiologique sur le cancer du poumon, WYNDER, MABUCHI et BEATTIE (1970) indiquent qu'après la cessation de fumer il faut 13 ans pour que la muqueuse bronchique redevienne normale et que le risque de cancer pulmonaire soit identique à celui des non fumeurs.

- * Chez les non-fumeurs, nous avons, dans les liquides de lavage, noté une corrélation très satisfaisante entre le nombre de lymphocytes par mm^3 et les concentrations en Ig G ($r = 0,932$) qui n'a pas été retrouvée dans le groupe des fumeurs. Cette dissociation chez ces derniers pourrait être, par exemple la conséquence d'une déficience de la transformation des lymphocytes B en plasmocytes sécrétants.

CYTOLOGIE	Témoins non fumeurs (n = 6) m (Valeurs extrêmes)	Fumeurs ayant cessé de fumer (n = 2)	Petits fumeurs (n = 2)	Fumeurs n = 5
CELLULES par mm ³	95,3 (82 - 109)	n° 1 360 n° 2 280	n° 1 230 n° 2 150	1 743 (300 - 3 100)
par mm ³ MACROPHAGES	83,5 (66 - 105)	n° 1 339 n° 2 258	n° 1 212 n° 2 143	1 590 (259 - 2 945)
en %	87 (76 - 95)	n° 1 94 n° 2 92	n° 1 92 n° 2 95	91,2 (85 - 96)
par mm ³ LYMPHOCYTES	9,6 (5 - 19)	n° 1 14 n° 2 17	n° 1 14 n° 2 6	83,6 (9 - 270)
en %	10,5 (5 - 19)	n° 1 4 n° 2 6	n° 1 6 n° 2 4	5,6 (2 - 12)
par mm ³ POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES	2,3 (0 - 5)	n° 1 7 n° 2 5	n° 1 4 n° 2 1	50,6 (3 - 150)
en %	2,5 (0 - 5)	n° 1 2 n° 2 2	n° 1 2 n° 2 1	2,6 (1 - 5)
par mm ³ POLYNUCLEAIRES EOSINOPHILES	0	0	0	30 - 62
en %	0	0	0	1 - 2

Tableau VII.7

FORMULE CELLULAIRE DU LIQUIDE DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE
CHEZ LES FUMEURS ET LES NON FUMEURS SAINS

D. – COMPARAISON AVEC LES DONNEES TIREES DE LA LITTERATURE

1. Nous n'avons recensé dans la littérature que cinq publications (REYNOLDS, NEWBALL, 1976 – REYNOLDS, FULMER, KAZMIEROWSKI, 1977 – WARR, MARTIN, SHARP et coll., 1977 – LOW, DAVIS et GIANCOLA, 1978 – HAYEM, SCHARFMAN, LAINE et coll., Juillet 1979), portant sur l'étude biologique des liquides de lavage broncho-alvéolaire dans le tabagisme. Il semble que cet état de fait soit exclusivement lié à la nécessité d'un volontariat.
 - * Si tous ces travaux fournissent des indications plus ou moins complètes sur la cellularité, les protéines totales, les Ig G et les Ig A, un seul présente des résultats sur les fractions lipidiques (LOW, DAVIS et GIANCOLA, 1978).

2. * Considérant l'hétérogénéité des groupes étudiés, la diversité des procédures de lavage et des techniques de dosage, le seul mode de comparaison possible nous semble être celui portant sur les rapports protéiques, qui dans certains cas ont été calculés à partir des données fournies par les auteurs (tableau VIII.8).

	Albumine/Protéines		Ig G/Protéines		Ig A/Protéines	
	NF	F	NF	F	NF	F
REYNOLDS ET NEWBALL (1976) NF n = 5 F n = 5	0,338	0,273	0,040	0,092	0,216	0,142
REYNOLDS, FULMER et coll. (1977) NF n = 11 F n = 21	0,447	0,400	-	-	-	-
WARR, MARTIN et coll. (1977) NF n = 15 F n = 11	0,390	0,450	0,133	0,236	0,233	0,190
LOW, DAVIS et coll. (1978) NF n = 12 F n = 14	0,257	0,293	-	-	-	-
HAYEM, SCHARFMAN et coll. (1979) NF n = 3 F n = 2	-	-	0,283	0,331	0,036	0,049
PRE NF n = 6 F n = 5	0,393	0,558	0,056	0,184	0,038	0,057

Tableau VII.8

LIVRES DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE DE FUMEURS (F) ET NON FUMEURS (NF) :
 Comparaison de quelques-uns de nos résultats à ceux obtenus par différents auteurs

* Tous les résultats présentés dans ces travaux concluent à l'existence d'une réaction cellulaire, essentiellement macrophagique et à une augmentation du rapport Ig G/Protéines dans le tabagisme.

* La diversité des valeurs des rapports protéiques souligne bien les difficultés de comparaison qui sont inhérentes aux habitudes tabagiques des sujets examinés et aux méthodologies utilisées.

3. Les conclusions de LOW et coll. (1978), concernant le phosphore lipidique et les lipides polaires (isolés par chromatographie sur colonne) indiquent l'existence, chez les fumeurs, d'une baisse non significative de leurs concentrations qui n'est donc pas en accord avec la franche diminution du taux des lécithines que nous avons observée. Peut-être faut-il en voir la raison dans l'utilisation d'une méthodologie complexe – notamment au niveau de la resolubilisation des lipides des lyophilisats de liquide de lavage que ces auteurs effectuent en s'aidant des ultrasons – qui pourrait, pour une large part, être la cause de la très grande dispersion de leurs résultats : pour les fumeurs, la concentration moyenne ^{indiquée} en lipides polaires est de 42,7 µg/ml avec pour valeurs extrêmes 10,9 et 101 µg/ml ; pour les non fumeurs 44,1 µg/ml avec pour valeurs extrêmes 14,7 et 161,3 µg/ml.

elle n'a aucun sens -

E. - CONCLUSION

Le tabagisme se traduit, au niveau des liquides de lavage alvéolaire, essentiellement par :

- * **une augmentation de l'indice de perméabilité albumino-potassique**

- * **un abaissement de la concentration en lécithines affectant le rapport L/P**
reflet global de l'état du film endo-alvéolaire

- * **un accroissement du taux des Ig G et du rapport Ig G/Protéines visualisant**
l'intensité des défenses immunitaires locales

- * **une importante réaction macrophagique.**

Chez le grand fumeur, une place particulière doit être faite à l'**hydroxyproline** dont la présence dans les liquides de lavage pourrait être le **témoin d'un déséquilibre protéase/antiprotéase** à l'origine du processus emphysémateux.

- VIII-2 -

**LE LIQUIDE DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE
DANS QUELQUES CAS D'ASBESTOSE
ET DE SILICOSE CHEZ L'HOMME**

A. – SUJETS ETUDIÉS

- * L'incidence propre de l'asbestose et de la silicose sur la composition des liquides de lavage est, chez l'homme, difficile à observer car, dans la plupart des cas, elle se superpose à une imprégnation tabagique plus ou moins importante.
- * Les asbestosiques et les silicotiques ont été sélectionnés sur les antécédents professionnels, le dossier radiographique, l'examen clinique et l'exploration fonctionnelle respiratoire.

La mise en évidence de corps asbestosiques par la réaction de PERLS sur les frottis de culots cellulaires a pour certains cas apporté la preuve irréfutable d'un empoussiérage par l'asbeste bleue ou crocidolite qui est une amiante dans laquelle le fer est substitué au magnésium. Ce protocole ne peut donc pas mettre en évidence un empoussiérage à l'asbeste blanche ou chrysotile qui correspond à un silicate de magnésium hydraté.

- * . Douze sujets empoussiérés – dont 6 par l'amiante et 6 par la silice, âgés de 27 à 56 ans ($m = 43$), ont subi un lavage broncho-alvéolaire.
 - . Sur les 6 empoussiérés à l'amiante, 2 ne fument pas. Les 4 autres présentent une imprégnation tabagique allant de 7 à 30 "paquet-année" ($m = 16,5$). La durée d'exposition aux poussières d'amiante est de 5 à 20 ans ($m = 10,3$).
 - . Sur les 6 sujets atteints de silicose, 2 ne fument pas et 4 présentent une imprégnation tabagique de 18 à 35 "paquet-année" ($m = 25,8$). La durée d'exposition aux poussières siliceuses est de 7 à 20 ans ($m = 13,8$).

B. – EMPOUSSIERES NON FUMEURS

Nous avons pu étudier les liquides de lavage de 2 asbestosiques (dont l'un présentait 4 corps asbestosique ferrugineux par mm^3) et de 2 silicotiques non fumeurs dont le pourcentage d'HbCO était normal ($m = 0,56$, valeurs extrêmes $0,50 - 0,60$) ainsi que celui de récupération du liquide de lavage ($m = 62,7\%$ valeurs extrêmes $56 - 70\%$).

1. Modifications biochimiques

- 1.1 Alors que les concentrations en albumine tendent à augmenter chez les asbestosiques et les silicotiques, celles de K^+ restent normales. Cette dissociation entre ces 2 paramètres se traduit cependant par une augmentation de l'indice albumino-potassique qui semblerait dans ces cas, être plutôt le reflet d'une accentuation des processus de transfert de pinocytose (tableau VIII.9).
- 1.2 Les taux de lécithines sont très variables ($10,4$ à $37 \mu\text{g/ml}$) alors que ceux de protéines sont généralement augmentés. Le rapport L/P est dans tous les cas modérément abaissé ($0,068$ à $0,109$).

Cette variabilité des concentrations de lécithines dans les liquides de lavage a pu aussi être observée pour leurs quantités totales, dans les poumons de rats soumis à un empoussiérage à l'amiante, alors que certains auteurs n'observent que de discrètes modifications du contenu pulmonaire en phospholipides (RAHMAN, BEG, VISWANATHAN et coll., 1975), d'autres soulignent l'existence d'une augmentation constante de la quantité totale de surfactant (TETLEY, RICHARDS et HARWOOD, 1977).

m (Valeurs extrêmes)	TEMOINS NF n = 6	AMIANTE NF n = 2	SILICOSE NF n = 2	TEMOINS F n = 5
ALBUMINE µg/ml	53,8 (23 – 75)	n° 1 74 n° 2 90	n° 1 78 n° 2 59	82,6 (48 – 115)
K ⁺ mEq/l	0,29 (0,20 – 0,45)	n° 1 0,30 n° 2 0,25	n° 1 0,35 n° 2 0,30	0,65 (0,40 – 0,85)
INDICE ALBUMINO- POTASSIQUE	14,8 (5,7 – 17,5)	n° 1 22,2 n° 2 22,5	n° 1 27,3 n° 2 17,7	54,7 (19,2 – 69)
LECITHINES µg/ml	20,6 (15,2 – 33,6)	n° 1 15,0 n° 2 10,4	n° 1 37 n° 2 12	10,7 (9,1 – 11,7)
PROTEINES TOTALES µg/ml	136,6 (90 – 150)	n° 1 220 n° 2 150	n° 1 490 n° 2 110	148,0 (90 – 170)
L/P	0,149 (0,126 – 0,176)	n° 1 0,068 n° 2 0,069	n° 1 0,075 n° 2 0,109	0,075 (0,061 – 0,101)

Tableau VIII.9

PERMEABILITE ET ETAT GLOBAL DE LA BARRIERE ALVEOLO-CAPILLAIRE
CHEZ 2 ASBESTOSIQUES ET 2 SILICOTIQUES NON FUMEURS

1.3 Ces deux pneumoconioses déclenchent, au niveau alvéolaire, une réaction de défense immunitaire mettant essentiellement en jeu les Ig G comme dans le tabagisme (tableau VIII.10).

m (Valeurs extrêmes)	TEMOINS non fumeurs (n = 6)	AMIANTE NF n = 2	SILICOSE NF n = 2	TEMOINS fumeurs n = 5
Ig G (µg/ml)	7,6 (6 - 12)	n° 1 69 n° 2 35	n° 1 253 n° 2 30	28,8 (9 - 55)
Ig A (µg/ml)	5,4 (4 - 10)	n° 1 12 n° 2 5	n° 1 18 n° 2 4	8,9 (4 - 22)
Ig G/PROTEINES	0,056 (0,040 - 0,077)	n° 1 0,313 n° 2 0,233	n° 1 0,516 n° 2 0,272	0,184 (0,100 - 0,323)
Ig A/PROTEINES	0,038 (0,026 - 0,052)	n° 1 0,054 n° 2 0,033	n° 1 0,037 n° 2 0,036	0,057 (0,035 - 0,129)
Ig G/Ig A	1,45 (1,20 - 1,75)	n° 1 5,75 n° 2 7,0	n° 1 14,0 n° 2 7,5	3,51 (2,25 - 6,15)

Tableau VIII.10

DEFENSE IMMUNITAIRE ALVEOLAIRE DANS DEUX CAS D'ASBESTOSE
ET DEUX CAS DE SILICOSE CHEZ DES PATIENTS NON FUMEURS (NF)

1.4 Les valeurs des pourcentages de lécithines saturées par rapport aux lécithines totales (valeurs extrêmes : 50 – 61 %), les concentrations en cholestérol libre (valeurs extrêmes : 4,6 – 5,8 $\mu\text{g/ml}$), en triglycérides (valeurs extrêmes 5,7 – 10 $\mu\text{g/ml}$) et en malonaldehyde (valeurs extrêmes 0,12 – 0,40 nMole/ml) ne sont pas significativement différentes de celles observées chez les sujets sains non fumeurs.

1.5 Chez les deux asbestosiques, les concentrations en oses neutres totaux (9 et 12 $\mu\text{g/ml}$) acide sialique (0,8 et 1,4 $\mu\text{g/ml}$) et fucose (1,4 et 1,15 $\mu\text{g/ml}$) sont normales. Chez les deux silicotiques les oses neutres sont à la limite supérieure de la normale (14 et 16 $\mu\text{g/ml}$), l'acide sialique augmenté (3,6 et 3,9 $\mu\text{g/ml}$), le fucose reste normal (1,15 et 1,75 $\mu\text{g/ml}$).

1.6 La recherche d'hydroxyproline s'est avérée négative chez ces patients.

2. Modifications cytologiques

Chez les asbestosiques, la réaction cellulaire est beaucoup moins prononcée que chez les silicotiques (tableau VIII.11). Il semble donc que l'empoussiérage par la silice soit plus agressif que celui par l'amiante.

Chez ces empoussiérés non tabagiques, nous n'avons pas observé la présence de polynucléaires éosinophiles.

m Valeurs extrêmes	TEMOINS non fumeurs (n = 6)	AMIANTE NF	SILICOSE NF	TEMOINS fumeurs (n = 5)
CELLULES par mm ³	95,3 (82 - 109)	n° 1 190 n° 2 125	n° 1 300 n° 2 690	1 743 (300 - 3 100)
MACROPHAGES par mm ³	83,5 (66 - 105)	n° 1 133 n° 2 108	n° 1 225 n° 2 621	1 590 (259 - 2 945)
LYMPHOCYTES par mm ³	9,6 (5 - 19)	n° 1 48 n° 2 15	n° 1 54 n° 2 55	83,6 (9 - 270)
POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES par mm ³	2,3 (0 - 5)	n° 1 9 n° 2 2	n° 1 21 n° 2 14	50,6 (3 - 150)

Tableau VII.11

FORMULE CELLULAIRE DES LIQUIDES DE LAVAGE DE DEUX ASBESTOSIQUES
ET DEUX SILICOTIQUES NON FUMEURS

C. - EMPOUSSIERES FUMEURS

Les fumeurs asbestosiques (n = 4) et silicotiques (n = 4) présentent des pourcentages d'HbCO (m = 1,32 % valeurs extrêmes 1,15 - 1,65) très peu différents de ceux des témoins fumeurs. Le pourcentage moyen de récupération des liquides de lavage est encore inférieur à celui de témoins non fumeurs, il est de 43,1 % (valeurs extrêmes 24 - 58 %). Les valeurs les plus basses sont observées chez deux silicotiques présentant les plus fortes imprégnations tabagiques (30 paquets-année).

1. Modifications biochimiques

- 1.1 Les concentrations en Albumine (valeurs extrêmes 50 - 110 µg/ml), K⁺ (0,4 à 1 mEq/l) et l'indice albumino-potassique (20 à 80) ne sont pas significativement différents de ce que l'on observe chez les témoins fumeurs. Il n'existe pas, pour ces paramètres, de différences significatives entre nos fumeurs asbestosiques et silicotiques.
- 1.2 Les fumeurs asbestosiques présentent des taux de lécithines (m = 16,3 µg/ml - 9,9 à 22,3 µg/ml) significativement plus élevés que ceux des fumeurs silicotiques mais paradoxalement non significativement différents de ceux des témoins non fumeurs. Les taux de lécithines des fumeurs silicotiques (m = 12,2 µg/ml - 10,3 à 14 µg/ml) ne se différencient pas significativement de ceux des témoins fumeurs. Les taux de protéines des fumeurs asbestosiques et silicotiques (m = 186 µg/ml - 120 à 250 µg/ml) - bien qu'ils aient une tendance à être plus élevés que ceux des témoins fumeurs (m = 148 µg/ml) - ne s'en différencient pas de façon significative.

Les rapports L/P ne sont pas significativement différents de ceux des témoins fumeurs (m = 0,075). Ceux des asbestosiques fumeurs sont moins abaissés (m = 0,091) que ceux des silicotiques fumeurs (m = 0,063).

1.3 L'association tabagisme/asbestose ou silicose a entraîné chez nos sujets une très forte amplification des réactions alvéolaires de défense immunitaire. Les concentrations en Ig G et les rapports Ig G/Protéines et Ig G/Ig A sont en moyenne 2 fois plus élevés que ceux rencontrés chez les fumeurs. Il n'apparaît pas de différence significative entre ces empoussiérés fumeurs et non fumeurs (tableau VIII.12).

1.4 Les valeurs des pourcentages de saturation des lécithines (valeurs extrêmes 40 et 62 %), des concentrations en cholestérol libre (valeurs extrêmes 3,4 µg/ml et 7,4 µg/ml), triglycérides (5,2 µg/ml et 10,2 µg/ml) et malonaldehyde (0,10 nMole/ml et 0,80 nMole/ml) ne sont pas significativement différentes de celles observées chez les sujets sains non fumeurs.

1.5 Les concentrations en oses neutres totaux ($m = 21,8 \mu\text{g/ml}$ valeurs extrêmes 14 – 42 µg/ml) et en acide sialique ($m = 2,45 \mu\text{g/ml}$, 1,2 – 4,3 µg/ml) ne sont pas significativement différentes de celles observées chez les fumeurs. Les concentrations en fucose ($m = 1,3 \mu\text{g/ml}$ 1 à 1,8 µg/ml) sont semblables à celles observées chez les témoins non fumeurs.

Ces résultats laissent supposer que l'augmentation de la production de mucines résultant du tabagisme n'est pas amplifiée par ces deux types d'empoussiérage.

1.6 L'hydroxyproline a été rencontrée à la concentration de 31,6 nMole/mg de protéines chez un des patients âgé de 27 ans, exposé depuis 5 ans à l'amianté et dont l'imprégnation tabagique était de 7 paquets-année. Le liquide de lavage broncho-alvéolaire était particulièrement riche en corps asbestosiques (5 corps ferrugineux/ml), en cellules ($1\ 500/\text{mm}^3$) et en acide sialique (4,3 µg/ml).

m (Valeurs extrêmes)	TEMOINS non fumeurs n = 6	AMIANTE Fumeurs n = 4	SILICOSE Fumeurs n = 4	TEMOINS Fumeurs n = 5
Ig G µg/ml	7,6 (6 - 12)	70,0 (48 - 90)	63,7 (52 - 78)	28,8 (9 - 55)
Ig A µg/ml	5,4 (4 - 10)	10,7 (5 - 24)	8,7 (7 - 12)	8,9 (4 - 22)
Ig G/PROTEINES	0,056 (0,040 - 0,077)	0,391 (0,342 - 0,381)	0,330 (0,289 - 0,371)	0,184 (0,100 - 0,323)
Ig A/PROTEINES	0,038 (0,026 - 0,052)	0,054 (0,029 - 0,053)	0,045 (0,035 - 0,066)	0,057 (0,035 - 0,129)
Ig G/Ig A	1,45 (1,20 - 1,75)	8,6 (6,4 - 12,9)	7,55 (6,5 - 9,7)	3,51 (2,25 - 6,15)

Tableau VIII.12

DEFENSE IMMUNITAIRE ALVEOLAIRE CHEZ LES FUMEURS ASBESTOSIQUES
ET SILICOTIQUES

Au niveau de la formule cellulaire, nous avons observé un nombre important de **polynucléaires éosinophiles** ($30/\text{mm}^3$) **témoignant de l'importance d'un processus immuno-allergique** développé au cours de cet empoussiérage sous l'influence éventuelle du tabagisme.

2. Modifications cytologiques

2.1 Chez les empoussiérés fumeurs, il est impossible de faire la part de l'empoussiérage dans la réponse cellulaire qui est de type tabagique. L'intensité de cette réponse, comme dans le tabagisme, est très variable d'un sujet à un autre.

2.2 Alors que les polynucléaires éosinophiles ne sont rencontrés que dans 2 cas sur 5 chez les témoins fumeurs, ils sont retrouvés respectivement dans 3 cas sur 4 et 2 cas sur 4 chez les asbestosiques et les silicotiques.

Il semble donc que la réaction immunoallergique pouvant apparaître dans le tabagisme soit potentialisée par l'empoussiérage.

m (Valeurs extrêmes)	TEMOINS non fumeurs n = 6	AMIANTE fumeurs n = 4	SILICE fumeurs n = 4	TEMOINS fumeurs n = 4
CELLULES/mm ³	95,3 (82 - 109)	625,2 (170 - 1 500)	557,5 (280 - 900)	1 743 (300 - 3 100)
MACROPHAGES /mm ³	83,5 (66 - 105)	541 (146 - 1 335)	499 (247 - 801)	1 590 (259 - 2 945)
LYMPHOCYTES /mm ³	9,6 (5 - 19)	60 (14 - 114)	41,5 (9 - 90)	83,6 (9 - 270)
POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES /mm ³	2,3 (0 - 5)	14,2 (2 - 45)	6,8 (4 - 9)	50,6 (3 - 150)
POLYNUCLEAIRES EOSINOPHILES /mm ³	0	10 (0 - 30)	10,2 (0 - 23)	19 (0 - 62)

Tableau VII.13

FORMULE CELLULAIRE DES LIQUIDES DE LAVAGE
DE FUMEURS ASBESTOSIQUES ET SILICOTIQUES

D. - CONCLUSION

1. Malgré le petit nombre d'observations dont nous disposons et la grande variabilité de réponse de certains paramètres (lécithines notamment) très influencés par l'état pathologique plus ou moins prononcé de la barrière alvéolo-capillaire, il semble que l'on puisse observer au cours des empoussié-
rages par l'amiante et la silice :

- une baisse plus ou moins prononcée du rapport L/P
- une réponse immunitaire locale que reflète les fortes valeurs du rapport Ig G/Protéines
- une réponse cellulaire modérée dans l'asbestose mais plus marquée dans la silicose.

2. La superposition du tabagisme à ces 2 types d'empoussié-
rage se traduit par :

- une baisse du rapport L/P plus prononcée dans la silicose que dans l'as-
bestose pour laquelle les taux subnormaux de lécithines pourraient être
liés à un déficit compensateur d'élimination mucociliaire.
- une réponse immunitaire locale ne paraissant pas être plus importante
que celle observée chez les non fumeurs.
- une réponse cellulaire de type tabagique qui dans 5 cas sur 8 est
accompagnée de polynucléaires éosinophiles, témoins de l'existence
d'un processus immuno-allergique apparaissant plus fréquemment chez
ces empoussiérés fumeurs.

- IX -

RESUME - CONCLUSION

1. La barrière alvéolo-capillaire

L'étude de la biologie structurale de la membrane alvéolo-capillaire fait ressortir :

- * la très grande importance du film liquidien endoalvéolaire et le rôle des **pneumocytes de type II** dans la production du **surfactant lipidique** (DPPC) dont on sait le rôle essentiel dans la mécanique respiratoire.

- * le rôle majeur des **macrophages** dans les mécanismes de défense alvéolaire ainsi que celui des **lymphocytes B** qui sont à l'origine de la **production locale d'immunoglobulines**.

- * la complexité de la structure de l'interstitium alvéolaire au niveau duquel deux protéines fibreuses sont rencontrées : le **collagène** (riche en **hydroxyproline**) et l'**élastine** qui participent à l'élasticité pulmonaire.

2. Le lavage broncho-alvéolaire

2.1 Un riche faisceau d'informations sur les modifications du film endo-alvéolaire au cours de différentes agressions pulmonaires exogènes et endogènes a pu être obtenu par le biais de l'étude chimique des liquides de lavage broncho-alvéolaire.

Ainsi dans un premier temps, nous avons été amenés à codifier les techniques de lavage broncho-alvéolaire chez différents animaux (souris, rat, lapin) et chez l'homme.

2.2 Le soluté chloruré sodique isotonique à 9 g ‰ s'est avéré être un liquide de lavage satisfaisant surtout vis-à-vis du contingent cellulaire dont l'intégrité est conservée.

2.3 Chez les animaux, les lavages sont pratiqués juxta post-mortem, sans isolement préalable des poumons. Chaque opération de rinçage comporte une série de cycles successifs comportant les 3 étapes suivantes :

- instillation d'un aliquot du volume total de lavage (20 secondes)
- repos (30 secondes)
- aspiration (30 secondes)

Pour des souris d'un poids moyen de 25 g, nous utilisons un volume total de 2 ml de NaCl à 9 g % ; pour des rats de 250 g, 15 ml répartis en 3 cycles de 5 ml ; pour des lapins de 2,6 kg, 60 ml répartis en 5 cycles (15 ml + 15 ml + 10 ml + 10 ml + 10 ml) au cours desquels les étapes aspiration/repos sont répétées 5 fois.

3 ml / 45
30 ml / 45

Nous avons vérifié indirectement la bonne reproductibilité des protocoles de lavage, à partir des quantités totales de lécithines récupérées au cours de lavages effectués sur des animaux de même espèce et de même poids.

2.4 Chez l'homme, le lavage broncho-alvéolaire est effectué, après une prémédication anxiolytique et sous anesthésie locale des voies supérieures, à l'aide d'un fibro-bronchoscope bloqué dans une bronche sous-segmentaire. On procède à 5 instillations successives de 50 ml de soluté de NaCl à 9 g %, préalablement tiédi. Après chaque instillation, le liquide est recueilli sous vide. Afin d'écartier au maximum l'incidence bronchique dans le lavage que nous souhaitons le plus possible alvéolaire, nous éliminons le 1er flacon correspondant au liquide récupéré à partir des 50 premiers ml et ne travaillons que sur le pool des recueils correspondant aux 4 instillations suivantes : considérant le nombre de cellules/mm³, les concentrations en protéines et lécithines, observés chez 6 sujets sains, non fumeurs, de même tranche d'âge, il apparaît que ce protocole de lavage présente une reproductibilité cliniquement satisfaisante.

2.5 Pour les sujets témoins, les pourcentages de liquide récupéré au cours de ces lavages sont respectivement de 83,4 % \pm 3,7 %, 84,8 % \pm 5,1 %, 87,3 % \pm 5,5 et 68 % \pm 5,4 chez la souris, le rat, le lapin et l'homme.

2.6 Nous avons vérifié que les quantités de lécithines saturées recueillies au cours des lavages sont toujours supérieures à celles nécessaires à l'existence d'un film monomoléculaire de DPPC sur la surface alvéolaire, en se référant aux récentes données de GAIL, STEINKAMP et MASSARO (1978) à savoir : 0,06 mg pour la souris (surface alvéolaire 0,08 m² pour 25 g), 0,54 mg pour le rat (surface alvéolaire 0,6 m² pour 240 g) et 8,10 mg pour le lapin (surface alvéolaire 7,3 m² pour 2,7 kg).

Nous avons estimé la valeur de cette quantité minimale de DPPC chez l'homme à environ 80/85 mg en considérant que pour une surface plus faible de 10 fois, le lapin devait disposer d'au moins 8,1 mg. Par ailleurs, l'évaluation de la quantité de lécithines dans l'ensemble du film alvéolaire a été faite en s'appuyant sur des données anatomiques qui indiqueraient que chez le sujet sain, 1/30 environ de la surface alvéolaire serait concernée par le lavage.

3. Chimie clinique analytique du liquide de lavage broncho-alvéolaire

3.1 Les liquides de lavage ainsi obtenus sont assimilables à un film liquidien endo-alvéolaire fortement dilué dont l'exploration bioclinique implique l'utilisation de méthodologies particulières alliant simplicité et fiabilité.

Ainsi, nous avons été amenés à effectuer des adaptations de méthodes et à élaborer des protocoles originaux permettant de doser les différents composés existants ou pouvant apparaître dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire lors d'agressions diverses.

3.2 Les liquides de lavage, dans un délai inférieur à 1 heure suivant leur recueil sont centrifugés durant 10 minutes à 600 g afin d'éliminer les éléments cellulaires. Nous avons vérifié que les dosages peuvent être différés, sans modifications significatives des résultats, dans la mesure où les surnageants sont conservés à -20°C .

Pour le dosage de certains constituants dont les taux sont particulièrement faibles, une concentration préalable s'avère parfois très utile (fucose, ac. sialique) voire nécessaire (Ig M). Nous effectuons cette opération par ultracentrifugation à travers une membrane sélective sous vide obtenu par une trompe à eau à l'aide de l'appareil "Sélectron" (SCHLEICHER et CHULL).

3.3 Dosage des constituants lipidiques et du malonaldehyde

3.3-1 Le dosage des **lécithines, triglycérides et cholestérol libre** est effectué selon un protocole original à partir d'un extrait lipidique méthanol-chloroformique du liquide de lavage. Ces différents composés lipidiques sont séparés par chromatographie sur une couche mince de gel de silice fixée sur une feuille de matière plastique (SCHLEICHER et SCHULL) en utilisant comme phase mobile de migration un mélange polaire pour les lécithines, apolaire pour les triglycérides et le cholestérol libre. La révélation est effectuée par immersion du chromatogramme, durant une minute dans une solution de Noir Amide en milieu acétique et décoloration du support par l'eau. Les taches bleues correspondant aux différentes fractions lipidiques sont découpées et éluées par le diméthylformamide. La densité optique des éluats à 610 nm est proportionnelle aux quantités de lipides.

donner le
cch

Il s'agit d'une méthode simple, rapide, sensible et reproductible. Elle facilite très largement le dosage des lécithines car elle permet d'éviter les étapes délicates que sont la concentration des liquides de lavage, et le dosage du phosphore dans la tache de lécithine repérée par les vapeurs d'iode et récupérée par grattage de la couche siliceuse.

3.3-2 Le dosage des **lécithines saturées** s'effectue selon le protocole décrit ci-dessus après destruction, par oxydation, à l'aide de l'oxyde d'osmium, des lécithines insaturées.

3.3-3 Dérivé de l'oxydation des acides gras polyinsaturés, le **malonaldehyde** est dosé spectrophotométriquement à 532 nm à l'aide de l'acide thiobarbiturique en milieu acide et à chaud (BARBER et BERHEIM, 1967).

3.4 Dosage des protéines et dérivés

3.4-1 Le choix d'une méthode de dosage des **protéines totales** dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire est, dans une certaine mesure, lié au protocole de lavage. Bien que très sensibles et rapides, les méthodes basées sur une mesure spectrophotométrique dans l'ultra-violet lointain sont à proscrire du fait de l'utilisation systématique, au cours des lavages, de quantités plus ou moins importantes d'anesthésiques locaux (xylocaïne) présentant tous une très forte absorption à ces longueurs d'onde.

Nous dosons les protéines totales par la méthode de Lowry dans laquelle la réaction du biuret entre ions cuivriques et liaisons peptidiques est associée à la réduction du réactif phospho-tungsto-molybdique de Folin-Ciocalteu par les hydroxyles tyrosiniques et les thiols cystéiniques. Chez l'homme, dans des rares cas où des quantités importantes de xylocaïne sont instillées et les volumes recueillis sont faibles, la méthode de Lowry peut être entachée d'erreurs par excès (de l'ordre de 0,05 à 0,20 g/l) visualisées par la méthode au violet sulfo et liées à la présence d'un agent de conservation phénolique (parahydroxybenzoate de méthyle) dans la solution de xylocaïne.

Les faibles volumes dont on dispose lors des lavages chez les souris nous ont incité à décrire une ultramicrométhode permettant la détermination des faibles concentrations protéiques contenues dans ces milieux.

Les protéines fixées par la chaleur sur une feuille de papier pour chromatographie sont colorées par immersion durant 5 minutes dans une solution aqueuse de violet sulfo en milieu acétique. Après décoloration du support, les taches protéiques sont découpées et éluées par une solution détergente (bromure de cétyl-triméthyl ammonium) dont on mesure l'absorption à 600 nm. Ce protocole s'avère plus sensible que celui de Lowry d'environ 3 à 4 fois et n'est pas perturbé par la xylocaïne et son agent de conservation.

3.4-2 Nous avons effectué le dosage spécifique de l'albumine, et des immunoglobulines G, A et M, par immunonéphélométrie laser à l'aide d'anticorps spécifiques. Il s'agit d'une immuno-néphélométrie de diffusion dans laquelle la lumière incidente ($\lambda = 632,8$ nm) est émise par un laser-gaz hélium-néon (Behring). Les liquides de lavage éventuellement concentrés (Ig M) ou dilués (au 1/5 pour l'Albumine) sont systématiquement filtrés sur Millipore afin d'obtenir un échantillon parfaitement limpide. Il en est de même pour les antisérums qui sont tous dilués au 1/5 dans le soluté de NaCl à 9 g ‰.

Afin d'obtenir une bonne reproductibilité dans les dosages, il est indispensable d'opérer la réaction immunochimique directement dans la microcuve de lecture qui en tout début de réaction est l'objet d'une seule agitation circulaire de 30 secondes. L'intensité de la lumière dispersée par l'immun-complexe est mesurée au bout de 30 minutes en évitant toute agitation au moment de la lecture.

3.4-3 L'hydroxyproline issue de l'hydrolyse chlorhydrique des protéines des liquides de lavage (20 h à 110°C en milieu HCl 6 N dans des ampoules sous vide) est séparée par passage sur une colonne cationique puis éluée par un tampon acide (pH 2,85) est dosée spectrophotométriquement à 440 nm par un mélange ninhydrine/hydrindantine sous azote.

3.5 Dosage des oses et dérivés

3.5-1 Les oses neutres totaux ont été dosés par une adaptation de la réaction à l'orcinol sulfurique à un autoanalyseur en flux continu. Cette réaction résulte de la condensation de l'orcinol avec des dérivés du furfural issus de l'action à 95°C de l'acide sulfurique sur les oses neutres.

3.5-2 Le dosage du fucose est effectué selon la réaction de DISCHE (1948). Elle résulte de l'action sur le fucose du chlorhydrate de cystéine en milieu sulfurique à 100°C.

3.5-3 Le dosage de l'acide sialique est effectué selon la méthode de WARREN (1959). Après libération des structures glycoprotéiniques par hydrolyse acide, l'acide sialique est oxydé par l'acide périodique en acide β formyl-pyruvique qui est condensé avec l'acide thiobarbiturique en un chromogène rose qui, après passage dans la cyclohexanone fait l'objet d'une mesure spectrophotométrique à 549 nm.

3.5-4 La méthode que nous avons utilisée pour le dosage des acides uroniques totaux est celle de BLUMENKRANTZ (1973). Les acides uroniques libérés en milieu sulfurique à chaud se combinent à froid au métaphényl phénol en formant un chromogène présentant un maximum d'absorption à 520 nm.

3.6 Parmi les paramètres dont nous venons de décrire les dosages, certains, qui ont été étudiés à la fois chez la souris, le rat, le lapin et l'homme, permettent d'établir une comparaison entre ces espèces dans la mesure où on les exprime en mg/m^2 de surface alvéolaire (tableau IX.1).

Chez l'homme, pour une surface alvéolaire moyenne de 75 m^2 , on estime, à partir de données anatomiques, que la surface lavée est de l'ordre de 1/15 du poumon exploré soit environ le 1/30 de la surface alvéolaire totale soit $2,5 \text{ m}^2$.

Verifier les calculs

	Souris (n = 10)	Rat (n = 10)	Lapin (n = 6)	Homme non fumeur (n = 6)
SURFACE ALVEOLAIRE LAVEE (m ²)	0,08	0,6	7,3	2,5
VOLUME DU LIQUIDE DE LAVAGE (ml)	2	15	60	250 - 50 = 200
LECITHINES TOTALES mg/m ² POUMON	2,05	1,90	1,59	2,05 1,65
PROTEINES TOTALES mg/m ²	3,87	4,29	3,42	13,66 10,93
L/P	0,529 0,428 (p139)	0,442	0,464 0,442 p. 142	0,150
OSÉS NEUTRES mg/m ²	-	0,505	0,138	0,65

Tableau IX.1

COMPARAISON DES VALEURS MOYENNES (en mg/m² de surface alvéolaire) DES LECITHINES, PROTEINES, OSÉS NEUTRES ET DU RAPPORT L/P CHEZ LA SOURIS, LE RAT, LE LAPIN ET L'HOMME

il faut calculer avec 200 ml au lieu de 250

et on a 100% de calculs (1%)

donc il est préférable de 50 ml + liquide

600 -

quelques calculs supplémentaires

De cette comparaison, il ressort que :

* les taux de lécithines par m^2 de surface alvéolaire sont du même ordre de grandeur dans les espèces considérables (1,60 à 2,05 mg/m^2).

* les taux de protéines sont de même ordre chez la souris, le rat et le lapin (3,40 à 4,30 mg/m^2). La valeur élevée (13,6 mg/m^2) rencontrée chez l'homme résulte peut-être des modalités du lavage au cours duquel l'instillation de 50 ml de liquide de lavage pourrait créer une distension de l'alvéole suffisante pour entraîner une augmentation de la transsudation des protéines plasmatiques. C'est en effet pour l'homme que la valeur du rapport volume injecté en ml/surface en m^2 est de beaucoup la plus élevée ; elle est de 20 alors que pour la souris, le rat et le lapin, elle est respectivement de 6, 8 et 2.

* le rapport L/P, beaucoup plus bas chez l'homme (0,150) que chez les autres espèces, résulte uniquement de la valeur plus élevée du taux des protéines.

3.7 Dans le tableau IX.2, nous avons rassemblé les données essentielles permettant d'établir le profil biochimique du liquide de lavage broncho-alvéolaire de l'homme sain non fumeur (tableau IX.2).

Pour les données exprimées en mg/m^2 de surface alvéolaire, nous avons admis que la composition du liquide de lavage piégé dans le poumon avait une composition peu différente de celle du liquide recueilli et que la surface alvéolaire concernée par le lavage était de l'ordre de 2,5 m^2 . Il s'agit en fait d'approximations.

Nous avons, par ailleurs, indiqué la valeur de certains rapports de concentrations d'intérêt clinique (tableau IX.3).

(n = 6)	Approximation en mg/m ² surface alvéolaire	μg/ml de liquide de lavage $m \pm t \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$
LECITHINES TOTALES	2,0	20,6 ± 7,0
LECITHINES SATUREES	1,1	11,8 ± 1,4
CHOLESTEROL LIBRE	0,7	6,9 ± 1,9
TRIGLYCERIDES	0,8	8,1 ± 5,2
PROTEINES TOTALES	13,6	136,6 ± 34,4
ALBUMINE	5,3	53,8 ± 21,8
Ig G	0,7	7,6 ± 2,1
Ig A	0,5	5,4 ± 2,1
OSSES NEUTRES TOTAUX	0,6	6,5 ± 4,2
FUCOSE	0,07	0,73 ± 0,3
ACIDE SIALIQUE	0,16	1,65 ± 1,0
K ⁺	0,029 mEq/m ²	0,29 mEq/l ± 0,09

exprime en
albumine

$\Delta = 698$
correspond à
quelques
protéines
entre autres.

Tableau IX.2

COMPOSITION DU LIQUIDE DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE
DE L'HOMME SAIN NON FUMEUR ET APPROXIMATION DES DONNEES EN MG/M²
DE SURFACE ALVEOLAIRE

LECITHINES / PROTEINES	0,150 ± 0,020
LECITHINES SATUREES / LECITHINES TOTALES	0,573 ± 0,069
ALBUMINE / PROTEINES	0,384 ± 0,115
Ig G / PROTEINES	0,056 ± 0,013
Ig A / PROTEINES	0,039 ± 0,009
Ig G / Ig A	1,45 ± 0,19

Tableau IX.3

VALEURS DE CERTAINS RAPPORTS DE CONCENTRATION
DANS LES LIQUIDES DE LAVAGE BRONCHO-ALVEOLAIRE
D'HOMMES SAINS NON FUMEURS

$$(n = 6, m \pm t \frac{\sigma}{\sqrt{n}})$$

4. Choix des paramètres les plus aptes à rendre compte de l'état de la barrière alvéolo-capillaire

La multiplicité des paramètres pouvant être dosés dans les liquides de lavage, nous a incité à sélectionner ceux qui semblaient devoir être les plus aptes à rendre compte de l'état de la barrière alvéolo-capillaire.

4.1 Des considérations biocliniques nous ont amené à privilégier le **rapport des concentrations en lécithines et protéines (L/P)**. Dans les fibroses interstitielles diffuses développées chez l'homme au cours des sarcoïdoses, nous avons observé l'existence d'une corrélation entre le rapport L/P et la capacité de transfert alvéolo-capillaire de l'oxyde de carbone (T_{CO}) qui permet la mise en évidence d'un déficit des échanges gazeux à travers la barrière alvéolo-capillaire soit par épaissement anormal de cette dernière au cours d'une atteinte exsudative, soit par différenciation de structure au cours d'un processus fibrogène. Ainsi, le rapport L/P, tout comme le T_{CO} , fournit une indication sur l'état général du système complexe que constitue la barrière alvéolo-capillaire. Ceci justifie son intérêt dans l'étude expérimentale des nuisances à l'impact alvéolaire, d'autant qu'il est bien établi que les agressions pulmonaires d'origine exogène (inhalations d'aérocontaminants) ou endogène (ingestions de toxiques, effets secondaires indésirables de médicaments lors de traitements prolongés) peuvent souvent être à l'origine de fibroses interstitielles diffuses qui sont des maladies de la paroi alvéolaire et de l'interstitium au niveau desquels se développent des altérations exsudatives d'évolution plus ou moins fibrogène.

4.2 Si dans les processus aigus la détermination du rapport nous semble nécessaire et suffisante, dans les processus chroniques, et plus particulièrement chez l'homme, elle doit être complétée par le dosage de l'**albumine**, des **Ig G** et des **Ig A**.

Non synthétisée par l'épithélium alvéolaire, l'albumine dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire témoigne du passage, des protéines du secteur vasculaire vers le film endo-alvéolaire et par là même de l'importance d'un œdème exsudatif. Le dosage des Ig G et des Ig A fournit de précieuses indications sur le niveau d'adaptation des défenses immunitaires locales qui est parfois très important au cours des agressions chroniques.

4.3 La concentration en K^+ dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire constitue un élément intéressant de l'exploration alvéolaire. Son augmentation signe soit une augmentation de la filtration de cet élément au niveau des pores interendothéliaux, soit une souffrance – voire une lyse – de certaines cellules de la paroi alvéolaire.

5. Modifications chimiques du liquide de lavage pulmonaire au cours d'intoxications aiguës par inhalation de CO, HCN et HCl et au cours d'hypoxie chez l'animal

L'étude des modifications de la composition des liquides de lavage dans les intoxications aiguës par inhalations des toxiques majeurs que sont CO, HCN et HCl a été motivée par le fait qu'ils sont à l'origine de détresses respiratoires sous tendues par un œdème pulmonaire dont la gravité est fonction de la nature du toxique et de la durée d'exposition. Nous avons par ailleurs testé la réponse du rapport L/P lors d'hypoxies hypercarboxique et normocarboxique.

5.1 Des rats de souche Wistar et des lapins de la race fauve de Bourgogne ont été intoxiqués selon le protocole décrit par TRUHAUT, BOUDENE et JOUANY (1975) consistant en une administration du toxique gazeux par voie endotrachéale sous ventilation artificielle contrôlée.

Par ce procédé, le toxique atteint obligatoirement l'alvéole ; les conditions d'intoxications sont parfaitement connues. L'assistance ventilatoire est maintenue durant 90 minutes, les 30 premières minutes correspondant à la phase d'intoxication et les 60 minutes suivantes à la période de récupération. Pour le rat et le lapin, la fréquence ventilatoire imposée est 18 ± 2 . Le débit gazeux est de 20 litres/heure pour le rat et 80 litres/heure pour le lapin. Nous avons vérifié que cette méthode de ventilation artificielle n'introduisait pas de modifications significatives de la composition des liquides de lavage.

- 5.2 * Dans les agressions aiguës par CO, HCN et HCl gazeux, le rapport L/P s'avère particulièrement sensible. Sa diminution qui apparaît dès le stade infraclinique est liée essentiellement à une augmentation de l'exsudation des protéines plasmatiques (essentiellement l'albumine), les concentrations en lécithines restant le plus souvent proches de la normale (CO, HCN). Dans le cas particulier d'HCl, la nette augmentation des lécithines – qui peut résulter d'une extrusion plus importante de corps lamellaires sous l'action corrosive de ce gaz – ne compense pas, cependant, l'effet de la très importante exsudation albumineuse sur le rapport L/P.
- * Dans nos conditions opératoires, l'altération de ce rapport au cours de l'intoxication par CO apparaît chez le rat vers 3 500 ppm. Ce seuil est environ 2 fois plus élevé chez le lapin : à 5 000 ppm de CO, la baisse du rapport L/P est de 34 % chez le rat alors que chez le lapin, pour 8 600 ppm elle n'est que de 20 %. Des modifications de même type mais d'intensité plus grande sont obtenues avec HCN : pour 80 ppm, chez le rat, le rapport L/P est abaissé de 43 %, alors que, chez le lapin, un abaissement de même ordre (- 49 %) nécessite 190 ppm. Par contre, avec HCl, il ne semble pas exister de très grandes différences de réponse entre ces 2 espèces.

Pour 4 500 ppm d'HCl, le rapport L/P s'abaisse de 11 % chez le rat (0,429 → 0,382) alors que pour 3 000 ppm chez le lapin, l'abaissement est de 13 % (0,447 → 0,386).

La très nette amplification de l'effet toxique d'HCl à partir de 4 500 ppm nous semble relever d'un **dépassement du pouvoir tampon du film liquidien** alvéolaire. Nous avons, en effet, observé qu'au cours de lavages pratiqués chez la souris avec des liquides de pH croissant, la baisse du rapport L/P était fonction de l'augmentation de la concentration en protéines, elle-même proportionnelle à l'acidité du milieu.

L'augmentation de la concentration en K^+ dans les liquides de lavage dès 2 300 ppm peut résulter de 2 actions, éventuellement simultanées, du toxique :

- atteinte cellulaire pouvant affecter plus particulièrement les fins et fragiles prolongements cytoplasmiques des pneumocytes de type I,
- altération des pores inter-endothéliaux entraînant un plus grand passage du K^+ vers la lumière alvéolaire.

* Le rapport L/P s'avère particulièrement sensible au cours de l'intoxication par HCN. En effet, chez le rat, la baisse de 30 % de ce rapport (0,429 → 0,300) est obtenue, dans nos conditions opératoires, avec seulement 55 ppm d'HCN alors qu'avec CO et HCl il faut respectivement atteindre 4 700 et 5 100 ppm (fig. IX.1).

* Le dosage des oses neutres fait apparaître le caractère non irritant pour les muqueuses de CO, légèrement agressif de HCN et particulièrement corrosif de HCl surtout à partir de 6 000 ppm.

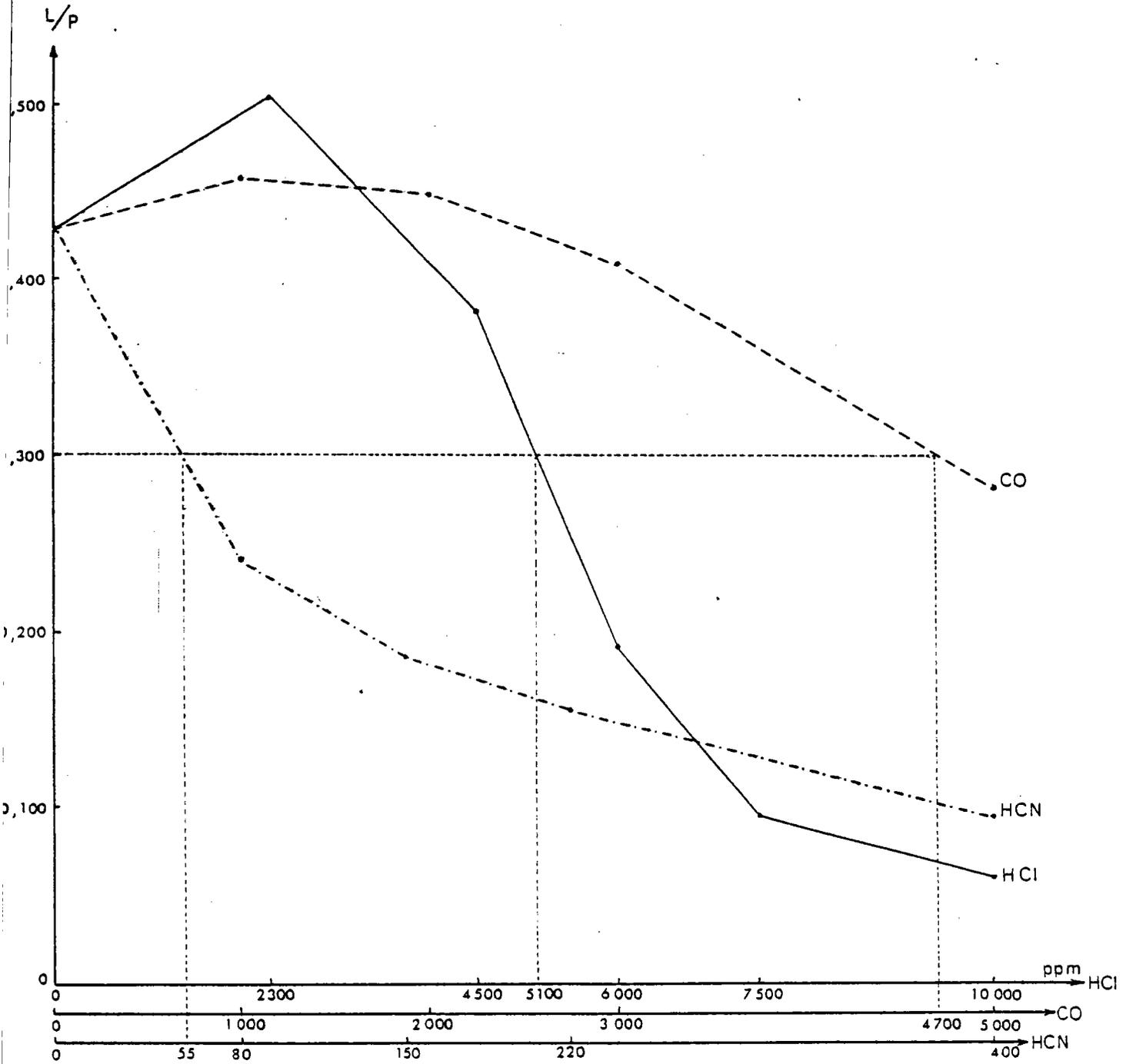


Fig. IX.1

Evolution du rapport L/P chez le rat au cours d'intoxications par CO, HCN et HCl

5.3 Dans les hypoxies qui ont été étudiées chez le lapin, nous avons observé une **baisse importante du rapport L/P (> 80 %)** résultant de la conjugaison d'une **augmentation de la concentration en protéines** – reflet de la souffrance alvéolo-capillaire – et **d'un abaissement du taux des lécithines** pouvant éventuellement résulter de l'action phospholipasique de macrophages altérés.

Ces résultats semblent plus marqués dans l'hypoxie hypercarboxique par hypoventilation (20 l/h fréquence 13 au lieu de 80 l/heure fréquence 18) que dans l'hypoxie normocarboxique par inhalation d'air dilué dans l'azote (mélange à 8,5 % d'O₂).

Au reflet sanguin très modéré de l'hypoxie normocarboxique s'oppose le tableau caractéristique de l'hypoxie hypercarboxique où l'on observe une hypercapnie très prononcée associée à une forte acidose et une importante hyperglycémie.

6. Modifications du rapport L/P des liquides de lavage broncho-alvéolaire de la souris au cours d'agressions par voie endogène.

6.1 L'agression de la barrière alvéolo-capillaire par des substances apportées par voie endogène nous a semblé mériter une attention particulière étant donné l'importance croissante de la **pathologie pulmonaire iatrogène**.

Pour la plupart des très nombreuses substances pouvant entraîner ce type de pathologie, des réactions d'hypersensibilité ont été invoquées. Le fait qu'elles n'aient été que rarement démontrées (ROSENOW, 1976) nous a conduit à envisager la **possibilité d'une action moléculaire directe de ces composés au niveau même des structures alvéolo-capillaires**.

C'est ainsi que nous avons étudié l'action de l'**éthanol**, autopolluant majeur de l'espèce humaine, de l'**acétazolamide** et de la **cyclophosphamide** médicaments qui, lors de traitements prolongés, sont respectivement responsables d'une acidose hypercarboxique et d'un processus fibrogène.

6.2 Pour chacune de ces substances, la détermination du rapport L/P a été effectuée sur des liquides de lavage d'animaux venant d'être sacrifiés et sur ceux d'animaux ayant été l'objet, 5 minutes avant le lavage, d'une **déplétion sanguine importante** par ponction de la veine cave inférieure.

Cette déplétion est de 0,6 ml, ce qui représente 20 à 25 % de la masse sanguine. Nous avons pensé que dans le cas d'une fragilisation discrète de la barrière alvéolo-capillaire, cette déplétion, alors que les mécanismes de compensation ne sont pas encore installés, engendrerait un gradient de pression favorable à la fuite du film liquidien endo-alvéolaire vers l'interstitium et le système capillaire. Nous avons émis l'hypothèse que cette fuite, d'autant plus importante que la barrière est lésée, pourrait entraîner une modification du rapport L/P dans la mesure où les cinétiques de traversée des protéines et des lécithines seraient différentes.

Ainsi, la déplétion sanguine préalable au lavage, devrait sensibiliser la réponse de ce rapport à l'action de substances dont l'effet ne serait pas observé en son absence.

6.3 Les animaux ont été traités durant 5 jours consécutifs et ont été sacrifiés une heure après la dernière injection intra-péritonéale du composé étudié. La dose quotidienne d'éthanol absolu injectée (5 ml/kg) correspond chez l'homme à une consommation, par jour, de 3,5 litres de vin à 10°. L'acétazolamide et la cyclophosphamide ont été injectées respectivement aux doses de 120 et 200 mg/kg. Ces doses très fortes, non utilisables en thérapeutique humaine, sont très bien supportées par la souris.

- 6.4** Nous avons vérifié la similitude des concentrations en lécithines, protéines et du rapport L/P dans les liquides de lavage obtenus en l'absence de déplétion sanguine et après.
- 6.5** * Dans l'intoxication alcoolique subaiguë de courte durée (5 jours), nous n'avons pas observé de modifications significatives de la valeur du rapport L/P et des taux de lécithines et protéines, qu'il y ait eu déplétion sanguine ou non avant le lavage.
- * Dans le cas de l'acétazolamide, l'atteinte discrète de la barrière alvéolo-capillaire n'est mise en évidence qu'après avoir effectué la déplétion sanguine sensibilisatrice permettant d'observer au niveau du liquide de lavage une importante diminution de la concentration en lécithines (- 43 % par rapport à celle obtenue en l'absence de déplétion) seule responsable de l'abaissement significatif ($p < 0,05$) du rapport L/P.
- * Avec la cyclophosphamide, la déplétion sanguine ne s'avère pas nécessaire étant donné l'importance des effets de cet antimitotique. On observe en effet, dans les liquides de lavage, en l'absence de déplétion sanguine préalable, par rapport aux témoins, une forte augmentation des concentrations en protéines (+ 156 %) et plus forte encore en lécithines (+ 265 %) entraînant celle du rapport L/P (+ 52 %). On peut logiquement penser que ce profil particulier du liquide de lavage soit le reflet de l'action toxique de ce composé sur les fragiles pneumocytes de type I qui sont remplacés par une prolifération des pneumocytes de type II plus résistants et dont on sait qu'ils produisent la DPPC.

7. Le liquide de lavage broncho-alvéolaire dans des cas de tabagisme, d'asbestose et de silicose chez l'homme

7.1 * Nous avons eu la possibilité d'étudier les modifications du **profil biologique des liquides de lavage dans le tabagisme** grâce à une coopération volontaire de 9 sujets adultes sains dont 5 sont des fumeurs présentant une imprégnation tabagique de 9 à 20 "paquets-année", 2 fumant moins de 4 cigarettes par jour et 2 anciens fumeurs. Les résultats ont été comparés à ceux issus de 6 autres sujets volontaires sains et non fumeurs.

* Tous les fumeurs présentaient un pourcentage sanguin d'HbCO supérieur d'environ 2 fois à celui des non fumeurs. Aucun d'entre eux était polyglobulique.

Chez les fumeurs, le pourcentage de récupération des liquides de lavage est abaissé d'environ 50 % alors qu'il est normal chez les sujets ayant cessé de fumer et les deux petits fumeurs consommant moins de 4 cigarettes par jour.

* Alors que chez les fumeurs les concentrations en protéines et albumine ne sont pas significativement différentes de celles des témoins non fumeurs, celles de K^+ sont par contre significativement augmentées ($p < 0,001$) et celles de lécithines significativement abaissées ($p < 0,001$). Le rapport L/P est abaissé d'environ 50 %.

* De ce tableau, il ressort que dans l'agression tabagique, la filtration pinocytaire de l'albumine n'est pas activée et que localement il ne doit pas y avoir d'atteinte capillaire suffisante pour entraîner une filtration de cette protéine – d'origine exclusivement plasmatique – par les pores interendothéliaux. L'existence, très vraisemblable, d'une plus grande filtration du K^+ par les pores interendothéliaux ne doit pas pour autant exclure la possibilité d'une souffrance cellulaire au niveau par exemple des pneumocytes de type I dont on sait la fragilité.

La baisse du rapport L/P est exclusivement imputable à l'effondrement du taux des **lécithines** (de 20,6 $\mu\text{g/ml}$ chez les non-fumeurs à 10,7 $\mu\text{g/ml}$ chez les fumeurs) lié soit à la réduction de leur synthèse, soit à une augmentation de leur élimination par les macrophages qui sont beaucoup plus nombreux dans les liquides de lavage de fumeurs.

- * L'agression tabagique est à l'origine d'une réaction de défense immunitaire dans laquelle ne sont impliquées que les **Ig G** dont les concentrations sont très significativement augmentées (de 7,6 $\mu\text{g/ml}$ chez les non fumeurs à 28,8 $\mu\text{g/ml}$ chez les fumeurs) ce qui entraîne une forte augmentation du rapport **Ig G/Protéines** (+ 228 %).

Chez les sujets ayant cessé de fumer, le rapport **Ig G/Protéines**, tout comme le nombre de cellules par mm^3 , restent augmentés et apparaissent comme les témoins d'un passé tabagique. Dans nos conditions de lavage, nous n'avons pas observé, dans les liquides récupérés, de variations statistiquement significatives des concentrations d'**Ig A**.

- * Le pourcentage de **lécithines saturées** par rapport aux **lécithines totales**, les concentrations en **cholestérol libre**, **triglycérides** et **malonaldehyde** ne sont pas l'objet de variations significatives.
- * **Pouvant être considérée** comme absente des liquides de lavage de sujets non fumeurs (0 nM ou $< 0,5$ nMole par mg de protéines), l'**hydroxyproline** a été mise en évidence à la concentration de 8,3 nMole/mg de protéines chez une femme de 25 ans, fumant 30 à 40 cigarettes par jour, présentant un rapport **Ig G/Protéines** (0,250) et un nombre de cellules par mm^3 (2 010) particulièrement élevés.

Nous pensons que cette présence d'**hydroxyproline** dans les liquides de lavage pourrait être le **témoin d'un déséquilibre protéase/antiprotéase** à l'origine de l'**emphysème**, couramment observée dans le tabagisme, qui se traduit par une dilatation exagérée et permanente des alvéoles pulmonaires pouvant aller jusqu'à leur rupture. Certains constituants des fumées de tabac pourraient lever l'inhibition par l' α_1 antitrypsine, d'actions élastasique et collagénasique issues de macrophages et de leucocytes altérés, permettant ainsi une atteinte de l'interstitium.

- * **L'augmentation de la concentration en oses neutres totaux** dans les liquides de lavage de fumeurs résulte de l'existence d'une hypersécrétion réactionnelle de mucines à l'étage bronchiolaire.
- * **Sur le plan cytologique**, on observe un accroissement important du nombre de cellules par mm^3 concernant essentiellement les macrophages et de façon plus modeste les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes.

L'importance de la réaction macrophagique signe la pénétration dans l'alvéole de la phase particulaire fine de l'aérosol tabagique. Contrairement aux témoins non fumeurs, dans les liquides de lavage de fumeurs, nous n'avons pas observé de corrélation entre les nombres de lymphocytes par mm^3 et les concentrations en Ig G. Peut-être faut-il en voir la cause dans une déficience des processus de transformation des lymphocytes B en plasmocytes sécrétants.

7.2 L'incidence propre de l'asbestose et de la silicose sur la composition des liquides de lavage est, chez l'homme, difficile à observer, car dans la plupart des cas, elle se superpose à une imprégnation tabagique plus ou moins marquée.

Nous avons cependant pu étudier les liquides de lavage de 2 asbestosiques et de 2 silicotiques non fumeurs. Au cours de ces empoussiérages, il semble que la baisse du rapport L/P soit constante et ce, malgré la grande variabilité des taux de lécithines et de protéines. Ces 2 pneumoconioses déclenche une importante réaction alvéolaire de défense immunitaire mettant exclusivement en jeu les Ig G comme dans le tabagisme.

Chez les asbestosiques, la réaction cellulaire est beaucoup moins prononcée que chez les silicotiques, ce qui semble indiquer une plus grande agressivité de l'empoussiérage par la silice.

- 7.3 * Chez les fumeurs asbestosiques (n = 4) et silicotiques (n = 4), les concentrations en albumine et K^+ n'étaient pas significativement différentes de celles observées chez des témoins fumeurs. Il en est de même pour les rapports L/P.
- * Chez ces sujets, la réponse cellulaire est de type tabagique. Son intensité, très variable, est fonction de l'imprégnation tabagique. On ne peut distinguer dans cette réponse les effets respectifs de l'empoussiérage et du tabagisme.
- * Sur le plan cytologique il semble que la réaction immuno-allergique pouvant apparaître dans le tabagisme (2 cas sur 5) soit potentialisée par l'empoussiérage. Des polynucléaires éosinophiles sont en effet retrouvés chez les empoussiérés fumeurs dans 5 cas sur 8 (3 cas sur 4 chez les asbestosiques, 2 cas sur 4 chez les silicotiques).

8. En conclusion

Dans ce travail, nous nous sommes attachés à codifier et à promouvoir tant sur le plan expérimental que clinique, le lavage broncho-alvéolaire en tant que procédé nouveau d'exploration du poumon profond, notamment en pathologie de l'environnement.

Sa généralisation au cours des bronchoscopies permettrait d'établir le rapport L/P de détermination facile, donnant un reflet satisfaisant de l'état de la barrière alvéolo-capillaire.

Par ailleurs, nous avons souligné les nombreuses possibilités d'atteinte de cette barrière par voie endogène et proposons un test simple d'innocuité pulmonaire des substances pouvant être ingérées ou injectées, basé sur l'établissement du rapport L/P dans les liquides de lavage, chez des souris traitées, après déplétion sanguine ou non.

L'étude des modifications du revêtement alvéolaire par le biais des liquides de lavage, au cours de différentes agressions chez l'animal et chez l'homme nous a obligé à mettre en œuvre des techniques originales adaptées à ce type de milieu et à considérer sous un angle pluridisciplinaire les problèmes relatifs à la pathologie de l'environnement aussi bien en aigu qu'en chronique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANGUS G., THURLBECK W. - Number of alveoli in the human lung
J. Appl. Physiol 1972, 32 483-489
- ARNER E., RHOADES R. - Long term nitrogen dioxide exposure
Arch Environ Health, 1973, 26 156-160
- ARNOUX B., FRITSCH P., MASSE R., CHRETIEN J. - Cinétique des défenses pulmonaires au niveau du poumon profond
Bull. europ Physiopath. resp., 1977, 13 83-94
- ASKIN F., KUHN C. - The cellular origin of pulmonary surfactant
Lab Invest 1971, 25 260-268
- AUERBACH O., HAMMOND E., GARFINKEL L., BENANTE C. - Relation of smoking and age to emphysema
N. Engl. J. Med. 1972, 286 853-860
- BABIOR B., KIPNESS R., CORNUTTE J. - Biological defense mechanisms. The production of leukocytes of superoxide : a potential bactericidal agent
J. Clin. Invest. 1973, 52 741-747
- BALIS J., SHELLEY S., Mc CUE M., RAPPAPORT E. - Mechanisms of damage to the lung surfactant system. Ultrastructure and quantification of normal and in vitro inactivated lung surfactant
Exp. Mol. Path. 1971, 14 243-262
- BARBER A., BERHEIM F. - Lipid peroxidation : Its measurements, occurrence and significance in animal tissues
Advances in gerontological Research 1967, 2 355-403
- BARTLETT G. - Phosphorus assay in column chromatography
J. Biol. Chem., 1959, 234 466-468
- BEREND N., WOOLCOK A., MARLIN G. - Correlation between the function and structure of the lung in smokers
Am. Rev. Resp. Dis., 1979, 119 695-705
- BERNHEIM F., BERNHEIM M., WILBUR K. - The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipids
J. Biol. Chem. 1948, 174 257-264
- BHATTACHARYYA S., LYNN W. - Structural studies on the oligosaccharides of a glycoprotein isolated from alveoli of patients with alveolar proteinosis
J. Biol. Chem., 1977, 252 1172-1179
- BHATTACHARYYA S., PASSERO M., DI AUGUSTINE R., LYNN W. - Isolation and characterization of two hydroxyproline containing glycoproteins from normal animal lung lavage and lamellar bodies
J. Clin. Invest., 1975, 55 914-920
- BHATTACHARYYA S., ROSE M., LYNN M., Mac LEOD C., ALBERTS M., LYNN W. - Isolation and characterization of a unique glycoprotein from lavage of chicken lungs and lamellar organelles
Amer. Rev. Resp. Dis., 1976, 114 843-850
- BIGNON J., JAURAND M., JAUBERT F., CHAHINIAN P. - Les protéines sériques de la surface alvéolaire
Rev. fr. Mal. Resp., 1976, 4 suppl. 3 49-66

BIGNON J., JAURAND M., PINCHON M., SAPIN C., WARNET J. - Immunoelectron microscopic and immunochemical demonstrations of serum proteins in the alveolar lining material of the rat lung
Am. Rev. Resp. Dis., 1976, 113 109-120

BLUMENKRANTZ N., ASBOE-HANSEN G. - New method for quantitative determination of uronic Acids
Anal. Biochem., 1973, 54 484-489

BOLANDE R., KLAUS M. - The morphologic demonstration of an alveolar lining layer and its relationship to pulmonary surfactant
Amer. J. Pathol., 1964, 45 449-463

BONNISCHEN R. - Ethanol : determination with alcohol dehydrogenase and DPN in *Methods of Enzymatic Analysis*, Ed. Bergmeyer, Academic Press London, 1965, pp. 285-287

BORNSTEIN P. - The biosynthesis of collagen
Ann. Rev. Biochem., 1974, 43 567-603

BOUDENE C., JOUANY J.M., TRUHAUT R. - Etude de la toxicité des produits de combustion et de pyrolyse de matériaux utilisés dans le bâtiment (III)
Arch. Mal. Prof., 1978, 39 3-24

BOULEY G., DUBREUIL A., DESPAUX N., BOUDENE C. - Toxic effects of cadmium microparticles on the respiratory system
Scand. J. Work Environ. Health, 1977, 3 116-121

BOULEY G., PRULIERE D., RIOTTE D. - Action des gaz d'échappement de moteur à essence, dilués dans l'air, sur la capacité immunologique du rat et de la souris
Revue d'Immunologie, 1971, 35 197-204

BOUSQUET J., MICHEL F. - Les immunoglobulines intervenant dans la défense de l'appareil respiratoire
Rev. fr. Mal. Resp., 1978, 6 629-654

BOWDEN D. - The alveolar macrophage
Curr. Top. Path., 1971, 55 1-36

BOWDEN D., ADAMSON Y. - Reparative changes following pulmonary cell injury. Ultrastructural cytodynamic and surfactant studies in mice after oxygen exposure
Arch. Path., 1971, 92 271-283

BOWDEN D., ADAMSON Y. - The pulmonary interstitial cell as immediate precursor of the alveolar macrophage
Amer. J. Pathol., 1972, 68 521-536

BOYLES P. - Interstitial pulmonary fibrosis after long term busulphan therapy
Clin. Med., 1969, 76 6-11

BRADLEY K., Mc CONNELL-BREUL S., CRYSTAL R. - Collagen in the human lung Quantification of rates of synthesis and partial characterization of composition
J. Clin. Invest., 1975, 55 543-550

- BRAIN J., GOLDE D., GREEN G., MASSARO D., VALBERG P., WARD P., WERB Z. -
Biologic potential of pulmonary macrophages
Amer. Rev. Resp. Dis., 1978, 118 435-443
- BRODY A., CRAIGHEAD J. - Cytoplasmic inclusions in pulmonary macrophages of
cigarette smokers
Lab. Invest., 1975, 32 125-132
- BROWN E., JOHNSON R., CLEMENTS J. - Pulmonary surface tension
J. Appl. Physiol., 1959, 14 717-720
- CHEVALIER G., COLLET A. - In vivo incorporation of choline ³H, leucine ³H,
galactose ³H in alveolar type II pneumocytes in relation to surfactant
synthesis.
Anat. Rec., 1972, 174 289-310
- CHRETIEN J., THIEBLEMONT M., MASSE R., CHAMEAUD J., PERRAUD R., LEBAS F. -
Action de la fumée de tabac sur le macrophage alvéolaire. Quelques données
récentes
Nouv. Presse Med., 1975, 4 2327-2331
- CLARK J., LAMBERTSEN C. - Pulmonary oxygen toxicity
Rev. Pharmacol., 1971, 23 133-136
- CLEMENTS J. - Dependence of pressure volume characteristics of lung on
intrinsic surface active material
Amer. J. Physiol., 1956, 187 592-598
- CLEMENTS J. - Pulmonary surfactant
Amer. Rev. Resp. Dis., 1970, 101 984-990
- CLEMENTS J., BROWN E., JOHNSON R. - Pulmonary surface tension and the mucus
lining of the lungs : some theoretical considerations
J. Appl. Physiol., 1958, 12 262-268
- CLEMENTS J., HUSTEAD R., JOHNSON R., GRIBETZ I. - Pulmonary surface tension
and alveolar stability
J. Appl. Physiol., 1961, 16 444-450
- COALSON J., BELLER J., GREENFIELD L. - Effects of 100 percent oxygen
ventilation on pulmonary ultrastructure and mechanics
J. Path., 1971, 104 267-273
- COHEN A., CLINE M. - The human alveolar macrophage : Isolation cultivation
in vitro and studies of morphologic and functional characteristics
J. Clin. Invest., 1971, 50, 1390-1398
- COHEN A., GOLD W. - Defense mechanisms of the lungs
Ann. Rev. Physiol., 1975, 37 325-350
- COHN Z., WIENER E. - The particulate hydrolases of macrophages II
Biochemical and morphological response to particle ingestion
J. Exp. Med., 1963, 118 991-1008
- COLACICCO G., BASU M.K. - Effect of serum albumin on dynamic force area
curve of dipalmitoyl lecithin
Respir. Physiol., 1978, 32 265-279

- COLACICCO G., RAY A., HENDRICKSON H., BUCKELEW A., SCARPELLI E. - Isolation of secretory Ig A from a lung surfactant fraction
Prep. Biochem., 1976, 6 443-450
- COMMINS B., LAWTHOR P. - A sensitive method for the determination of carboxyhaemoglobin in a finger prick sample of blood
BR. J. Ind. Med., 1965, 22 139-143
- CORNISH H., ABAR E. - Toxicity of pyrolysis Products of vinyl plastics
Arch. Environ Health, 1969, 19 15-20
- CUTRONEO K.R., GUZMAN N.A., SHARAWY M.M. - Evidence for a subcellular vesicular site of collagen prolyl hydroxylation
J. Biol. Chem., 1974, 249 5989-5994
- DANIELE R., ALTOSE M., ROWLANDS D. - Immunocompetent cells from the lower respiratory tract of normal lungs
J. Clin. Invest., 1975, 56 986-995
- DAVIS N., BAILEY A. - Chemical synthesis of the reduced form of an intermolecular crosslink of collagen
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, 45 1416-1422
- DEATON C., MAXWELL K., SMITH R., CREVELING R. - Use of laser nephelometry in the measurement of serum proteins
Clin. Chem., 1976, 22 1465-1471
- DE CHATELET L., MULLIKIN D., Mc CALL C. - The generation of superoxide anion by various types of phagocytes
J. Infect. Dis., 1975, 131 443-446
- DELAHUNTY T., SPITZER H., JIMENEZ J., JOHNSTON J. - Phosphatidate phosphohydrolase activity in porcine pulmonary surfactant
Amer. Rev. Resp. Dis., 1979, 119 75-80
- DERMER G. - The pulmonary surfactant content of the inclusion bodies found within type II alveolar cells
J. ultrastruct. Res., 1970, 33 306-317
- DISCHE Z., SHETTLES L. - A specific color reaction of methyl pentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination
J. Biol. Chem., 1948, 175 595-603
- EMIRGIL C., SOBOL B., HEYMANN B. - Pulmonary function in alcoholics
Am. J. Med., 1974, 57 69-75
- ENGLE M., DANSERS R., LONGMORE W. - Phospholipid composition and acetyl transferase activity of lamellar bodies isolated from rat lung
Arch. Biochem. Biophys., 1976, 173 586-595
- EVANS M., CABRAL L., STEPHENS R., FREEMAN G. - Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂
Am. J. Pathol., 1973, 70 175-198
- EVEN Ph., CAUBARRERE I., DUROUX P., RUFF F., FERNANDEZ F., BROUET G. - Mouvement de l'eau et des solutés dans le poumon normal et au cours des œdèmes pulmonaires lésionnels ou non
Rev. Franç. Mal. Resp., 1973, 1 1217-1230

- FANSON R., WAITE M. - Lysosomal phospholipases A₁ et A₂ of normal and bacillus Calmette Guérin induced alveolar macrophages
J. cell. Biol., 1973, 56 621-627
- FARIDY E. - Effect of distension on release of surfactant in excised dogs lungs
Respir. Physiol., 1976, 27 99-114
- FEDORKO M., HIRSCH J. - Structure of monocytes and macrophages
Semin. Hemat., 1970, 7 109-124
- FINLEY T., LADMAN A. - Low yield of pulmonary surfactant in cigarette smokers
New Engl. J. Med., 1972, 286 223-227
- FINLEY T., SWENSON E., CURRAN W. - Bronchopulmonary lavage in normal subjects and patients with obstructive lung disease
Ann. Intern. Med., 1967, 66 651-658
- FISHER H., CLEMENTS J., WRIGHT R. - Enhancement of oxygen toxicity by the herbicide paraquat
Amer Rev. Resp. Dis., 1973, 107 246-252
- FLEISHMAN R., BAKER J., THOMPSON G., SCHAEPPPI U. et coll. - Bleomycin induced interstitial pneumonia in dogs
Thorax, 1971, 26 675-680
- FOLCH J., LEES M., SLOANE-STANLEY G. - A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues
J. Biol. Chem., 1957, 226 497-501
- FRIDOVITCH I. - Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity in free radicals in biology
W.A. Pryor ed., Academic Press, 1976, pp. 239-277
- FRUCHART J., PONTHEIU A., PORCHET N. et coll. - Détermination précise du rapport lécithine/sphingomyeline dans le liquide amniotique : proposition d'une méthode de référence
Clin. Chim. Acta, 1977, 79 549-556
- FUNG Y., SOBIN S. - Theory of sheet flow in lung alveoli
J. Appl. Physiol., 1969, 26 472-488
- GAHMBERG C., ANDERSON L. - Leukocyte surface origin of human α_1 acid glycoprotein
J. Exp. Med., 1978, 801 507-521
- GAIL D., STEINKAMP H., MASSARO D. - Interspecies variation in lung lavage and tissue saturated Phosphatidyl choline
Respir. Physiol., 1978, 33 289-297
- GALLOP P., BLUMENFELD O., SEIFTER S. - Structure and metabolism of connective tissue proteins
Ann. Rev. Biochem., 1972, 41 617-672
- GEIGER K., GALLAGHER M., HEDLEY WHYTE J. - Cellular distribution and clearance of aerosolized dipalmitoyl lecithin
J. Appl. Physiol., 1975, 39 759-766

GIL J., REISS O. - Isolation and characterization of lamellar bodies and tubular myelin from rat lung homogenates
J. Cell. Biol., 1973, 58 152-171

GODINEZ Q., SANDERS R., LONGMORE L. - Phosphatidylglycerol in rat lung. I. - Identification as a metabolically active phospholipid in isolated perfused rat lung
Biochemistry, 1975, 14 830-834

GOERKE J. - Lung surfactant
Biochem. Biophys. Acta, 1974, 344 241-261

GOLDE D., BYERS L., FINLEY T. - Proliferative capacity of human alveolar macrophage
Nature, 1974, 247 373-375

GOLDE D., FINLEY T., CLINE M. - The pulmonary macrophage in acute leukemia
N. Engl. J. Med., 1974, 290 875-878

GOLDFARB A., SAIDEL L., MOSOVICH E. - The ultraviolet absorption spectra of proteins
J. Biol. Chem., 1951, 193 397-404

GOLDSTEIN E., BARTLEMA H. - Role of the alveolar macrophage in pulmonary bacterial defense
Bull. europ. Physiopath. resp., 1977, 13 57-67

GOLDSTEIN E., LIPPERT W., WARSHANER D. - Pulmonary alveolar macrophage : Defender against bacterial infection of the lung
J. Clin. Invest., 1974, 54 519-528

GOULD V., SMUCKLER E. - Alveolar injury in acute carbone tetrachloride intoxication
Arch. intern. Med., 1971, 128 109-117

GRANT M., KEFALIDES N., PROCKOP D. - The biosynthesis of basement membrane collagen in embryonic chick lens
J. Biol. Chem., 1972, 247 3539-3551

GRANT M., PROCKOP D. - The biosynthesis of collagen
N. Engl. J. Med., 1972, 286 194-199, 242-249, 291-300

GRAY M., LIAN S., STAHLMAN M., LEQUIRE V. - Partial characterization of lamellar body rich cell fractions from lungs of lamb of different ages
Fed. Proc., 1974, 33 224-229

GREEN G. - Defense of the lung
Amer. Rev. Resp. Dis., 1970, 102 691-703

GREEN G., JAKAB C., LOW R., DAVIS G. - Defense mechanisms of the respiratory membrane
Am. Rev. Resp. Dis., 1977, 115 479-514

GROSS I., WARSHAW J. - Enzyme activities related to fatty acid synthesis in developing mammalian lung
Pediat. Res., 1974, 8 193-199

- HAMOSH M., HAMOSH P. - Lipoprotein lipase in rat lung : the effect of fasting
Biochim. Biophys. Acta, 1975, 380 132-140
- HAMOSH M., SHECHTER Y., HAMOSH P. - Effect of tobacco smoke on the metabolism of rat lung
Arch. Environ. Health., 1979, 34 17-23
- HANCE A., CRYSTAL R. - The connective tissue of lung
Amer. Rev. Resp. Dis., 1975, 112 657-711
- HARARI A., LEMAIRE F., VOLTER F., RAPIN M. - Hemodynamic assessment in non cardiogenic pulmonary edema
Europ. Soc. Clin. Inv., 1974, Abstract n° 147
- HAYASHI M., SORNBERGER C. et HUBER G. - Morphometric analysis of tracheal gland secretion and hypertrophy in male and female rats after experimental exposure to tobacco smoke
Amer. Rev. Resp. Dis., 1979, 119 67-73
- HAYEM A., SCHARFMAN A., LAINE A., LEBAS J., KOPACZEWSKI A. - Composition proteique et enzymatique des liquides de lavage bronchique et broncho-alveolaire de six sujets normaux
Bull. europ. Physiopath. resp., 1979, 15 611-624
- HENDERSON R., PFLEGER R. - Surface tension studies of phosphatidylglycerol isolated from the lungs of beagle dogs
Lipids, 1972, 7 492-494
- HENDRY A., POSSMAYER F. - Pulmonary phospholipid biosynthesis : properties of a stable microsomal glycerophosphate acyltransferase preparation from rabbit lung
Biochim. Biophys. Acta, 1974, 369 156-172
- HINDLE W., POSNER E., SWEETNAM M., TAN R. - Pleural effusion and fibrosis during treatment with methysergide
Brit. Med. J., 1970, 1 605-606
- HOMASSON J., BOISSINOT E., ROUILLER A., MOLINE J. - Constance de l'altération du transfert alvéolo-capillaire chez l'homme par la bléomycine
Nouv. Presse Med., 1974, 3 1103-1105
- HOPEWELL P., MURRAY J. - The adult respiratory distress syndrome
Ann. Rev. Med., 1976, 27 343-356
- JANOFF A. - Elastase like protease of human granulocytes and alveolar macrophages. In "Pulmonary Emphysema and Proteolysis"
Edited by Mittman C., New-York, Academic Press, 1972, pp. 205-224
- JANOFF A., CARP H. - Possible mechanisms of emphysema in smokers
Am. Rev. Resp. Dis., 1977, 116 65-72
- JOBE A. - An in vivo comparison of acetate and palmitate as precursors of surfactant phosphatidylcholine
Biochem. Biophys. Acta, 1979, 572 404-412

- JOHN R., THOMAS J. - Chemical compositions of elastins isolated from aortas and pulmonary tissues of humans of different ages
Biochem J., 1972, 127 261-269
- JOUANY J.M., TRUHAUT R., BOUDENE C. - Etude de la toxicité des produits de combustion et de pyrolyse de matériaux utilisés dans le bâtiment (II)
Arch. Mal. Prof., 1977, 38 751-772
- KALB V., BERNLOHR R. - A new spectrophotometric assay for protein in cell extracts
Anal. Biochem., 1977, 82 362-371
- KALTREIDER H. - Expression of immune mechanisms in the lung
Am. Rev. Resp. Dis., 1976, 113 347-379
- KALTREIDER H., CHAN M. - The class specific immunoglobulin composition of fluids obtained from various levels of the canine respiratory tract.
J. Immunol., 1976, 116 423-429
- KALTREIDER H., SALMON S. - Immunology of the lower respiratory tract
J. Clin. Invest., 1973, 52 2211-2217 - 1974, 54 263-270
- KAPANCI Y., ASSIMACOPOULOS A., IRLE C. - Contractile interstitial cells in pulmonary alveolar septa
J. Cell. Biol., 1974, 60 375-392
- KAPANCI Y., TOSCO R., EGGERMANN J. - Demonstration of the extracellular alveolar lining layer surfactant in human lungs on ultrastructural study
Virchows Arch. Abt. B. Zellpath, 1972, 10 243-252
- KARRER H. (a) - An electron microscopic study of the fine structure of pulmonary capillaries and alveoli of the mouse
Bull. Johns Hopkins Hosp., 1956, 98 65-84
- KARRER H. (b) - The ultrastructure of mouse lung
Exptl Cell. Res., 1956, 11 542-547
- KARRER H. (c) - The ultrastructure of mouse lung
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1956, 2 241-252
- KAZMIEROWSKI J., ADUAN R., REYNOLDS H. - Pulmonary host defense : coordinated interaction of mechanical, cellular and humoral immune systems of the lung
Bull. Europ. Physiopath. Resp., 1977, 13 103-116
- KIM M., GOLDSTEIN E., LEWIS J., LIPPERT W., WARSHANER D. - Murine pulmonary alveolar macrophages : rates of bacterial ingestion inactivation and destruction
J. Infect. Dis., 1976, 133 310-319
- KING R., CLEMENTS J. - Surface active materials from dog lung II. Composition and physiological correlations
Amer. J. Physiol., 1972, 223 715-726
- KIRSHNER R., ESTERLY J. - Pulmonary lesions associated with busulfan therapy for chronic myelogenous leukemia
Cancer (Philad), 1971, 27 1074-1080

KLEBANOFF S., HAMON C. - Antimicrobial systems of mononuclear phagocytes.
In *Mononuclear phagocytes in immunity infection and pathology*
Blackwell Scientific Publications, London, 1975, pp. 507-531

KOWITZ R., REBA R., PARKER R., SPICER W. - Effects of chlorine gas upon
respiratory function
Arch. Environ. Health, 1967, 14 545-553

KROGH M. - The diffusion of gases through the lungs of man
J. Physiol., 1914, 49 271-300

LAFORCE M., KELLY W., HUBER G. - Inactivation of staphylococci by alveolar
macrophages with preliminary observations on the importance of alveolar
lining material
Amer. Rev. Resp. Dis., 1973, 108 783-790

LAROS C. - The pathogenesis of lung emphysema
Respiration, 1972, 29 442-457

LAROS C., KUYPER C., JANSSEN H. - The chemical composition of fresh human
lung parenchyma
Respiration, 1972, 29 458-467

LAURENT T., OBRINK B. - On the restriction of the rotational diffusion of
proteins in polymer networks
Eur. J. Biochem., 1972, 28 94-101

LEAKE E., SMITH W. - Diffuse interstitial pulmonary fibrosis after
busulphan therapy
Lancet, 1963, 2 432-435

LE MESURIER S., STEWART B., O'CONNELL P., LYKKE A. - Pulmonary responses to
atmospheric pollutants. II. Effect of petrol vapour inhalation on secretion
of pulmonary surfactant
Pathology, 1979, 11 81-87

LEVITSKY S., ANNABLE C., PARK B., DAVIS A., THOMAS P. - Depletion of
alveolar surface active material by transbronchial plasma irrigation of
the lung
Ann. Surg., 1971, 173 107-112

LOW F. - The pulmonary alveolar epithelium of laboratory mammals and man
Anat. Rec., 1953, 117 241-263

LOW F. - The extracellular portion of the human blood-air barrier and its
relation to tissue space
Anat. Rec., 1961, 139 105-124

LOW F., DANIELS C. - Electron microscopy of the rat lung
Anat. Rec., 1952, 113 437-450

LOW R., DAVIS G., GIANCOLA M. - Biochemical analysis of broncho-alveolar
lavage fluids of healthy human volunteer smokers and non smokers
Amer. Rev. Respir. Dis., 1978, 118 863-875

LOWRY O., ROSEBROUGH N., FARR A., RANDALL R. - Protein dosage with the
Folin phenol reagent
J. Biol. Chem., 1951, 193 265-275

LYKKE A., STEWART B., O'CONNELL P., LE MESURIER S. - Pulmonary responses to atmospheric pollutants : An ultrastructural study of fibrosing alveolitis evoked by petrol vapour
Pathology, 1979, 11 71-80

LYNN W., SAHU S., BHATTACHARYYA S. - Alveolar surface glycoproteins : their structure and accumulation in diseased human airways
Colloque International sur le lavage broncho-alveolaire chez l'homme, Lille, 1979

MACKLIN C. - The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumonocytes
Lancet, 1954, 266 1099-1104

MARSCHALL R., NEUBERGER A. - Qualitative and quantitative analysis of the component sugars
in Glycoproteins, ed. A. Gottschalk, Elsevier Londres, 1972, tome 1, pp. 224-299

MASON R., NELLENBOGEN J., CLEMENTS J. - Isolation of disaturated phosphatidylcholine with osmium tetroxide
J. Lip. Res., 1976, 17 281-284

Mc CULLOUGH B., COLLINS J., JOHANSON W., GROVER F. - Bleomycin induced diffuse interstitial pulmonary fibrosis in baboons
J. Clin. Invest., 1978, 61 79-88

MEBAN C. - Localization of phosphatidic acid phosphatase activity in granular pneumocytes
J.Cell. Biol., 1972, 53 249-252

MEYRICK B., REID L. - The alveolar wall
Br. J. Dis. Chest., 1970, 64 121-140

MICHELSON A., Mc CORD - Superoxide and superoxide dismutase
Academic Press, 1977

MILLER E., ROBERTSON P. - The stability of collagen cross links when derived from hydroxylysyl residues
Bichem. Biophys. Res. Commun., 1973, 54 432-439

MOTLES E., VERGARA G., OYARZUN M., PUIG F., VAINROY M. - Efecto de la acetazolamida sobre el sistema surfactante del pulmon de cobayo
Arch. Biol. Exper., 1971, 8 19-25

MURRAY J., HOPEWELL P. - The adult respiratory distress syndrome in Respiratory emergencies, ed. par Shibel et Moser, Mosby St-Louis, 1977 pp. 101-128

NAGAISHI C. - Functional anatomy and histology of the lung
London University Park Press, 1972, pp. 102-180

NEWHOUSE M., SANCHIS J., BIENENSTOCK J. - Lung defense mechanisms
N. Engl. J. Med., 1976, 295 990-997, 1045-1052

NICHOLS B. - Normal rabbit alveolar macrophages. I. The phagocytosis of tubular myelin
J. Exp. Med., 1976, 44 906-919

- NIR I., PEASE D. - Polysaccharides in lung alveoli
Am. J. Anat., 1976, 147 457-464
- OGILVIE C., FORSTER R., BLAKEMORE W., MORTON J. - A standardized breath holding technique for the clinical measurement of the diffusing capacity of the lung for carbon monoxide
J. Clin. Invest., 1957, 36 1-9
- OLINER H., SCHWARTZ R., RUBIO P. - Interstitial pulmonary fibrosis following busulphan therapy
Am. J. Med., 1961, 31 134-139
- OYANAGUI Y. - Inhibition of superoxide anion. Production in non stimulated guinea pig peritoneal exudate cells by anti inflammatory drugs
Biochem. Pharmacol., 1978, 27 777-782
- PAGE-ROBERTS B. - Preparation and partial characterization of a lamellar body fraction from rat lung
Biochem. Biophys. Acta, 1972, 260 334-338
- PAINE A. - Excited states of oxygen in biology
Biochem. Pharmacol., 1978, 27 1805-1813
- PATTLE R. - Properties function and origin of the alveolar lining layer
Proc. Roy. Soc. (London), 1958, B 148 217-240
- PATTLE R. - The cause of the stability of bubbles derived from the lung
Phys. Med. Biol., 1960, 5 11-26
- PATTLE R. - The lining layer of the lung alveoli
Brit. Med. Bull., 1963, 19 41-44
- PATTLE R. - Surface lining of lung alveoli
Physiol. Rev., 1965, 45 48-79
- PATTLE R., CLAIREAUX A., DAVIES P., CAMERON A. - Inability to form a lung lining film as a cause of the respiratory distress syndrome in the newborn
Lancet, 1962, 2 469-473
- PFLEGER R., HENDERSON R., WAIDE J. - Phosphatidylglycerol. A major component of pulmonary surfactant
Chem. Phys. Lipids, 1972, 9 51-68
- PRATT S., FINLEY T., SMITH M., LADMAN A. - A comparison of alveolar macrophages and pulmonary surfactant obtained from the lungs of human smokers and non smokers by endobronchial lavage
Anat. Rec., 1969, 163 497-508
- PRE J., BLADIER D., GEORGES R., SAUMON G., TURBIE Ph., MAHE C., BATESTI J.-P. - Intérêt du rapport Lécithines/Protéines dans le liquide de lavage alvéolaire en pathologie pulmonaire interstitielle
Colloque INSERM International sur le lavage broncho-alvéolaire chez l'homme, Institut Pasteur, Lille, Février 1979

- PRESTON B., OBRINK B., LAURENT R. - The rotational diffusion of albumin in solutions of connective tissue polysaccharides
Eur. J. Biochem., 1973, 33 401-406
- PREVOST M., LEVY P., BOURBON P., DOUSTE-BLAZY L. - Action in vivo de l'anhydride sulfureux sur le surfactant pulmonaire de rat
J. Europ. Tox., 1975, 8 47-51
- RAHMAN Q., BEG M., VISWANATHAN P., ZAIDI S. - Biochemical changes caused by asbestos dust in the lungs of rats
Scand. J. Work environ. Health, 1975, 1, 50-53
- REYNOLDS H. - Lung host defense : A status report
Chest, 1979, 75 Supplément 239-242
- REYNOLDS H., ATKINSON J., NEWBALL H., FRANK M. - Receptors for immunoglobulins and complement on human and rabbit alveolar macrophages
Clin. Res., 1974, 22 427 (Abstract)
- REYNOLDS H., ATKINSON J., NEWBALL H., FRANK M. - Receptors for immunoglobulin and complement on human alveolar macrophages
J. Immunol., 1975, 114 1813-1819
- REYNOLDS H., FULMER J., KAZMIEROWSKI J., ROBERTS W., FRANK M., CRYSTAL R. - Analysis of cellular and Protein content of broncho-alveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary, fibrosis and chronic hypersensitivity pneumonitis
J. Clin. Invest., 1977, 59 165-175
- REYNOLDS H., KAZMIEROWSKI J., NEWBALL H. - Specificity of opsonic antibodies to enhance phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* by human alveolar macrophages
J. Clin. Invest., 1975, 56 376-385
- REYNOLDS H., NEWBALL H. - Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lungs by bronchial lavage
J. Lab. Clin. Med., 1974, 84 559-573
- REYNOLDS H., NEWBALL H. - Fluid and cellular milieu of the human respiratory tract
in *Immunologic and infections reactions in the lung*, édité par Kirkpatrick C et Reynolds H., Marcel Dekker, New-York, 1976, pp. 3-27
- REYNOLDS H., THOMPSON R. - Pulmonary host defenses. II. Interactions of respiratory antibodies with *Pseudomonas aeruginosa* and alveolar macrophages
J. Immunol., 1973, 111 369-380
- ROBERT L. - Les glycoprotéines tissulaires. Hypothèses concernant les membranes basales au cours du diabète
Presse Méd., 1971, 79 2277-2283
- ROBERT L., ROBERT B. - La biosynthèse des glycoprotéines du tissu conjonctif et sa régulation
Expos. Ann. Biochim. Méd., 1970, 30 189-227
- ROBERT L., ROBERT B. - Structural glycoproteins of connective tissue : their role in morphogenesis and immunopathology
in "Connective Tissues. Biochemistry and Pathophysiology", eds R. Fricke et F. Hartman, Springer-Verlag Berlin, 1974, pp. 240-256

ROONEY S., PAGE-ROBERTS B., MOTOYAMA E. - Role of lamellar inclusions in surfactant production : studies on phospholipids. Composition and biosynthesis in rat and rabbit lung subcellular fraction
J. Lip. Res., 1975, 16 418-425

ROSENOW E. - Drug induced hypersensitivity disease of the lung in Immunologic and Infections reactions in the lung, ed. Kirkpatrick et Reynolds, Dekker, New-York, 1976, pp. 261-287

ROUJEAU J., NOGUES G., LECLERC J.-P. - Intoxication par le paraquat. Etude anatomoclinique et expérimentale
Rev. Franç. Mal. Resp., 1974, 1 65-73

RYAN U., RYAN J., SMITH D. - Alveolar type II cells studies on mode of release of lamellar bodies
Tissue cell., 1975, 7 587-599

SAHU S., DI AUGUSTINE R., LYNN W. - Lipids found in pulmonary lavage of patients with alveolar proteinosis and in rabbit lamellar bodies
Am. Rev. Resp. Dis., 1976, 114 177-185

SAWADA H., OKAJIMA Y., HAYASHI M., YAMABAYASHI H. - Reassembly in vitro of lung surfactant lipoprotein
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1977, 74 1263-1267

SCARPELLI E., CONDORELLI S., COLACICCO G., COSMI E. - Lamb fetal pulmonary fluid. II. Fate of phosphatidylcholine
Pediatr. Res., 1975, 9 195-207

SCHMIDT H. (a) - Die TBA Zahl als Mass fur den Oxydationsgrad von Nahrungsfetten
Fette Seifen Anstrichmittel, 1959, 61 127-133

SCHMIDT H. (b) - Uber TBA Methin Farbstoffe
Fette Seifen Anstrichmittel, 1959, 61 881-886

SCHULTZE H., HEREMANS J. - Molecular biology of human Proteins
Vol. 1 p. 182, Elsevier London, 1961

SHIMOYO T., ABE M., OHTA M. - A method for determination of saturated phosphatidylcholine
J. Lipid Res., 1974, 15 525-527

SIEBER A., GROSS J. - Determination of proteins by Laser nephelometry
Labor Blatter, 1976, 26 117-124

SIEGEL R., PINNELL S., MARTIN G. - Crosslinking of collagen and elastin. Properties of lysyl oxidase
Biochemistry, 1970, 9 4486-4492

SIMON L., LIU J., THEODORE J., ROBIN E. - Effect of hyperoxia, hypoxia and maturation on superoxide dismutase activity in isolated alveolar macrophages
Amer. Rev. Resp. Dis., 1977, 115 279-284

SMITH U., RYAN J. - Electron microscopy of endothelial and epithelial components of the lung
Fed. Proc., 1973, 32 1957-1966

- SNIDER G., CELLI B., GOLDSTEIN R., O'BRIEN J., LUCEY E. - Chronic interstitial pulmonary fibrosis produced in hamsters by endotracheal bleomycin
Am. Rev. Resp. Dis., 1978, 117 289-297
- SPIRO R.G. - Characterization and quantitative determination of the hydroxylysine linked carbohydrate units of several collagens
J. Biol. Chem., 1969, 244 602-612
- SPITZER H., RICE J., Mc DONALD P., JOHNSTON J. - Phospholipid biosynthesis in lung lamellar bodies
Biochem Biophys. Res. Commun., 1975, 66 17-23
- STARCHER B., KUHN C., OVERTON J. - Increased elastin and collagen content in the lungs of hamsters receiving an intratracheal injection of bleomycin
Am. Rev. Resp. Dis., 1978, 117 299-305
- STEPHENS R., SLOAN M., EVANS M., FREEMAN G. - Early response of lung to low levels of ozone
Am. J. Pathol., 1973, 74 31-58
- STOEKENIUS W., MAHR S. - Studies on the reaction of osmium tetroxide with lipids and related compounds
Lab. Invest., 1975, 14 458-469
- STOSSEL T. - Phagocytosis
New Engl. J. Med., 1974, 290 774-780
- STOSSEL T., MASON R., POLLARD T., VAUGHAN M. - Isolation and properties of phagocytic vacuoles. II. Alveolar macrophages
J. Clin. Invest., 1972, 51 604-614
- TANZER M. - Cross linking of collagen
Science, 1973, 180 561-566
- TETLEY T., RICHARDS R., HARWOOD J. - Changes in pulmonary surfactant and Phosphatidylcholine metabolism in rats exposed to chrysotile asbestos dust
Biochem. J., 1977, 166 323-329
- THOM M., ZACHMAN R. - The enzymes of lecithin biosynthesis in human neonatal lungs : IV. Phosphorylcholine cytidyl transferase
Ped. Res., 1975, 9 201-206
- THURLBECK W., WILLIAM M. - The internal surface area of nonemphysematous lungs
Am. Rev. Resp. Dis., 1967, 95 765-775
- TIERNEY D., CLEMENTS J., TRAHAN H. - Rates of replacement of lecithins and alveolar instability in rat lungs
Amer. J. Physiol., 1967, 213 671-676
- TOMASI T. - Secretory immunoglobulins
N. Engl. J. Med., 1972, 287 500-506
- TOPILOW A., TOTHEMBRY S., COTRELL T. - Interstitial pneumonia after prolonged treatment with cyclophosphamide
Am. Rev. Resp. Dis., 1973, 108 114-118

- TRUHAUT R., BOUDENE C., JOUANY J.M. - Etude de la toxicité des produits de combustion et de pyrolyse de matériaux utilisés dans le bâtiment. I. Etude de la toxicité aiguë, par voie aérienne, des toxiques majeurs pouvant être libérés lors d'incendies
Arch. Mal. prof., 1975, 36 707-738
- TRUHAUT R., BOUDENE C., JOUANY J.M., DUCASTEL F. - Première note sur une méthode d'intoxication aiguë de l'animal par voie pulmonaire et sa représentation graphique (Physiogramme)
J. Europ. Toxicol., 1969, 4 200-206
- UITTO J., JIMENEZ S.A., DEHM P., PROCKOP D.J. - Characterization of the precursor forms of the α_1 and α_2 chains of collagen from matrix free tendon cell
1972, Biochim. Biophys. Acta, 278 198-205
- VAN DER VIES - Individual determination of cortisol and corticosterone in a single small sample of peripheral blood
Acta Endocrinologica, 1961, 38 399-406
- VAN GOLDE L. - Metabolism of phospholipids in the lung
Amer. Rev. Resp. Dis., 1976, 114 977-1 000.
- VIJAYARATNAM G., CORRIN B. - Experimental paraquat poisoning. A histological and electron optical study of the changes in lung
J. Path., 1971, 103 123-129
- VOGEL J., KRETZSCHMAR G., IWAINSKY H., KITTELMANN B. et coll. - Über die oberflächenspannung der lungen
Z. Erkr. Atm. Bd., 1970, 133 272-284
- VON NEERGAARD K. - Neue Auffassungen über einen grundbegriff der Atemmechanik
Z. Ges. Exp. Med., 1929, 66 373-394
- WADDELL W., HILL C. - A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein
J. Lab. Clin. Med., 1956, 48 311-314
- WAGNER M., HEINEMANN H. - Effect of ethanol on phospholipid metabolism by the rat lung
Am. J. Physiol., 1975, 299 1316-1320
- WALDMAN R., GANGULY R. - Immunity to infection on secretory surfaces
J. Infect. Dis., 1974, 130 419-440
- WANG M., MENG H. - Uptake and metabolism of α monopalmitin by rat lung in vitro
Lipids, 1975, 10 721-725
- WARR G., MARTIN R., SHARP P., ROSSEN R. - Normal human bronchial immunoglobulins and proteins. Effects of cigarette smoking
Amer. Rev. Respir. Dis., 1977, 116 25-30
- WARREN L. - The thiobarbituric acid assay of sialic acids
J. Biol. Chem., 1959, 8 1971-1975
- WATKINS J. - The surface properties of pure phospholipids in relation to those of lung extracts
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 152 293-306

- WEBER R., COON J., TRIOLO A. - Nicotine inhibition of the metabolism of 3-4 benzopyrene, a carcinogen in tobacco smoke
Science, 1974, 184 1081-1083
- WEBSTER P., LORIMER E., MAN P., WOOLF C., ZAMEL N. - Pulmonary function in identical twins : comparison of non smokers and smokers
Am. Rev. Resp. Dis., 1979, 119 223-228
- WEIBEL E. - Morphometry of the human lung
New York Academic Press, 1963
- WEIBEL E., GOMEZ D. - A principle for counting tissue structures on random sections
J. Appl. Physiol., 1962, 17 343-349
- WEILL H., GEORGE R., SCHWARZ M. et ZISKIND M. - Late evaluation of pulmonary function after acute exposure to chlorine gas
Am. Rev. Resp. Dis., 1969, 99 374-381
- WILLIAMS R., GIBBON R. - Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A : Mechanism of antigen disposal
Science, 1972, 177 697-699
- WONG K., BARRY B., STONE C., O'NEIL J., CRAPO J. - Lung injury after 3 months exposure to short length chrysotile asbestos fibers
Am. Rev. Resp. Dis., 1978, 119 n° 4 241 Abstract
- WYNDER E., MABUCHI K., BEATTIE E. - The epidemiology of lung cancer. Recent trends
J. Amer. Med. Ass., 1970, 213 2221-2226
- YAMADA K., OLDEN K. - Fibronectins adhesive glycoproteins of cell surface
Nature, 1978, 278 179-184
- YEAGER H. - Tracheobroncheal secretions
Am. J. Med., 1971, 493-509
- YOUNG S., TIERNEY D. - Dipalmitoyl lecithin secretion and metabolism by the rat lung
Amer. J. Physiol., 1972, 222 1539-1544
- ZACHMAN R. - The enzymes of lecithin biosynthesis in human newborn lungs : I. Choline kinase
Biol. Neonat., 1971, 19 211-219
- ZACHMAN R. - The enzymes of lecithin biosynthesis in human newborn lungs : III. Phosphorylcholine glyceride transferase
Ped. Res., 1973, 7 632-637