



HAL
open science

Utilisation de traceurs radioactifs pour l'évaluation du recrutement des leucocytes et des échanges vasculaires au niveau d'organes *in vivo*. Description d'une méthode et discussion des problèmes d'interprétation sur quelques exemples

M. Bureau

► **To cite this version:**

M. Bureau. Utilisation de traceurs radioactifs pour l'évaluation du recrutement des leucocytes et des échanges vasculaires au niveau d'organes *in vivo*. Description d'une méthode et discussion des problèmes d'interprétation sur quelques exemples. Journal de Physique III, 1997, 7 (3), pp.749-770. 10.1051/jp3:1997153 . jpa-00249610

HAL Id: jpa-00249610

<https://hal.science/jpa-00249610>

Submitted on 4 Feb 2008

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.

Utilisation de traceurs radioactifs pour l'évaluation du recrutement des leucocytes et des échanges vasculaires au niveau d'organes *in vivo*. Description d'une méthode et discussion des problèmes d'interprétation sur quelques exemples

M.F. Bureau (*)

Unité de Pharmacologie Cellulaire, Unité Associée Institut Pasteur (**),
25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

(Reçu le 18 juin 1996, révisé le 27 novembre 1996, accepté le 12 décembre 1996)

PACS 87.80 +s - Biophysical instrumentation and techniques
PACS.87.90.+y - Other topics in biophysics and medical physics

Résumé. — Une méthode expérimentale utilisant simultanément différents traceurs γ a été développée pour évaluer l'inflammation *in vivo*. Des expériences ont été réalisées chez le cobaye anesthésié pour tester l'effet pulmonaire d'agents inflammatoires. Des globules rouges, de l'albumine et des cellules inflammatoires (plaquettes ou leucocytes) radiomarqués respectivement au technetium 99m, à l'iode 131 et à l'indium 111 sont injectés i.v. Leurs radioactivités sont mesurées sur une région pulmonaire par détection externe et sur des échantillons sanguins au compteur puit. À partir de ces mesures sont évaluées les variations des contenus pulmonaires en globules rouges, en albumine extravasculaire et en leucocytes non circulants lors d'une stimulation inflammatoire. Ces paramètres sont corrélés aux modifications de la perfusion, des échanges vasculaires et de la séquestration leucocytaire. La fiabilité de la méthode et la signification des paramètres évalués sont discutées.

Abstract. — An experimental method using simultaneously different γ emitter tracers was developed to evaluate inflammation *in vivo*. Experiments were performed on the anaesthetized guinea-pig to test pulmonary effects of inflammatory agents. Red blood cells, albumin and inflammatory cells (platelets or leucocytes) radiolabelled with 99m technetium, 131 iodine and 111 indium respectively were injected i.v. Their radioactivities were measured on a pulmonary region by external detection and on blood samples in a well type counter. From these measurements variations of the lung contents in red blood cells, extravascular albumin and non circulating leucocytes during inflammatory stimulation were evaluated. These parameters are indexes of blood perfusion, vascular exchanges and leucocyte sequestration respectively. Fiability of the method and meaning of the parameters evaluated are discussed.

(*) e-mail . mbureau@infobiogen.fr - Adresse actuelle: UMR 133/RPR, Rhône-Poulenc-Rorer CRVA, BP 14, 94403 Vitry-sur Seine, France
(**) INSERM n°285

Glossaire

Radioactivités

ALB	radioactivité de l'albumine mesurée sur une région pulmonaire par détection externe ;
alb	radioactivité de l'albumine mesurée sur un échantillon sanguin au compteur puit .
C	radioactivité des cellules inflammatoires mesurée sur une région pulmonaire par détection externe ;
c	radioactivité des cellules inflammatoires mesurée sur un échantillon sanguin au compteur puit ;
RBC	radioactivité des globules rouges mesurée sur une région pulmonaire par détection externe ,
rbc	radioactivité des globules rouges mesurée sur un échantillon sanguin au compteur puit .
q_1, q_2, q_3	quantités de radioactivités injectées en cpm pour ^{99m}Tc , ^{111}In et ^{131}I ;
Q_1, Q_2, Q_3	les mêmes quantités corrigées pour les mesures externes.

Indices et coefficients

t	temps de la mesure ;
0	temps de référence habituellement 30 minutes après l'injection de l'albumine et des globules rouges radiomarqués ;
F	valeur du rapport ALB/alb 30 minutes après l'injection de l'albumine radiomarquée ;
K_t	rapport $\text{RBC}_t/\text{RBC}_0$;
A	valeur du rapport, [$(^{99m}\text{Tc}/^{111}\text{In})$ mesuré par détection externe / $(^{99m}\text{Tc}/^{111}\text{In})$ mesuré au compteur puit] pour une solution où ^{99m}Tc et ^{111}In sont mélangés.

Paramètres

$\% \text{ALB}_{\text{ev},t}$	pourcentage du contenu vasculaire en albumine radiomarquée au temps 0 qui se trouve dans l'espace extravasculaire au temps t ,
$(\text{ALB}_{\text{ev}}/\text{ALB}_{\text{blood}})_t$	rapport des radioactivités de l'albumine dans les compartiments extravasculaire et sanguins sur une région pulmonaire au temps t ;
$\% \text{RBC}_t$	pourcentage du contenu pulmonaire en globules rouges radiomarqués relativement à sa valeur initiale au temps 0 ;
$c_{\text{total},t}$	pourcentage de cellules radiomarquées circulantes relativement à la quantité injectée au temps t ;
Cm_t	pourcentage de cellules inflammatoires non circulantes relativement au contenu initial en globules rouges dans la région pulmonaire observée au temps t ;
Δcm_t	variation de Cm_t relativement à sa valeur au temps de référence 0.

Introduction

L'accumulation de leucocytes et l'augmentation des échanges vasculaires au niveau d'un organe sont des signes majeurs d'une réaction inflammatoire à son début. Quand les possibilités de drainage lymphatique sont dépassées, l'accroissement du flux liquidien du sang vers les tissus conduit à la formation d'un œdème. Il est supposé que l'activation des leucocytes recrutés par les agents inflammatoires est une cause essentielle d'une hyper perméabilisation de l'endothélium vasculaire [1-3] ayant pour conséquence l'augmentation des flux de solutés et de liquide du sang vers les tissus.

Différents auteurs se sont intéressés à l'évaluation soit de l'accumulation de cellules inflammatoires [4-6] soit des échanges entre le sang et les tissus [7, 8].

Je propose ici une méthode d'utilisation de traceurs radioactifs combinant ces deux types de mesures ce qui permet plus facilement de déterminer une corrélation éventuelle entre effets leucocytaires et vasculaires. La préparation animale choisie est le cobaye anesthésié et l'organe étudié est le poumon. Les traceurs sont des érythrocytes radiomarqués au technetium 99m (^{99m}Tc) comme traceur de référence vasculaire, de l'albumine sérique radiomarquée à l'iode 131 (^{131}I) comme traceur d'échange vasculaire et enfin des cellules inflammatoires (neutrophiles, éosinophiles, plaquettes. . .) radiomarquées à l'indium 111 (^{111}In) dont on pourra suivre le recrutement par l'organe étudié. Suite à l'injection i. v. des trois traceurs, leurs radioactivités sont mesurées au niveau de l'organe étudié à l'aide d'une sonde de détection externe et sur des échantillons sanguins au compteur puits. Ainsi sont suivis simultanément l'évolution des contenus en globules rouges- ^{99m}Tc , en albumine- ^{131}I extravasculaire et en cellules inflammatoires- ^{111}In non circulantes de l'organe cible, les deux derniers paramètres étant obtenus grâce à la soustraction de la contribution sanguine. Ces paramètres sont respectivement des index du volume sanguin, des échanges trans-endothéliaux de l'albumine et du recrutement des cellules inflammatoires. Le mode d'expression adopté pour les résultats permet la comparaison des contenus sanguin et tissulaire en cellules inflammatoires. Cette méthode a été décrite et utilisée dans le cadre de différentes études de l'inflammation pulmonaire [9-13]. Le but de cet article est de reprendre en détail la description des calculs et de la procédure expérimentale et de discuter la signification des paramètres évalués à partir de la présentation de quelques résultats.

1. Méthode

1.1. PROTOCOLE GÉNÉRAL. — Le montage expérimental est décrit figure 1. Le cobaye est anesthésié, curarisé et ventilé. La mise en place d'un cathéter carotidien et d'un cathéter jugulaire permettra les prélèvements sanguins et les injections. Une sonde de détection de la radioactivité γ (Na-I cristal, 2" x 2", Aptec, USA), collimatée par un chapeau en plomb (Fig. 2), est placée au contact d'une région du thorax droit, au-dessus du poumon (diamètre du champs de mesure = 1 cm) (Fig. 3). Des cellules radiomarquées à l'indium 111 (^{111}In) (plaquettes, neutrophiles, éosinophiles. . .) puis 2 à 3 heures plus tard, des globules rouges et de la sérum albumine humaine radiomarqués respectivement au technetium 99m (^{99m}Tc) et à l'iode 131 (^{131}I) sont injectés par le cathéter jugulaire. Une saisie "on line" des radioactivités est réalisée toute les 33 secondes avec un temps actif de mesure de 30 secondes sur trois fenêtres d'énergie (113-157, 160-276, 330-411 keV pour ^{99m}Tc , ^{111}In et ^{131}I respectivement) grâce à la connexion de la sonde gamma à une carte d'interface (Intertechnique, Soft Interwin, les Ulis, France) implantée dans un ordinateur (Dell 450 MX). Les valeurs moyennes de recouvrement de spectre des 3 traceurs dans les fenêtres d'énergie choisies ont été données dans une publication précédente [10]. Elles sont systématiquement redéterminées pour chaque expérience.

La détection externe des radioactivités pulmonaires débute juste avant l'injection de globules rouges et d'albumine radiomarqués et le premier prélèvement sanguin est réalisé 30 minutes plus tard. Après quelques points de ligne de base, l'agent testé pour ses effets pulmonaires est injecté par voie intraveineuse (catheter jugulaire) ou intratrachéale. Les radioactivités sanguines et plasmatiques des échantillons prélevés avant et après stimulation sont mesurées dans un compteur gamma puits (LKB Wallac, 1282 Compugamma, Turku, Finland). Les données sanguines sont ensuite mémorisées sur un fichier informatique. Lors d'une dernière étape, le traitement informatique des fichiers contenant les valeurs des radioactivités pulmonaires et sanguines permet de calculer pour différents temps les contenus pulmonaires en globules rouges- ^{99m}Tc , en albumine- ^{131}I extravasculaire et en cellules- ^{111}In (plaquettes, neutrophiles, éosinophiles. . .)

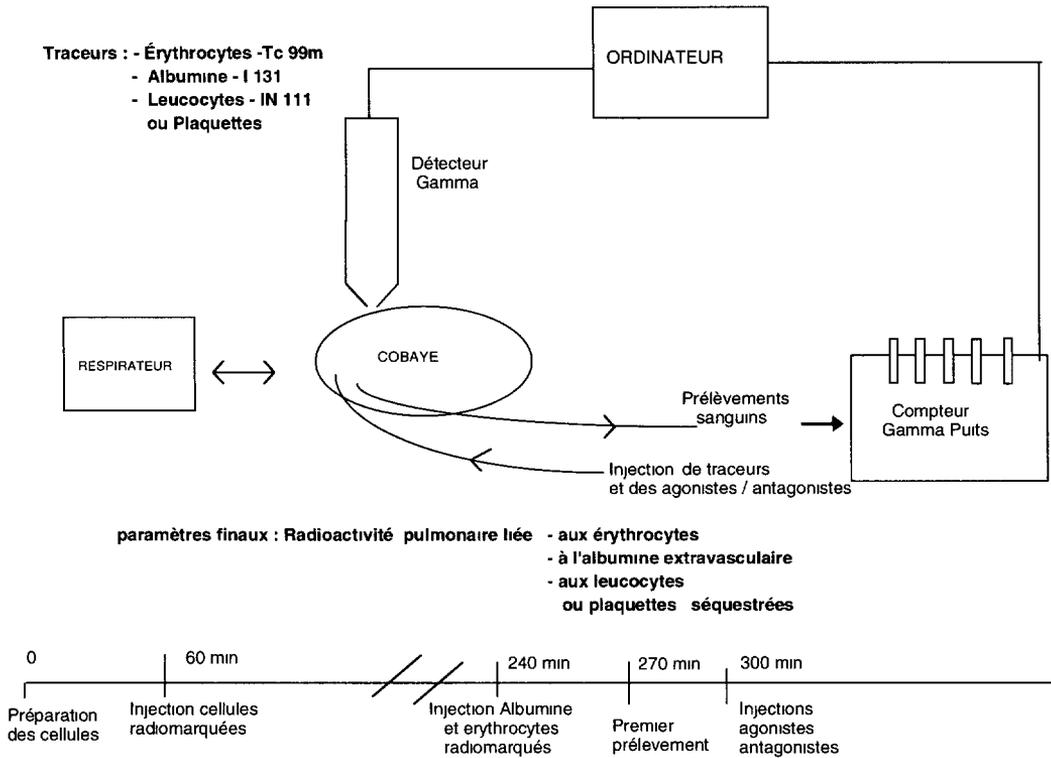


Fig. 1. — Montage expérimental La sonde de détection de la radioactivité gamma est placée au contact du thorax face au poumon droit Le support de la sonde permettant d'ajuster sa position n'est pas représenté. En bas du schéma est indiqué le déroulement des différentes étapes de l'expérience.

[Experimental design. The probe to detect radioactivity gamma was placed in front of the right lung region at contact of the chest. The system allowing to adjust the detector position is not shown. At bottom is indicated the time course of the different experimental steps]

non circulantes. Pour compléter la discussion de la signification des paramètres mesurés sont utilisés les résultats d'expériences de lavage bronchoalvéolaire qui permettent d'estimer un nombre de leucocytes infiltrés jusque dans la lumière des voies aériennes lors d'une stimulation inflammatoire. Les lavages sont réalisés sur l'animal anesthésié selon une procédure décrite par ailleurs [14].

1.2. TRACEURS. — L'albumine, les érythrocytes et les plaquettes (PL) ou leucocytes (neutrophiles, éosinophiles, ...) sont radiomarqués respectivement à l'iode 131, au technetium 99m et à l'indium 111.

L'albumine-¹³¹I est fournie par Cis Biointernational (Gif-sur-Yvette, France) Les PL sont isolées à partir de 3 ml de sang du cobaye d'expérience, prélevés sur citrate de sodium ($3,8 \times 10^3$ g ml⁻¹ sang), et radiomarquées à l'oxynate d'indium 111 (Cis Biointernational, Gif-sur-Yvette, France) selon une procédure décrite par ailleurs [6]. Notons que l'addition de prostacycline (PGI₂) à une concentration finale de 10⁻⁶ M permet d'éviter l'activation plaquettaire en cours de séparation. Ces PL sont réinjectées au cobaye par le cathéter jugulaire (400×10^6 cellules).

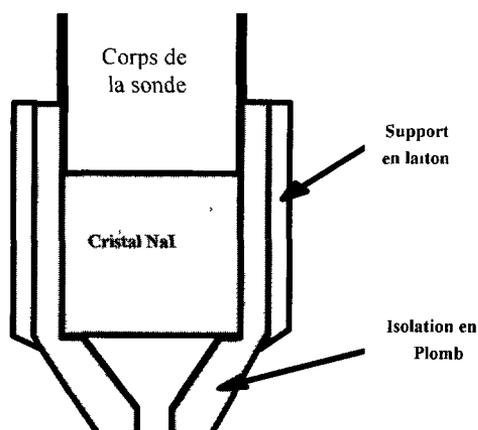


Fig. 2. — Collimatage de la sonde de détection de la radioactivité gamma. Le diamètre de l'orifice est de 1 cm. La distance de cet orifice à la surface de détection du cristal NA-I est de 3 cm. La surface de détection utilisable représente 88,5 % de la surface totale. L'épaisseur de la protection en plomb est de 0,8 à 1,1 cm. L'ensemble du schéma est à l'échelle.

[Collimating of the gamma probe. Diameter of the aperture is of 1 cm. The distance of the aperture to the detection area of NA-I crystal is of 3 cm. Usable detection area represents 88.5% of the total area. Thickness of the lead protection is of 0.8 to 1.1 cm. The whole sketch is at scale.]

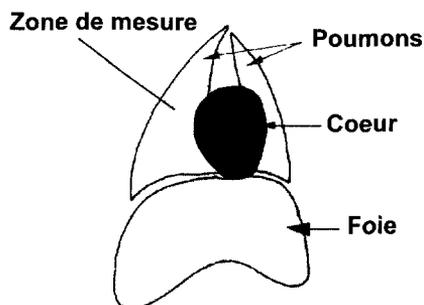


Fig. 3. — Zone de détection de la radioactivité pulmonaire. La radioactivité est détectée sur une zone (diamètre = 1 cm) du poumon droit. Afin de limiter l'interférence de la radioactivité cardiaque le corps de l'animal est penché sur la gauche.

[Detection area of the lung radioactivity. Detection of the radioactivity was performed on a limited area (diameter = 1 cm) above the right lung. Body of the animal was turned on the left to limit interference of heart radioactivity.]

Les techniques permettant d'obtenir un type leucocytaire pur tel que les polynucléaires neutrophiles [15] ou les polynucléaires éosinophile [16,17] nécessitent un animal donneur. Il semble important de pouvoir utiliser des cellules autologues [18]. Ainsi dans de nombreuses expériences nous avons utilisé une technique de séparation des leucocytes sanguins de l'animal d'expérience. Les leucocytes sont obtenus à partir de 2 ml de sang selon la technique décrite par Sweatman *et al.* [18]. Ces leucocytes sont en grande partie des polynucléaires neutrophiles (> 60 %, Ref. [13]).

Quelle que soit la cellule utilisée et son mode d'obtention, à chaque étape l'autoactivation est limitée par l'utilisation d'un tampon sans calcium ni magnésium (Dulbéco : KCl 0,2 g ; KH_2PO_4 0,2 g , NaCl 8 g ; Na_2HPO_4 2,16 g ; H_2O qsp 1 litre) et l'addition de PGE_2 (Sigma, St Louis, MO) à une concentration finale de 1 à 5×10^{-5} M. Les leucocytes sont ensuite incubés avec le tropolonate d'indium 111 obtenu par mélange du chlorure d'indium 111(CIS) avec du tropolone (Sigma) (10 à $20 \mu\text{Ci } ^{111}\text{In}$ pour 5 à 40×10^6 cellules/ml, concentration finale en tropolone entre 3 et 5×10^{-4} M) pendant 5 minutes selon le protocole défini par Dampure *et al.* [4]. Les cellules sont alors lavées deux fois avec du tampon puis resuspendues dans du plasma additionné de prostacycline (Sigma) (10^{-6} M) et injectées i.v. au cobaye (0,4 à 0,7 ml)

Notons que la prostacycline ou la prostaglandine E_2 utilisés lors de la séparation des plaquettes ou des neutrophiles sont rapidement métabolisés *in vivo* et ne modifient donc pas nos résultats.

Les érythrocytes sont radiomarqués au technetium 99m selon la procédure décrite dans la trousse de radiomarquage fournie par le CEA ORIS (France). En bref, 2 ml de sang sont prélevés sur citrate de sodium ($3,8 \times 10^{-3}$ g ml^{-1} de sang), et 0,5 ml d'une solution de pyrophosphate d'étain (dans du NaCl 9 %) sont ajoutés. Cinq minutes plus tard les cellules sont lavées dans du NaCl 9 % hépariné (1000 UI d'héparine l^{-1}) puis incubées avec le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite lavées deux fois dans Na Cl 9 % hépariné. Enfin, les érythrocytes- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ sont mélangés avec de la sérum albumine humaine ^{131}I avant l'injection intraveineuse.

1.3. CALCULS. — Dans ce qui suit les termes en minuscules désignent des radioactivités sanguines mesurées au compteur puits, les termes en majuscules des radioactivités mesurées par détection externe sur une région pulmonaire. Soit rbc et RBC pour la radioactivité liée aux globules rouges, alb et ALB pour l'albumine, enfin c et C pour les cellules inflammatoires (leucocytes, plaquettes...).

1.3.1. *Corrections de recouvrement de spectre.* — Les radioactivités mesurées pour chaque isotope sont corrigées des radioactivités additionnelles dues aux deux autres isotopes. Les équations de correction sont déterminées grâce à la résolution d'un système de trois équations à trois inconnues.

1.3.2. *Calculs sur les radioactivités des échantillons sanguins*

Normalisation des radioactivités. — La radioactivité de chaque traceur est exprimée pour un ml de sang ou de plasma en % de la quantité de radioactivité injectée (cpm). Dans ce qui suit il s'agira toujours de calculs portant sur des radioactivités ainsi normalisées.

Calcul de l'hématocrite. — La mesure de radioactivité de l'albumine- ^{131}I dans le sang et le plasma permet de calculer l'hématocrite (Hct) de chaque échantillon sanguin d'après : $\text{Hct} = 1 - (\text{alb}_{\text{sang}}/\text{alb}_{\text{plasma}})$ avec alb radioactivité normalisée de l'albumine. À noter que cet hématocrite diffère d'un hématocrite déterminé par centrifugation. Ce dernier dépend du volume relatif en globules rouges auquel se rajoute un petit volume de plasma emprisonné de l'ordre de 1,3 % du volume cellulaire pour un sang "normal" [19].

Correction de l'éluion du traceur. — La radioactivité non liée aux cellules est prise en compte comme suit :

$$x_t = x_{\text{blood},t} - [x_{\text{plasma},t}(1 - \text{Hct})]$$

avec x_t radioactivité liée aux cellules (cellules inflammatoires, globules rouges) dans le sang au temps t .

$x_{\text{blood},t}$ et $x_{\text{plasma},t}$ radioactivités mesurées dans le sang et le plasma à ce même temps t .

Proportion des cellules injectées restant dans la circulation. — Le pourcentage total des cellules injectées qui restent circulantes à un temps t est donné par :

$$c_{\text{total},t} = (c_t/\text{rbc}_t)100$$

avec c et rbc radioactivités des cellules inflammatoires et des érythrocytes respectivement

1.3.3. Calcul des contenus de l'organe étudié en érythrocytes TC-99m, en albumine I-131 extravasculaire et en cellules inflammatoires IN-111 non circulantes

Variation du contenu de l'organe en érythrocytes. — Ces variations sont exprimées en % d'une radioactivité basale de référence qui est, dans nos expériences, la radioactivité moyenne avant la stimulation par un agent inflammatoire.

Albumine extravasculaire. — La valeur de la radioactivité ^{131}I liée à l'albumine extravasculaire pour la région de l'organe observée au temps t est exprimée en pourcent de la radioactivité de l'albumine mesurée à un temps initial de référence (0) dans la même région. Soit :

$$\% \text{ALB}_{\text{ev},t} = (\text{ALB}_{\text{total},t} - \text{ALB}_{\text{blood},t})100/\text{ALB}_{\text{total},0} \quad (1)$$

$$= [\text{ALB}_{\text{total},t} - (\text{alb}_t \times F \times K_t)]100/\text{ALB}_{\text{total},0} \quad (2)$$

$$= \text{ALB}_{\text{ev},t}100/\text{ALB}_{\text{total},0}, \quad (3)$$

avec ALB la radioactivité de l'albumine mesurée par détection externe sur une région de l'organe, et alb la radioactivité mesurée sur un échantillon sanguin. L'indice "ev" indique qu'il s'agit d'une radioactivité dans l'espace extravasculaire. L'indice "total" indique qu'il s'agit de la somme des radioactivités sanguines (blood) et extravasculaires pour la région considérée. Les indices t et 0 sont pour le temps de la mesure et le temps initial de référence qui est généralement le dernier temps de prélèvement sanguin avant l'injection de l'agent testé. $F = \text{ALB}/\text{alb}$ 30 minutes après l'injection d'albumine radiomarquée, ce traceur a alors eu le temps de se répartir dans l'ensemble du volume sanguin. Bien que de l'albumine radiomarquée ait sans doute quitté le compartiment vasculaire durant cette période, cela ne modifie pas significativement la valeur de F , qui reste quasiment constante entre 5 et 60 minutes après l'injection i.v. du traceur (Fig. 4).

K_t dans l'équation (2) est un facteur qui permet de corriger l'effet des variations de volume sanguin.

$K_t = \text{RBC}_t/\text{RBC}_0$, avec RBC la radioactivité des érythrocytes mesurée par détection externe sur la région étudiée.

Dans la pratique c'est l'équation (2) qui est utilisée dans les programmes de calcul. Enfin le rapport des radioactivités de l'albumines dans les compartiments extravasculaires et sanguins est donné par

$$\frac{\text{ALB}_{\text{ev}}}{\text{ALB}_{\text{blood}}}$$

Contenu en cellules inflammatoires non circulantes. — Le mode de calcul utilisé ci-dessus pour obtenir la valeur de la radioactivité liée à l'albumine extravasculaire ne peut pas être employé pour les cellules inflammatoires, puisque celles-ci ne sont à aucun moment exclusivement sanguines. Dès leur injection, les cellules inflammatoires radiomarquées sont partiellement séquestrées dans les lits vasculaires des organes.

Afin de rendre compatibles les expressions des radioactivités pulmonaires et sanguines, pour pouvoir les soustraire, nous avons réalisé 2 opérations.

- 1) La normalisation aux quantités radioactives injectées.

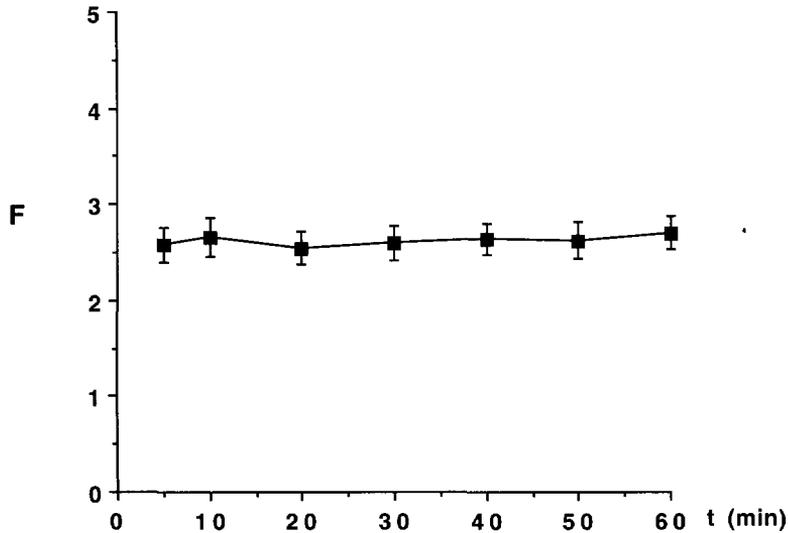


Fig 4. — Absence de variation du coefficient F en fonction du temps. Valeurs moyennes \pm SEM du coefficient F ($n = 5$ animaux) L'albumine radiomarquée est injectée à $t = 0$ min

[Lack of variation of the coefficient F with time. Values are mean \pm SEM of the coefficient F ($n = 5$ animals). Radiolabelled albumin was injected at time 0 minute.]

2) L'utilisation des rapports des radioactivités normalisées des cellules inflammatoires (^{111}In) sur celle des érythrocytes ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), ce qui permet :

- d'être indépendant du mode de mesure (par unité de surface en détection externe, par unité de volume au compteur puits) ;
- d'exprimer le contenu en cellules inflammatoires relativement au contenu en érythrocytes. Le facteur de conversion A permet de déterminer la valeur de la radioactivité qui serait mesurée par détection externe quand on dispose de la radioactivité mesurée au compteur puits. Ainsi, pour un mélange de technetium $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et d'indium ^{111}In nous avons : ($^{99\text{m}}\text{Tc} / ^{111}\text{In}$) mesuré par détection externe = A ($^{99\text{m}}\text{Tc} / ^{111}\text{In}$) mesuré au compteur puits. Il s'en suit que

$$\frac{Q_1}{Q_2} = \frac{Aq_1}{q_2} \quad (4)$$

où q_1 et q_2 sont les valeurs des quantités de radioactivité injectées pour $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et ^{111}In mesurées au compteur puits et Q_1 et Q_2 sont les valeurs correspondantes pour normaliser les radioactivités mesurées par détection externe. Q_1 et Q_2 peuvent également être déterminées en mesurant la radioactivité maximum des traceurs considérés, dans la zone de mesure pour la détection externe, juste après leur injection.

Ainsi, connaissant Q_1/Q_2 , nous pouvons calculer le rapport des radioactivités pulmonaires normalisées des cellules inflammatoires (C) sur celle des érythrocytes (RBC) au temps t , *i.e.* $(C/\text{RBC})_{\text{total},t}$.

En tenant compte des variations du contenu en érythrocytes à l'aide du coefficient K_t l'expression $(C/RBC)_{\text{total},t} \times K_t \times 100$ représente le pourcentage total des cellules inflammatoires dans l'organe étudié relativement à son contenu initial en érythrocytes. Enfin la soustraction de la contribution sanguine à cette valeur donnera le pourcentage de cellules inflammatoires radiomarquées non circulantes relativement au contenu initial de l'organe en érythrocytes. Ceci est donné par

$$Cm_t = [(C/RBC)_{\text{total},t} - (c/rbc)_{\text{blood},t}]100K_t, \quad (5)$$

avec $(c/rbc)_{\text{blood},t}$ le rapport des radioactivités normalisées des cellules inflammatoires sur celles des érythrocytes dans le sang.

Puisque le rapport $(c/rbc)_{\text{blood},t}$ tel que mesuré avec le compteur puits est équivalent à $(C/RBC)_{\text{blood},t}$ tel qu'il serait mesuré par détection externe, comme prévu nous avons

$$Cm_t = (C_{\text{total}} - C_{\text{blood}})_t 100/RBC_0. \quad (6)$$

Au temps t la variation de Cm_t vis-à-vis de sa valeur au temps de référence 0 est donnée par

$$\Delta Cm_t = Cm_t - Cm_0. \quad (7)$$

Ce paramètre représente le contenu additionnel de l'organe en cellules inflammatoires non circulantes relativement à son contenu initial en érythrocytes. Les radioactivités étant normalisées et les érythrocytes radiomarqués étant un traceur de référence vasculaire, ce paramètre est également équivalent au pourcentage des cellules radiomarquées injectées qui sont séquestrées par l'organe au temps t . En conséquence, si les cellules séquestrées ne retournent pas dans la circulation, le rapport de cette valeur à celle de la réduction du contenu sanguin représente la valeur de la contribution relative de l'organe à la séquestration des cellules.

Deux représentations des résultats sont utilisées :

- 1) $\Delta Cm_t 100/C_{\text{blood},0}$ est le pourcentage de cellules circulantes au temps 0 séquestrées par l'organe au temps t .
- 2) $\Delta Cm_t 100/C_0$ est la séquestration cellulaire en pourcent de la séquestration basale.

Pour conclure cette partie indiquons que l'ensemble de ces calculs est basé sur l'hypothèse que l'hématocrite au niveau de l'organe diffère peu de l'hématocrite systémique. En ce qui concerne le poumon cette différence est de l'ordre de 10 % [20]. Les effets des variations d'hématocrite en fonction du temps sur la valeur de K_t sont également négligés. Il est d'autre part supposé que la concentration en leucocytes du sang artériel périphérique est peu différente de celle du sang au niveau du lit vasculaire pulmonaire

1.3.4. Programmes de calculs. — Pratiquement, les radioactivités mesurées par détection externe au niveau de l'organe étudié et sur échantillons sanguins au compteur puits sont mémorisées sous forme de fichiers ascii. Au compteur puits les effets de recouvrement de spectre des trois traceurs sont automatiquement corrigés en fonction de mesures préliminaires sur des standards des trois isotopes. Pour les mesures de détection externe il a fallu inclure cette procédure de correction dans les programmes de calcul. Les fluctuations de la radioactivité détectée sont lissées en moyennant les valeurs saisies deux par deux. Les radioactivités corrigées sanguines et pulmonaires de ^{99m}Tc , ^{111}In et ^{131}I pour chaque temps de mesure sont mémorisées sur fichier.

À ce premier stade il est possible d'obtenir les courbes de variation en fonction du temps des radioactivités pulmonaires des trois traceurs qui sont la résultante des variations tissulaires et sanguines.

Au niveau sanguin les radioactivités des trois traceurs sont exprimées en % par ml, des radioactivités injectées. Les résultats sont corrigés des radioactivités éluées. Peuvent ensuite être calculés pour les différents temps de prélèvement : le volume sanguin, le volume plasmatique, l'hématocrite, le % par ml des cellules radiomarquées injectées circulantes.

Dans une dernière étape quand le temps de mesure pulmonaire correspond à $\pm 0,3$ minutes au temps de mesure sanguine, les calculs de soustraction de la contribution sanguine sont réalisés.

Sont ainsi évalués les contenus pulmonaires en :

- albumine extravasculaire en % de la radioactivité sanguine basale de l'albumine ;
- cellules radiomarquées séquestrées en % de leur radioactivité circulante basale ou en % de leur radioactivité séquestrée basale.

1.3.5. Statistiques. — Les valeurs données sont les moyennes \pm SEM (écart type/racine de n) d'expériences réalisées sur plusieurs animaux. Les comparaisons statistiques entre groupes d'animaux sont réalisées à l'aide du test non paramétrique de Fisher.

2. Résultats sur le poumon de cobaye

Ce modèle expérimental a été utilisé pour évaluer l'effet de différentes conditions inflammatoires au niveau pulmonaire chez le cobaye. Dans une première partie seront présentés les différents faits qui permettent de considérer que cette méthode produit des résultats valides. Dans une deuxième partie la signification physiologique des paramètres évalués sera discutée à partir de quelques exemples

2.1. VALIDATION DE LA MÉTHODE. — La fiabilité de la détermination des différents paramètres a été évaluée dans le premier article présentant le modèle [9]. En résumé :

2.1.1. Sélectivité — Chez les petits animaux comme le cobaye, la valeur de la radioactivité d'un organe, mesurée par détection externe, risque d'être modifiée par la radioactivité des organes voisins. Nous avons pu limiter fortement ce type d'interférence en collimatant la sonde de détection avec un chapeau de plomb. La sélectivité de la mesure de radioactivité vis-à-vis de l'organe considéré avait été évaluée en comparant les valeurs des rapports de radioactivité $^{111}\text{In}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ et $^{131}\text{I}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ sur une région pulmonaire et sur le poumon isolé juste après sacrifice de l'animal (provoquée par une surdose d'anesthésique). Ces mesures montraient que le rapport $^{111}\text{In}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ne variait pas alors que le rapport $^{131}\text{I}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ était supérieur de près de 30 % pour les mesures *in vivo* ce qui indiquait une interférence de la radioactivité ^{131}I des organes voisins. Avec le collimatage actuel la différence est moindre (12 à 20 %). Il est probable que ce défaut de sélectivité de mesure de la radioactivité ^{131}I affecte partiellement l'évaluation du contenu pulmonaire en albumine extravasculaire. Il est à noter que l'utilisation d'une gamma caméra sur de petits animaux est envisageable [21]. La définition des zones de mesures est alors plus précise et il est possible de suivre l'évolution des radioactivités sur plusieurs organes.

2.1.2. Effet du volume courant. — Au niveau d'un organe comme le poumon, la radioactivité des compartiments sanguins et tissulaires ne doit pas être influencée par les variations du volume d'air dans les alvéoles, ce qui est le cas [9]. En effet une augmentation du volume courant de 10 à 20 ml kg^{-1} induit une réduction de radioactivité de $6,7 \pm 1,9$ % (SE, $n = 3$). Pour une variation de 10 à 15 ml kg^{-1} , aucune diminution de radioactivité n'est détectable. L'inflation alvéolaire durant le bronchospasme étant largement inférieure à 100 %, cet effet peut être négligé

Tableau I. — *Effets du fMLP et du LPS sur les numérations sanguines en leucocytes froids et radiomarqués. Valeurs moyennes \pm SEM ($n = 4$ à 10 animaux) des pourcentages de variation de la numération sanguine des leucocytes et de la radioactivité liée à des leucocytes injectés (leucocytes*) à des temps donnés après injection i.v. de fMLP ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) ou de LPS (1 mg kg^{-1}).*

[Effects of fMLP and LPS on radiolabelled and native blood leucocyte counts. Mean \pm SEM ($n = 4$ to 10 animals) values of percent variations of blood leucocyte counts and radioactivity bound to injected leucocytes (leucocytes*) at given times after fMLP ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) or LPS (1 mg kg^{-1}) i.v. injection.]

Agent inflammatoire	fMLP $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ i.v.	LPS 1 mg kg^{-1} i.v.	
	10 min	10 min	90 min
Leucocytes	$-49,5 \pm 8,4$ ($n = 4$)	$-56,9 \pm 4,1$ ($n = 6$)	$-60,2 \pm 4,3$ ($n = 6$)
Leucocytes*	$-59,5 \pm 11$ ($n = 10$)	$-51,4 \pm 9,3$ ($n = 10$)	$-85,7 \pm 4,1$ ($n = 10$)

2.1.3. *Fluctuations de radioactivité.* — La variation périodique de radioactivité due au mouvement pulmonaire et à la pulsation cardiaque est moyennée sur le temps d'une mesure de 30 secondes (fréquence cardiaque 200 à 400 cycles min^{-1} , fréquence respiratoire imposée 60 cycles min^{-1}). Il existe cependant une fluctuation de la radioactivité d'une mesure à l'autre, probablement liée au détecteur, qui est d'autant plus faible, relativement, que la radioactivité injectée est importante. Cet effet est réduit par le lissage des courbes. Dans nos conditions expérimentales il est négligeable.

2.1.4. *Référence vasculaire.* — Les érythrocytes radiomarqués sont effectivement un traceur de référence vasculaire s'ils restent tous dans le compartiment vasculaire. Ce point avait été vérifié dans le premier travail [9]. Ainsi la perte en érythrocytes radiomarqués injectés n'excède pas 2,5 % en 1 heure.

2.1.5. *Qualité des cellules.* — Les cellules inflammatoires radiomarquées (plaquettes, leucocytes) doivent répondre *in vivo* comme les mêmes cellules sanguines non radiomarquées. Dans le travail de 1989 [9] nous avons vérifié d'une part que peu de cellules étaient détruites (test d'exclusion au bleu trypan) par les opérations de radiomarquage, d'autre part que ces cellules répondaient *in vitro* à l'un de leurs activateurs (fMLP) comme les cellules non radiomarquées. Ces tests ne permettent cependant pas d'affirmer que les cellules radiomarquées répondent comme les mêmes cellules chez l'animal *in situ*. Une approche plus convaincante est de comparer le même type de réponse cellulaire *in vivo* avec les cellules radiomarquées et non radiomarquées de l'animal. Ces dernières cellules n'ayant subi aucune manipulation. Pour cela nous avons comparé les variations des comptes sanguins en cellules (leucocytes ou plaquettes) radiomarquées et natives. Ainsi après injection de PAF ces comptes sont comparables [9]. De même l'activation indirecte des plaquettes par le fMLP induit une thrombopénie comparable selon qu'elle est évaluée par numération sanguine ou par mesure de la variation de radioactivité sanguine liée aux plaquettes [10]. Dans le tableau I sont comparées les valeurs de leucopénie obtenues par les deux méthodes après injection i.v. de fMLP ou de LPS.

2.1.6. *Fiabilité des calculs*

Temps. — La précision de l'estimation du temps de prélèvement des échantillons sanguin est de l'ordre de ± 10 secondes. Le logiciel doit ensuite déterminer le temps de la mesure réalisée

par détection externe correspondant au plus près à celui de la mesure sanguine. La précision est ici de ± 20 secondes (voir programmes de calcul paragraphe 1.3.3). La précision en temps sur les événements calculés est donc de l'ordre d'une demi-minute.

Albumine extravasculaire (Aev). — Pour le calcul du contenu pulmonaire en albumine radiomarquée extravasculaire nous calculons un facteur F qui suppose que 30 minutes après son injection la radioactivité de l'albumine a eu le temps de se répartir dans l'ensemble du compartiment sanguin. Il est également supposé que la proportion d'albumine ayant quitté le sang en 30 minutes est suffisamment faible pour ne pas affecter la valeur de F ce qui est le cas (voir section calcul, paragraphe 1.3.3). La contribution de la radioactivité de l'albumine sanguine à la radioactivité pulmonaire totale (sang + tissus) dépend du volume sanguin. Pour tenir compte des variations de volume sanguin entre le temps initial de référence (0) pour lequel a été calculé F et le temps de la mesure (t) nous utilisons le facteur $K_t = \text{RBC}_t / \text{RBC}_0$ avec RBC la radioactivité des érythrocytes mesurée par détection externe sur la région étudiée. Il est supposé que $\text{RBC}_t / \text{RBC}_0 = \text{volume sanguin au temps } t / \text{volume sanguin au temps } 0$.

En fait la radioactivité des érythrocytes est une quantité par unité de temps. Elle dépend de la perfusion de l'organe. Au niveau pulmonaire la perfusion est essentiellement fonction du recrutement capillaire c'est-à-dire du volume disponible pour l'écoulement sanguin. À noter aussi que ce calcul suppose un hémocrite constant. Cette condition peut ne pas être vérifiée dans des situations inflammatoires graves au cours desquelles une hémococoncentration importante survient du fait d'une fuite plasmatique. L'équation (2) montre qu'une hémococoncentration entraîne une surestimation de la radioactivité de l'albumine sanguine à soustraire et donc une sous-estimation du contenu en albumine extravasculaire.

Séquestration leucocytaire. — La séquestration leucocytaire est évaluée à partir de l'équation (5). Ici il est supposé que le rapport des radioactivités normalisées des cellules (leucocytes, plaquettes) sur celles des érythrocytes mesurés sur un échantillon de sang artériel périphérique est égal à ce rapport tel qu'il serait mesuré pour le sang du lit vasculaire pulmonaire ce qui implique que la concentration en cellules circulantes du sang artériel périphérique est la même que celle du sang pulmonaire. Il n'est pas possible actuellement de vérifier si cette approximation est acceptable. Notons cependant que dans l'état actuel de la méthode en conditions basales, avec les leucocytes radiomarqués, seulement $5,7 \pm 0,6$ % de la radioactivité injectée reste circulante. Le reste de la radioactivité injectée est séquestré dans l'ensemble des organes dont en moyenne $71 \pm 7,8$ % ($n = 26$) dans les poumons ce qui indique l'importance relativement faible de la contribution sanguine à la radioactivité pulmonaire. Les données morphométriques de Hogg *et al.* [22] chez l'homme montrent qu'au niveau de la microcirculation pulmonaire (diam $< 15 \mu\text{m}$) qui représente 40 % du volume sanguin pulmonaire, 22 % des neutrophiles ont une vitesse de transit équivalente à celle des globules rouges. En tenant compte de l'ensemble du volume sanguin pulmonaire on aurait de l'ordre de 55 % des neutrophiles circulants. En considérant que d'autres organes séquestrent aussi les neutrophiles la valeur serait plus faible. Néanmoins la valeur de 5,7 % de leucocytes radiomarqués circulant (> 60 % neutrophiles chez le cobaye) observée avec notre modèle expérimental est certainement une sous-estimation probablement due en partie à l'altération de ces cellules par les processus de séparation et de radiomarquage. Cela indique les améliorations qui doivent encore être apportées en ce qui concerne la qualité des cellules radiomarquées. L'effet de l'altération des leucocytes par les procédures de radiomarquage avait été notamment évalué dans le travail de Saverymutu *et al.* [5]. Au niveau de la circulation périphérique, les leucocytes marginent essentiellement au niveau de l'endothélium des vénules post capillaire. Cette margination dépend des conditions hémodynamiques et de l'adhésivité cellulaire [23, 24]. Pour ce qui concerne les poumons, la séquestration leucocytaire se produit surtout au niveau des capillaires [25, 26]. Avec des cellules

comme les plaquettes, la radioactivité circulante est beaucoup plus grande (> 40 %) mais les différences de concentration en plaquettes entre le sang artériel périphérique et le sang du lit vasculaire pulmonaire sont probablement moindres [27].

2.2. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

2.2.1. Effets d'une stimulation inflammatoire

2.2.1.1. Sensibilité de la méthode. — Il a été vérifié que ce modèle est capable de mettre en évidence des modifications de volume sanguin, de séquestration des neutrophiles ou des plaquettes et d'échanges vasculaire de l'albumine au niveau pulmonaire lors de stimulations inflammatoires standards [9]. Depuis ces premiers travaux de validation, différentes améliorations ont été apportées. Ainsi la focalisation du collimateur de la sonde a été renforcée (Fig. 2). Tout au long des procédures de séparation et de radiomarquage, les cellules inflammatoires sont protégées de l'autoactivation par l'adjonction de prostaglandines au tampon (voir paragraphe 1.2). Je décrirais ci-après quelques uns des résultats obtenus avec les procédures les plus récentes.

La figure 5 montre l'effet de l'injection d'un agent inflammatoire le FMLP, sur les radioactivités pulmonaires liées aux leucocytes, aux érythrocytes et à l'albumine. Relativement aux effets d'une injection de sérum physiologique (NaCl 0,9 %) la radioactivité pulmonaire des leucocytes est augmentée alors que celle des érythrocytes et de l'albumine décroît. Cette première approche indique donc une accumulation pulmonaire des leucocytes lors de cette stimulation inflammatoire. L'hématocrite et le contenu sanguin en érythrocytes n'étant pas significativement modifiés au cours de ces expériences, la réduction du contenu pulmonaire en érythrocytes signifie celle du volume sanguin probablement due à une vasoconstriction. La réduction du contenu en albumine est très probablement liée à la réduction de volume sanguin puisque la majeure partie de l'albumine est sanguine.

La figure 6 montre qu'après soustraction de la contribution sanguine, il est possible de révéler l'évolution du contenu en albumine extra-vasculaire pulmonaire (Aev). Le volume de l'espace extravasculaire relativement à l'espace vasculaire est probablement inférieur à 30 % ce qui limite la valeur maximum possible de Aev. Rappelons que les radioactivités ^{131}I cardiaques et/ou hépatiques peuvent affecter partiellement la valeur de Aev. Associée à une réduction du volume sanguin l'augmentation du contenu pulmonaire en albumine extravasculaire traduit celle des échanges trans-endothéliaux.

La soustraction de la contribution sanguine permet également de suivre l'évolution du contenu pulmonaire en leucocytes non circulants (Fig. 7). La mesure de la radioactivité sanguine liée aux leucocytes permet de suivre la leucopénie. Pour l'ensemble de ces paramètres, comme précédemment, les effets des agents inflammatoires sont significativement différents des effets du sérum physiologique. Dans ce qui suit nous analyserons plus en détail sur d'autres exemples ce que représente la séquestration pulmonaire des leucocytes, la leucopénie qui l'accompagne et les échanges capillaires d'albumine. Enfin nous discuterons de la relation éventuelle entre séquestration leucocytaire et échanges capillaires.

2.2.1.2. Séquestration pulmonaire des leucocytes et leucopénie. — Les courbes de la figure 8 montrent les effets leucocytaires de deux agents inflammatoires le leukotriène B_4 (LTB_4), et l'endotoxine bactérienne. Le LTB_4 est un dérivé de l'acide arachidonique membranaire qui est synthétisé par les leucocytes lors de leur activation. Ce médiateur avec d'autres (PAF, $\text{TNF}\alpha$, interleukines...) peut activer d'autres leucocytes et ainsi contribuer à entretenir et propager l'inflammation. L'endotoxine bactérienne ou lipopolysaccharide (LPS) est un composant de la paroi externe des bactéries gram négatif dont les effets inflammatoires sont connus. Ces effets sont médiés par un certain nombre de molécules produites par les cellules activées (PAF, $\text{TNF}\alpha$, leukotriènes, interleukines...). Après l'injection i.v. de $3,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ de LTB_4 la séquestration

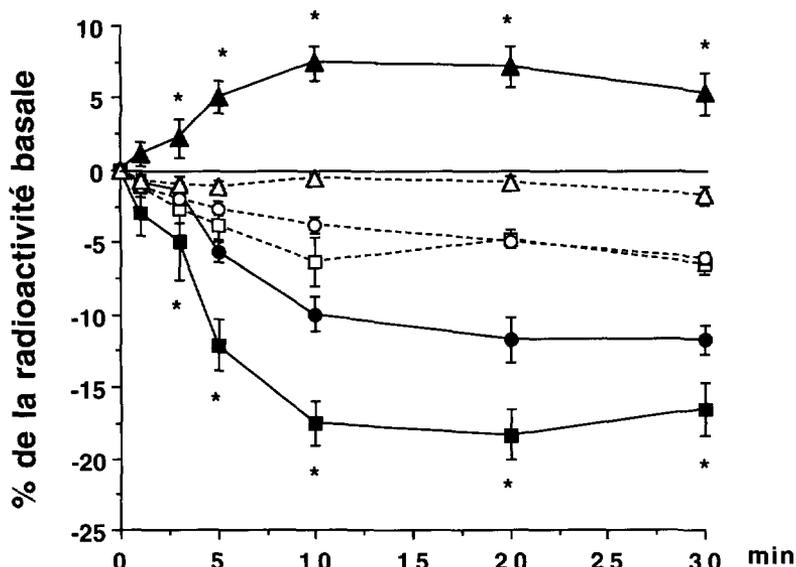


Fig 5. — Effets pulmonaires de l'injection de fMLP ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$ i.v.) sur les radioactivités liées aux globules rouges, à l'albumine et aux leucocytes. Valeurs moyennes \pm SEM ($n = 11$ animaux) de la radioactivité mesurée par détection externe sur une région pulmonaire en % de la radioactivité basale 5 minutes avant l'injection de fMLP pour ^{99m}Tc lié aux globules rouges (■), ^{131}I lié à l'albumine (●), ^{111}In lié aux leucocytes (▲) (*) la différence avec les valeurs contrôles (injection i.v. de sérum physiologique, symboles vides, courbes en pointillés, $n = 7$ animaux) est significative avec $p < 0,05$

[Pulmonary effects of fMLP injection ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$ i.v.) on radioactivities bound to red blood cells, albumin and leucocytes respectively. Values are mean \pm SEM ($n = 11$ animals) of the radioactivity of ^{99m}Tc bound to red blood cells (■), ^{131}I bound to albumin (●) and ^{111}In bound to leucocytes (▲) as measured by external detection on a pulmonary region in % of the basal radioactivity 5 minutes before fMLP injection. Significance of the difference with control values (i.v. injection of saline, empty symbols, dotted lines, $n = 7$ animals) (*) $p < 0.05$.]

pulmonaire des leucocytes et la leucopénie qui l'accompagne sont transitoires. La leucopénie est plus faible que la séquestration pulmonaire des leucocytes ce qui ici peut s'expliquer par un retour des leucocytes radiomarqués séquestrés dans la circulation. Une arrivée de leucocytes non radiomarqués dans la circulation tels que ceux provenant de la moelle aurait un effet inverse (dilution de la radioactivité) de même que la séquestration des leucocytes radiomarqués par un autre organe que le poumon. Les effets du LPS sont beaucoup plus progressifs. Mais là aussi notamment pour la dose de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ de LPS la leucopénie est diminuée. La leucopénie évaluée par comptage des leucocytes radiomarqués est donc un paramètre complexe faisant intervenir des échanges bidirectionnels entre les leucocytes sanguins circulants et les leucocytes séquestrés dans l'ensemble des organes. La séquestration leucocytaire est également un paramètre composite puisqu'elle inclue les leucocytes marginés le long de l'endothélium (adhérents ou non), ceux qui se sont infiltrés dans les tissus et ceux ayant atteint la lumière alvéolaire et qui peuvent être récupérés par lavage bronchoalvéolaire.

Le tableau II indique les comptes en leucocytes (neutrophiles + éosinophiles + lymphocytes) dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LBA) à différents temps après l'injection de lipopolysaccharide (LPS) aux doses de $0,1$ et 1 mg kg^{-1} . Les comptes leucocytaires du LBA sont également exprimés en % des leucocytes sanguins avant injection de LPS.

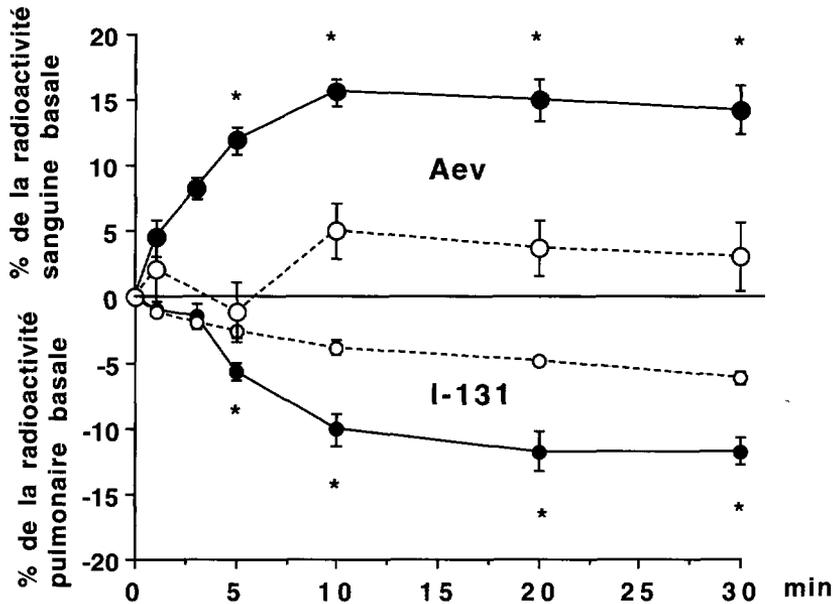


Fig 6 — Effets de l'injection de fMLP ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$ i.v.) sur le contenu pulmonaire en albumine radiomarquée extravasculaire. Comparaison avec le contenu total. Valeurs moyennes \pm SEM ($n = 11$ animaux) de la radioactivité (^{131}I) pulmonaire liée à l'albumine totale (I-131) (●) et à l'albumine extravasculaire (Aev) (●) en % de la radioactivité sanguine avant injection de fMLP (*) la différence avec les valeurs contrôles (injection i.v. de sérum physiologique, symboles vides, courbes en pointillés, $n = 7$ animaux) est significative avec $p < 0,05$.

[fMLP ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$ i.v.) induced variation of the lung content in radiolabelled extravascular albumin. Comparison with the total lung content. Values are mean \pm SEM ($n = 11$ animals) of lung radioactivity (^{131}I) bound to total albumin (I-131) (●) and to extravascular albumin (Aev) (●) in % of blood radioactivity before fMLP injection. Significance of the difference with control values (i.v. injection of saline, empty symbols, dotted lines, $n = 7$ animals) (*) $p < 0.05$.]

Le tableau III donne les résultats pour les mêmes expériences en ce qui concerne les neutrophiles.

Le nombre de leucocytes récupérés dans le LBA augmente progressivement en fonction du temps après l'injection de LPS. 24 h après 1 mg kg^{-1} de LPS, on compte 4,82 millions de leucocytes dans le BAL soit 2,5 % des leucocytes sanguins qui ont migré jusqu'aux voies aériennes. Bien que cette valeur soit probablement sous-estimée [28] elle est certainement largement inférieure à la valeur de séquestration pulmonaire totale des leucocytes radiomarqués observée au même temps et qui apparaît beaucoup plus rapidement figure 8. Nous n'avons pas évalué le nombre de leucocytes infiltrés dans les tissus sur ces temps. Il est probable qu'il est également relativement faible comparé au nombre des leucocytes sanguins circulants. Ainsi d'après l'étude morphométrique de Wang *et al.* [29] les neutrophiles infiltrés dans les tissus dans la zone de la microcirculation pulmonaire représentent de l'ordre de 20 % des neutrophiles vasculaires. Après injection de LPS le nombre de neutrophiles augmente dans les deux compartiments et leurs proportions relatives ne sont pas modifiées. En considérant l'ensemble de la circulation pulmonaire la proportion des neutrophiles infiltrés vis-à-vis des neutrophiles vasculaires devrait être encore plus faible.

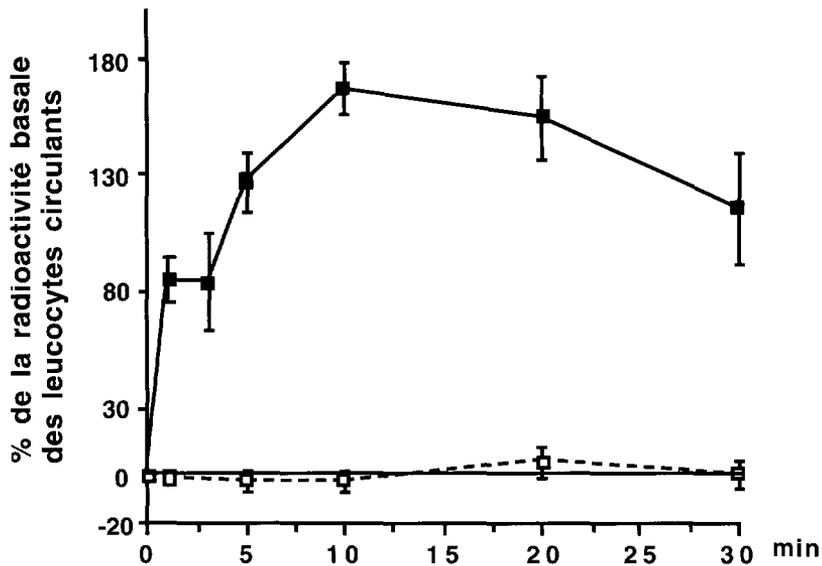


Fig. 7 — Séquestration pulmonaire des leucocytes radiomarqués induite par le fMLP ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$ i.v.) Valeurs moyennes \pm SEM ($n = 11$ animaux) de la radioactivité (^{111}In) pulmonaire liée aux leucocytes non circulants en % de la radioactivité sanguine avant injection de fMLP. Toutes les valeurs sont significativement différentes des valeurs contrôles (injection i.v. de sérum physiologique, symboles vides, courbes en pointillés, $n = 7$ animaux) avec $p < 0,05$.

[fMLP ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$ i.v.) induced sequestration of radiolabelled leucocyte within the lung. Values are mean \pm SEM ($n = 11$ animals) of lung radioactivity (^{111}In) bound to leucocytes in % of blood radioactivity before fMLP injection. All values were significantly different from control values (i.v. injection of saline, empty symbols, dotted lines, $n = 7$ animals) with $p < 0.05$]

Tableau II — Effets du LPS ($0,1$ et 1 mg kg^{-1} i.v.) sur les comptes en leucocytes du liquide de lavage bronchoalvéolaire. Valeurs moyennes \pm SEM ($n = 6$ animaux) des comptes en millions de cellules ($1\text{k } 10^6$) et en % du compte leucocytaire sanguin total avant traitement ($1\text{k } \%$ sg).

[LPS (0.1 et 1 mg kg^{-1} i.v.) induced variation of leucocyte counts in bronchoalveolar lavage fluid. Values are mean \pm SEM ($n = 6$ animals) of leucocytes counts in million of cells ($1\text{k } 10^6$) and in % of the total blood leucocyte count before treatment ($1\text{k } \%$ sg).]

Dose LPS i.v.	$0,1 \text{ mg kg}^{-1}$		1 mg kg^{-1}	
	$1\text{k } 10^6$	$1\text{k } \%$ sg	$1\text{k } 10^6$	$1\text{k } \%$ sg
0	$1,56 \pm 0,33$ $n = 6$	$0,81 \pm 0,17$	$1,56 \pm 0,33$ $n = 6$	$0,81 \pm 0,17$
1 h	$1,37 \pm 0,34$ $n = 6$	$0,71 \pm 0,18$	$1,71 \pm 0,21$ $n = 6$	$0,89 \pm 0,11$
6 h	$2,34 \pm 0,62$ $n = 6$	$1,22 \pm 0,32$	$2,75 \pm 0,55$ $n = 6$	$1,44 \pm 0,29$
24 h	$2,04 \pm 0,4$ $n = 6$	$1,06 \pm 0,21$	$4,82 \pm 0,84$ $n = 6$	$2,52 \pm 0,44$

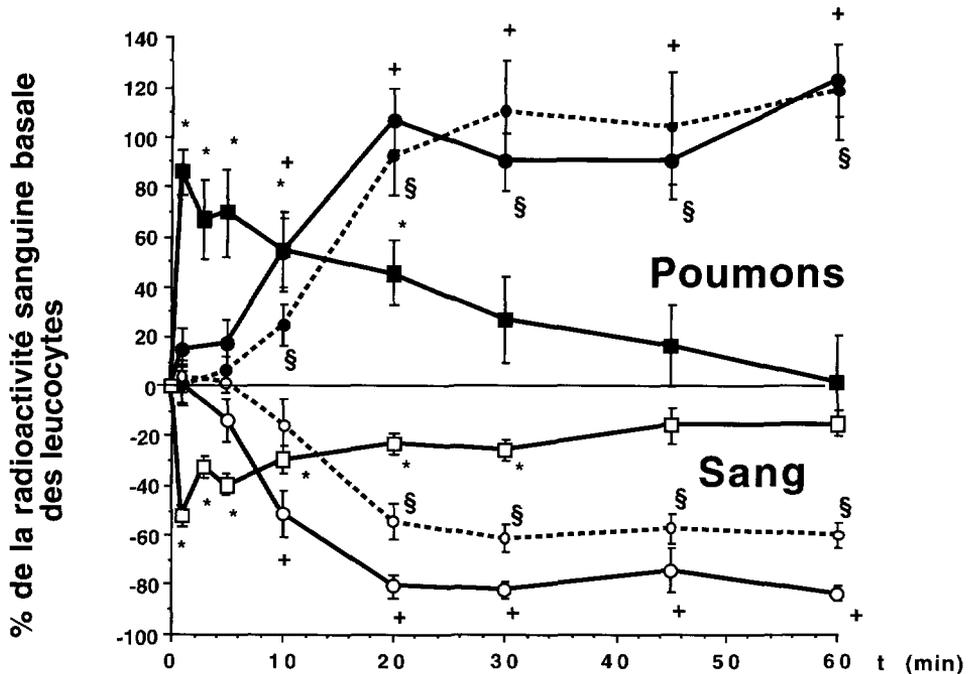


Fig 8 — Séquestration pulmonaire des leucocytes et leucopénies induite par le leukotriène B₄ (LTB₄, 3,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ i.v.) et le LPS (0,1 et 1 mg kg^{-1} i.v.). Valeurs moyennes \pm SEM de la radioactivité (¹¹¹In) en % de la radioactivité sanguine basale pour les leucocytes non circulants pulmonaires après injection de LTB₄ (3,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ i.v. $n = 16$ animaux) (■) ou de LPS 0,1 mg kg^{-1} ($n = 10$ animaux) (—●—) ou 1 mg kg^{-1} i.v. ($n = 10$ animaux) (●), de même pour les leucocytes circulants du sang comme indiqué par les symboles vides. Une différence avec les valeurs contrôles (injection i.v. de sérum physiologique, $n = 8$ animaux, non montré) significative avec $p < 0,05$ est indiquée par (*) pour le LTB₄, (+) pour le LPS 1 mg kg^{-1} et (§) pour le LPS 0,1 mg kg^{-1} .

[Lung sequestration of leucocytes and leucopenia induced by leukotriene B₄ (LTB₄, 3.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ i.v.) and LPS (0.1 and 1 mg kg^{-1} i.v.). Values are mean \pm SEM for ¹¹¹In radioactivity in percent of the basal blood radioactivity for non circulating lung leucocytes after the injection of LTB₄ (3.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ i.v. $n = 16$ animals) (■) or LPS 0.1 mg kg^{-1} ($n = 10$ animals) (—●—) or 1 mg kg^{-1} i.v. ($n = 10$ animals) (●) and similarly for blood circulating leucocytes as indicated by open symbols. Significance of the difference with control values (i.v. injection of saline, $n = 8$ animals, not shown) with $p < 0.05$ is indicated by (*) for LTB₄, (+) for LPS 1 mg kg^{-1} and (§) for LPS 0.1 mg kg^{-1} .]

Sur des temps d'expérience assez courts (1 à 2 heures) notre méthode évalue donc surtout une séquestration vasculaire des leucocytes, la proportion de ces cellules infiltrées dans les tissus, les voies aériennes étant relativement faibles.

Différents travaux ont montré que la séquestration vasculaire des leucocytes est sensible aux variations hémodynamiques [23, 30]. Il est notable que cette sensibilité aux conditions d'écoulement existe toujours lors d'une inflammation malgré le développement d'interactions fortes des leucocytes avec l'endothélium *via* les intégrines [31]. Nous avons nous-même constaté une démargination des leucocytes pulmonaires lors de la perfusion d'histamine (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en 10 min). Cette démargination serait due aux effets vasomoteurs de cet agent [11].

Tableau III. — Effets du LPS (0,1 et 1 mg kg⁻¹ i.v.) sur les comptes en neutrophiles du liquide de lavage bronchoalvéolaire. Valeurs moyennes ± SEM (n=6 animaux) des comptes en millions de cellules (PN 10⁺⁶) et en % du compte en neutrophiles sanguins total avant traitement (PN % sg)

[LPS (0.1 et 1 mg kg⁻¹ i.v.) induced variation of neutrophil counts in bronchoalveolar lavage fluid. Values are mean ± SEM (n = 6 animals) of neutrophil counts in million of cells (PN 10⁺⁶) and in % of the total blood neutrophils count before treatment (PN % sg).]

Dose LPS i.v.	0,1 mg kg ⁻¹		1 mg kg ⁻¹	
	PN 10 ⁺⁶	PN % sg	PN 10 ⁺⁶	PN % sg
0	0,17 ± 0,03	0,37 ± 0,06	0,17 ± 0,03	0,37 ± 0,06
1 h	0,34 ± 0,10	0,74 ± 0,22	0,73 ± 0,09	1,59 ± 0,20
6 h	0,42 ± 0,06	0,92 ± 0,14	1,46 ± 0,32	3,19 ± 0,70
24 h	0,70 ± 0,10	1,53 ± 0,21	3,49 ± 0,78	7,65 ± 1,72

2.2 1.3. Échanges vasculaires pulmonaires d'albumine. Rôle des leucocytes. — Nous n'avons pas mesuré directement les flux d'échanges de l'albumine à travers l'endothélium vasculaire. Cependant dans beaucoup de situations la variation du contenu en albumine radiomarquée extravasculaire (Aev) peut donner des indications sur ces échanges. Sa valeur dépendra du recrutement capillaire et des flux d'entrée et de sortie de l'albumine dans l'espace extravasculaire. Dans ce modèle les variations de perfusion liées à celles du recrutement capillaire sont évaluées d'après les mesures de la radioactivité liée aux globules rouges. Dans le cas du poumon nous avons souvent observé une diminution de la perfusion simultanément à l'augmentation de Aev ce qui traduit alors clairement un accroissement du flux d'albumine du sang vers les tissus à travers la barrière endothéliale.

Dans des situations où la radioactivité tissulaire liée aux GR augmente avec Aev, il faudrait analyser plus précisément les variations relatives de ces deux paramètres pour déterminer si un accroissement du passage trans-endothélial d'albumine intervient ou non dans l'augmentation de Aev.

Notons que des modifications d'échange de l'albumine à travers l'endothélium peuvent être dues à des variations de la pression hydrostatique et/ou de la perméabilité de cette barrière puisque ces échanges sont de nature convective et diffusive [32]. Indiquons encore que le drainage lymphatique tend à compenser un flux d'entrée excessif à travers l'endothélium et donc l'augmentation de Aev.

Nous avons pu souvent observer une augmentation des échanges trans-endothéliaux de l'albumine simultanément à la séquestration leucocytaire. Cependant il n'existe pas de relation directe entre séquestration leucocytaire et échanges trans-endothéliaux. Parfois même cette relation est totalement absente. Ainsi lors du choc antigénique intra-trachéal chez des cobayes sensibilisés, Aev augmente alors qu'il n'est pas possible de détecter une séquestration pulmonaire significative des leucocytes. Dans ce cas nous avons pu montrer que la fuite d'albumine est due à l'histamine [11]. Avec le lipopolysaccharide bactérien (LPS) on peut au contraire observer une séquestration leucocytaire sans augmentation des échanges trans-endothéliaux. Le tableau IV résume les effets du LPS (0,1 et 1 mg kg⁻¹ i.v.) chez le cobaye traité ou non par un inhibiteur de la 5-lipoxygénase (BW B70C) [33] ou par un corticoïde la dexaméthasone, sur la séquestration vasculaire des leucocytes, leur migration jusqu'aux voies aériennes (lavage bronchoalvéolaire LBA) et le contenu en albumine extravasculaire au niveau pulmonaire.

Tableau IV. — *Effets du LPS (0,1 et 1 mg kg⁻¹ i.v.) sur la séquestration pulmonaire des leucocytes, leur infiltration et les échanges d'albumine et leur modulation par un inhibiteur de la 5-lipoxygénase et un corticoïde. Les paramètres évalués (n = 5 à 10 animaux pour chaque groupe) sont : la séquestration pulmonaire des leucocytes, l'infiltration des leucocytes et des neutrophiles jusqu'aux voies aériennes d'après les numérations sur le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LBA), les échanges trans-endothéliaux d'albumine d'après le contenu pulmonaire en albumine extravasculaire (Aev). BW pour BW B70C un inhibiteur de la 5-lipoxygénase injectée 1 heure avant le LPS (30 mg kg⁻¹ i.p.). Dexa pour dexaméthasone (20 mg kg⁻¹ sc matin et soir pendant 3 jours et 1 heure avant l'expérience). (+) augmentation significative, (-) inhibition significative, (ns) pas d'effet significatif, (ND) non déterminé*

[Lung leucocyte sequestration, infiltration and microvascular albumin exchanges following i.v. LPS injection (0.1 and 1 mg kg⁻¹ i.v.) and their modulation by a 5-lipoxygenase inhibitor and a corticoid. Evaluated parameters (n = 5 to 10 animals for each group) were: lung leucocyte sequestration, leucocyte and neutrophile infiltration toward the airway lumen from bronchoalveolar lavage fluid counts (LBA), trans-endothelial albumin exchanges from the lung content in extravascular albumin (Aev). BW for the 5-lipoxygenase inhibitor BW B70C injected 1 hour before LPS (30 mg kg⁻¹). Dexa for dexamethasone (20 mg kg⁻¹ sc during 3 days twice a day and 1 hour before experiment). (+) significant increase, (-) significant inhibition, (ns) non significant effect, (ND) non determined.]

Agent Paramètre	LPS 0,1 mg kg ⁻¹	BW + LPS 0,1 mg kg ⁻¹	LPS 1 mg kg ⁻¹	BW + LPS 1 mg kg ⁻¹	Dexa + LPS 1 mg kg ⁻¹
leucocytes séquestrés 1 h	+	-	+	+	+
leucocytes LBA 1 h	ns	ns	+	ND	+
PMN LBA 1 h	ns	ns	+	ND	-
leucocytes LBA 6 h	ns	ns	+	-	-
PMN LBA 6 h	ns	ns	+	-	-
Aev 1 h	ns	ns	+	-	+

La dose de 0,1 mg kg⁻¹ i.v. de LPS induit une séquestration pulmonaire significative des leucocytes. Mais seule une plus forte dose de 1 mg kg⁻¹ induit une augmentation de Aev tout en induisant toujours une séquestration leucocytaire [13].

En fait comme il a été vu précédemment dans le pool des leucocytes séquestrés seule une faible part est infiltrée dans les tissus. Or il semble que l'augmentation des échanges d'albumine est plutôt liée à l'infiltration leucocytaire, ces deux événements étant associés dans les expériences citées. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats obtenus en inhibant la voie 5 lipoxygénase par le BW B70C. Dans ce cas l'augmentation de Aev et l'infiltration leucocytaire induites par 1 mg kg⁻¹ LPS sont inhibés alors que la séquestration vasculaire des leucocytes ne

l'est pas [13]. Cependant l'inhibition de la "perméabilité" endothéliale n'est pas le seul moyen de prévenir l'infiltration tissulaire des leucocytes et plus particulièrement des leucocytes polynucléaires neutrophiles. Dans un travail concernant la modulation par la dexaméthasone des effets du LPS nous avons observé que ce corticoïde n'inhibait pas l'augmentation de "perméabilité" endothéliale induite par le LPS alors qu'il inhibait la migration des neutrophiles jusqu'aux voies aériennes ce qui peut être lié à un effet sur la deuxième barrière constituée par l'épithélium ou sur la migration elle-même [14].

Conclusions

En conclusion la méthode d'utilisation de traceurs radioactifs chez l'animal *in vivo* qui a été développée permet d'évaluer simultanément la séquestration des leucocytes et les variations des contenus en albumine extravasculaire et en globules rouges au niveau d'un organe. Malgré certaines améliorations envisageables cette méthode est dans son état actuel suffisamment sensible pour détecter les effets de doses physiologiques d'agents inflammatoires. Il a été montré que la séquestration pulmonaire des leucocytes induite par les agents inflammatoires a lieu essentiellement au niveau vasculaire. L'infiltration de ces cellules dans les tissus étant relativement négligeable. Les variations du contenu pulmonaire en globules rouges sont supposées être représentatives des variations de perfusion. L'augmentation du contenu pulmonaire en albumine extravasculaire, à perfusion constante ou diminuée, indique un accroissement des échanges trans-endothéliaux de l'albumine et probablement la formation d'un œdème. Enfin il n'existe pas de relation claire entre séquestration vasculaire des leucocytes et augmentation des échanges trans-endothéliaux d'albumine. La séquestration vasculaire des leucocytes a plusieurs causes qui peuvent intervenir simultanément soit : la margination passive du fait d'un ralentissement de l'écoulement et donc une diminution de la contrainte de cisaillement [30], l'interaction faible avec l'endothélium *via* les sélectines [31], l'interaction forte *via* les intégrines [31], la diminution de déformabilité des leucocytes [34]. C'est probablement la fraction des leucocytes interagissant fortement *via* les intégrines avec l'endothélium qui peut altérer ses propriétés d'échange. Une telle relation entre intégrines, activation des leucocytes et modification de l'endothélium a été démontrée récemment [35]. Une compréhension plus fine de la relation entre l'interaction leucocytes-endothélium et la modification des propriétés d'échange de la barrière endothéliale conduisant à la formation de l'œdème *in vivo* nécessite de pouvoir agir sélectivement sur l'expression ou la fonction de certaines protéines d'adhésion.

Remerciements

Mes remerciements vont au professeur B.B. Vargaftig, directeur de l'unité associée Pasteur-INSERM n°285, qui m'a offert sa confiance et donné tous les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail méthodologique.

Bibliographie

- [1] Haslett C., Savill J.S. and Meagher L., The neutrophil, Current Opinion, *Immunol.* **2** (1989) 10-18.
- [2] Kaslovsky R.A., Horgan M.J., Lum H., McCandless B.K., Gilboa N., Wright S.D. and Malik A.B., Pulmonary edema induced by phagocytosing neutrophils. Protective effect of monoclonal antibody against phagocyte CD 18 Integrin. *Circulation. Res.* **67** (1990) 795-802.

- [3] Wedmore C.V. and Williams T.J., Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation, *Nature Lond.* **289** (1981) 646-650.
- [4] Dampure H.J., Osman S. and Brady F., The labelling of blood cells in plasma with ¹¹¹In-Tropolonate, *Br. J. Radiol.* **55** (1982) 247-249.
- [5] Saverymutu S.H., Peter A.M., Reavy H.F. and Lavender H.J., Lung transit of ¹¹¹Indium labelled granulocytes. Relationship to labelling techniques, *Scand. J. Haematol.* **30** (1983) 151-160.
- [6] Page C.P., Paul W. and Morley J., An *in vivo* model for studying platelet aggregation and disaggregation, *Throm. Haemostasis* **47** (1982) 210-213.
- [7] Taylor A., Townsley M.I. and Korhuis R.J., Macromolecule transport across the pulmonary microvessel walls, *Exp. Lung. Res.* **8** (1985) 97-123.
- [8] Staub N.C., Pulmonary edema due to increased microvascular permeability to fluid and proteins, *Circ. Res.* **43** (1978) 143-151.
- [9] Bureau M.F., Malanchere E., Pretolani M., Boukili M.A. and Vargaftig B.B., A new method to evaluate extravascular albumin and blood cell accumulation in the lung, *J. Appl. Physiol.* **67** (1989) 1479-1488.
- [10] Bureau M.F., de Clerck F., Lefort J., Arreto C.D. and Vargaftig B.B., Thromboxane A2 accounts for bronchoconstriction but not for platelet sequestration and microvascular albumin exchanges induced by fMLP in the guinea-pig lung, *J. Pharm. Exp. Ther.* **260** (1992) 832-840.
- [11] Bureau M.F., Arreto C.D., Lefort J. and Vargaftig B.B., Albumin exchange and inflammatory cell recruitment in lungs of antigen-challenged guinea-pigs: role of histamine, *J. Appl. Physiol.* **77** (1994) 252-261.
- [12] Arreto C.D., Bureau M.F., Imaizumi A. and Vargaftig B.B., Pharmacological differentiation by pertussis toxin of the *in vivo* acute response to fMLP and PAF in guinea-pig lungs, *Br. J. Pharmacol.* **108** (1993) 412-417.
- [13] Bureau M.F., Barbosa de Castro C.M., Cortese C., Bachelet M. and Vargaftig B.B., Modulation by the 5-lipoxygenase inhibitor BW B70C of the endotoxin induced microvascular albumin exchanges and vascular leucocyte sequestration and infiltration in guinea-pig lungs, *Eur. J. Pharmacol.* (1997) sous presse.
- [14] de Castro C.M.M.B., Bureau M.F., Vargaftig B.B. and Bachelet M., Interference of dexamethasone with leukocyte, blood volume and albumin movements in lungs from endotoxemic guinea-pigs, *Pulm. Pharm.* **8** (1995) 289-297.
- [15] Bird J. and Giroud J.P., The reactivity of neutrophils at the site of an acute inflammatory reaction as measured by chemiluminescence, *Agents Actions* **15** (1984) 349-355.
- [16] Coeffier E., Joseph D. and Vargaftig B.B., LTB₄, a potent chemotactic factor for purified guinea-pig eosinophils: Interference of PAF-aceter antagonists, *Int. J. Immunopharmac* **13** (1991) 273-280.
- [17] Coeffier E., Joseph D. and Vargaftig B.B., Role of interleukine-5 in enhanced migration of eosinophils from airways of immunized guinea-pigs, *Br. J. Pharmacol.* **113** (1994) 749-756.
- [18] Sweatman W.J.F., Brandon D.R., Cranstone S., Gooderham R. and Walker J.R., ¹¹¹In-radiolabelled guinea-pig peripheral leukocytes *in vivo* distribution and response to leukotriene B₄, *J. Pharmacol. Methods.* **18** (1987) 227-237.
- [19] Chien S., Usami S., Dellenbach R.J. and Gregersen M.I., Shear dependent deformation of erythrocytes in rheology of human blood, *Am. J. Physiol.* **219** (1970) 136-142.

- [20] Lee J.S., Lee L.P., Evans M.P. and Gamas L., A density method to quantify pulmonary microvascular haematocrit, *Microvasc. Res.* **30** (1985) 222-234.
- [21] Bureau M., Vicart P., Bedig G and Vulpillat M., Blood, liver and lung kinetics of technetium-99m-labelled granulocytes in the rat. Study by external monitoring with a gamma camera, *Int. J. Microcirc: Clin Exp* **5** (1986) 53-63.
- [22] Hogg J.C., Coxson H O , Brumwell M.L., Beyers N., Doerschuk C.M., Macnee W. and Wiggs B.R., Erythrocyte and polymorphonuclear cell transit time and concentration in human pulmonary capillaries, *J. Appl. Physiol.* **77** (1994) 1795-1800.
- [23] Perry M.A. and Granger D.N., Role of CD11/CD18 in shear rate dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules, *J. Clin. Invest.* **87** (1991) 1798-1804.
- [24] Bienvenu K and Granger D.N., Molecular determinants of shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules, *Am J. Physiol.* (1993) H1504-H1508.
- [25] Kuhnle G.E.H., Kuebler W.M., Groh J. and Goetz A.E., Effect of blood flow on the leukocyte-endothelium interaction in pulmonary microvessels, *Am. J. Respir Crit. Care. Med.* **152** (1995) 1221-1228.
- [26] Lien D.C., Henson P.M., Capen R.L., Hensen J E., Hanson W.L., Wagner Jr. W.W. and Worthen G.S., Neutrophil kinetics in the pulmonary microcirculation during acute inflammation, *Lab. Invest.* **65** (1991) 145-159.
- [27] Slaaf D.W., Woldhuis B., Tangelder G.J. and Reneman R S., Is an inverted fähraeus effect present for blood platelets flowing in rabbit mesenteric arterioles? Proceedings of the fifth world congress for microcirculation (Louisville, Kentucky U.S.A. 08 31-09 05, 1991).
- [28] Downey G.P., Worthen G.S., Henson P.M. and Hyde D.M., Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation, *Am. Rev. Respir. Dis* **147** (1993) 168-176.
- [29] Wang C.Z., Herndon D.N., Traber L.D , Yang S.F., Cox R A., Nakasawa H., Barrow R E. and Traber D.L., Pulmonary inflammatory cell response to sustained endotoxin administration, *J. Appl. Physiol.* **76** (1994) 516-522.
- [30] Doershuk C M., Downey G.P., Doherty D.E., English D., Gie R P , Ohgami M., Worthen G.S., Henson P.M. and Hogg J.C., Leukocyte and platelet margination within microvasculature of rabbit lungs, *J. Appl. Physiol.* **68** (1990) 1956-1961.
- [31] Granger D.N. and Kubes P., The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion, *J. Leuk. Biol.* **55** (1994) 662-675
- [32] Haraldson B and Rippe B., Influence of perfusate oncotic pressure on the transcapillary clearance of albumin in maximally vasodilated rat skeletal muscle, *Acta. Physiol Scand.* **130** (1987) 219-228.
- [33] Yeadon M., Dougan F.L., Petrovic A., Beesley J.E. and Payne A.N., Effect of BW B70C, a novel inhibitor of arachidonic acid 5-lipoxygenase, on allergen-induced bronchoconstriction and late-phase lung eosinophil accumulation in sensitized guinea-pig, *Agent and Actions* **38** (1993) 8-18.
- [34] Hidetaka I., English D. and Doerschuk C M., Effect of zymosan-activated plasma on the deformability of rabbit polymorphonuclear leukocytes, *J. Appl. Physiol.* **73** (1992) 1370-1376.
- [35] Fujita H., Morita I. and Murota S , A possible mechanism for vascular endothelial cell injury elicited by activated leukocytes: A significant involvement of adhesion molecules, CD11/CD18, and ICAM-1, *Arch. Biochem. Biophys.* **309** (1994) 62-69.