

Université de Montréal

Étude des conséquences immunomodulatrices des solutés cristalloïdes

Par

Frédéric Brillant-Marquis

Sciences Biomédicales, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Sciences biomédicales, option Médecine expérimentale

Juillet 2019

© Frédéric Brillant-Marquis, 2019

Université de Montréal

Sciences biomédicales, Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

Étude des conséquences immunomodulatrices des solutés cristalloïdes

Présenté par

Frédéric Brillant-Marquis

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Jean-François Gauchat

Président-rapporteur

Jean-François Cailhier

Directeur de recherche

Sacha De Serres

Membre du jury

Résumé

L'impact immunomodulateur des solutés cristalloïdes

Tous les patients de soins intensifs reçoivent des solutés cristalloïdes. Ils sont souvent dans un état inflammatoire sévère. Parmi ces solutés cristalloïdes, le Normal Salin (NS) a des concentrations élevées en chlorure et en sodium ce qui a été associé à divers effets immuno-activateurs.

Nous visons à évaluer l'effet des différents solutés sur les cellules immunitaires de sujets sains et sur un modèle d'inflammation aiguë sur sang total.

Dans cette étude de type chassé-croisé, 11 sujets sains ont été recrutés pour recevoir 1L de chaque soluté. Grâce aux prélèvements sanguins pris en pré et post-infusion, nous évaluons le phénotype des leucocytes par cytométrie en flux et les cytokines plasmatiques par multiplex. Les tests *ex vivo* sont faits en exposant du sang total aux solutés suite à une stimulation au LPS.

Notre étude suggère une diminution de l'activation des neutrophiles par le LR et le PL par rapport au NS. On constate aussi une augmentation des monocytes totaux et classiques circulants suite au NS. Le NS augmente les concentrations de la cytokine pro-inflammatoire Interleukine (IL)-17A et diminue certains facteurs anti-inflammatoires comme IL-10 et *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) par rapport aux deux autres solutés. *Ex vivo*, l'ajout de NS augmente l'activation des monocytes par rapport au LPS seul par rapport au LR et au PL. Le PL diminue aussi l'activation précoce des lymphocytes T.

Nos résultats suggèrent que le NS a un effet plus immunoactivateur que les 2 autres solutés. Une meilleure compréhension de ces effets pourrait mener à une utilisation personnalisée des cristalloïdes pour un retour plus efficace à l'homéostasie inflammatoire.

Mots-clés : Inflammation, leucocytes, cytokines, soins intensifs, solutés cristalloïdes, cytométrie de flux

Abstract

The immunomodulatory impact of crystalloid fluids

Intensive care unit patients' inflammatory status can switch from an early pro-inflammatory to a late anti-inflammatory phase, which favors infections. They can receive different crystalloids, either Normal Saline (NS), Ringer's Lactate (RL) or Plasma-Lyte (PL). NS has high NaCl concentrations which has been associated with inflammatory effects on immune cells.

Our aim is to evaluate the impact of these three different crystalloid fluids on immune cells in healthy subjects and on a whole blood model of acute inflammation.

Using our comprehensive immunomonitoring platform, we assessed the immunological phenotype of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and neutrophils in humans. 11 healthy subjects received a liter of NS, RL and PL in a randomized cross-over fashion. Blood samples were taken before and 6h later. PBMC and neutrophil phenotypes were assessed by flow cytometry and cytokine concentrations were measured by a multiplex assay. *Ex vivo* assays were performed by exposing whole blood to the different crystalloids following a stimulation with LPS.

Study of healthy subject's PBMCs suggested that RL and PL reduced activation of neutrophils compared to NS. Total and classical monocytes were increased with NS compared to RL and PL. RL and PL also increase plasma levels of anti-inflammatory cytokine Interleukin (IL)-10 and pro-repair cytokine basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) compared to NS, while NS increased plasma levels of the pro-inflammatory cytokine IL-17A. In whole blood assays, following LPS stimulation, NS increased monocytic activation compared to LR and PL. In T cells, PL decreased early activation.

Conclusions: Our results suggest that crystalloids have different immune consequences with NS being more immune activating than RL and PL. A better understanding of their immune modulation could lead to personalization of their use according to the inflammatory status of patients to restore their immune homeostasis.

Keywords: Inflammation, peripheral blood leucocytes, cytokines, intensive care, crystalloid fluids, flow cytometry

Table des matières

Résumé	5
Abstract	7
Table des matières	9
Liste des tableaux	11
Liste des figures	13
Liste des sigles et abréviations	15
Remerciements	19
Chapitre 1 – Introduction	21
Les solutés cristalloïdes	21
Le Normal Salin	21
Le Lactate Ringer	22
Le PlasmaLyte A	22
L'inflammation	25
La réaction inflammatoire aiguë	27
Neutrophiles	29
Monocytes et macrophages	31
Les cellules de l'immunité adaptative	32
Cytokines et chimiokines	34
Le sodium comme activateur inflammatoire	35
Chapitre 2 – Matériels et méthodes	39
Schéma de l'étude	39
Prélèvements sanguins	39
Isolation des neutrophiles et des PBMC	40
Cytométrie en flux	41
Étapes communes de la préparation des cellules pour la cytométrie en flux	41
Analyse du phénotype des neutrophiles par cytométrie en flux	41
Analyse du phénotype des PBMCs par cytométrie en flux	42
Tests fonctionnels des neutrophiles	42
Dosage de protéines par Multiplex	43
Principes généraux	43
Dosage de cytokines plasmatiques	44
Tests <i>ex vivo</i> sur sang total	44
Analyses statistiques	45
Chapitre 3 – Résultats	47
Caractérisation du phénotype des neutrophiles activés	47
Effets des solutés sur les neutrophiles de sujets sains	48
Phénotype de surface	48
Fonctions neutrophiliques	50
Effets des solutés sur le phénotype des PBMCs de sujets sains	50
Monocytes	50
Cellules dendritiques	52
Lymphocytes	54

Effets des solutés sur les cytokines plasmatiques de sujets sains	54
Effets des solutés sur les valeurs biochimiques de sujets sains.....	55
Effets immunomodulateurs des solutés sur un modèle d'inflammation aiguë <i>ex vivo</i> en sang total.....	56
Effets sur les neutrophiles	56
Effets sur les monocytes.....	56
Effets sur les lymphocytes T	59
Chapitre 5 – Discussion.....	61
Caractérisation des phénotypes cellulaires.....	61
Effet des solutés sur les sujets sains	61
Neutrophiles	61
PBMCs	64
Cytokines.....	66
Effet biochimique.....	69
Effets des solutés sur un modèle d'inflammation aiguë.....	70
Les neutrophiles	70
Les monocytes.....	71
Les Lymphocytes T.....	72
Chapitre 6 – Conclusion.....	75
Références bibliographiques	77
Annexes.....	87
Annexe 1 – Données supplémentaires	87
Annexe 2 – Tableaux.....	96
Annexe 3 : Solutions	102

Liste des tableaux

Tableau 1. –	Composition des solutés cristalloïdes par rapport au plasma.....	22
Tableau 2. –	: Liste des données biochimiques analysées par les laboratoires du CHUM	96
Tableau 3. –	Panel d’anticorps pour le phénotypage des neutrophiles par cytométrie en flux ...	97
Tableau 4. –	Panel 1(Lymphocytes T)	97
Tableau 5. –	Panel 2 (Lymphocytes Treg).....	98
Tableau 6. –	Panel 3 (Lymphocytes T et cytokines).....	98
Tableau 7. –	Panel 4 (Populations de leucocytes).....	99
Tableau 8. –	Panel 5 (Monocytes).....	99
Tableau 9. –	Panel 5.2 (Monocytes et TNF- α)	100
Tableau 10. –	Panel 6 (Lymphocytes B).....	100
Tableau 11. –	Liste des cytokines, chimiokines et facteurs solubles périphériques détectables par Multiplex MSD	101
Tableau 12. –	Solution de Dextran 3%	102
Tableau 13. –	Milieu R10.....	102
Tableau 14. –	FACS Buffer	102

Liste des figures

Figure 1. – Effets biochimiques des solutés sur les patients en soins intensifs.	24
Figure 2. – Les syndromes de réponse pro-inflammatoire (SIRS) et de compensation anti-inflammatoire suite à une insulte inflammatoire sévère (CARS).	27
Figure 3. – Les effets du NaCl sur les cellules immunitaires.	36
Figure 4. – Principe de fonctionnement du Multiplex.	44
Figure 5. – Test d'activation des neutrophiles et effets sur les phénotypes de surface.	48
Figure 6. – Effet des solutés sur le phénotype de surface des neutrophiles de sujets sains.	49
Figure 7. – Effets des solutés sur les populations de monocytes chez les sujets sains.	51
Figure 8. – Effet des solutés sur les populations de cellules dendritiques des sujets sains.	53
Figure 9. – Effet des solutés sur les cytokines plasmatiques.	55
Figure 10. – Effets biochimiques des solutés.	56
Figure 11. – Effets des solutés sur le phénotype des monocytes activés par le LPS.	58
Figure 12. – Effet des solutés sur le phénotype des lymphocytes T.	60
Figure 13. – Résumé des effets des solutés sur les cellules immunitaires.	73
Figure 14. – Expression des marqueurs d'activation sur les neutrophiles pré et post solutés.	87
Figure 15. – Proportions de monocytes totaux et classiques pré- et post-soluté.	88
Figure 16. – Proportions de cellules dendritiques myéloïdes pré- et post-soluté.	89
Figure 17. – Effet des solutés sur les lymphocytes T.	89
Figure 18. – Effet des solutés sur les lymphocytes B.	90
Figure 19. – Effets des solutés sur les lymphocytes NK.	91
Figure 20. – Concentrations plasmatiques des cytokines pré- et post-soluté.	93
Figure 21. – Effet des solutés sur l'état d'activation des monocytes.	94
Figure 22. – Effet des solutés sur l'état d'activation des lymphocytes T.	95

Liste des sigles et abréviations

ACK : *Ammonium Chloride Potassium*

Ac: anticorps

Ca: calcium

CARS: *Compensatory Anti-inflammatory Syndrome*

BCR: *B-cell receptor*

BSA: bovine serum albumin

CCL: *CC-Chemokine ligand*

CD: *Cluster of differentiation*

CIVD : Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée

Cl: Chlorure

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CXCL : *CXC-Chemokine ligand*

CX₃CL : *CX₃C-Chemokine ligand*

DAMP : *Damage associated molecular pattern*

DC : Cellules Dendritiques

DHR : Dihydrorhodamine

DMSO: Diméthylsulfoxyde

ERK: *extracellular-signal regulated kinase*

FB: *FACS Buffer*

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FBS: *Fetal Bovine Serum*

fMLP: *N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine*

HLA-DR: *Human Leukocyte Antigen-DR Isotype*

IFN: Interféron

IL: Interleukine

iNOS : *inducible Nitrous oxyde synthase*

IV : Intraveineux

K : potassium

LPS : Lipopolysaccharide

LR: Lactate Ringer

Na: Sodium

NADPH: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NF- κ B: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NLR: *Nod-like* Receptor

NS: Normal Salin

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

MCP: *Monocyte Chemoattractant Protein*

MFI: *Mean Fluorescence Intensity*

MIP: *Macrophage Inflammatory Protein*

MOF: *Multi-organ Failure*

NLRP3: *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*

PAMP : *Pathogen associated molecular pattern*

PD-L : *Programmed Death-Ligand*

PRR : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

PBMC: *Peripheral blood mononuclear cells*

PBS: *Phosphate buffered saline*

PL : PlasmaLyte A

PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate

ROS: *Reactive oxygen species* (espèces réactives de l'oxygène)

SGK: *Serum and Glucocorticoid-Regulated Kinase*

SSC: *Side Scatter*

TCR: *T-cell receptor*

TLR: *Toll-like Receptor*

TNF: *Tumor necrosis factor*

Remerciements

Merci au Dr. Jean-François Cailhier de m'avoir accepté dans ton laboratoire, d'abord comme stagiaire, puis comme étudiant, et m'avoir nourri de sciences, de connaissances, de fromages et de bons vins dans cette expérience fortifiante et enrichissante. Tu as toujours su me guider et m'épauler à travers ce projet dans la bonne humeur et avec l'ambiance comique et enivrante qui te caractérise.

Merci à Patrick Laplante de m'avoir appris les bases du fonctionnement en laboratoire, des règles de bonne pratique aux mesures de stérilité, de la manipulation d'une pipette à la préparation d'un bon oral.

Merci à ma compagne de vie et future docteure Typhaine Gris de m'avoir si bien accueilli dans le laboratoire, en me donnant un coup de main quand j'en ai eu besoin, tant dans le laboratoire qu'à l'extérieur du laboratoire. Merci pour tous les beaux moments passés ensemble depuis le début de cette année. Je suis éternellement reconnaissant pour l'aide que tu m'as offerte, de mes premières expériences au laboratoire à la rédaction de ce mémoire.

Merci à Paméla Thébault pour avoir tenté de m'infuser une fraction de ton savoir à propos de la cytométrie en flux et pour tout le matériel prêté à des moments opportuns.

Merci aux stagiaires du laboratoire, Benjamin et Ana, ainsi qu'à Benoît que j'ai brièvement côtoyé, pour avoir rendu l'atmosphère de travail convivial tout en travaillant de façon si acharnée au nom de la Science.

Merci aux membres de l'unité des soins intensifs du CHUM pour avoir participé à mon projet en donnant leur temps et leur corps.

Merci enfin à la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal de m'avoir permis de suspendre mes études de médecine pour vivre cette belle expérience

Chapitre 1 – Introduction

Les solutés cristalloïdes

Les thérapies de solutés intraveineux (IV) ont été introduites pour la première fois en 1832 en Grande-Bretagne au cours d'une épidémie de choléra, une maladie caractérisée par une déshydratation secondaire à des diarrhées et vomissements. À cette époque, le paradigme pour le traitement de cette maladie consistait en des saignées, qui aggravaient les pertes liquidiennes des patients. C'est le Dr. Thomas Latta qui, suite aux études de son collègue Dr. WB O'Shaughnessy, a été le premier à mettre cette technique de réanimation liquidienne en pratique avec une injection IV de solution saline chez une patiente en état critique (3). Il a rapidement constaté que l'état de cette dernière s'était grandement amélioré, mais de façon temporaire uniquement. Le docteur Latta a donc pensé que pour être efficace, ce traitement devait être administré en continu. Cependant, son observation n'a pas été prise en compte par l'ordre médical de l'époque et, lors de l'épidémie de choléra en 1848, seule une infime minorité de patients a bénéficié de ce traitement. Ce n'est qu'au cours des années 1930, soit environ un siècle plus tard, que l'étude des thérapies d'infusions IV modernes a été reprise pour finalement être aujourd'hui accessible à grande échelle (4).

Le Normal Salin

La composition du premier soluté utilisé est bien différente de ceux disponibles de nos jours. Lors des épidémies de choléra, le soluté utilisé était composé d'eau et de différents sels. Il a fallu attendre les expériences du Dr. Hamburger en 1896 pour voir l'arrivée du premier soluté cristalloïde encore utilisé aujourd'hui : le salin 0,9%, composé de NaCl (chlorure de sodium) à une concentration de 0,9% dans l'eau (Tableau 1. –) (4). Son appellation de Normal Salin (NS) vient du fait qu'il se rapprochait d'une tonicité physiologique lors d'expériences de laboratoire. Toutefois, il est maintenant acquis que le NS est en fait supraphysiologique (5) du fait de son importante concentration en sodium (154 mmol/L *versus* 140 mmol/L dans le plasma) et surtout de chlorure (154 mmol/L *versus* 98 mmol/L dans le plasma). Cette

importante concentration de chlorure est associée à plusieurs conséquences biologiques comme l'acidose hyperchlorémique iatrogénique, l'insuffisance rénale aiguë et même des infections (6-8).

Le Lactate Ringer

D'autres solutés cristalloïdes à composition plus physiologique ont été créés plus tard. En 1880, Dr. Sydney Ringer a inventé une solution saline complétée de calcium (Ca^{2+}) et de potassium (K^+), qui visait initialement à promouvoir la contraction cardiaque (4). Finalement, dans les années 1930, Dr. Hartmann a ajouté à cette solution du lactate de sodium, pour ses fonctions de tamponnage du pH dans le but de traiter l'acidose métabolique (6). C'est cette nouvelle solution qui est maintenant connue sous le nom de Lactate Ringer (LR) (Tableau 1. –).

Le PlasmaLyte A

Plus récemment, d'autres solutions cristalloïdes ont été conçues dont le PlasmaLyte A (PL). Ce soluté contient des concentrations de sodium et de chlorure presque identiques au plasma en plus d'être ajusté au pH sanguin de 7,4 (Tableau 1. –). Le PL contient des anions différents du LR et aucun calcium, qui pourrait interférer avec les produits anticoagulants ou les médicaments lorsqu'il est utilisé comme véhicule (6).

	pH	Osmolarité	Na	Cl	K	Ca	Système tampon	Prix (\$CAN)
Plasma	7,4	289	142	103	4	5	HCO_3 22-32	N/A
Normal Salin	5,5	308	154	154	0	0	Nil	1,26 \$/L
Lactate Ringer	6,5	273	130	109	4	3	Lactate 28	1,44 \$/L
Plasmalyte A	6,5	295	140	98	5	0	Gluconate 23/Acétate 27	7 \$/L

Tableau 1. – Composition des solutés cristalloïdes par rapport au plasma

Le NS est hypernatrémique, hyperchlorémique et hyperosmolaire par rapport au plasma, alors que les solutés balancés (LR et PL) se rapprochent davantage de la composition du plasma rapportée. Le NS demeure toutefois le plus utilisé vu son prix moindre. Adapté de Canadiem.org

De nos jours, les solutés cristalloïdes sont les traitements les plus prescrits au monde avec plus de 1 million de litres par jour seulement pour le Normal Salin (NS). Ils sont employés en médecine le plus souvent pour maintenir la volémie des patients, pour expandre le volume circulant des patients en contraction volémique ou même pour réanimer des patients en choc (6). Ils peuvent aussi servir à corriger des désordres électrolytiques ou de véhicule pour livrer des médicaments par voie IV. Bien que l'hydratation par voie orale soit habituellement favorisée, lorsque cette voie est inutilisable, on utilise des solutés par voie IV.

Le NS, le LR et le PL sont les trois solutés cristalloïdes les plus utilisés dans des contextes de réanimation volémique. Le NS est de loin le plus fréquemment utilisé vu son coût moindre, devant le LR (6). Le PL, au Québec, est seulement utilisé en salle d'opération ou dans certaines unités de soins intensifs.

De par leur composition relativement similaire à celle du plasma, les solutés cristalloïdes ont généralement peu d'effets secondaires. Les patients peuvent principalement souffrir de surcharge liquidienne si un trop grand volume leur est administré, ou de désordre électrolytique si le mauvais soluté leur est prescrit. Dans les dernières années, de plus en plus d'études se sont intéressées à d'autres complications associées spécifiquement au NS, soit la toxicité rénale et l'acidose métabolique hyperchlorémique (7). Les hypothèses proposées pour expliquer la toxicité rénale impliquent une modulation du rétrocontrôle tubulo-glomérulaire (9), une vasoconstriction des vaisseaux rénaux (10) et une hyperkalémie par l'inhibition de la rénine, toutes attribuables à une charge en chlore élevée (11). Des évidences animales suggèrent aussi que l'acidose métabolique dues aux hautes concentrations de chlore peut exacerber une instabilité hémodynamique (12, 13). Deux grandes études publiées dans le *New England Journal of Medicine* en 2018 ont démontré, à l'aide de cohortes unicentriques composées de plus de 15 000 patients de soins intensifs et plus de 13 000 patients hospitalisés aux urgences, que les patients qui recevaient du NS développaient rapidement des déséquilibres électrolytiques (Figure 1. –). De plus, une augmentation d'environ 1% du risque de complications rénales par rapport aux patients recevant le LR ou le PL a été observée.

Ces constatations étaient vraies autant pour les patients en soins intensifs que pour les patients hospitalisés dans les unités de soins standards de l'hôpital (14, 15).

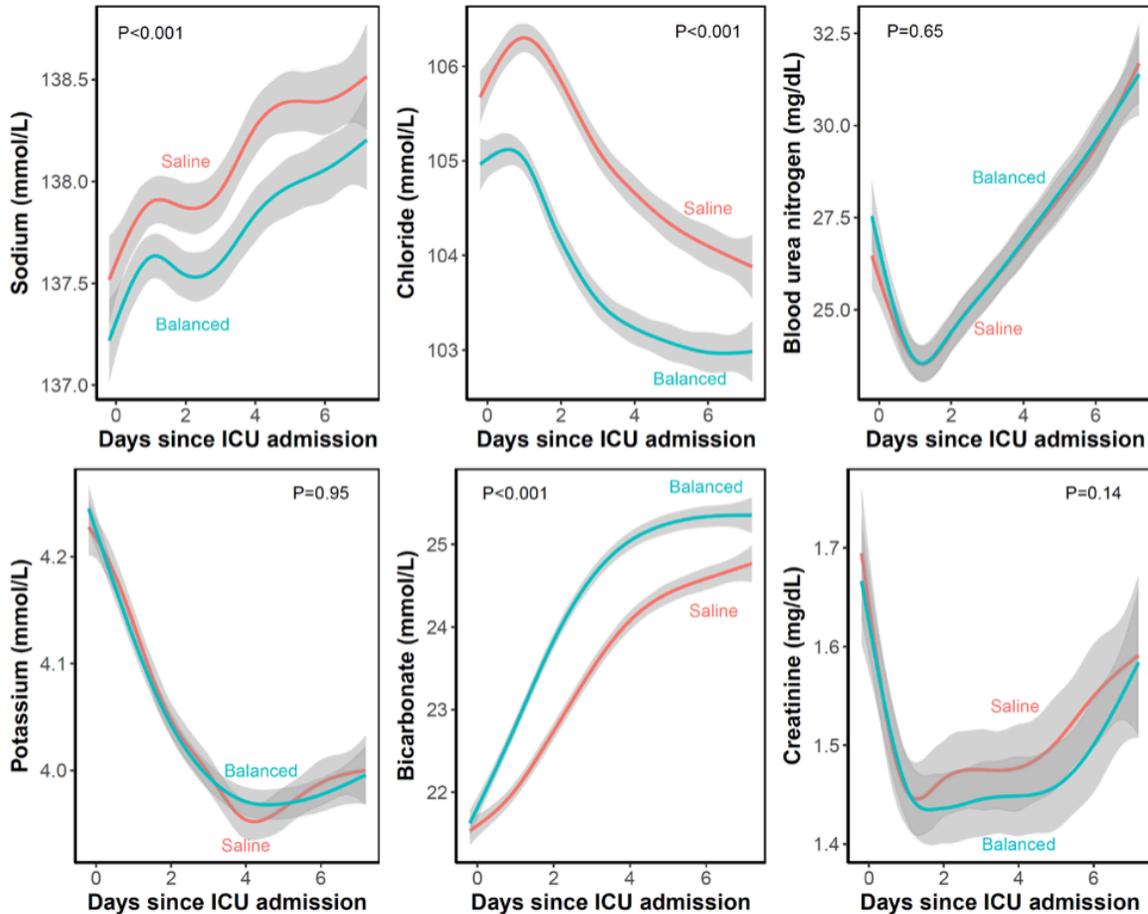


Figure 1. – Effets biochimiques des solutés sur les patients en soins intensifs.

En quelques jours après leur admission aux soins intensifs, les patients recevant uniquement du NS ont une augmentation de leur natrémie et de leur chlorémie ainsi qu'une diminution de leur bicarbonatémie par rapport aux patients recevant des solutés balancés. On observe aussi une légère augmentation de leur créatininémie, traduisant une baisse de leur fonction rénale. Tiré de Semler, Self (14). Reproduced with permission from New England Journal of Medicine, Copyright Massachusetts Medical Society.

Dans un contexte de soins intensifs, il y avait aussi une augmentation de 0,8% de la mortalité dans le groupe recevant le NS (14). Bien que ces chiffres puissent paraître minimes, ils deviennent significatifs lorsque l'on considère les 5 millions de patients admis dans toutes les unités de soins intensifs occidentales. Il est important de noter que la toxicité des solutés est

dose dépendante et variable selon la susceptibilité des patients exposés. Ainsi, les patients plus malades sont plus à risque de subir les effets toxiques d'un soluté donné. Les patients en soins intensifs, par exemple, qui reçoivent presque systématiquement des solutés en quantité importante, sont les plus vulnérables aux conséquences néfastes du NS.

L'inflammation

D'un point de vue biologique, l'inflammation est la réponse du système immunitaire inné suite à une insulte tissulaire (traumatique, thermique, infectieuse, ischémique ou chimique) visant à éliminer l'agent responsable et à restaurer l'homéostasie tissulaire. La réaction inflammatoire aiguë est caractérisée par une cascade d'évènements dont l'activation des macrophages résidents, le recrutement de neutrophiles et l'activation des cellules endothéliales. Ces cellules produisent des médiateurs chimiques, comme l'oxyde nitrique (NO), les prostaglandines et les leucotriènes, ayant comme rôle d'activer les plaquettes, qui elles-mêmes initient la cascade de la coagulation. Cela favorise l'hémostase en cas d'hémorragie concomitante à l'insulte tissulaire. Ces mêmes médiateurs causent une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire permettant aux leucocytes impliqués dans la réponse inflammatoire de migrer au site d'insulte tissulaire (16). Ces évènements sont méticuleusement coordonnés par la communication entre les cellules qui est permise par de petites molécules appelées cytokines et chimiokines (16, 17).

Les forces mises en œuvre dans l'inflammation aiguë, bien qu'elles soient localisées seulement au tissu atteint, ne sont pas ciblées spécifiquement contre l'agent offensant. Les cellules impliquées, notamment les neutrophiles, causent donc une certaine quantité de dommages tissulaires collatéraux en détruisant du tissu sain à proximité de l'insulte initiale. Or, la réaction inflammatoire est habituellement d'une courte durée et régulée par des mécanismes compensatoires, ce qui fait que les dommages collatéraux sont légers et limités, à moins qu'il y ait dérégulation de ces mécanismes et que l'inflammation ne devienne chronique (17).

La résolution de l'inflammation est tout aussi importante que son initiation, car non seulement elle prévient l'inflammation chronique dans le tissu, mais elle permet aussi le passage à la

phase de réparation tissulaire. Cette étape est permise par le renversement de la perméabilité capillaire, le drainage lymphatique de l'œdème et des leucocytes et la reprogrammation des macrophages à un phénotype anti-inflammatoire favorisant la phagocytose de débris cellulaires et de cellules apoptotiques. Dépendamment de la capacité de régénération des tissus, la phase de réparation peut prendre la forme d'une régénération tissulaire avec une architecture presque identique à l'état initial, ou d'une cicatrisation avec un remplacement du tissu lésé par des dépôts de collagène. Dans cette dernière situation, le tissu endommagé ne retrouve pas toute sa fonction initiale, le tissu lésé faisant place à la fibrose (16, 17).

Les patients en sepsis (infection systémique), sévèrement brûlés ou ayant subi un traumatisme ou une chirurgie lourde sont en état inflammatoire important et nécessitent une hospitalisation aux soins intensifs. Cependant, dans ces cas de réactions inflammatoires très sévères, la sur-activation des mécanismes de coagulation et de vasodilatation peut mener d'une part au syndrome de Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée (CIVD) résultant en de multiples micro thrombi dans l'ensemble de la circulation menant à des embolies disséminées, et d'autre part à un choc, c'est-à-dire à une hypoperfusion des organes secondaire à une chute de la tension artérielle (18). L'atteinte de plusieurs organes qui s'ensuit mène à une dysfonction multiviscérale (19). De plus, la réaction inflammatoire sévère de ces patients est souvent suivie d'une phase anti-inflammatoire due à l'épuisement du système immunitaire (20). Cette seconde phase, que l'on appelle aussi le *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome* (CARS), est associée à un épuisement immunitaire qui favorise l'apparition de complications telles que des infections sévères ou la réactivation d'infections latentes (Figure 2. –) (21). Ces complications infectieuses sont alors responsables d'une importante morbidité et mortalité (2, 19). La rapidité avec laquelle les patients retrouvent leur homéostasie inflammatoire, ou autrement dit, un état basal de fonctionnement normal, est cruciale à une évolution clinique adéquate. Ainsi, une compréhension optimale de l'impact inflammatoire

des stratégies thérapeutiques, dont le choix du soluté adéquat, est importante pour éviter une hyper-inflammation ou une amplification d'un état d'immunosuppression (15).

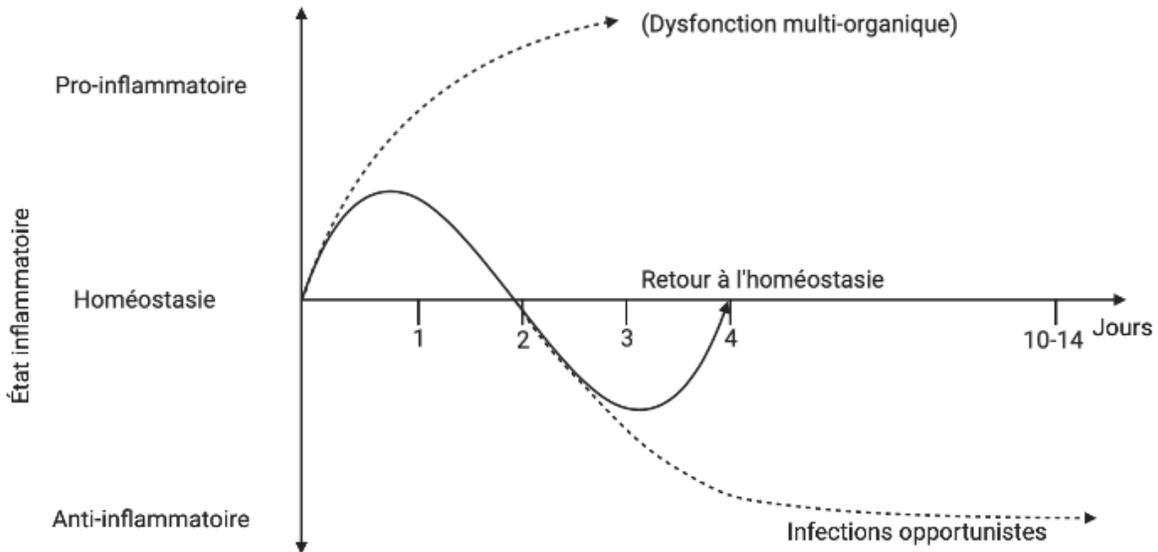


Figure 2. – Les syndromes de réponse pro-inflammatoire (SIRS) et de compensation anti-inflammatoire suite à une insulte inflammatoire sévère (CARS).

Les patients en état inflammatoire aigu passent parfois par une phase d'immunosuppression suivant la phase pro-inflammatoire précoce, surtout lorsque celle-ci est très sévère. Cette immunosuppression favorise alors l'apparition de complications infectieuses tardives. Adapté de Hotchkiss, Monneret (2), créé sur Biorender.com

La réaction inflammatoire aiguë

La réaction inflammatoire aiguë peut être initiée par une insulte tissulaire ou par la présence de microorganismes pathogènes. Des molécules présentant des motifs spécifiques aux pathogènes ou aux dommages cellulaires sont détectées par les cellules immunitaires résidentes permettant ainsi leur activation. D'une part, les microbes possèdent des Motifs Moléculaires associés aux Pathogènes (PAMPs), et d'autre part, le dommage cellulaire et tissulaire libère des molécules telles que l'adénosine triphosphate (ATP) ou l'ADN dont la fonction est de signaler au voisinage une insulte tissulaire. Ces molécules sont appelées Motifs Moléculaires associés au Dommage cellulaire (DAMPs), ou alarmines (17). Les cellules de l'immunité innée possèdent une panoplie de récepteurs spécialisés dans la reconnaissance de ces motifs moléculaires appelés les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

(PRR). Les PRR sont classés en trois grandes familles : les PRR d'endocytose (dont les *Scavenger Receptors* et les *C-type Lectin Receptors*), les PRR de signalisation (les *Toll-like Receptors (TLR)* et les *Nod-like Receptors (NLR)*) et les PRR solubles (17). La reconnaissance de motifs moléculaires par les PRR de signalisation déclenche des cascades de voies de signalisation intracellulaires telles que la voie *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB)* ou celle de l'inflammasome, qui vont activer les cellules en question et favoriser la production de cytokines et chimiokines responsables de la propagation et de l'amplification de l'inflammation (16). Par exemple, le *Tissue Necrosis Factor (TNF)-α* et l'Interleukine (IL)-1β, issus de ces deux voies de signalisation, activent les macrophages alors que l'IL-8 attire les neutrophiles. Ces leucocytes activés vont éliminer l'agent infectieux par la production de molécules comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou des protéases. La phagocytose est un autre moyen d'éliminer la cible, qui est efficace aussi en cas de dommage tissulaire. Les phagocytes activés entourent le pathogène à éliminer par fixation successive des PRR à leur cible. Ils peuvent alors internaliser la cellule à éliminer dans une vésicule géante appelée phagosome. Par fusion successive avec les lysosomes, le milieu du phagosome devient acide, favorisant ainsi l'activation de protéases et la production de molécules microbicides telles que les ROS, permettant une élimination complète de la cible. À cette étape, on parle de phagolysosome (17). Ces mécanismes ont pour but de contenir l'inflammation au niveau local et d'éviter son amplification.

Afin de minimiser les dégâts collatéraux causés par l'inflammation aiguë, plusieurs mécanismes assurent sa résolution. L'activation excessive des neutrophiles, pouvant contribuer aux dommages collatéraux, est évitée par leur durée de vie courte de 10 à 12h et par leur élimination par apoptose. Ce type de mort cellulaire programmé n'est pas associé à la libération de signal pro-inflammatoire et active un phénotype anti-inflammatoire des macrophages favorisant la clairance apoptotique et le nettoyage de la zone inflammatoire. La phagocytose des cellules immunitaires par les phagocytes est appelée efferocytose. Elle est associée à une réduction de l'inflammation, car elle stimule la production de cytokines anti-

inflammatoires telles que l'IL-10 et le *Tissue growth factor* (TGF)- β favorisant le passage à la phase de réparation tissulaire (17).

Neutrophiles

Les leucocytes polymorphonucléaires, ou granulocytes, dont font partie les neutrophiles, sont caractérisés par la présence de plusieurs types de granules dans leur cytoplasme. Les neutrophiles constituent en temps normal 60% des leucocytes circulants dans le sang périphérique, d'où leur importance primordiale dans l'immunité et dans le processus d'inflammation. Dans un état de base, la demi-vie des neutrophiles circulants est seulement de 6 à 8 heures, ce qui implique qu'ils subissent un renouvellement cellulaire massif avec une production de l'ordre de 10^{11} neutrophiles par jour (22). Les neutrophiles descendent des progéniteurs myéloïdes communs, c'est-à-dire de la lignée myéloïde de l'hématopoïèse (23).

Les neutrophiles matures possèdent quatre types de granules : les granules azurophiles (ou primaires), spécifiques (ou secondaires), à gélatinase (ou tertiaire) et les vésicules sécrétoires. Les granules azurophiles sont les premières à être formées et contiennent des hydrolases, des protéases et des protéines antibactériennes telles que la myéloperoxidase, qui leur confèrent le rôle d'élimination des microorganismes phagocytés. Les granules spécifiques ont également une fonction antimicrobienne et contiennent les éléments du système NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydase. Les granules à gélatinase contiennent des hautes concentrations de métalloprotéinases de la matrice (MMP) qui facilitent l'extravasation et le déplacement des neutrophiles dans le milieu extracellulaire, et contiennent aussi des molécules d'adhésion cellulaire (CD11b, CD66b). Elles sont plus promptement libérées de la cellule. Enfin, les vésicules sécrétoires contiennent sur leur membrane une grande quantité de récepteurs (notamment les récepteurs aux peptides bactériens formylés [fMLP] et CD16 [récepteur à Fc γ III] qui sont transloqués à la membrane cellulaire lors de l'exocytose permettant ainsi à la cellule inactive de commencer à interagir avec l'endothélium vasculaire et les autres leucocytes et de répondre aux signaux inflammatoires (22-26).

Lors d'une réaction inflammatoire, les neutrophiles sont les premiers à migrer massivement au site de l'insulte en réponse aux signaux moléculaires envoyés par les cellules résidentes des tissus affectés, comme les macrophages et les cellules dendritiques. Pour ce faire, les neutrophiles circulants passent par les processus successifs d'adhésion à l'endothélium et de diapédèse au niveau de la veinule post-capillaire. D'abord, pendant le roulement, ils s'accrochent de façon transitoire aux cellules endothéliales grâce aux interactions entre leur L- et P-selectines et leurs récepteurs respectifs. La L-selectine, ou CD62L, est exprimée constitutivement sur les neutrophiles à l'état basal, puis est rapidement perdue après leur activation dans le processus de transmigration endothéliale (23, 27). Par la suite, en réponse à la présence des chimiokines telles que l'IL-8 ou des fragments du complément, les intégrines constitutivement présentes à leur surface s'activent et permettent l'adhésion définitive aux ligands de l'endothélium. Puis, les neutrophiles quittent la circulation par diapédèse et se déplacent à travers l'espace extracellulaire où ils migrent selon le gradient de chimiokines vers le site de l'insulte (16, 23, 24).

Les neutrophiles sont aussi des phagocytes. Ils sont activés par des signaux exogènes comme les peptides bactériens Lipopolysaccharide (LPS) et fMLP ou par des cytokines endogènes telles que le TNF- α . Le phénotype activé du neutrophile se distingue par l'expression accrue des molécules d'adhésion cellulaire CD11b et CD66b ainsi que de la perte de l'expression basale de CD62L (25-27). Une fois activés, ils participent à la défense immunitaire non seulement par leur production de molécules cytotoxiques et microbicides, mais aussi en ingérant des microbes et en les détruisant dans le phagosome par la production de ROS grâce au système NADPH oxidase. Ce système converti l'oxygène (O_2) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est lui-même transformé par la myéloperoxidase en acide hypochlorique (HOCl), une molécule qui a un haut pouvoir antimicrobien (22-24).

Les neutrophiles ont aussi la capacité de produire des Neutrophil extracellular traps (NETs) dans une forme de mort cellulaire, la NETose. Il s'agit de structures composées de chromatine et de protéines antimicrobiennes provenant des granules, qui sont libérées suite à la

dégradation de la membrane cellulaire. Ces structures neutrophiliques emprisonnent et tuent les pathogènes dans un dernier effort de sacrifice cellulaire (22-24).

Monocytes et macrophages

Comme les neutrophiles, les monocytes et les macrophages sont des cellules phagocytaires de la lignée myéloïde. Les monocytes sont directement libérés de la moelle osseuse dans la circulation et, en cas de réaction inflammatoire, peuvent avoir un rôle dans l'immunité et l'inflammation systémique ou être recrutés dans les tissus périphériques où ils mûrissent en macrophages (23, 28-32). Les macrophages sont aussi présents à l'état d'homéostasie dans les tissus périphériques en tant que cellules résidentes où ils ont un rôle important dans la détection d'une invasion de microorganismes pathogènes ou d'une insulte tissulaire grâce à leurs PRRs (23, 30).

Les monocytes activés peuvent avoir différents rôles en fonction de leur phénotype que l'on distingue selon l'expression de CD14 et de CD16. Les monocytes classiques (CD14⁺CD16⁻) auraient un rôle principalement de phagocyte sans fonction pro- ou anti-inflammatoire, alors que les monocytes non-classiques (CD14^{low}CD16⁺) seraient plutôt impliqués dans la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1 β). Les monocytes intermédiaires (CD14⁺CD16⁺) seraient un sous-type peu présent dans la circulation, davantage apparentés aux monocytes classiques et aurait à la fois un rôle phagocytaire et de production de cytokines pro- et anti-inflammatoires (31, 33-35). Les monocytes activés expriment des marqueurs d'activation tels que le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type 2 *Human Leukocyte Antigen-DR Isotype* (HLA-DR) qui permet de présenter les antigènes aux lymphocytes T, les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 qui participent à amplifier le signal de stimulation lors du contact avec un lymphocyte T, et des molécules de co-inhibition telles que *Programmed Death-Ligand* (PD-L)1 (CD274) qui au contraire, inhibent l'activation des lymphocytes T afin de prévenir la sur-activation de la réponse immunitaire (29, 30, 36-38).

Les macrophages aussi peuvent être activés sous différents phénotypes selon les stimuli présents dans le micro-environnement. La présence de cytokines pro-inflammatoires comme

le TNF- α , l'Interféron (IFN)- γ , l'IL-2 ou de peptides bactériens comme le LPS induit le phénotype pro-inflammatoire M1. Les macrophages M1 ont une capacité de destruction des microorganismes pathogènes par phagocytose ainsi que par une production accrue d'enzymes lysosomales, de ROS et d'oxyde nitrique (NO) par l'enzyme *inducible Nitrous oxyde synthase* (iNOS). De plus, ils produisent des chimiokines qui attirent d'autres leucocytes au site inflammatoire et des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α qui propagent la réaction inflammatoire en activant ces leucocytes. Le phénotype M1 a donc globalement un effet pro-inflammatoire, microbicide et cytotoxique et est donc important lors de la phase aiguë d'une réaction inflammatoire (39-48).

Au contraire, le phénotype M2 est activé par des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10 ou le TGF- β . Les macrophages M2 produisent eux-mêmes des molécules anti-inflammatoires telles que l'IL-10, le TGF- β et l'arginase. Ils ont plutôt un rôle immunorégulateur, pro-fibrotique et angiogénique. Ils ont aussi une grande capacité de phagocytose, notamment pour les cellules immunitaires apoptotiques, que l'on appelle la clairance apoptotique. Cette clairance apoptotique produit des cytokines qui favorisent la résolution de la phase inflammatoire aiguë et l'initiation de la phase de réparation tissulaire (42-47, 49, 50).

Les cellules de l'immunité adaptative

Comme les macrophages, les cellules dendritiques (DC) sont des cellules présentatrice d'antigènes (CPA) et peuvent détecter les signaux de danger grâce à leurs PRR. Elles sont à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative grâce à leur grande capacité de présentation antigénique. En effet, après avoir phagocyté un pathogène, elles le digèrent en peptides antigéniques dans le phagolysosome, puis présentent ceux-ci à leur surface sur les CMH de type 2. Elles peuvent ensuite entrer en contact avec les lymphocytes T naïfs afin d'initier une réponse immunitaire adaptative contre le pathogène (23, 51). Les DC peuvent être d'origine myéloïde (DC myéloïdes ou conventionnelles) ou lymphoïde (DC plasmacytoïdes). Les DC myéloïdes (CD11c⁺) sont les plus communes et sont généralement résidentes dans les tissus périphériques d'où elles migrent vers les ganglions lymphatiques

après leur activation. En tant que CPA, elles sont efficaces pour capturer et présenter les antigènes étrangers au soi, mais elles sont également capables de produire une réponse inflammatoire via la sécrétion de cytokines telles que le TNF- α suite à la stimulation de leur PRR (52). Les DC plasmacytoïdes (CD11c⁻) sont plutôt situés dans le sang périphérique et dans les organes lymphoïdes, et se spécialisent dans la réponse antivirale avec la production d'IFN- α (28, 52, 53).

Le système immunitaire adaptatif est composé des lymphocytes T et B qui dirigent respectivement l'immunité cellulaire et humorale. Contrairement aux cellules de l'immunité innée, ces cellules possèdent respectivement à leur surface les récepteurs *T-cell receptor* (TCR) et *B-cell receptor* (BCR) qui ont la particularité d'être spécifiques à un seul antigène. Pour ce faire, lors de leur maturation, l'ADN codant pour ces récepteurs subi une recombinaison, ce qui permet d'obtenir une très grande diversité de TCR et de BCR, tous spécifiques à des antigènes différents. La réponse immunitaire adaptative est aussi caractérisée par une expansion clonale des lymphocytes activés, permettant, en plus de la réponse immédiate, d'établir une population lymphocytaire mémoire (16, 23, 51).

Les lymphocytes T se divisent en deux sous-types : les lymphocytes T CD4⁺, ou auxiliaires (*helper T-cell*, Th) et les lymphocytes T CD8⁺, ou cytotoxiques. Ils sont activés dans les ganglions lymphatiques lors de la reconnaissance, par leur TCR, d'un antigène présenté à la surface d'une CPA qui a migré depuis la zone d'infection. Ils sur-expriment alors des molécules d'activation telles que CD69, CD25 et plusieurs autres (16, 23, 51).

Les lymphocytes T auxiliaires ont un rôle indirect dans l'immunité adaptative en dirigeant la réponse immunitaire selon le type de pathogène à combattre. Les lymphocytes Th1 sont impliqués dans l'immunité cellulaire, soit la défense contre les pathogènes intracellulaires, comme les virus et certaines bactéries. Les lymphocytes Th2 dirigent l'immunité humorale contre les pathogènes extracellulaires comme les parasites, et sont aussi impliqués dans les réactions allergiques. Les lymphocytes Th17 ont un rôle dans l'inflammation tissulaire et promeuvent le recrutement de neutrophiles, mais sont aussi impliqués dans certaines pathologies auto-immunes. Plusieurs autres types de lymphocytes Th ont été décrits, dont les

T régulateurs (*Tregs*) qui sont immunosuppresseurs et participent aux mécanismes de tolérance immunitaire (16, 23, 51).

Les lymphocytes T cytotoxiques portent leur nom du fait de leur capacité de destruction des cellules somatiques infectées. Suite à la reconnaissance par leur TCR de l'antigène présenté à la surface de la cellule somatique via un CMH de type 1, ils peuvent induire la mort cellulaire par différentes stratégies. Les molécules cytotoxiques perforine et granzyme perforent la membrane de la cellule cible pour la détruire de l'intérieur alors que la molécule de surface Fas ligand déclenche la cascade apoptotique lorsqu'elle se lie à son récepteur Fas sur la cellule cible (16, 23, 51).

Les lymphocytes B sont caractérisés par la présence à leur surface de BCR qui sont en fait des immunoglobulines (Ig), ou anticorps. Après la reconnaissance d'un antigène spécifique au BCR et leur activation, ils deviennent des plasmocytes, qui sécrètent des Ig. Ces Ig participent à l'immunité humorale en opsonisant les pathogènes, ce qui facilite la phagocytose par les cellules phagocytaires et permet l'activation du complexe d'attaque membranaire du système du complément à leur surface (16, 23, 51).

Cytokines et chimiokines

Afin de bien coordonner tous les acteurs du système immunitaire dans la réponse inflammatoire, les cellules ont besoin d'un système de communication. Les cytokines et chimiokines jouent ce rôle en tant que molécules de communication intercellulaires. Les cytokines induisent des réponses dans leurs cellules cibles en favorisant certains phénotypes et la production d'autres cytokines. Les chimiokines permettent l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire, leur extravasation et le recrutement de cellules particulières au site d'inflammation par un système de gradient de concentration (23, 51). Différents profils de cytokines sont sécrétés par les cellules du système immunitaire en réponse à certains stimuli afin de monter une réponse appropriée à la situation. Par exemple, lors de l'invasion par un pathogène ou lors d'une insulte tissulaire, les cellules résidentes qui détectent la présence de PAMPs ou de DAMPs initient une réponse inflammatoire aiguë par la production

de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α , IL-1 β et IL-6 et des chimiokines telles que CXC-Chemokine ligand- (CXCL)-8 (IL-8), CC-Chemokine ligand-(CCL)-2 (*Monocyte Chemoattractant Protein* [MCP]-1) et CCL-3 (*Macrophage Inflammatory Protein* [MIP]-1 α) (53-56). Au contraire, à la fin de la phase aiguë de l'inflammation, un changement de profil cytokinique permet la résolution de l'inflammation et la transition vers la phase de réparation tissulaire. Ces cytokines ont des effets anti-inflammatoires comme IL-10 et pro-fibrotique/angiogéniques comme TGF- β , b-FGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) (57-61).

Le sodium comme activateur inflammatoire

Le sodium et le sel de table (NaCl) ont fait l'objet de beaucoup de recherche dans le domaine médical, notamment pour leurs effets néfastes à hautes doses sur le système cardiovasculaire. Par ailleurs, le sodium est de plus en plus étudié pour ces effets pro-inflammatoires sur les cellules du système immunitaire.

Chez la souris, les concentrations élevées de NaCl potentialisent l'activation M1 des macrophages stimulés au LPS via l'induction de gènes comme *iNOS* et inhibe la polarisation M2 anti-inflammatoire induite par IL-4 (41, 50). De plus, il a aussi été démontré qu'il y a une augmentation de la concentration de sodium au site infectieux lors d'une infection cutanée, ce qui accentue l'activation M1 des macrophages et améliore la réponse antimicrobienne dans un modèle murin (62). Les macrophages résidents agissent aussi comme senseurs osmotiques et, suite à un stress hyperosmolaire par augmentation de la concentration tissulaire de NaCl, déclenchent une réponse inflammatoire induite par la voie de l'inflammasome via le PRR intracellulaire NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) et la production d'IL-1 β (40). Moins de données sont disponibles à ce sujet chez l'humain, mais il a néanmoins été démontré que les macrophages humains exposés à des concentrations élevées de NaCl prennent un phénotype particulier M(Na) caractérisé par une augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires dont *IL1B* et *IL8* et l'augmentation de la production des chimiokines comme IL-8 ainsi que la diminution de l'expression des gènes anti-inflammatoires *TREM2* et *MRC1* codant pour des récepteurs à endocytose. De plus, comme chez la souris, les

concentrations élevées de NaCl potentialisent l'activation M1 des macrophages stimulés au LPS (Figure 3. –) (41). Une augmentation de l'apport de sel dans la diète a été reliée à une augmentation de la population de monocytes circulants ainsi qu'à une augmentation de leur production des cytokines inflammatoires IL-6 et IL-23 et une diminution de leur production de la cytokine immunosuppressive IL-10 (63). Il a aussi été démontré que l'augmentation de l'apport sodé dans la diète était liée à une expansion du sous-type de monocytes intermédiaires et une production intracellulaire de ROS par les monocytes (64).

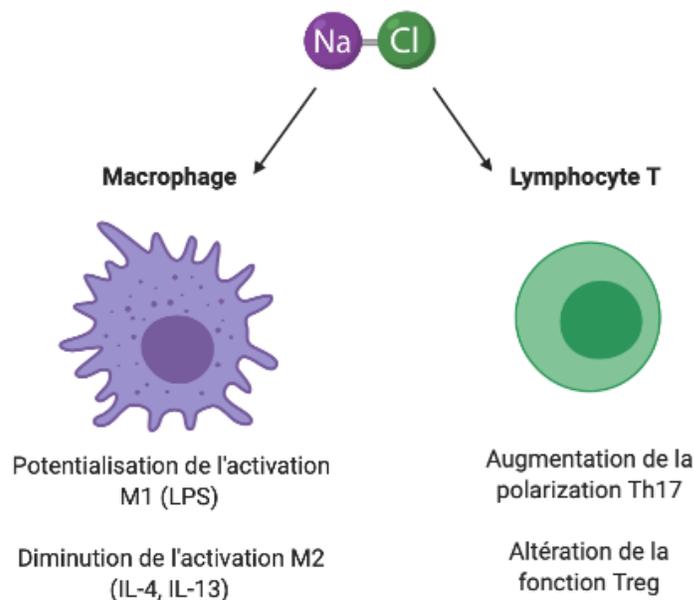


Figure 3. – Les effets du NaCl sur les cellules immunitaires.

Chez les macrophages, les hautes concentrations de NaCl causent un phénotype pro-inflammatoire M(Na) en plus d'accroître l'activation par le LPS. De plus, le NaCl favorise la polarisation Th17 pro-inflammatoire des lymphocytes T et diminue leur polarisation Treg anti-inflammatoire. Adapté de Rucker, Rudemiller (1), créé sur Biorender.com

Les concentrations de sodium auraient aussi un effet sur le phénotype des lymphocytes T. En effet, de hautes concentrations de Na⁺ dans le milieu de culture induisent l'enzyme SGK (*Serum and Glucocorticoid-Regulated Kinase*)-1 sensible au sodium qui régule l'expression du récepteur IL-23R chez les lymphocytes T naïfs, ce qui oriente leur polarisation vers le phénotype Th17 pro-inflammatoire (65). *In vivo*, dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (le modèle murin de la sclérose en plaques) cette augmentation

de lymphocytes Th17 peut être causée par une diète riche en sel et se reflète chez la souris par une exacerbation du phénotype (66). De plus, les concentrations augmentées de NaCl, encore via SGK-1, interfèrent avec le rôle immunosuppresseur des lymphocytes T régulateurs tant dans un modèle murin *in vivo* que dans un modèle humain *in vitro* (67). Par ailleurs, l'enzyme SGK-1 a comme effet de retarder la résolution de l'inflammation via un rôle important dans la survie des neutrophiles, retardant ainsi leur clairance du site d'inflammation (68).

Enfin, des variations minimales de la concentration plasmatique de sodium auraient aussi un effet sur l'endothélium vasculaire. En aussi peu que 30 minutes, une augmentation du sodium plasmatique de 2-3 mM rigidifie le cortex endothélial et diminue la production d'oxyde nitrique par les cellules endothéliales ce qui participe à leur dysfonction. Une augmentation plus marquée de la concentration de sodium active les cellules endothéliales et augmente leur production de TNF- α et d'IL-1 β après seulement 24h. Des hautes concentrations de sodium peuvent même endommager et diminuer la couche de glycocalyx tapissant l'endothélium, une membrane de glycoprotéines chargée négativement qui agit comme une barrière diminuant les interactions entre les cellules circulantes et l'endothélium. Il est cependant incertain si cet effet est secondaire à une dégradation accrue du glycocalyx, à une diminution de sa régénération ou aux deux. Cela, en plus de l'activation endothéliale qui induit l'expression de molécules d'adhésion cellulaire sur l'endothélium, favorise l'adhésion des monocytes à la paroi vasculaire (69). En somme, les concentrations élevées de sodium plasmatique créées des conditions idéales au développement et à la perpétuation de processus inflammatoires.

Nous avançons donc l'hypothèse que les solutés cristalloïdes ont des effets inflammatoires différents dus à leur composition biochimique différente et que le LR et le PL ont un effet immuno-activateur moindre que le NS sur les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et les neutrophiles. Nos objectifs sont d'évaluer, dans un premier temps, l'effet immuno-modulateur des solutés sur des sujets sains, puis d'évaluer l'effet immuno-modulateur des solutés dans un modèle d'inflammation aiguë.

Chapitre 2 – Matériels et méthodes

Schéma de l'étude

Les sujets sains recrutés pour cette étude sont des individus majeurs sans pathologie ni traitement connus tel que déterminé par un entretien médical, la lecture et la signature du formulaire de consentement établi par l'équipe de recherche et validé par le Comité d'Éthique de Recherche du CHUM (CÉR CHUM). Chaque individu recruté recevra au total 3 infusions par voie IV d'un litre de chacun des solutés cristalloïdes (NS, LR et PL) sur 15 minutes. Ces trois infusions seront espacées d'au minimum 2 semaines afin d'assurer l'élimination complète du soluté précédent. L'ordre des solutés à administrer pour chaque sujet sain est déterminé par randomisation en respectant un design expérimental de type chassé-croisé. Des prélèvements de sang sont effectués directement avant et 6 heures après l'infusion de soluté. Ces prélèvements de sang serviront à toutes les expériences menées par la suite sur sang total, cellules isolées ou plasma, à l'évaluation de l'impact des solutés sur le phénotype leucocytaire et sur l'état inflammatoire, mais aussi à la réalisation d'analyses biochimiques réalisées par les laboratoires regroupés du CHUM.

Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins sont effectués par l'équipe de soins infirmiers du CHUM. 50 ml de sang veineux sont prélevés dans 5 tubes Vacutainer K2 EDTA 10 ml (BD Biosciences, États-Unis). Les tubes sont inversés 10 fois afin de bien distribuer l'anti-coagulant du tube et conservés sur glace jusqu'à leur utilisation. Des prélèvements sont aussi effectués dans un tube Vacutainer SST II Advance 5 ml (BD Biosciences) et dans une seringue héparinée Preset 1ml (BD Biosciences) et envoyés aux laboratoires regroupés du CHUM pour des analyses biochimiques et de gaz sanguins veineux (Tableau 2. – , annexe 2).

Isolation des neutrophiles et des PBMC

Pour la mise en banque des échantillons, les prélèvements sanguins sont transférés dans des tubes Falcon (Sarstedt, Allemagne) à fond conique de 50ml et centrifugé à 260g sans frein pendant 15 minutes à température ambiante, afin de séparer le plasma des éléments figurés du sang. Trois ml de plasma sont mis en banque et stockés à -80 °C pour des analyses ultérieures. Afin de générer le sérum autologue, le reste du plasma est défibriné et décomplémenté par une incubation d'une heure à 37°C avec une solution de CaCl₂ à 22 µM dans une bouteille en verre stérile. Le culot issu de la première centrifugation, constitué des d'éléments figurés du sang est re-suspendu dans une solution de Dextran 3% (Tableau 13. – , annexe 3) (MP Biomedicals, États-Unis) pour un ratio 1:1. Le tout est bien homogénéisé en inversant précautionneusement les tubes 10 fois. Pour permettre la sédimentation des érythrocytes, les tubes sont laissés au repos pendant 30 min à température ambiante. La phase supérieure pauvre en érythrocytes est ensuite transférée dans de nouveaux tubes Falcon 50 ml et diluée avec du Phosphate Buffered Saline (PBS) jusqu'à l'obtention d'un volume total de 30 ml par tube. 13 ml de Lymphocyte Separation Medium (Wisent, Canada) sont déposés soigneusement sous la suspension cellulaire. Une centrifugation à 400 g, sans frein, à température ambiante est alors effectuée pendant 20 minutes afin de séparer les granulocytes des PBMC par gradient de densité. Le surnageant est alors jeté et l'anneau de PBMC transféré dans un autre tube Falcon 50 ml. Afin d'éliminer les érythrocytes du culot de neutrophiles issus de l'étape de Dextran, une lyse osmotique est effectuée sur ce dernier par suspension dans 20 ml d'eau distillée stérile (Baxter, Canada) pendant exactement 20 secondes. L'arrêt de la lyse se fait par ajout de 20 ml de PBS 2X. Les neutrophiles et les PBMC sont lavés 2 fois avec 50 ml de PBS et centrifugés 10 min, 400g, à température ambiante, puis les PBMC sont congelés dans une solution de congélation contenant du fetal bovine serum (FBS) (Wisent) et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Bioshop, Canada) à une concentration de 10 millions de cellules par ml. Les granulocytes sont ensuite re-suspendus à 2 millions de cellules par ml dans du milieu de culture Roswell Park Memorial Institute (RPMI) contenant 10% de sérum autologue et 1% d'antibiotiques Pénicilline/Streptomycine.

Cytométrie en flux

Étapes communes de la préparation des cellules pour la cytométrie en flux

Les étapes suivantes sont communes à toutes les préparations de cellules pour la cytométrie en flux. Les différents culots sont suspendus dans 500 µL de *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) Buffer (FB) (Tableau 14. – annexe 3) et centrifugés 5 min à 400 g (cette étape est appelée le lavage). Les cellules sont re-suspendues dans 50 µL de solution de blocage (*Human blocking*, BD Pharmingen, États-Unis) diluée dans le PBS à 10 µg/ml, et incubées 10 min sur glace. Les Ac des différents panels étudiés (Tableau 3. – -Tableau 10. – , annexe 2) dilués dans du FB sont ajoutés et incubés pendant 20 min dans l'obscurité et sur glace. Pour les Ac ciblant des molécules intracellulaires, des étapes supplémentaires sont nécessaires pour permettre la perméabilisation membranaire selon les recommandations du fabricant (Fix/Perm FoxP3 buffer kit; eBioscience, États-Unis). Les cellules sont incubées 30 minutes à l'obscurité à sur glace avec les Ac intracellulaires, lavées et finalement caractérisées à l'aide du cytomètre de flux (BD LSRFortessa, États-Unis).

Analyse du phénotype des neutrophiles par cytométrie en flux

Pour l'analyse phénotypique des neutrophiles, 1 million de granulocytes isolés ou 500 µl de sang total lysé par une solution d'Ammonium Chloride Potassium (ACK) sont préparés pour la cytométrie en flux tel que décrit ci-dessus. Les anticorps utilisés pour analyser le phénotype des neutrophiles et leur dilution sont présentés dans le Tableau 3. – en annexe 2. Afin d'analyser les variations d'expression des marqueurs d'activation, les valeurs d'intensité de fluorescence moyennes (MFI) calculées par le logiciel sont récupérées. Les résultats sont présentés sous forme de ratio post/pré-infusion de soluté pour chaque individu tel que décrit dans la littérature (70).

Analyse du phénotype des PBMCs par cytométrie en flux

Lorsque le sujet a reçu les trois solutés, les PBMCs congelés avant et après chaque infusion sont décongelés et marqués avec 6 panels d'Ac différents, numérotés de 1 à 6, afin d'analyser le phénotype des diverses populations de PBMC. Les détails des 6 panels sont présentés en annexe 2 (Tableau 4. – -Tableau 10. –). Avant le marquage du panel 3, les cellules sont mises en culture dans du milieu R10 (Tableau 13. – , annexe 3) et stimulés pendant 16h avec un cocktail activateur de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/ionomycine (Sigma, Canada), pour la production de cytokines, et de Brefeldine A (Sigma), un inhibiteur du transport entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, pour bloquer la sécrétion de ces cytokines. Ces cytokines confinées dans les cellules peuvent ainsi être marquées et analysées. Tout comme pour les neutrophiles, les variations des populations cellulaires parmi les PMBC totaux sont présentées sous forme de rapport post/pré-infusion de soluté pour chaque individu.

Tests fonctionnels des neutrophiles

Les neutrophiles ont pour principale fonction l'élimination des microorganismes extracellulaires par phagocytose et sont d'importants producteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Mesure de la production de ROS : Pour mesurer la production de ROS, 1µl d'une solution de dihydrorhodamine (DHR) (Sigma) est ensuite ajoutée aux neutrophiles en suspension (2 millions cellules/mL) pour une concentration finale de 100 µM pendant 15 min à 37 °C. Les conditions Lipopolysaccharide (LPS) (Sigma) 1µg/ml et PMA 200 nM nous servent alors de contrôles positifs. Le DHR diffuse alors dans les cellules et est oxydé en un dérivé fluorescent, la rhodamine 123, par les ROS. Le signal fluorescent mesurable par cytométrie en flux sera donc proportionnel à la quantité de ROS produits par les neutrophiles.

Mesure du potentiel de phagocytose : 100 µl de billes fluorescentes *Latex beads, carboxylate-modified polystyrene, fluorescent yellow-green* (Sigma) dilués 1 : 90 dans le même milieu de culture est ajouté à aux neutrophiles en suspension (2 millions cellules/mL). Les billes fluorescentes peuvent être phagocytées par les neutrophiles leur donnant un degré de

fluorescence proportionnel à la quantité de billes ingérées. Les mêmes conditions LPS et PMA nous servent alors de contrôles positifs. Pour ce test, deux plaques en parallèle (4°C vs 37°C, contrôle d'attachement des billes aux cellules), contenant les mêmes conditions, sont alors mises à incuber 30min.

Les protocoles utilisés pour ces deux tests sont basés sur des méthodes décrites dans la littérature scientifique (71-76). Suite aux étapes décrites ci-dessus, les cellules sont transférées dans des tubes de FACS, lavées au FB avant d'être re-suspendues et caractérisées au cytomètre en flux.

Dosage de protéines par Multiplex

Principes généraux

Les tests Multiplex permettent de mesurer la concentration de plusieurs protéines à la fois dans un même échantillon. Brièvement, chaque puits des plaques de 96 puits préparés par MSD (Mesoscale Diagnostics, LLC, États-Unis) contient plusieurs Ac de capture spécifique des protéines d'intérêt. Lorsque les échantillons sont mis dans les puits, les protéines d'intérêt vont s'attacher à leur Ac spécifiques et y être « piégées ». La détection se fait par ajout des Ac de détection qui sont aussi spécifiques des protéines d'intérêt, conjugués à une molécule électro-chimiluminescente (Figure 4. –). L'appareil Meso Quickplex SQ 120 (Mesoscale Diagnostics), en passant un courant électrique à travers la circuiterie disposée sous la plaque, peut ainsi mesurer les signaux lumineux émis dans chaque puits et correspondant à chacune des protéines d'intérêt. À l'aide d'une échelle de standards contenant des concentrations connues de chaque protéine, l'instrument convertit ces signaux lumineux en concentrations.

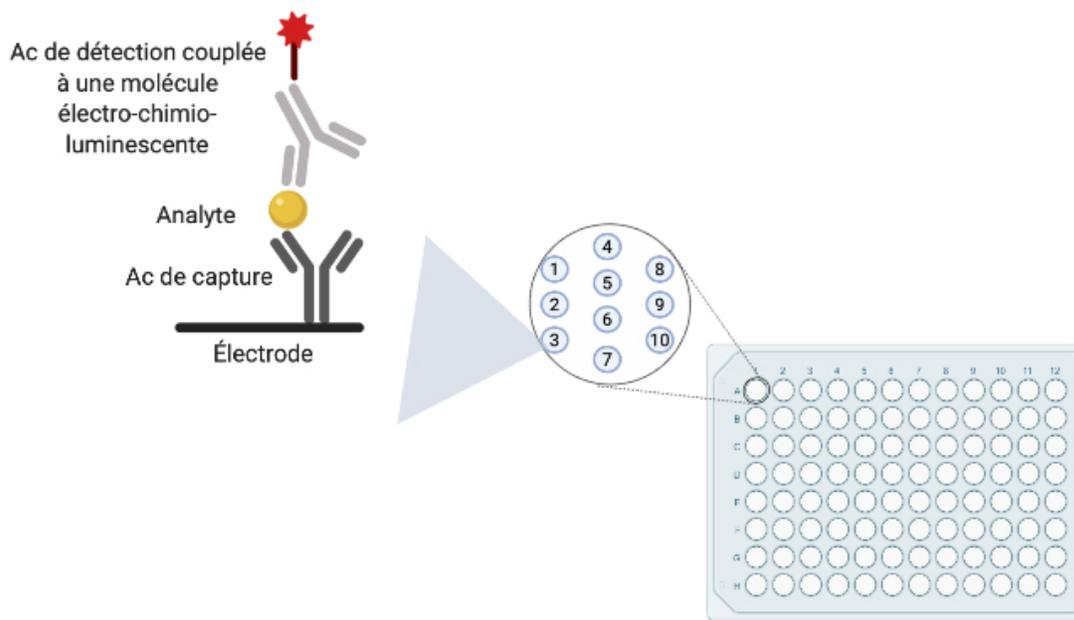


Figure 4. – Principe de fonctionnement du Multiplex.

Les protéines d'intérêt sont fixées au fond des puits par des anticorps de capture, puis détectés dans l'appareil après l'ajout d'un anticorps conjugué à une molécule électro-chimio-luminescente activée par un courant électrique qui passe dans la plaque. Adapté de Mesoscale Discovery[®], créé sur Biorender.com

Dosage de cytokines plasmatiques

Au moment de leur utilisation, les échantillons de plasma sont décongelés et analysés selon les recommandations du fabricant (V-PLEX Human Biomarker 40-Plex Kit, Mesoscale Diagnostics). La liste complète des cytokines détectables dans ce kit se trouve dans le Tableau 11. – en annexe 2.

Tests *ex vivo* sur sang total

À partir des prélèvements sanguins pré-solutés des sujets sains, des échantillons de 500 µl de sang total sont mis dans des tubes Falcon de 15ml et incubés 1h à 37 °C dans les conditions suivantes : 1 tube sans stimulation, 4 tubes stimulés au LPS 1µg/ml et 1 tube stimulé à la PMA 200 nM. Après 1h, 125 µl de chaque soluté (LR, PL ou NS) sont ajoutés à 3 des 4 tubes stimulés au LPS et le 5^e est laissé tel quel à titre de contrôle. Les tubes sont remis à incuber 4h à 37 °C. Les tubes sont ensuite mis sur glace pour freiner la stimulation. Deux lyses des érythrocytes sont effectuées par incubation avec 10 ml d'ACK pendant 5min à 4°C sous agitation, suivi d'une

centrifugation à 420 g, 4 °C, 5 min. Le surnageant est éliminé. Les culots de leucocytes sont re-suspendus, lavé dans le FB et prêts pour le marquage de cytométrie de flux. Les panels utilisés sont le panel 1 (Tableau 4. – , annexe 2), 5 (Tableau 8. – , annexe 2) ou 5.2 (Tableau 9. – , annexe 2). Lorsque le panel 5.2 est utilisé, la Brefeldine A à 2,5 µg/ml est ajouté à chaque échantillon avant les stimulations initiales afin d’empêcher la sécrétion de TNF- α et ainsi de faciliter sa mesure.

Analyses statistiques

Dans le volet de sujet sains de l’étude, les analyses statistiques sont des ANOVA univariés suivis de tests des étendues de Tukey lorsque les ANOVA révèlent la présence de différences significatives entre les 3 groupes (LR, PL et NS). Dans le volet *ex vivo* sur sang total, les analyses statistiques *post hoc* consistent en des tests de comparaison multiples de Dunnett avec comme la condition contrôle « LPS seul » comme point de comparaison. Dans tous les cas, les analyses sont réalisées à l’aide du logiciel GraphPad et le seuil de significativité est considéré à $\alpha = 0,05$.

Chapitre 3 – Résultats

Caractérisation du phénotype des neutrophiles activés

Afin de mettre en place un panel de cytométrie en flux pouvant identifier l'état d'activation des neutrophiles, un test a été fait sur des neutrophiles *ex vivo* en sang total soumis à différentes conditions de stimulation pendant 1h (sans stimulation, LPS 1-10 µg/ml, PMA 20-200 nM, TNF-α 50-100 ng/ml) (Figure 5. –). Nous avons constaté que le LPS et la PMA causent une augmentation de l'expression de surface de CD11b et une augmentation plus discrète de CD66b. Ces stimulations induisent également une diminution marquée de CD62L. De plus, ces stimulations ont un effet dose-réponse sur l'expression de ces marqueurs, démontrant le degré d'activation variable des neutrophiles. L'expression de HLA-DR, bien qu'il ait été décrit comme marqueur d'activation neutrophilique dans certaines conditions (77), n'est augmentée que par la stimulation à la PMA. Nous avons donc choisi les marqueurs CD11b et CD62L pour caractériser l'activation des neutrophiles.

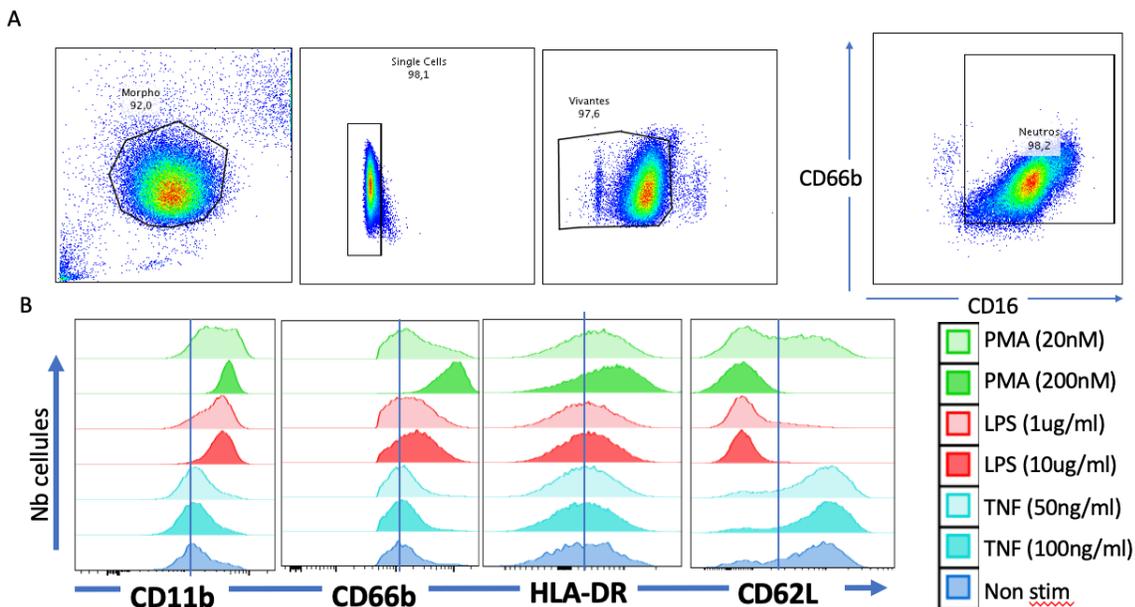


Figure 5. – Test d'activation des neutrophiles et effets sur les phénotypes de surface.

A) Stratégie de gating : Après isolation des granulocytes au Dextran, ceux-ci sont lus par le cytomètre de flux; les débris morphologiques, les doublets et les cellules mortes sont éliminées avant que les neutrophiles soient sélectionnés avec les marqueurs CD66b et CD16.

B) Histogrammes des marqueurs d'activation: Après une exposition de 1h à deux concentrations de différents stimuli, la variation d'expression des marqueurs d'activation est analysée par cytométrie en flux. L'augmentation de CD11b et la diminution de CD62L marquent une activation des neutrophiles.

Effets des solutés sur les neutrophiles de sujets sains

Phénotype de surface

Les analyses de cytométrie en flux faites sur les neutrophiles isolés avant et après l'infusion de solutés semblent montrer une diminution de l'expression de CD11b après le LR et le PL (rapports des MFI post/pré de 0,82 et 0,84) et une variation minimale de l'expression après le NS (rapport des MFI post/pré de 0,95) ($p[ANOVA]>0,05$) (Figure 6. –). L'expression de CD66b est également diminuée après l'administration des solutés, mais de façon équivalente entre les trois groupes. L'expression de CD62L est plutôt stable après le LR (ratio=0,92), diminuée après le NS (ratio=0,74) et augmentée après le PL (ratio=1,18) (Figure 6. –). L'expression des marqueurs d'activation CD11b et CD62L pré-soluté et post soluté est présentée à la Figure 14. – en annexe 2. Enfin, l'expression de HLA-DR demeure stable après chaque soluté. En somme, les variations

d'expression de CD11b et de CD62L indiquent une possible diminution de l'activation neutrophilique suite à l'infusion par le LR et surtout le PL et une activation stable, voire augmentée par le NS. Néanmoins, aucune de ces différences n'est statistiquement significative.

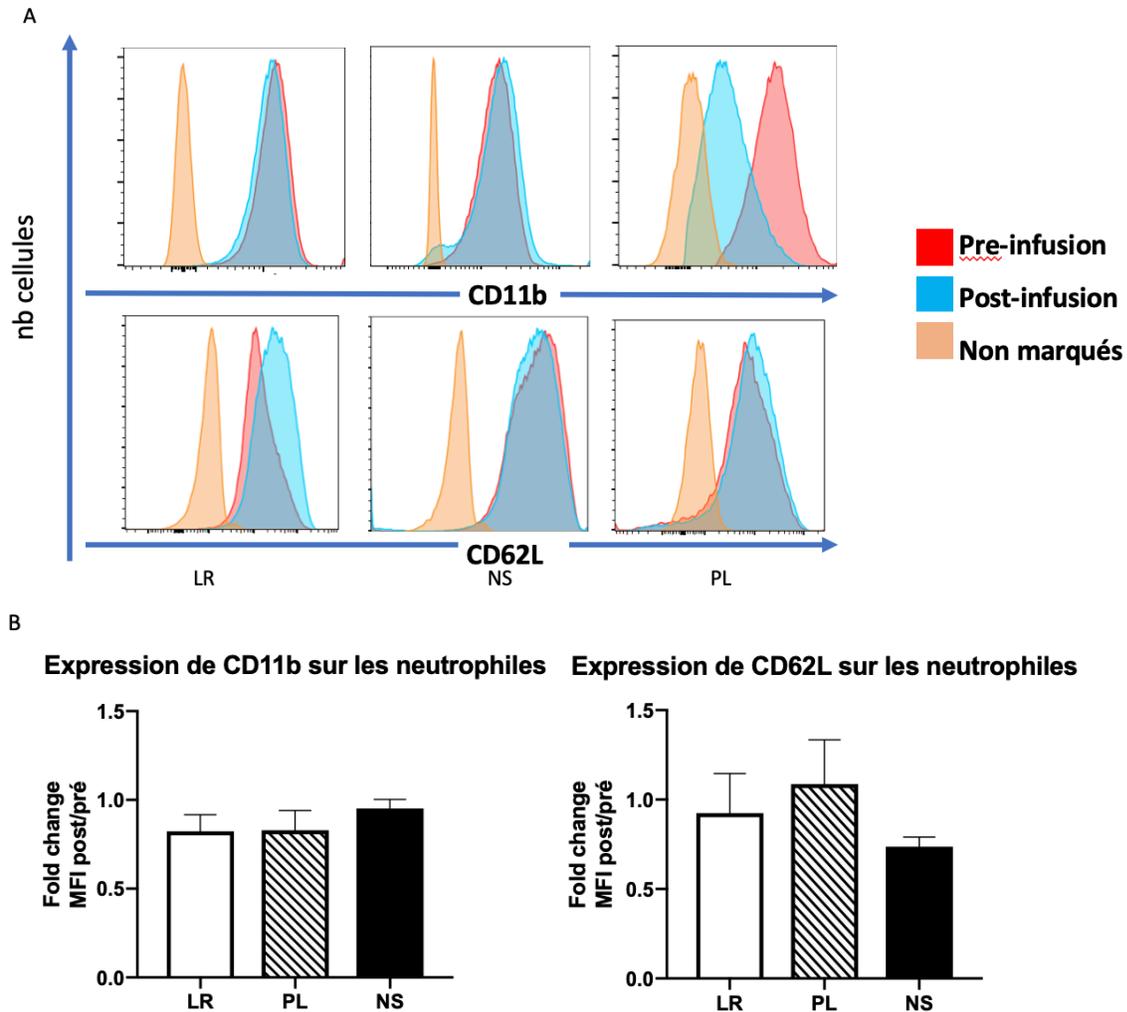


Figure 6. – Effet des solutés sur le phénotype de surface des neutrophiles de sujets sains.

A) Exemple d'expression des marqueurs d'activation avant et après chaque soluté pour un sujet sain. Chez ce sujet sain, on constate une légère diminution de l'expression de CD11b et une augmentation de l'expression de CD62L sur les neutrophiles après le LR et le PL. Ce phénotype concorde avec un état moins activé des neutrophiles.

B) Quantification de l'activation des neutrophiles par les solutés. Le LR (n=8) et le PL (n=7) semblent diminuer l'expression de CD11b par rapport au NS (MFI post/pré de 0,82 et 0,84; $p[ANOVA]>0,05$) alors que le NS (n=8) semble diminuer l'expression de CD62L (MFI post/pré = 0,74; $p[ANOVA]>0,05$) par rapport au LR et au PL.

Fonctions neutrophiliques

Nous avons, à ce jour, recueilli peu de données par rapport à l'analyse fonctionnelle des neutrophiles. Les stimulations au LPS et à la PMA augmentent la production de ROS et la phagocytose, confirmant l'efficacité des contrôles. Cependant, il y a trop de variabilité et les échantillons sont trop petits pour observer des variations entre les différents groupes avec solutés.

Effets des solutés sur le phénotype des PBMCs de sujets sains

Monocytes

L'analyse du phénotype des cellules mononucléées du sang périphérique par cytométrie en flux avec le panel 5 (Tableau 8. – , Annexe 2), nous révèle que la proportion des cellules CD11c⁺ parmi les PBMCs vivantes augmente de façon statistiquement significative suite à l'infusion du NS ($\Delta=+1,32\%$) par rapport au LR et tend à faire de même suite au PL ($\Delta_{LR}=-1,73\%$; $\Delta_{PL}=-2,82\%$; $p[\text{ANOVA}]=0,04$; $p[\text{Tukey}]_{\Delta_{LR-NS}}=0,006$) (Figure 7. –). Ces cellules CD11c⁺ sont constituées de monocytes à environ 90%. Nous avons constaté les mêmes différences dans les sous-types de monocytes classiques (CD14⁺CD16⁻), qui constituent la grande majorité des monocytes ($\Delta_{NS}=+0,93\%$; $\Delta_{LR}=-1,87\%$; $\Delta_{PL}=-2,58\%$; $p[\text{ANOVA}]=0,02$; $p[\text{Tukey}]_{\Delta_{LR-NS}}=0,03$) (Figure 7. –), et aucune différence entre les différents solutés pour les monocytes intermédiaires (CD14⁺CD16⁺) et non-classiques (CD14^{low}CD16⁺). Cependant, aucune différence n'a pu être observée quant à l'expression des différents marqueurs d'activation (CD274, CD66b) ou des molécules de co-stimulation (CD80, CD86). Les proportions de monocytes totaux et classiques pré-soluté et post-soluté sont présentées à la Figure 15. – en annexe 1.

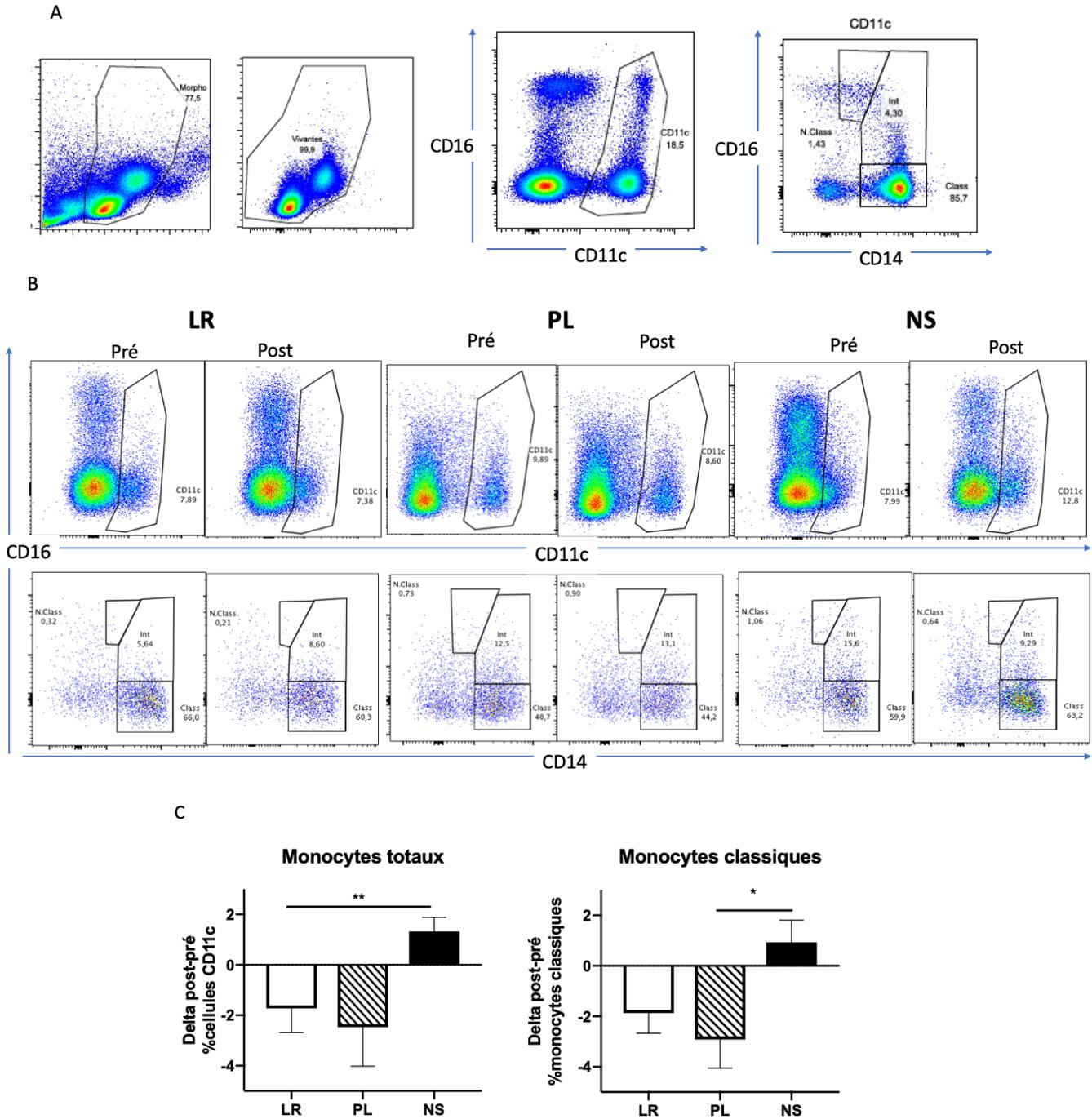


Figure 7. – Effets des solutés sur les populations de monocytes chez les sujets sains

A) Stratégie de gating. Après isolation des PBMC au ficoll, ceux-ci sont lus par le cytomètre de flux; les débris morphologiques, les doublets et les cellules mortes sont éliminées avant que les monocytes soient sélectionnés avec le marqueur CD11c puis caractérisés avec les marqueurs CD14 et CD16.

B) Exemple des variations des populations monocytaires chez un sujet sain. Chez ce sujet sain, on constate une légère diminution des monocytes totaux et du sous type classique après le LR et le PL et une augmentation après le NS.

C) Quantification des populations de monocytes. Le NS (+1,33%) augmente significativement les monocytes totaux par rapport au LR (-1,73%; $p[\text{Tukey}]=0,006$) et tend à avoir le même effet par rapport au PL (-2,47%; $p[\text{Tukey}]>0,05$). La même observation est vraie chez le sous-type de monocytes classiques ($\Delta\text{NS}=+0,93\%$; $\Delta\text{LR}=-1,87\%$; $\Delta\text{PL}=-2,58\%$, $p[\text{Tukey}]_{\Delta\text{LR-NS}}=0,03$)

Cellules dendritiques

Le panel 4 (Tableau 7. – , annexe 2) de cytométrie en flux permet d'analyser les différentes populations des cellules immunitaires composant les PBMCs. Des variations similaires entre les trois solutés ont été observées pour les populations de DC totales (CD14⁺HLA-DR⁺). Cependant, en divisant cette population entre les DC de lignée myéloïde (CD11c⁺) et non-myéloïde (CD11c⁻), nous avons constaté une augmentation de la proportion de DC myéloïdes par le NS ($\Delta\text{NS}=+0,79\%$) alors que les deux autres solutés semblent diminuer cette population ($\Delta\text{LR}=-0,31\%$; $\Delta\text{PL}=-0,29\%$; $p[\text{ANOVA}]>0,05$) (Figure 8. –). Toutefois, aucune de ces différences n'est statistiquement significative. Les proportions de DC myéloïdes pré-soluté et post-soluté sont présentées à la Figure 16. – en annexe 1.

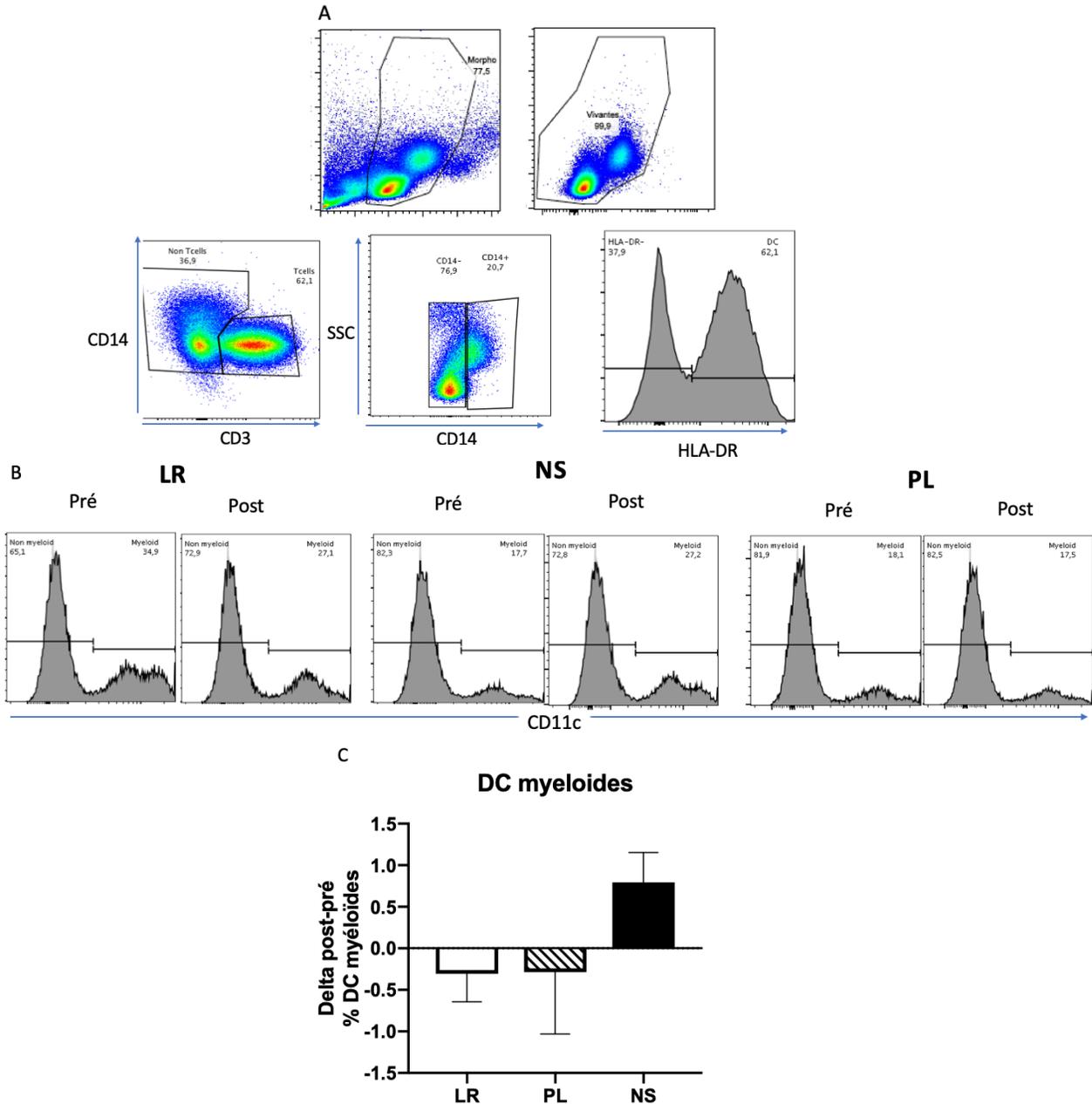


Figure 8. — Effet des solutés sur les populations de cellules dendritiques des sujets sains.

A) Stratégie de gating. Après isolation des PBMC au ficoll, ceux-ci sont lus par le cytomètre de flux ; les débris morphologiques, les doublets et les cellules mortes sont d’abord éliminées. Les lymphocytes T sont exclus par le marqueur CD3, puis les monocytes sont exclus par le marqueur CD14.

B) Les DC sont ensuite sélectionnées par l’expression de HLA-DR. Les DC sont divisées en myéloïdes et non-myéloïdes par leur expression de CD11c. Chez ce sujet sain, on remarque une diminution des DC myéloïdes après le PL et le LR et une augmentation après le NS.

C) Quantification des cellules dendritiques myéloïdes: Le NS (+0,79%) semble augmenter les DC myéloïdes par rapport au LR (-0,31%) et au PL (-0,29%)(p[ANOVA]>0,05).

Lymphocytes

Le panel 1 (Tableau 4. – , annexe 2) permettant d'analyser les populations de lymphocytes T ne montre pas de différence dans les proportions totales de lymphocytes T (CD3⁺) entre les solutés ($p[\text{ANOVA}]>0,05$). Par ailleurs, nous n'avons pas observé de différence entre les solutés par rapport à l'expression de marqueurs d'activation des lymphocytes T (résultats non présentés). L'activation des lymphocytes T pour la mesure de la production de cytokines (Panel 3, Tableau 6. – , annexe 2) n'a pas permis d'identifier de différence entre les trois solutés (résultats non présentés). Nous n'avons pas remarqué de différence non plus au niveau des lymphocytes Treg (panel 2, Tableau 5. – , annexe 2), ce qui est probablement attribuable à leur faible proportion chez nos sujets sains (résultats non présentés). Enfin, l'analyse des lymphocytes B ($p[\text{ANOVA}]>0,05$) et des lymphocytes NK ($p[\text{ANOVA}]>0,05$) montrent peu de variations après l'infusion des solutés. Les données des populations de lymphocytes T, B et NK sont présentées en annexe 1 (Figure 17. – , Figure 18. – et Figure 19. –)

Effets des solutés sur les cytokines plasmatiques de sujets sains

Le dosage des cytokines plasmatiques par multiplex démontre peu de variations entre les concentrations pré- et post-soluté pour la majorité des cytokines. Ces résultats étaient ici attendus car nous travaillons sur des sujets sains qui ne sont pas en état inflammatoire aigu ou chronique. Cependant, des tendances chez certaines cytokines ont pu être notées entre les solutés (Figure 9. –). La cytokine pro-inflammatoire IL-17A semble augmenter légèrement après le NS alors qu'elle diminue légèrement après le LR et le PL (ratio post/pré NS=1,14; LR=0,97; PL=0,93; $p[\text{ANOVA}]>0,05$). La chimiokine MIP-1 β ne semble pas varier entre les 3 groupes (ratio post/pré NS=1,10; LR=1,12; PL=1,07; $p[\text{ANOVA}]>0,05$).

La cytokine bFGF reste en moyenne stable après l'infusion de NS alors que le LR et le PL ont chacun eut un effet d'augmentation de ses concentrations (ratio post/pré NS=1,19; LR=1,34; $\Delta\text{PL}=1,44$; $p[\text{ANOVA}]>0,05$). D'une façon similaire, les concentrations de VEGF-C semblent augmenter davantage après le LR et le PL qu'après le NS (ratio post/pre NS=1,28; LR=1,37; PL=1,51; $p[\text{ANOVA}]>0,05$). Les mêmes tendances sont également retrouvées pour les autres cytokines de la famille VEGF (VEGF et VEGF-D). Enfin, les concentrations de la cytokine anti-inflammatoire IL-

10 semblent diminuer de façon plus importante avec le NS par rapport aux deux autres solutés (ratio post/pre NS=0,73; LR=0,85; PL=1,19; p [ANOVA]>0,05; p [Tukey]_{PL-NS}=0,04). Toutefois, aucune de ces différences entre les solutés n'est statistiquement significative.

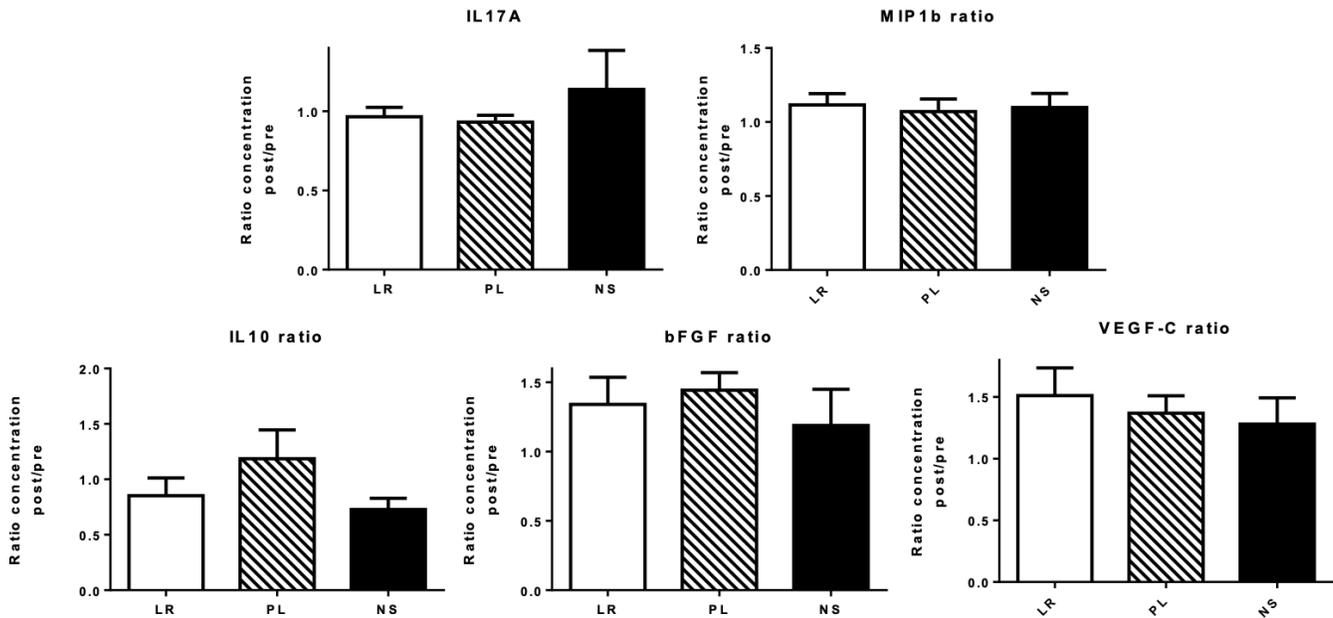


Figure 9. – Effet des solutés sur les cytokines plasmatiques.

Le NS semble augmenter les concentrations de la cytokines IL17A (ratio post/pré NS=1,14; LR=0,97; PL=0,93; p >0,05) mais pas la cytokine MIP-1b (ratio post/pré NS=1,10; LR=1,12; PL=1,07) par rapport au LR et au PL. Le LR et le PL semblent augmenter les concentrations des cytokines IL-10 (ratio post/pre NS=0,73; LR=0,85; PL=1,19; p >0,05), bFGF (ratio post/pre NS=1,19; LR=1,34; PL=1,44; p >0,05) et VEGF-C par rapport au NS (ratio post/pre NS=1,28 ; LR=1,37; PL=1,51; p >0,05).

Effets des solutés sur les valeurs biochimiques de sujets sains

Les analyses biochimiques menées avec les prélèvements sanguins des sujets sains n'ont pas montré de variations selon les différents solutés. En effet, peu de variations sont constatées pré-post-solutés, au niveau des bicarbonates (HCO_3), du Cl et du Na (p [ANOVA]>0,05 dans les 3 analyses) (Figure 10. –). De plus, aucune de ces variations n'a été assez grande pour résulter en des valeurs biochimiques hors des valeurs normales.

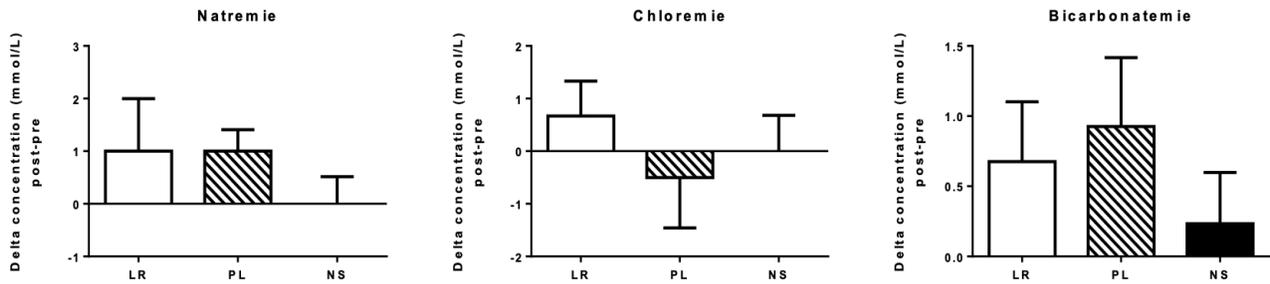


Figure 10. – Effets biochimiques des solutés.

L'infusion de 1L des différents solutés ne semble pas causer de perturbation biochimique sur des sujets sains.

Effets immunomodulateurs des solutés sur un modèle d'inflammation aiguë *ex vivo* en sang total

Cette expérience faite *ex-vivo* sur sang total stimulé au LPS avait pour but de reproduire les conditions d'un patient en état inflammatoire aigu sévère, plus spécifiquement suite à une infection bactérienne systémique, ou sepsis. Les observations pourraient éventuellement être extrapolées à d'autres types de réaction inflammatoire, comme dans un trauma ou une chirurgie lourde.

Effets sur les neutrophiles

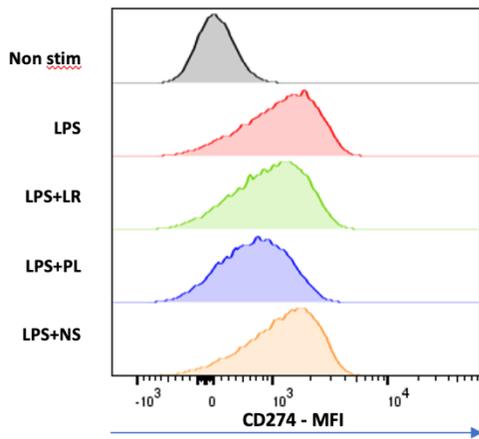
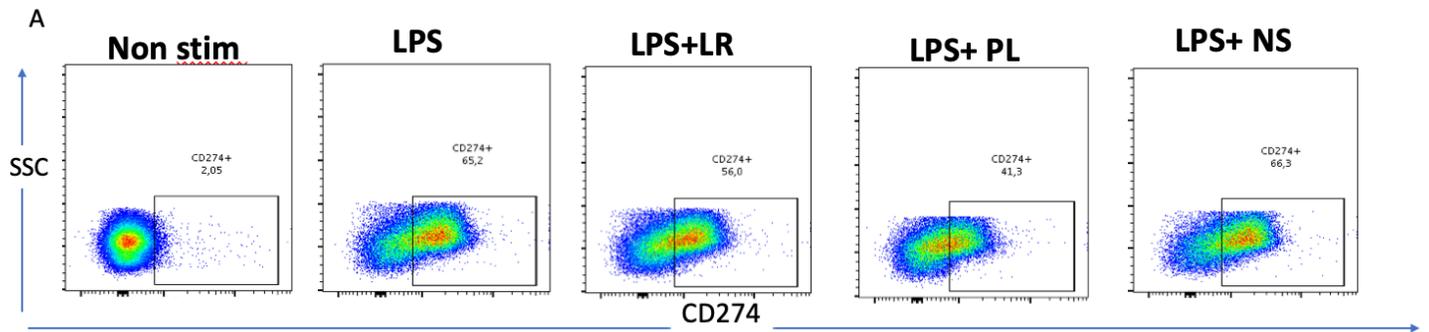
Les expériences menées sur sang total ont montré l'effet d'activation attendu du LPS et de la PMA sur le phénotype de surface des neutrophiles, avec une augmentation d'expression de CD11b et de CD66b et une diminution de CD62L. Cependant, l'ajout des différents solutés n'a pas eu d'effet additionnel sur leur phénotype par rapport à la condition LPS seul.

Effets sur les monocytes

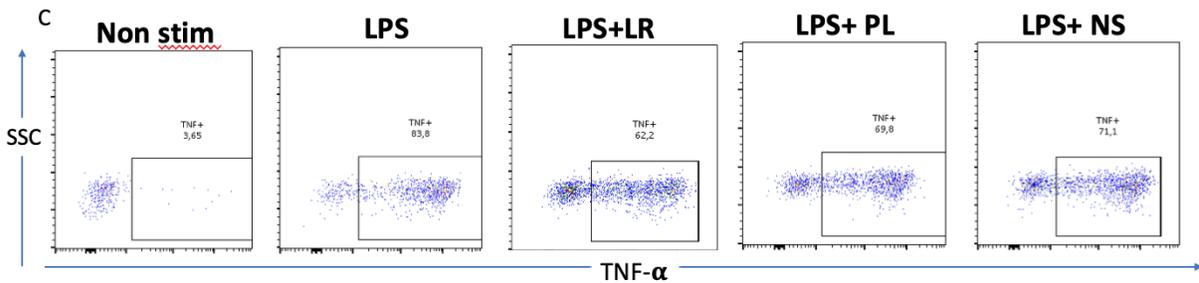
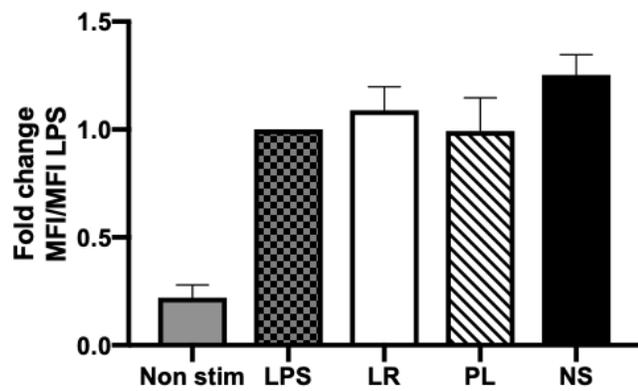
La stimulation au LPS du sang total semble avoir augmenté la proportion de monocytes classiques par rapport au total des cellules CD11c. Par ailleurs, l'expression de la molécule de co-inhibition CD274, ou PD-L1, qui est aussi un marqueur d'activation des monocytes, est nettement augmentée par rapport à la condition sans stimulation, et ce, pour tous les sous-types de monocytes et pour les cellules CD11c⁺ totales. La production de TNF- α et le pourcentage de cellules productrices de TNF- α sont également augmentées dans tous les sous-types de

monocytes suite à la stimulation au LPS, mais dans des proportions beaucoup plus importantes chez les monocytes intermédiaires et non-classiques que chez les monocytes classiques.

Suite à l'ajout des différents solutés, les proportions des cellules CD11c totales ou des différents sous-types de monocytes restent inchangées par rapport à la condition LPS seul. Afin de garder les valeurs numériques plus constantes d'une expérience à l'autre, les valeurs de pourcentage d'expression de TNF- α sont normalisées en fonction de la condition de LPS seul, et les valeurs d'expression de CD274 sont exprimées comme un ratio par rapport à la condition de LPS seul. Les valeurs brutes sont présentées dans la Figure 21. – en annexe 1. L'expression de CD274 des cellules CD11c⁺ reste inchangée après le LR et le PL par rapport au LPS seul (ratio LR/LPS=1,09; PL/LPS=0,99) alors qu'elle semble être augmentée après le NS (NS/LPS=1,25) (p[ANOVA]<0,0001; p[Dunnett]_{LPS-nonstim}=0,0002; p[Dunnett]_{LPS-LR}=0,9; p[Dunnett]_{LPS-PL}=0,9; p[Dunnett]_{LPS-NS}=0,2) (Figure 11. –). De plus, cette tendance est vraie pour tous les sous-types de monocytes. Par ailleurs, chez le sous-type de monocytes intermédiaires, le pourcentage de cellules TNF- α ⁺ semble diminuer par rapport à la condition LPS seul après le LR et le PL (Δ LR-LPS=-11,0%; Δ PL-LPS=-7,4%) alors qu'il reste stable après le NS (Δ NS-LPS=-3,7%) (p[ANOVA]<0,0001; p[Dunnett]_{LPS-nonstim}<0,0001; p[Dunnett]_{LPS-LR}=0,2; p[Dunnett]_{LPS-PL}=0,5; p[Dunnett]_{LPS-NS}=0,9) (Figure 11. –).



B Expression de CD274 par les monocytes



D Production de TNF- α par les monocytes intermédiaires

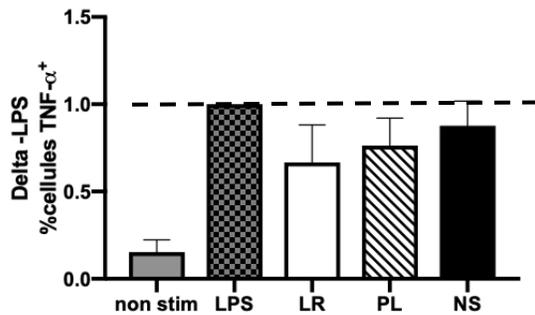


Figure 11. – Effets des solutés sur le phénotype des monocytes activés par le LPS

A) Exemple de l'expression de CD274 par les monocytes dans les différentes conditions. Haut : graphique montrant l'expression de CD274 par les monocytes dans les différentes conditions. Bas : Histogramme comparant la MFI du marqueur CD274 par cytométrie en flux dans les mêmes populations de cellules dans les différentes conditions. Dans cet exemple, on constate que le LPS induit fortement l'expression de CD274 sur les monocytes. Le LR et le PL semblent aussi diminuer l'expression de CD274 par rapport au NS après l'exposition au LPS.

B) Quantification de l'effet des solutés sur l'expression de CD274 par les monocytes. Alors que l'expression de CD274 reste stable après le LR (ratio LR/LPS=1,09) et le PL (ratio PL/LPS=0,99) par rapport au LPS seul, l'ajout de NS semble augmenter son expression (ratio NS/LPS=1,25) ($p[\text{ANOVA}]>0,05$).

C) Exemple de la production de TNF- α par les monocytes intermédiaires dans les différentes conditions. Dans cet exemple, on constate que le LPS induit fortement la production de TNF- α par les monocytes intermédiaires. Le LR et le PL semblent aussi diminuer la production de TNF- α davantage que le NS après l'exposition au LPS.

D) Quantification de l'effet des solutés sur la production de TNF- α par les monocytes intermédiaires. Alors que la proportion de cellules TNF- α^+ diminue après le LR ($\Delta\text{LR-LPS}=-11,02\%$) et le PL ($\Delta\text{PL-LPS}=-7,4\%$) par rapport au LPS seul, l'ajout de NS semble maintenir cette proportion stable ($\Delta\text{NS-LPS}=-3,7\%$) ($p[\text{ANOVA}]>0,05$).

Effets sur les lymphocytes T

La stimulation au LPS du sang total n'a pas eu d'effet sur les proportions de LT totales (CD3) ou des sous-types de LT (CD4 et CD8) par rapport à la condition sans stimulation. Toutefois, dans cette condition expérimentale, l'expression du marqueur d'activation précoce CD69 est augmentée de près de 2 fois par rapport à la condition sans stimulation tant chez les CD4 que chez les CD8. Les expressions des marqueurs d'activation CD25 et CD278 ne sont pas augmentées par le LPS à ce temps de récolte, bien qu'elles le soient par la PMA. Chez les CD4, l'expression de CD69 demeure stable par rapport à la condition LPS seul suite à l'ajout de LR et de NS (ratio LR/LPS=0,94; NS/LPS=0,89), mais elle semble diminuée suite à l'exposition au PL (rapport MFI PL/LPS=0,70) ($p[\text{ANOVA}]<0,0001$; $p[\text{Dunnett}]_{\text{LPS-PMA}}<0,0001$; $p[\text{Dunnett}]_{\text{LPS-LR}}=0,9$; $p[\text{Dunnett}]_{\text{LPS-PL}}=0,9$; $p[\text{Dunnett}]_{\text{LPS-NS}}=0,4$) (Figure 12. –). Ces tendances sont vraies aussi chez les LT CD8 ($p[\text{ANOVA}]<0,0001$; $p[\text{Dunnett}]_{\text{LPS-PMA}}<0,0001$; $p[\text{Dunnett}]_{\text{LPS-LR}}=0,9$; $p[\text{Dunnett}]_{\text{LPS-PL}}=0,9$; $p[\text{Dunnett}]_{\text{LPS-NS}}=0,4$).

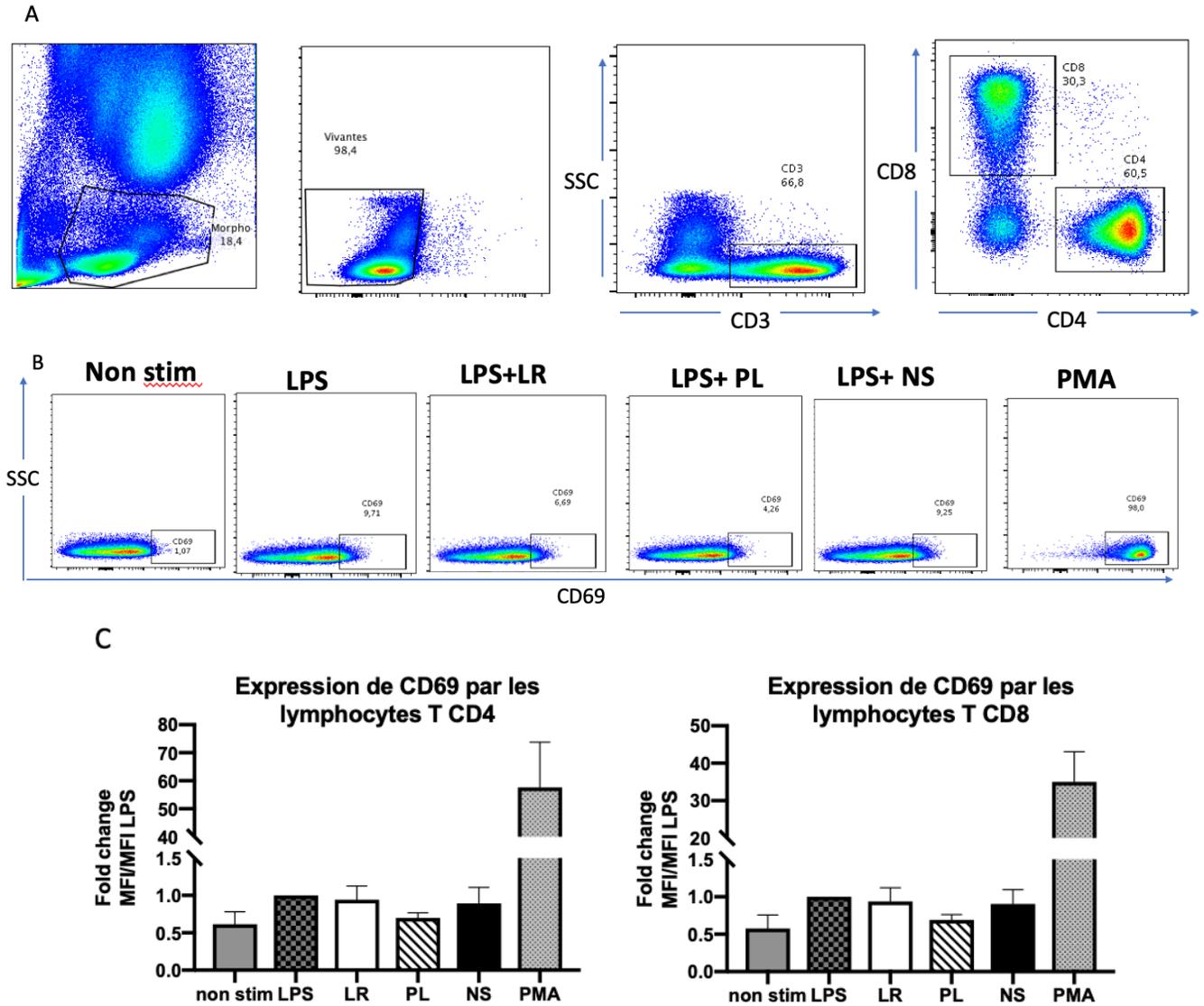


Figure 12. – Effet des solutés sur le phénotype des lymphocytes T

A) Stratégie de gating. Après la lyse des globules rouges, les cellules du sang total sont lues par le cytomètre de flux ; les débris morphologiques, les doublets et les cellules mortes sont d'abord éliminés. Puis, les lymphocytes T sont sélectionnés par marquage CD3 et divisés en CD8 et CD4.

B) Exemple d'expression de CD69 par les lymphocytes T dans les différentes conditions. L'activation précoce des lymphocytes T est déterminée par leur expression de CD69. Sur cet exemple, on constate que le LPS augmente légèrement l'expression de CD69 par rapport au contrôle positif avec la PMA. L'ajout de NS semble maintenir l'expression de CD69 stable par rapport au LPS seul alors que le LR et davantage le PL semble diminuer celle-ci.

C) Quantification de l'effet des solutés sur l'expression de CD69 par les lymphocytes T. Alors que l'expression de CD69 reste stable après le LR (ratio LR/LPS=0,94 [CD4] et =0,94 [CD8]) et le NS (ratio NS/LPS=0,89 [CD4] et =0,91 [CD8]) par rapport au LPS seul, l'ajout de PL semble diminuer son expression (ratio PL/LPS=0,70 [CD4] et =0,69 [CD8]).

Chapitre 5 – Discussion

Caractérisation des phénotypes cellulaires

Afin de bien analyser les changements de phénotypes induits par les solutés, il est important d'avoir une méthode fiable, précise et validée. Les panels de cytométrie en flux utilisés pour le phénotypage des PBMCs sont ceux utilisés par la plateforme d'immunomonitoring du CRCHUM. Ces panels nous permettent de distinguer avec précision les lymphocyte T (CD3), leurs sous-types (CD4, CD8), leur état naïf ou mémoire, central ou périphérique (CD45, CD62L) ainsi que leur état d'activation (CD69, CD25 et CD278). Les monocytes (CD11c, CD14) ainsi que leur sous-types classique (CD14⁺, CD16⁻), intermédiaire (CD14⁺, CD16⁺) et non classique (CD14^{low}, CD16⁺) et leur état d'activation (CD80, CD86, CD274) peuvent aussi être analysée. Les autres populations pouvant être distinguées sont les cellules dendritiques (CD14⁻, HLA-DR⁺) et leurs sous-types myéloïde et non-myéloïde (CD11c), les cellules NK (*Natural Killer*) (CD56, CD16), les lymphocytes T régulateurs (FoxP3) et les lymphocytes B avec leurs état de différenciation Bm1, Bm2, pré-GC, Bm3-4, eBm5, Bm5 (CD38, IgD)(78). Les marqueurs de surface distinctifs des neutrophiles sont connus (CD16, CD66b) et certains marqueurs sont utilisés pour déterminer leur état d'activation (CD11b, CD66b, CD62L) (25, 26, 70). Suite à nos tests de caractérisation du phénotype d'activation des neutrophiles nous avons utilisé l'augmentation de la fluorescence de CD11b et la diminution de la fluorescence de CD62L pour identifier une activation neutrophilique.

Effet des solutés sur les sujets sains

Neutrophiles

Nous avons observé que l'exposition aux différents solutés utilisés dans notre étude semble altérer le phénotype des neutrophiles du sang périphérique. En moyenne, nos observations laissent croire que le PL et le LR pourraient entraîner une légère diminution de l'activation des neutrophiles, avec une diminution de l'expression de CD11b alors que le NS garderait l'état d'activation globalement stable (Figure 6. –). Toutefois, on semble aussi constater une diminution

de l'expression de CD62L, soit la L-selectine, avec le NS, ce qui traduirait une légère activation dans cette condition.

La perte de cette molécule d'adhésion cellulaire, qui lie les neutrophiles aux récepteurs de l'endothélium des vaisseaux, est également un bon marqueur d'activation (27). Toutefois, comme ce sont ici des neutrophiles circulants, la perte de CD62L ne traduirait pas l'adhésion aux parois endothéliales et la transmigration endothéliale, mais pourrait plutôt être à l'origine d'un renversement de l'adhésion et d'une démarginisation des neutrophiles (22, 24). Cette observation pourrait être corrélée à une augmentation de la proportion de neutrophiles circulants, ou une neutrophilie, mais nous n'avons pas de décompte différentiel leucocytaire dans cette étude pour confirmer cela. À l'inverse, la légère augmentation de l'expression de CD62L suite à l'infusion de PL pourrait traduire une diminution de l'activation ainsi qu'une marginalisation accrue des neutrophiles aux parois vasculaires.

Les mécanismes qui pourraient expliquer ces observations sont incertains, mais plusieurs explications peuvent être avancées. Premièrement, la charge élevée de NaCl dans le NS pourrait avoir un effet sur le phénotype des neutrophiles. Aucune association n'a été documentée entre le phénotype des neutrophiles et le NaCl, mais il est bien connu que le NaCl a un effet pro-inflammatoire et activateur sur plusieurs types leucocytaires, dont particulièrement les monocytes et les macrophages (14, 40, 41, 62), qui ont en commun avec les neutrophiles leur origine myéloïde. De plus, un effet du NaCl sur les neutrophiles a déjà été démontré chez le poisson-zèbre via l'enzyme SGK-1 qui agit dans les cascades d'activation du neutrophile en aval de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38, elle-même sensible à l'osmolarité (65). L'activation de l'inflammasome NLRP3 sensible à l'état hyperosmolaire induit par une diète riche en sel est un autre mécanisme qui résulte en une réponse inflammatoire dans les macrophages murins, mais qui est aussi présent dans les neutrophiles et qui pourrait donc expliquer nos observations (40). Enfin, de petites variations dans la natrémie affecte grandement l'endothélium vasculaire à court et à long terme, pouvant causer une dysfonction endothéliale et même un phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales et une sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β (69). Cela pourrait également être à l'origine d'une réponse inflammatoire systémique et d'un changement de phénotype des neutrophiles.

La cause de la légère diminution des marqueurs inflammatoires suite à l'exposition au LR et au PL est moins claire. En effet, ces solutés ont des compositions plutôt physiologiques très proches du plasma. On s'attendrait donc à ce que leurs effets biochimiques et immuno-modulateurs soient presque nuls. De plus, les neutrophiles sont souvent décrits comme des cellules qui, une fois activées dans le site inflammatoire, y font leur travail et y meurent pour ensuite être phagocytées par les macrophages avec la résolution de l'inflammation. Très peu est donc connu sur des facteurs qui pourraient « désactiver » ces cellules, outre la diminution de facteurs activateurs. Ainsi, il est possible que le simple effet de dilution par les solutés cause une diminution de concentration des cytokines et autres facteurs activateurs des neutrophiles, entraînant une légère diminution de leur activation, bien que cet effet n'ait jamais été démontré dans la littérature. Par ailleurs, il faut considérer que les prélèvements de cette étude étaient toujours faits environ aux mêmes moments de la journée, soit vers 8h30 avant l'infusion de soluté et vers 14h30 après l'infusion de soluté. Des facteurs endogènes suivant des cycles circadiens pourraient donc expliquer ces variations que l'on observe. Par exemple, les taux sériques de cortisol, sont plus élevés le matin (79) ce qui pourrait affecter le phénotype des neutrophiles. En effet, il est connu que les corticostéroïdes ont comme effet d'augmenter en nombre la quantité de neutrophiles circulants et marginalisés, soit le même effet que le LPS au niveau quantitatif (22, 24, 80). L'effet du cortisol sur le phénotype neutrophilique est inconnu, mais pourrait bien expliquer cette diminution de l'activation que l'on observe l'après-midi par rapport au matin. Dans ce cas, cette variation phénotypique serait complètement indépendante des solutés reçus et l'effet réel de ces solutés serait nul ou même impossible à déterminer avec notre étude. Toutefois, afin de confirmer cette hypothèse, nous devons inclure à notre étude une analyse de la variabilité du phénotype des neutrophiles au cours de la journée, avec des sujets sains ne recevant pas de soluté. Il demeure toutefois que le NS semble montrer un effet immuno-activateur légèrement supérieur aux autres solutés auprès des neutrophiles.

Les quelques tests fonctionnels effectués sur les neutrophiles ne permettent pas de conclure à un effet des solutés sur les fonctions neutrophiliques (production de ROS et phagocytose). En effet, l'inconsistance des résultats et le trop faible échantillonnage rendent l'interprétation des données impossible. Il aurait été pertinent d'appliquer ce protocole auprès d'un plus grand

nombre de prélèvements, mais sa mise en place tardive au cours de l'étude ne nous l'a pas permis. Il aurait été intéressant de corroborer les résultats phénotypiques obtenus avec des tests fonctionnels. Théoriquement, nous aurions pu nous attendre à ce que l'augmentation de l'activation induite par le NS se reflète par une augmentation de la production de ROS et de la phagocytose, mais nous aurions également pu observer une dysfonction sur ces aspects secondaire à une activation inadéquate ou à une sur-activation initiale. La mise en place de ces protocoles aura du moins permis aux autres membres du laboratoire d'en faire des protocoles de routine.

PBMCs

Les résultats que nous avons obtenus par rapport aux PBMCs de nos sujets sains sont une augmentation statistiquement significative de la proportion totale de monocytes circulants et des monocytes classiques par le NS par rapport aux deux autres solutés. Le NS semble aussi augmenter les DC myéloïdes par rapport aux deux autres solutés.

Il semble donc que le NS ait un effet global sur la promotion et le recrutement des cellules immunitaires de la lignée myéloïde. Cette observation semble explicable compte tenu du rôle de ces cellules myéloïdes comme patrouilleurs et senseurs de signaux provenant du microenvironnement. Il est connu que des concentrations élevées de NaCl dans le microenvironnement des macrophages active un phénotype pro-inflammatoire particulier et accentue une éventuelle réponse à un autre stimulus comme le LPS (41). Les niveaux élevés de NaCl dans le NS pourraient ainsi être suffisants pour induire une réponse similaire dans les monocytes circulants, ce qui provoquerait une réponse inflammatoire associée à un recrutement de monocytes en circulation, probablement via les réserves de la moelle osseuse (28, 37). Deux études ont déjà démontré des résultats similaires, c'est-à-dire une augmentation des monocytes circulants suivant une diète riche en sel. La première montre une augmentation du sous-type de monocytes intermédiaires ainsi qu'une activation pro-inflammatoire après un changement de la diète sur quelques jours (64) alors que la seconde montre une augmentation des monocytes totaux ainsi que de cytokines inflammatoires après un changement de diète sur quelques mois (63). La charge sodée impliquée dans notre protocole (1L de NS à 154 mmol/L) est donc inférieure

à ces études, mais pourrait néanmoins faire varier la natrémie et la chlorémie de façon assez importante pour causer un effet sur les monocytes en raison de son infusion rapide directement dans la circulation sanguine. Considérant qu'un sujet a un volume circulant d'environ 5L, une natrémie à 140 mmol/L et une chlorémie à 100 mmol/L, l'infusion rapide d'un litre de NS pourrait donc augmenter sa natrémie d'environ 3 mmol/l et sa chlorémie d'environ 9 mmol/L. Nous pensons que c'est la rapidité de cette augmentation qui pourrait expliquer un choc sur les monocytes, même si les paramètres biochimiques restent à des valeurs dans les limites de la normale. Une autre étude a également démontré que les macrophages sont sensibles à des changements de l'osmolarité environnante, et étant donné que le NS est également hyperosmolaire, cela pourrait être une autre explication à nos observations (40).

L'augmentation de la proportion de monocytes circulants est habituellement provoquée par l'effet des chimiokines *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 (CCL-2) et MCP-3 (CCL-7) sur les précurseurs de monocytes dans la moelle osseuse via leur récepteur *CC-Chemokine receptor* (CCR)-2 (28, 54, 55). Les monocytes classiques sont le sous-type exprimant le plus ce récepteur et dont l'émigration de la moelle dépend le plus de l'axe de CCR-2 et de ses ligands (29). Les monocytes intermédiaires et non-classiques, de leur côté, expriment d'avantage le récepteur *CX₃C-Chemokine receptor* (CX₃CR)-1, spécifique à la chimiokine *CX₃C-Chemokine ligand* (CX₃CL1, ou fractalkine) et leur migration dépendrait davantage de cet axe (29). Ce résultat pourrait donc être lié à une augmentation des chimiokines CCL-2 et CCL-7. Cependant, nos résultats de Multiplex ne corroborent pas cette hypothèse quant à la chimiokine CCL-2 et nous n'avons pas de mesure pour les concentrations de CCL-7. Une autre hypothèse pour expliquer l'augmentation de monocytes circulants pourrait être liée à la chimiokine MIP-1 β . En effet, le rôle de cette chimiokine est d'attirer les monocytes et macrophages vers le site d'inflammation. Cependant, cet effet n'est pas observé dans nos analyses cytokiniques. En situation d'inflammation aiguë ou chronique, le sous-type de monocyte non-classiques est augmenté au dépend du sous-type classique (30, 33, 38). Toutefois, peu de situations sont connues menant à une augmentation sélective des monocytes classiques. La pharmacothérapie aux glucocorticoïdes est une des seules situations menant à une augmentation relative des monocytes classiques qui est associée à une apoptose des deux autres sous-types et une augmentation du sous-type classique (31).

Nous n'avons pas, à ce jour, étudié la mécanistique derrière nos observations, mais les voies de signalisation qui pourraient être impliquées sont notamment les voies de l'inflammasome NLRP3, de la MAPK p38 et du facteur mitogénique, *extracellular-signal regulated kinase* (ERK). En effet, celles-ci sont impliquées dans la polarisation pro-inflammatoire des macrophages et sont sensibles à la concentration locale de sodium et à l'osmolarité (40, 41). Étant donné que ces voies sont aussi présentes chez les monocytes (39, 81), elles pourraient expliquer une activation de ces cellules suite à un changement de la natrémie et de l'osmolarité environnante ainsi que la monocytose qui s'en suivrait par la production de CCL-2 et CCL-7 (54, 55).

Nos résultats montrent aussi les mêmes tendances dans la population de cellules dendritiques myéloïdes. Les mécanismes pouvant expliquer la variation de cette population pourrait être similaires à ceux des monocytes étant donné que ces deux types de cellules ont beaucoup de voies de signalisations et de récepteurs en commun dont CCR2 qui est impliqué dans leur maturation et dans leur migration (53). Étant donné leur rôle d'APC et leur capacité à produire une réponse inflammatoire, l'augmentation de ce sous-type cellulaire pourrait impliquer leur recrutement accru dans les sites périphériques ainsi qu'un plus grand potentiel de réponse inflammatoire aiguë.

Cytokines

Nous avons observé des tendances intéressantes dans les dosages de cytokines. Le NS semblait légèrement augmenter les concentrations d'IL-17A par rapport aux deux autres solutés alors qu'il semblait diminuer les concentrations des cytokines IL-10, bFGF et VEGF-C. Globalement, ces variations que l'on observe montreraient un effet pro-inflammatoire après l'infusion de NS et un effet anti-inflammatoire, pro-angiogénique et pro-fibrotique après l'infusion des solutés « balancés » LR et PL.

MIP-1 β est une chimiokine produite principalement par les monocytes et les macrophages activés par un stimulus inflammatoire, comme IL-1 β ou encore LPS. Son rôle principal est de recruter des cellules pro-inflammatoires, notamment les monocytes et les neutrophiles, au site d'inflammation (56). Sachant que les solutés se distribuent non seulement dans le contenant vasculaire mais aussi dans le milieu extravasculaire interstitiel, nous aurions pu nous attendre à

une activation des macrophages résidents à cause de la concentration plus élevée de sodium. Cependant, l'absence de variation de la production MIP-1 β que nous observons pourrait s'expliquer par une variation trop minime de la concentration de sodium causée par un seul litre de NS et une activation trop faible des macrophages.

L'IL-17A est une cytokine produite par les lymphocytes Th17 qui a des propriétés pro-inflammatoires utiles dans la réponse immunitaire contre les bactéries notamment. Cependant, une production exagérée d'IL-17A est impliquée dans plusieurs maladies auto-immunes dont l'arthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques ainsi que dans l'inflammation chronique (82). Une augmentation de la différenciation des lymphocytes T en Th17 a été observée dans des modèles murins et *in vitro* en présence de concentrations élevées de sodium (65, 66). Il se pourrait donc que l'augmentation d'IL-17A vue après l'infusion de NS soit due à une différenciation accrue en lymphocytes Th17.

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire. Elle est principalement produite par les cellules Tregs et aussi par les CPA. Elle inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, comme IL-1, IL-6 et TNF- α (57). Il a été démontré qu'une concentration élevée de sodium affecte la fonction des lymphocytes Treg et diminue l'expression et la sécrétion d'IL-10 par les macrophages activés (41, 67), ce qui pourrait expliquer la diminution d'IL-10 suite à l'infusion de NS par rapport aux deux autres solutés.

Les facteurs de croissance de la famille VEGF sont des glycoprotéines sécrétées essentiellement par les macrophages, les plaquettes et les kératinocytes. Leur fonction principale est de stimuler l'angiogenèse par leur effet mitogène sur les cellules endothéliales(60) et est donc sécrétée surtout après la phase d'inflammation aiguë, lors de la phase anti-inflammatoire et réparatrice. Dans une étude faite sur des patients en choc suite à un trauma, il a été démontré que la dégradation du glycocalyx libère des fragments moléculaires dans la circulation dont des récepteurs solubles à VEGF (*soluble vascular endothelial growth factor receptor 1*) (59, 83). Ces récepteurs sont normalement les récepteurs membranaires des cellules endothéliales et servent donc à la signalisation des facteurs de croissance VEGF. Par ailleurs, des concentrations élevées de sodium, même à très court terme, peuvent induire des changements au glycocalyx et même

provoquer sa dégradation (69). Il est donc possible qu'une dégradation rapide de glycocalyx induite par la concentration élevée de sodium contenue dans le NS libère ces récepteurs solubles, qui le lient alors à leurs ligands de la famille VEGF circulants, diminuant ainsi la concentration plasmatique de toutes les formes de VEGF, comme nous l'observons dans notre étude. Il n'est pas clair cependant ce que cette variation de facteurs angiogéniques signifie cliniquement. Dans cette même étude, l'augmentation des récepteurs solubles de VEGF est associée à un mauvais pronostic, un état de choc et un état inflammatoire sévère chez les patients traumatiques (59). Il se pourrait donc que, chez ces patients très malades, la diminution de VEGF circulant mène à un retard dans la résolution de l'inflammation et à une dysfonction micro-vasculaire liée à la dégradation du glycocalyx. Cependant, chez les sujets sains de notre étude comme chez des patients dont l'état circulatoire et inflammatoire est stable, ces variations de VEGF sont probablement sans grande conséquence.

Les *Fibroblast Growth Factors* (FGF) sont également une famille de facteurs de croissance dont la fonction est de promouvoir l'angiogenèse et la réparation tissulaire. Les macrophages sont une importante source de bFGF lorsqu'activés avec un phénotype M2 anti-inflammatoire et pro-réparation et, au contraire, la production de bFGF est inhibée par un phénotype M1 pro-inflammatoire (84, 85). Les FGF ont la particularité d'avoir une affinité élevée pour les composantes de la matrice extracellulaire, dont l'héparan sulfate (HS), un glycosaminoglycan qui constitue également en grande partie le glycocalyx des endothéliums (58). De plus, les fragments d'HS circulants générés lors de lésions tissulaires ou lors de la dégradation du glycocalyx sont nécessaires à l'action des FGF. En effet, ils permettent de créer un trimère avec les molécules de la famille FGF et leurs récepteurs, ce qui favorise l'activation de ceux-ci (61, 86). L'activation des FGFR est ensuite responsable des cascades de signalisation permettant la réparation des tissus environnants dont l'HS qui constitue la matrice extracellulaire et le glycocalyx (61). Ainsi, lors d'une lésion tissulaire, les HS libérés avec les résidus de dégradation de la matrice extracellulaire facilitent l'action des FGF et la réparation tissulaire. La diminution de bFGF suite à l'infusion de NS par rapport au LR et au PL pourrait être due à une certaine dégradation du glycocalyx libérant des molécules d'HS, ce qui permet au bFGF d'être utilisés. Une autre explication à cette diminution relative du bFGF serait l'état pro-inflammatoire causé par l'activation des cellules

endothéliales secondaire à la concentration élevée de sodium et par l'activation des macrophages résidents en phénotype M1 dans les tissus interstitiels. Dans ce cas, la production diminuée de bFGF pourrait avoir comme conséquence d'inhiber la réparation du glycocalyx, lui-même dégradé par les hautes concentrations de sodium, et donc d'exacerber et de chroniciser la dysfonction micro-vasculaire et l'activation des cellules endothéliales. Ici encore, chez des patients en soins intensifs dans un état circulatoire critique, une telle perpétuation de la dysfonction endothéliale pourrait être très grave et exacerber leur situation, alors que l'effet est probablement négligeable chez le sujet sain. L'augmentation de la concentration de bFGF que nous observons dans les groupes LR et PL pourraient être secondaire à la dégradation du glycocalyx que l'on voit lors de l'hypervolémie due à l'infusion de solutés (87) ou cela pourrait être dû à une variation cyclique de cette cytokine pendant la journée. Chez le groupe NS, cette augmentation pourrait alors être inhibée par l'activation des macrophages et des cellules endothéliales tel que décrit ci-haut.

Effet biochimique

Les solutés infusés à nos sujets sains n'ont entraîné que très peu de variations sur les valeurs biochimiques de leurs analyses sanguines. En effet, nous n'avons constaté aucune différence entre les solutés pour ces paramètres et les valeurs ne se sont jamais situées à l'extérieur des valeurs de référence.

Toutefois, dans une récente étude comparant le NS aux solutés balancés (LR et PL), il a été démontré que, chez les patients hospitalisés, les solutés balancés réduisaient les risques d'hypernatrémie ($\text{Na} > 145 \text{ mmol/L}$), d'hyperhyperchlorémie ($\text{Cl} > 110 \text{ mmol/L}$), et d'hypobicarbonatémie ($\text{HCO}_3 < 20 \text{ mmol/L}$) (14, 15). Plusieurs raisons expliquent ces différences avec notre étude. D'abord, dans ces études, les patients en soins intensifs recevaient en moyenne plus de 2L de soluté pendant leur séjour aux soins intensifs alors que les patients hospitalisés dans les unités régulières en recevaient en moyenne 1,6 L. Malgré ces volumes de soluté relativement petits, des variations électrolytiques étaient présentes entre les groupes et se faisaient plus évidentes avec l'augmentation du volume de soluté reçu. De plus, les patients hospitalisés, d'autant plus ceux aux soins intensifs, sont malades de façon aiguë et ont bien souvent des maladies chroniques également. Leur contrôle de l'homéostasie électrolytique, qui dépend

surtout la fonction rénale et de leur état volémique et électrolytique de base, est donc moins efficace. Au contraire, nos sujets sains n'avaient pas de maladie chronique et n'étaient pas malades de façon aiguë. On pouvait donc s'attendre à ce qu'ils soient capables de réguler assez rapidement les anomalies électrolytiques causées par l'infusion rapide d'un seul litre de soluté, de façon à ce que celles-ci ne soient plus présentes lors du deuxième prélèvement sanguin 6h plus tard. Cette différence avec notre étude traduit également d'autres éléments importants à considérer dans l'interprétation de tous nos résultats: le contrôle de l'homéostasie, autant électrolytique qu'inflammatoire, est meilleur chez nos sujets sains que chez un patient et les patients reçoivent généralement plus de volume de solutés que nos sujets sains.

Effets des solutés sur un modèle d'inflammation aiguë

Les neutrophiles

Le premier résultat intéressant que nous avons obtenu des expériences sur sang total est que les neutrophiles ne semblent pas affectés par les solutés après l'activation par le LPS, alors qu'ils semblaient l'être chez nos sujets sains.

Plusieurs explications sont possibles. Le neutrophile est une cellule dont la mission est plus simple que le macrophage ou le monocyte : après avoir migré dans un site inflammatoire, il est activé, il phagocyte ses cibles puis il meurt rapidement, soit par apoptose, soit par NETose. Son phénotype est moins modulable, étant donné qu'il peut seulement passer d'un état basal à activé. Une fois activé, il ne peut pas revenir à l'état basal ou changer de phénotype (22, 24, 88). L'activation par le LPS est probablement trop puissante pour permettre un changement ultérieur de leur phénotype. De plus, étant donnée leur courte demi-vie, les neutrophiles sont difficiles à étudier *ex vivo*, car ils meurent rapidement et ne peuvent d'ailleurs pas être mis en culture. Cette expérience est donc probablement moins appropriée pour les neutrophiles que pour les autres types cellulaires.

Les monocytes

Alors que sur les sujets sains nous avons observé des variations au niveau des populations de monocytes, nous n'avons vu aucun résultat de ce genre dans cette expérience de modèle *ex vivo* d'inflammation aiguë.

Cela semble logique, car les monocytes ne peuvent se diviser et leurs populations ne peuvent seulement varier en réponse à une libération de cellules de la moelle osseuse ou des réserves spléniques, ce qui est évidemment impossible dans une expérience *ex vivo*.

Quant au phénotype des monocytes, nous avons observé que chez le sous-type de monocytes intermédiaires, la proportion de cellules produisant du TNF- α après la stimulation au LPS semble diminuer suite à l'ajout de LR et de PL alors qu'elle reste inchangée suite à l'ajout de NS.

Étant donné que les compositions du PL et du LR sont très semblables à celle du plasma, nous ne pensons pas que ces solutés aient d'effet anti-inflammatoire qui pourrait expliquer cette diminution de production de TNF- α , bien que nous ne puissions pas exclure cette possibilité. Nous pensons plutôt que cette diminution s'expliquerait par le simple effet de dilution provoqué par l'ajout d'un volume de soluté. En effet, dans cette expérience, l'ajout des solutés au milieu de culture diminue la concentration de LPS ce qui devrait donc entraîner une diminution de l'activation des monocytes. Conséquemment, la production stable de TNF- α suite à l'ajout de NS pourrait s'expliquer par un effet pro-inflammatoire de ce soluté qui annulerait son effet de dilution. Cet effet pourrait être expliqué par la concentration élevée en sodium du NS. En effet, il a déjà été démontré que les macrophages augmentent leur expression du gène du TNF- α suite à l'exposition à des concentrations élevées de sel (41). Cet effet pourrait se traduire en une augmentation du profil d'inflammation aiguë lors de l'infusion avec du NS. Cliniquement, cela pourrait avoir plusieurs effets importants chez un patient instable, dont l'exacerbation d'une tempête cytokinique, l'augmentation de la perméabilité capillaire, l'aggravation de l'état de choc et la dysfonction multi-organique (21). En effet, la dysfonction multiviscérale (*Multi Organ Failure*, MOF), qui est une cause de décès importante chez les patients en situation critique et en état inflammatoire sévère, est associée à des concentrations plasmatiques élevées de TNF- α (89). Par exemple, chez les patients en sepsis, la production excessive de cette cytokine peut mener au

MOF et plusieurs études cliniques ont été faites tentant d'améliorer le pronostic de ces patients en diminuant par immunothérapie les niveaux de TNF- α , bien que ce principe n'ait jamais été adopté en clinique (90).

Par ailleurs, nous avons observé que suite à l'activation par le LPS, seul l'ajout de NS fait augmenter l'expression de PD-L1 par l'ensemble des monocytes, les autres solutés maintenant son expression au même niveau qu'avec le LPS seul.

L'expression de PD-L1 sur les monocytes et les macrophages est considéré comme un marqueur d'activation (36, 91). Cependant, son rôle est de se lier au récepteur PD-1 exprimé notamment sur les lymphocytes T activés et d'inhiber leur prolifération et la réponse immunitaire. PD-L1 a donc un puissant effet immunosuppresseur, qui a d'ailleurs été lié à l'immunosuppression secondaire à la sur-activation inflammatoire, ou le syndrome CARS que l'on peut voir entre autres chez les patients en sepsis (20, 91). De plus, il a été démontré que l'expression de PD-L1 sur les monocytes circulants est un facteur de mauvais pronostic et est corrélé avec une mortalité accrue chez les patients en sepsis (92). Des expériences *ex-vivo* ont démontré une amélioration de la dysfonction immunitaire (93, 94) et des modèles animaux de sepsis ont montré une diminution de la mortalité après le traitement avec des anticorps anti-PD-L1 (95). Présentement, des essais cliniques sont en cours pour ce traitement chez les patients en sepsis. Selon cette logique, chez des patients en état inflammatoire sévère et à risque de dysfonction immunitaire, l'utilisation de NS comme soluté de réanimation pourrait exacerber leur pronostic en accélérant l'apparition d'un état d'immunosuppression.

Les Lymphocytes T

Chez les lymphocytes T, l'exposition au PL suite à la stimulation au LPS semble diminuer l'activation par l'expression de CD69, alors que le NS et le LR gardent leur activation stable.

L'explication de ce phénomène est incertaine, étant donné l'absence de ressemblance entre ces deux derniers solutés. Nous pouvons toutefois avancer que le PL ayant la composition la plus physiologique, il aurait l'effet immunomodulateur le plus neutre des trois solutés, et son effet anti-inflammatoire lié à la dilution du LPS serait le mieux préservé. Les différences biochimiques entre la composition du plasma et celles du NS et du LR pourraient constituer un stimulus auprès des

lymphocytes T pour expliquer le maintien de leur activation après la stimulation au LPS. Il faut toutefois considérer que les lymphocytes T répondent habituellement plus lentement à rapidement à un stimulus, à moins d'une activation directe de leur TCR. Étant des cellules de l'immunité adaptative, il faut un certain temps pour que les CPA en état inflammatoire ne leur transmettent un signal immuno-activateur. Il aurait donc peut-être été plus adéquat de laisser la stimulation plus longtemps lors de cette expérience afin de bien apprécier la variation de l'état des lymphocytes T. Ainsi, nous aurions peut-être pu apprécier un effet immunosuppresseur sur les lymphocytes lié à l'augmentation de l'expression de PD-L1 des monocytes suite à l'exposition au NS. L'interprétation que nous pouvons tirer des résultats que nous avons pour les lymphocytes avec cette expérience est donc limitée.

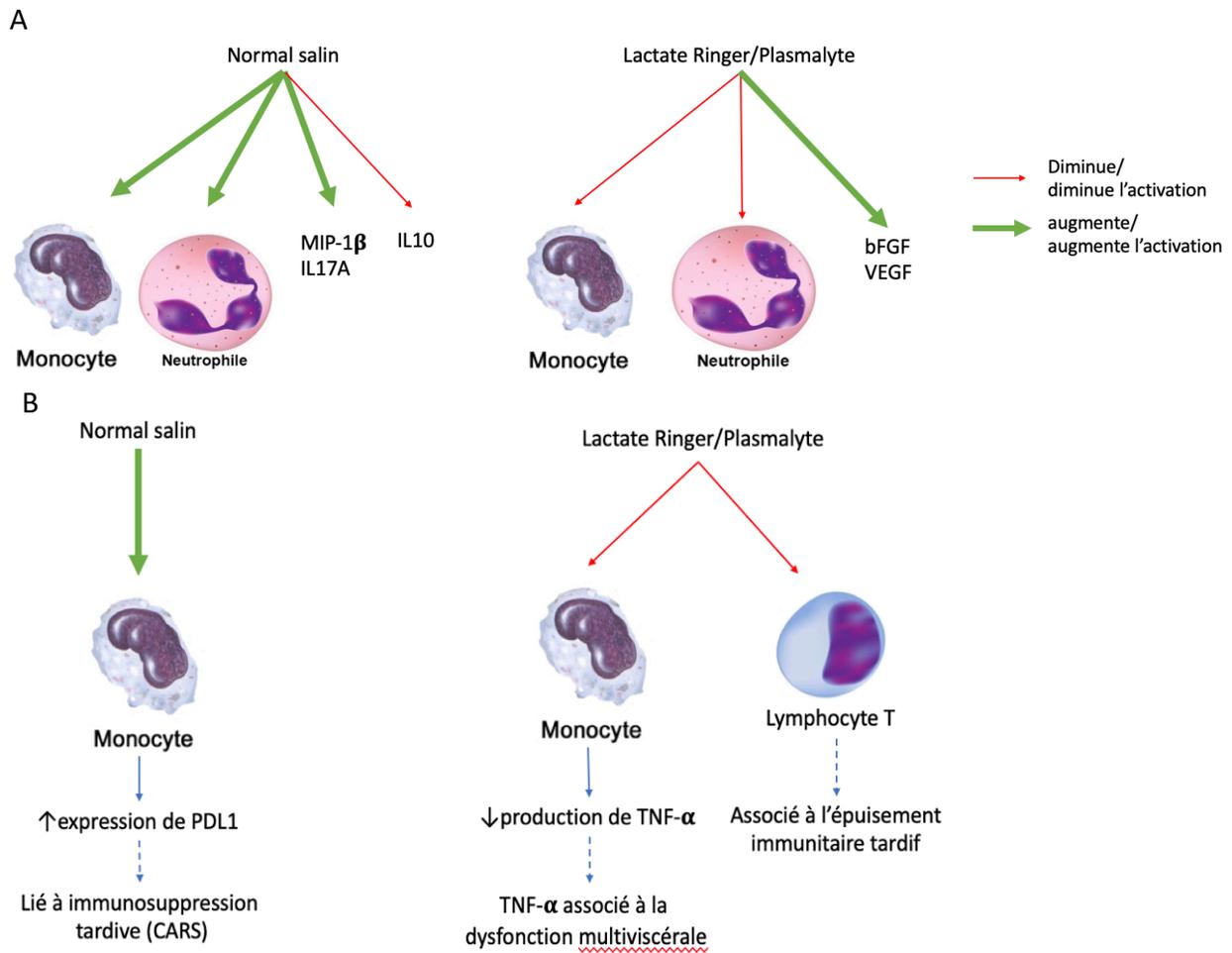


Figure 13. – Résumé des effets des solutés sur les cellules immunitaires

A) Effets des solutés chez les sujets sains. Chez le sujet sain, le NS semble augmenter les populations de monocytes circulants, activer les neutrophiles, augmenter les concentrations de cytokines pro-inflammatoires (IL17A, MIP-1 β) et diminuer les concentrations de cytokines anti-inflammatoires (IL10). Le LR et le PL, au contraire, diminuent les populations de monocytes, diminuent l'activation des neutrophiles et augmentent les concentrations de cytokines anti-inflammatoires et pro-fibrotiques (bFGF, VEGF-C).

B) Effets des solutés dans un modèle d'inflammation aiguë. Dans un état d'inflammation aiguë, le NS accentue l'activation des monocytes via l'expression de PDL1, dont la surexpression est liée à l'immunosuppression tardive (CARS) et à la mortalité en sepsis. Le LR et le PL diminuent la production de TNF- α par les monocytes, dont la surproduction est liée au MOF, et le PL diminue l'activation précoce des lymphocytes T, dont la suractivation est liée à l'épuisement immunitaire tardif.

Chapitre 6 – Conclusion

En somme, s'il était déjà connu que les cellules du système immunitaire sont sensibles à leur microenvironnement, notre étude suggère pour une première fois que les solutés cristalloïdes, qui sont abondamment prescrits dans les unités de soins hospitaliers, peuvent affecter l'état inflammatoire systémique (Figure 13. –). Nos résultats montrent que le Normal Salin, qui a une composition hypertonique, hypernatrémique et hyperchlorémique, cause une augmentation de certains paramètres inflammatoires chez les sujets sains par rapport aux LR et au PL. Suite à l'infusion de NS, les neutrophiles ont un phénotype activé, il y a une augmentation de la proportion de monocytes circulants dans le sang et certaines cytokines et chimiokines pro-inflammatoires sont augmentées. Au contraire, les cytokines anti-inflammatoires et facteurs de croissances angiogéniques sont diminués dans le plasma. Toutefois, nos résultats les plus importants concernent notre modèle d'état inflammatoire aigu. Dans cette condition, nous avons observé que le NS pourrait exacerber l'état inflammatoire par la production accrue de TNF- α et à augmenter l'expression de PD-L1 sur les monocytes, une molécule associée à l'état d'immunosuppression. Cela pourrait, en pratique, contribuer à accélérer l'apparition de l'immunosuppression et des complications infectieuses associées et ainsi assombrir le pronostic des patients aux soins intensifs. En effet, il a déjà été démontré que le NS était inférieur aux solutés balancés chez les patients en sepsis quant à leur pronostic et à l'apparition de complications rénales (14). Toutefois, ces observations n'étaient pas corrélées avec l'état inflammatoire ou l'expression de PD-L1 de ces patients. Des études cliniques plus spécifiques seraient donc nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Ce projet ouvre la porte à de nouvelles considérations par rapport à l'utilisation des solutés cristalloïdes. Alors qu'ils étaient autrefois considérés comme sans danger, il est maintenant bien connu que ces solutés ont des effets aux niveaux rénal et biochimique et leur effet immunomodulateur est à considérer en clinique. Il serait intéressant de recruter de plus grandes cohortes de sujets afin de mieux caractériser les tendances que nous avons observées mais que nous n'avons pu confirmer. Des études sur des patients hospitalisés et voir même sur des patients

aux soins intensifs permettrait aussi confirmer les effets que nous voyons chez les sujets sains et même voir des effets potentiellement plus importants vu leur état inflammatoire très précaire et labile. Des études *in vitro* seraient utiles afin de vérifier les mécanismes cellulaires et moléculaires que nous avons avancés et éventuellement cibler les constituants des solutés qui sont en cause afin d'ajuster leur composition, si nécessaire.

En effet, l'enjeu est grand. Malgré plusieurs études montrant que le NS est néfaste sur la fonction rénale des patients et sur leurs paramètres biochimiques, ce soluté continue à être prescrit très fréquemment dans les hôpitaux, principalement à cause de son très faible coût. Au Québec, le PL n'est pas disponible sur la majorité des unités de soins. Cependant, le LR semble être une alternative intéressante. Effectivement, des études ont montré que ces deux solutés sont comparables par rapport à leurs conséquences rénales et ils semblent aussi similaires d'un point de vue immunomodulateur. De plus, le LR est disponible à grande échelle à un prix très comparable à celui du NS. Nous pensons donc qu'en démontrant l'effet inflammatoire des solutés, nous fournissons un fort argument pour changer le paradigme quant à leur utilisation.

Références bibliographiques

1. Rucker AJ, Rudemiller NP, Crowley SD. Salt, Hypertension, and Immunity. *Annu Rev Physiol.* 2018;80:283-307.
2. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(3):260-8.
3. Chen L. The myth of 0.9% saline: neither normal nor physiological. *Crit Care Nurs Q.* 2015;38(4):385-9.
4. Awad S, Allison SP, Lobo DN. The history of 0.9% saline. *Clin Nutr.* 2008;27(2):179-88.
5. Stocker RA. "Normal" Saline and Co: What Is Normal? *Crit Care Med.* 2016;44(12):2282-3.
6. Severs D, Hoorn EJ, Rookmaaker MB. A critical appraisal of intravenous fluids: from the physiological basis to clinical evidence. *Nephrol Dial Transplant.* 2015;30(2):178-87.
7. McDermid RC, Raghunathan K, Romanovsky A, Shaw AD, Bagshaw SM. Controversies in fluid therapy: Type, dose and toxicity. *World J Crit Care Med.* 2014;3(1):24-33.
8. Young PJ, Joannidis M. Crystalloid fluid therapy: is the balance tipping towards balanced solutions? *Intensive Care Med.* 2014;40(12):1966-8.
9. Schnermann J, Ploth DW, Hermle M. Activation of tubulo-glomerular feedback by chloride transport. *Pflugers Arch.* 1976;362(3):229-40.
10. Wilcox CS. Regulation of renal blood flow by plasma chloride. *J Clin Invest.* 1983;71(3):726-35.
11. Kirchner KA, Kotchen TA, Galla JH, Luke RG. Importance of chloride for acute inhibition of renin by sodium chloride. *Am J Physiol.* 1978;235(5):F444-50.
12. Annane D, Siami S, Jaber S, Martin C, Elatrous S, Declere AD, et al. Effects of fluid resuscitation with colloids vs crystalloids on mortality in critically ill patients presenting with hypovolemic shock: the CRISTAL randomized trial. *JAMA.* 2013;310(17):1809-17.
13. Yunus NM, Bellomo R, Story D, Kellum J. Bench-to-bedside review: Chloride in critical illness. *Crit Care.* 2010;14(4):226.

14. Semler MW, Self WH, Wanderer JP, Ehrenfeld JM, Wang L, Byrne DW, et al. Balanced Crystalloids versus Saline in Critically Ill Adults. *N Engl J Med*. 2018;378(9):829-39.
15. Self WH, Semler MW, Wanderer JP, Wang L, Byrne DW, Collins SP, et al. Balanced Crystalloids versus Saline in Noncritically Ill Adults. *N Engl J Med*. 2018;378(9):819-28.
16. Kumar V, Robbins SL. Robbins basic pathology. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2007. xiv, 946 p. p.
17. Ward PA AS. Acute and Chronic Inflammation. In: Serhan CN WP, Gilroy DW, editor. *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge: Cambridge University Press; 2010. p. 1–16.
18. Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS. The changing immune system in sepsis: is individualized immuno-modulatory therapy the answer? *Virulence*. 2014;5(1):45-56.
19. Sundar KM, Sires M. Sepsis induced immunosuppression: Implications for secondary infections and complications. *Indian J Crit Care Med*. 2013;17(3):162-9.
20. Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(12):862-74.
21. Delano MJ, Ward PA. The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunol Rev*. 2016;274(1):330-53.
22. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*. 2010;31(8):318-24.
23. Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW. *Fundamentals of inflammation*. Cambridge ; New York: Cambridge University Press; 2010. 1 ressource en ligne (xiv, 473 pages) p.
24. Bekkering S. Another look at the life of a neutrophil. *World Journal of Hematology*. 2013;2(2).
25. Lakschevitz FS, Hassanpour S, Rubin A, Fine N, Sun C, Glogauer M. Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Exp Cell Res*. 2016;342(2):200-9.
26. Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, Freeman BA, Daiber A, Gehling UM, et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(2):431-6.

27. Ivetic A. A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behaviour. *Cell Tissue Res.* 2018;371(3):437-53.
28. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:669-92.
29. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):762-74.
30. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2014;2(1):1.
31. Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol.* 2014;289(1-2):135-9.
32. Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:421-52.
33. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep.* 2015;5:13886.
34. Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 2011;118(5):e16-31.
35. Ziegler-Heitbrock L. Blood Monocytes and Their Subsets: Established Features and Open Questions. *Front Immunol.* 2015;6:423.
36. Hartley G, Regan D, Guth A, Dow S. Regulation of PD-L1 expression on murine tumor-associated monocytes and macrophages by locally produced TNF-alpha. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(4):523-35.
37. Ingersoll MA, Platt AM, Potteaux S, Randolph GJ. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol.* 2011;32(10):470-7.
38. Spahn JH, Kreisel D. Monocytes in sterile inflammation: recruitment and functional consequences. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2014;62(3):187-94.

39. Awad F, Assrawi E, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Cobret L, Duquesnoy P, et al. Impact of human monocyte and macrophage polarization on NLR expression and NLRP3 inflammasome activation. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175336.
40. Ip WK, Medzhitov R. Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation. *Nat Commun*. 2015;6:6931.
41. Zhang WC, Zheng XJ, Du LJ, Sun JY, Shen ZX, Shi C, et al. High salt primes a specific activation state of macrophages, M(Na). *Cell Res*. 2015;25(8):893-910.
42. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-69.
43. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):723-37.
44. Stout RD. Editorial: macrophage functional phenotypes: no alternatives in dermal wound healing? *J Leukoc Biol*. 2010;87(1):19-21.
45. Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol*. 2013;93(6):875-81.
46. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol*. 2004;76(3):509-13.
47. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13.
48. Yang Y, Kim SC, Yu T, Yi YS, Rhee MH, Sung GH, et al. Functional roles of p38 mitogen-activated protein kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:352371.
49. Schwacha MG. Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burns*. 2003;29(1):1-14.
50. Binger KJ, Gebhardt M, Heinig M, Rintisch C, Schroeder A, Neuhofer W, et al. High salt reduces the activation of IL-4- and IL-13-stimulated macrophages. *J Clin Invest*. 2015;125(11):4223-38.

51. Murphy K, Weaver C, Mowat A, Berg L, Chaplin D, Janeway C, et al. Janeway's immunobiology. 9th edition. ed. New York, NY: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2017. xx, 904 pages p.
52. Hayashi Y, Ishii Y, Hata-Suzuki M, Arai R, Chibana K, Takemasa A, et al. Comparative analysis of circulating dendritic cell subsets in patients with atopic diseases and sarcoidosis. *Respir Res.* 2013;14:29.
53. Jimenez F, Quinones MP, Martinez HG, Estrada CA, Clark K, Garavito E, et al. CCR2 plays a critical role in dendritic cell maturation: possible role of CCL2 and NF-kappa B. *J Immunol.* 2010;184(10):5571-81.
54. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(6):313-26.
55. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest.* 2007;117(4):902-9.
56. Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 2002;13(6):455-81.
57. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology.* 2008;180(9):5771-7.
58. Ornitz DM. FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays.* 2000;22(2):108-12.
59. Ostrowski SR, Sorensen AM, Windelov NA, Perner A, Welling KL, Wanscher M, et al. High levels of soluble VEGF receptor 1 early after trauma are associated with shock, sympathoadrenal activation, glycocalyx degradation and inflammation in severely injured patients: a prospective study. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2012;20:27.
60. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer.* 2011;2(12):1097-105.

61. Yang Y, Haeger SM, Suflita MA, Zhang F, Dailey KL, Colbert JF, et al. Fibroblast Growth Factor Signaling Mediates Pulmonary Endothelial Glycocalyx Reconstitution. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;56(6):727-37.
62. Jantsch J, Schatz V, Friedrich D, Schroder A, Kopp C, Siegert I, et al. Cutaneous Na⁺ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense. *Cell Metab.* 2015;21(3):493-501.
63. Yi B, Titze J, Rykova M, Feuerecker M, Vassilieva G, Nichiporuk I, et al. Effects of dietary salt levels on monocytic cells and immune responses in healthy human subjects: a longitudinal study. *Transl Res.* 2015;166(1):103-10.
64. Zhou X, Zhang L, Ji WJ, Yuan F, Guo ZZ, Pang B, et al. Variation in dietary salt intake induces coordinated dynamics of monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates in humans: implications in end organ inflammation. *PLoS One.* 2013;8(4):e60332.
65. Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, et al. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature.* 2013;496(7446):513-7.
66. Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakana H, Yosef N, Linker RA, et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature.* 2013;496(7446):518-22.
67. Hernandez AL, Kitz A, Wu C, Lowther DE, Rodriguez DM, Vudattu N, et al. Sodium chloride inhibits the suppressive function of FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Clin Invest.* 2015;125(11):4212-22.
68. Burgon J, Robertson AL, Sadiku P, Wang X, Hooper-Greenhill E, Prince LR, et al. Serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 regulates neutrophil clearance during inflammation resolution. *J Immunol.* 2014;192(4):1796-805.
69. Schierke F, Wyrwoll MJ, Wisdorf M, Niedzielski L, Maase M, Ruck T, et al. Nanomechanics of the endothelial glycocalyx contribute to Na⁽⁺⁾-induced vascular inflammation. *Sci Rep.* 2017;7:46476.
70. Pollara J, Edwards RW, Lin L, Bendersky VA, Brennan TV. Circulating mitochondria in deceased organ donors are associated with immune activation and early allograft dysfunction. *JCI Insight.* 2018;3(15).

71. Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry A*. 2009;75(6):475-81.
72. Abel G, Szollosi J, Fachel J. Phagocytosis of fluorescent latex microbeads by peritoneal macrophages in different strains of mice: a flow cytometric study. *Eur J Immunogenet*. 1991;18(4):239-45.
73. Gu BJ, Sun C, Fuller S, Skarratt KK, Petrou S, Wiley JS. A quantitative method for measuring innate phagocytosis by human monocytes using real-time flow cytometry. *Cytometry A*. 2014;85(4):313-21.
74. Bitzinger DI, Schlachetzki F, Lindner R, Trabold B, Dittmar MS. Flow-cytometric measurement of respiratory burst in rat polymorphonuclear granulocytes: Comparison of four cell preparation procedures, and concentration-response evaluation of soluble stimulants. *Cytometry A*. 2008;73(7):643-50.
75. Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Pillars Article: Flow Cytometric Studies of Oxidative Product Formation by Neutrophils: A Graded Response to Membrane Stimulation. *J. Immunol*. 1983. 130: 1910-1917. *J Immunol*. 2016;197(3):683-90.
76. Nordenfelt P. Quantitative assessment of neutrophil phagocytosis using flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 2014;1124:279-89.
77. Davis RE, Sharma S, Conceicao J, Carneiro P, Novais F, Scott P, et al. Phenotypic and functional characteristics of HLA-DR(+) neutrophils in Brazilians with cutaneous leishmaniasis. *J Leukoc Biol*. 2017;101(3):739-49.
78. Grange C, Letourneau J, Forget MA, Godin-Ethier J, Martin J, Liberman M, et al. Phenotypic characterization and functional analysis of human tumor immune infiltration after mechanical and enzymatic disaggregation. *J Immunol Methods*. 2011;372(1-2):119-26.
79. Chung S, Son GH, Kim K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(5):581-91.
80. Parks KR, Davis JM. Epinephrine, cortisol, endotoxin, nutrition, and the neutrophil. *Surg Infect (Larchmt)*. 2012;13(5):300-6.
81. Li LB, Leung DY, Goleva E. Activated p38 MAPK in Peripheral Blood Monocytes of Steroid Resistant Asthmatics. *PLoS One*. 2015;10(10):e0141909.

82. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect.* 2013;2(9):e60.
83. Ushiyama A, Kataoka H, Iijima T. Glycocalyx and its involvement in clinical pathophysiologies. *J Intensive Care.* 2016;4(1):59.
84. Henke C, Marineili W, Jessurun J, Fox J, Harms D, Peterson M, et al. Macrophage production of basic fibroblast growth factor in the fibroproliferative disorder of alveolar fibrosis after lung injury. *Am J Pathol.* 1993;143(4):1189-99.
85. Laplante P, Brillant-Marquis F, Brissette MJ, Joannette-Pilon B, Cayrol R, Kokta V, et al. MFG-E8 Reprogramming of Macrophages Promotes Wound Healing by Increased bFGF Production and Fibroblast Functions. *J Invest Dermatol.* 2017;137(9):2005-13.
86. Uchimido R, Schmidt EP, Shapiro NI. The glycocalyx: a novel diagnostic and therapeutic target in sepsis. *Crit Care.* 2019;23(1):16.
87. Milford EM, Reade MC. Resuscitation Fluid Choices to Preserve the Endothelial Glycocalyx. *Crit Care.* 2019;23(1):77.
88. Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW, Ayoub SS. *Fundamentals of Inflammation.* Cambridge: Cambridge University Press,; 2010. Available from: <https://doi.org/10.1017/CBO9781139195737> Accès réservé UdeM
Conditions d'utilisation: http://www.bib.umontreal.ca/ca/conditions-utilisation-fiche_004.pdf.
89. Liu XS, Luo ZH, Yang ZC, Huang WH, Li AN. The significance of changes in serum tumour necrosis factor (TNF) activity in severely burned patients. *Burns.* 1994;20(1):40-4.
90. Lv S, Han M, Yi R, Kwon S, Dai C, Wang R. Anti-TNF-alpha therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis. *Int J Clin Pract.* 2014;68(4):520-8.
91. Avendano-Ortiz J, Maroun-Eid C, Martin-Quiros A, Toledano V, Cubillos-Zapata C, Gomez-Campelo P, et al. PD-L1 Overexpression During Endotoxin Tolerance Impairs the Adaptive Immune Response in Septic Patients via HIF1alpha. *J Infect Dis.* 2018;217(3):393-404.
92. Shao R, Fang Y, Yu H, Zhao L, Jiang Z, Li CS. Monocyte programmed death ligand-1 expression after 3-4 days of sepsis is associated with risk stratification and mortality in septic patients: a prospective cohort study. *Crit Care.* 2016;20(1):124.

93. Patera AC, Drewry AM, Chang K, Beiter ER, Osborne D, Hotchkiss RS. Frontline Science: Defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1. *J Leukoc Biol.* 2016;100(6):1239-54.
94. Chang K, Svabek C, Vazquez-Guillamet C, Sato B, Rasche D, Wilson S, et al. Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit Care.* 2014;18(1):R3.
95. Shindo Y, McDonough JS, Chang KC, Ramachandra M, Sasikumar PG, Hotchkiss RS. Anti-PD-L1 peptide improves survival in sepsis. *J Surg Res.* 2017;208:33-9.

Annexes

Annexe 1 – Données supplémentaires

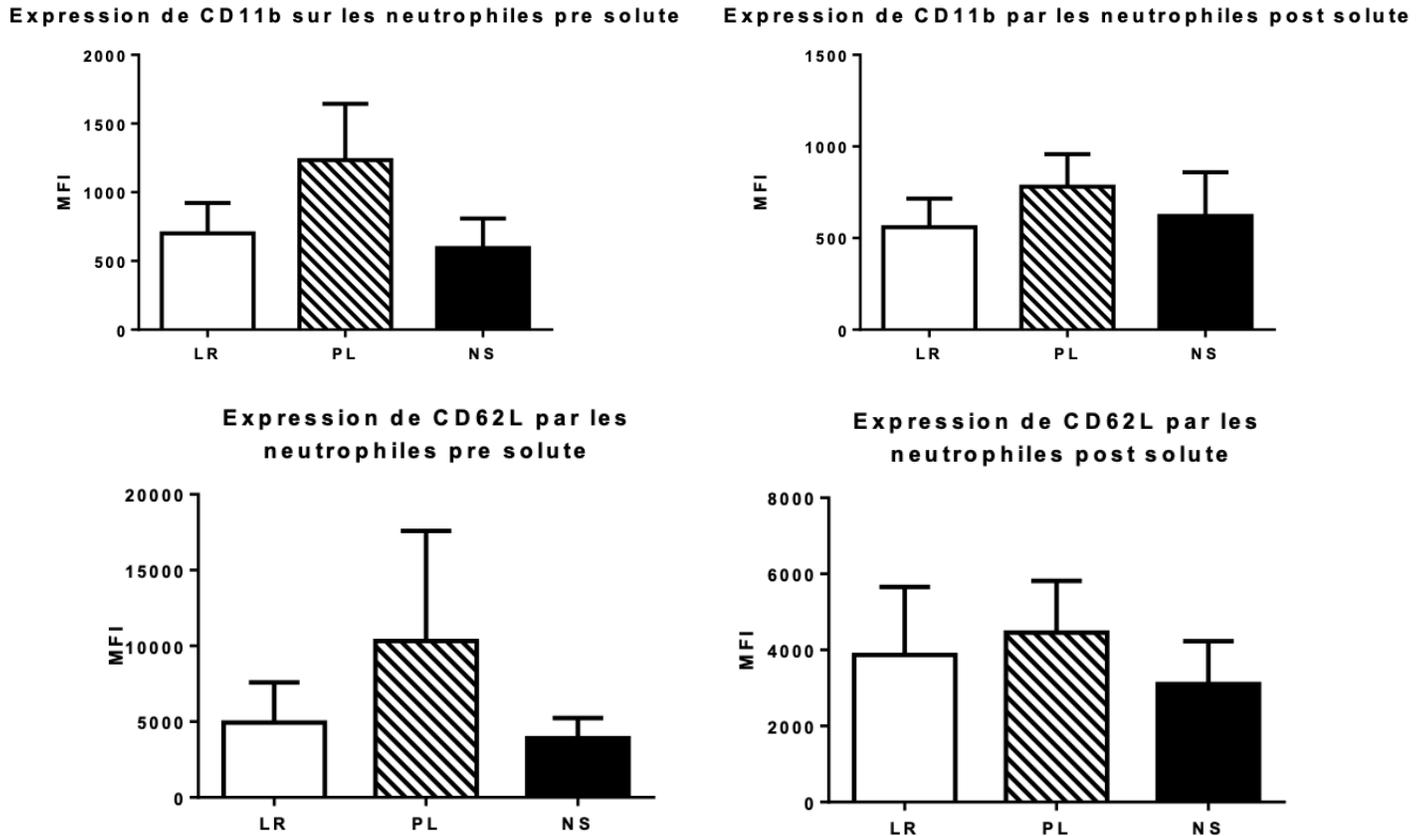


Figure 14. – Expression des marqueurs d'activation sur les neutrophiles pré et post solutés

Haut : Expression de CD11b par les neutrophiles circulants pré- et post-soluté.

Bas : Expression de CD62L par les neutrophiles circulants pré- et post- soluté.

Étant donné que la fluorescence des marqueurs est très variable lors des différentes expériences sur le cytomètre de flux, lors de l'analyse, les paires de mesures (pré-post-soluté) de chaque expérience ont servi à créer un ratio d'expression post-/pré- soluté afin de minimiser cette variabilité.

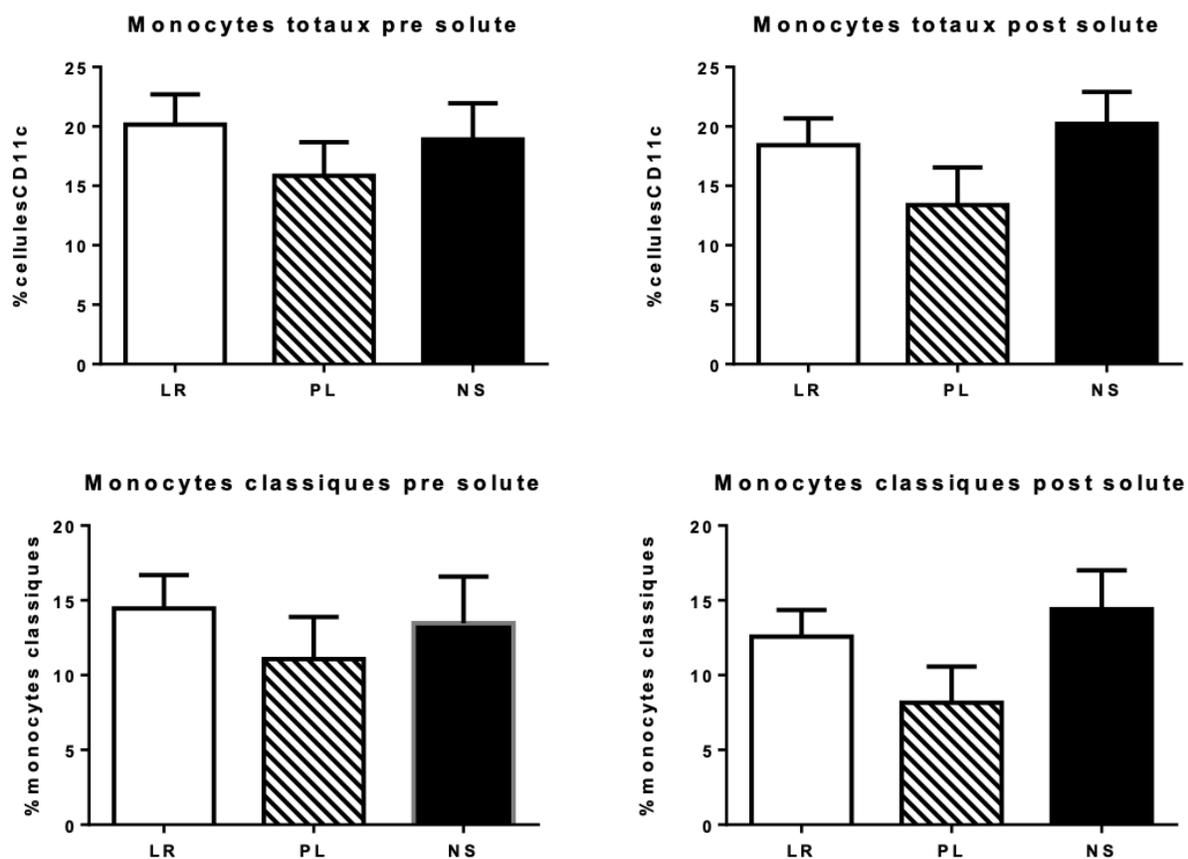


Figure 15. – Proportions de monocytes totaux et classiques pré- et post-soluté

Haut : Pourcentage de monocytes totaux (CD11c⁺) parmi les PBMC vivantes pré-soluté et post-soluté.

Bas : Pourcentage de monocytes classiques (CD11c⁺CD14⁺CD16⁻) parmi les PBMC vivantes pré-soluté et post-soluté.

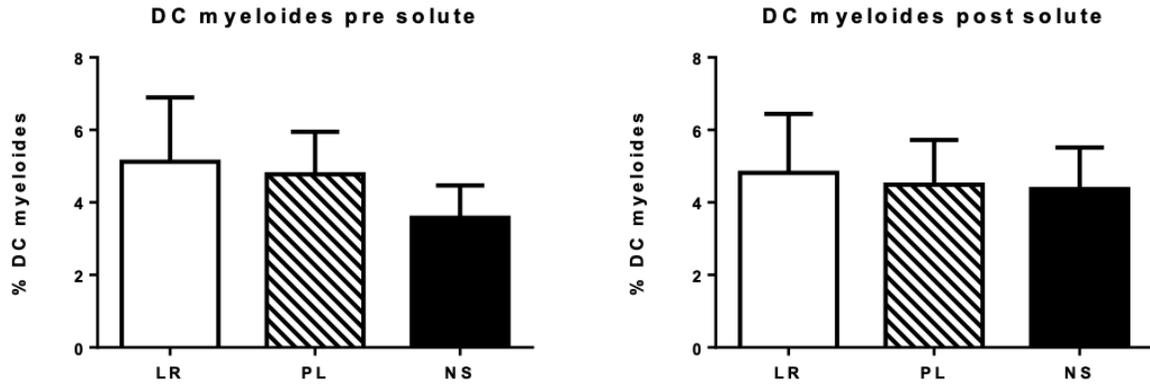


Figure 16. – Proportions de cellules dendritiques myéloïdes pré- et post-soluté

Pourcentage de cellules dendritiques myéloïdes (CD3⁻CD14⁺HLA-DR⁺CD11c⁺) pré-soluté et post-soluté par rapport aux PBMC vivantes.

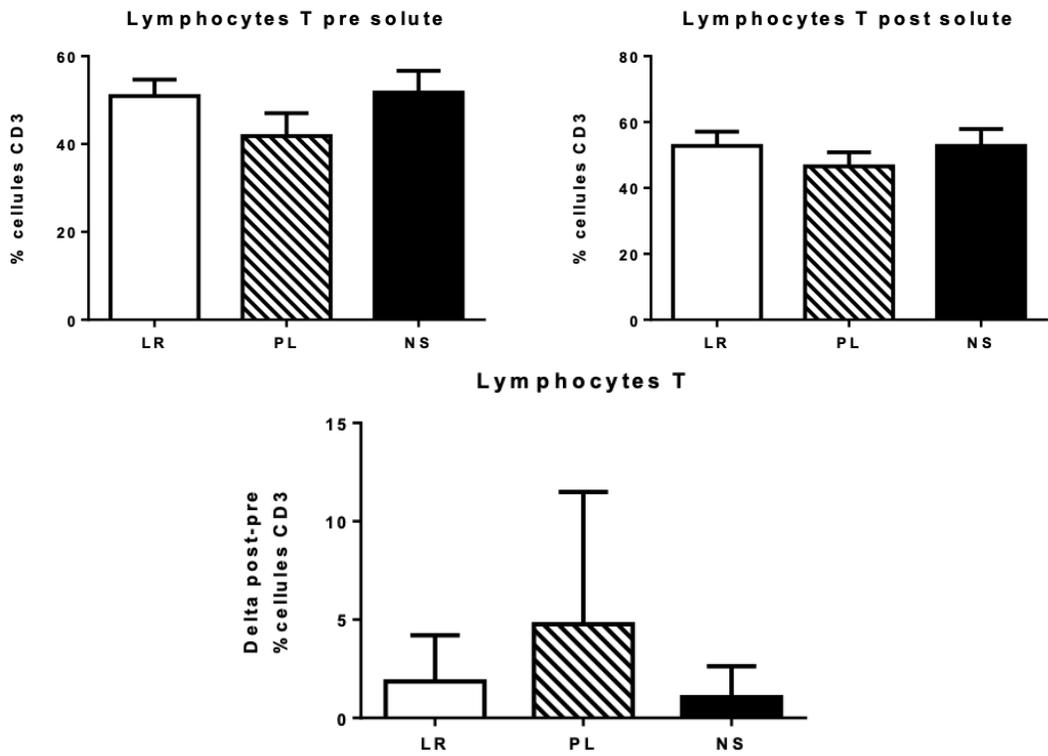


Figure 17. – Effet des solutés sur les lymphocytes T

Haut : Pourcentages de lymphocytes T (CD3⁺) pré- et post-soluté par rapport aux PBMC vivantes.
 Bas : Delta post-pré soluté des pourcentages de lymphocytes T.

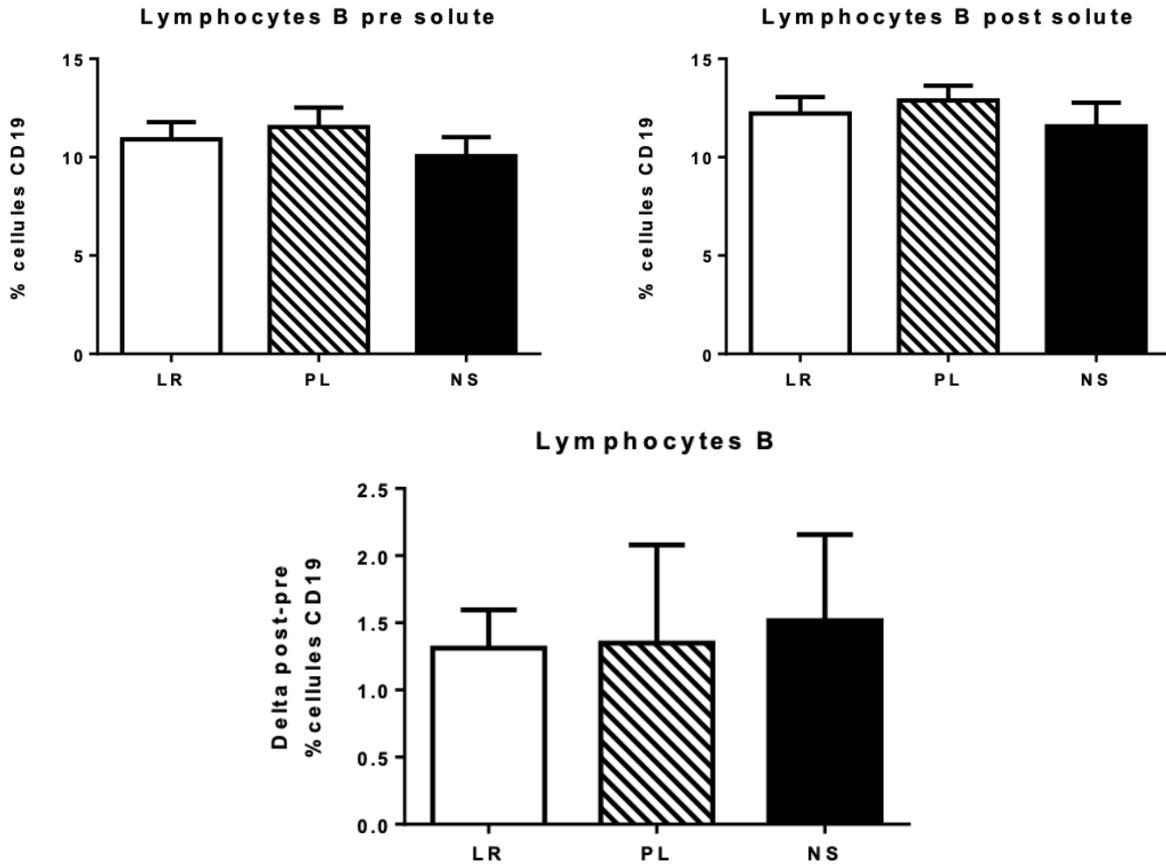


Figure 18. – Effet des solutés sur les lymphocytes B

Haut : Pourcentages de lymphocytes B (CD3⁻CD14⁻CD56⁻CD19⁺) pré- et post- soluté par rapport aux PBMC vivantes.

Bas : Delta post-pré soluté des pourcentages de lymphocytes B.

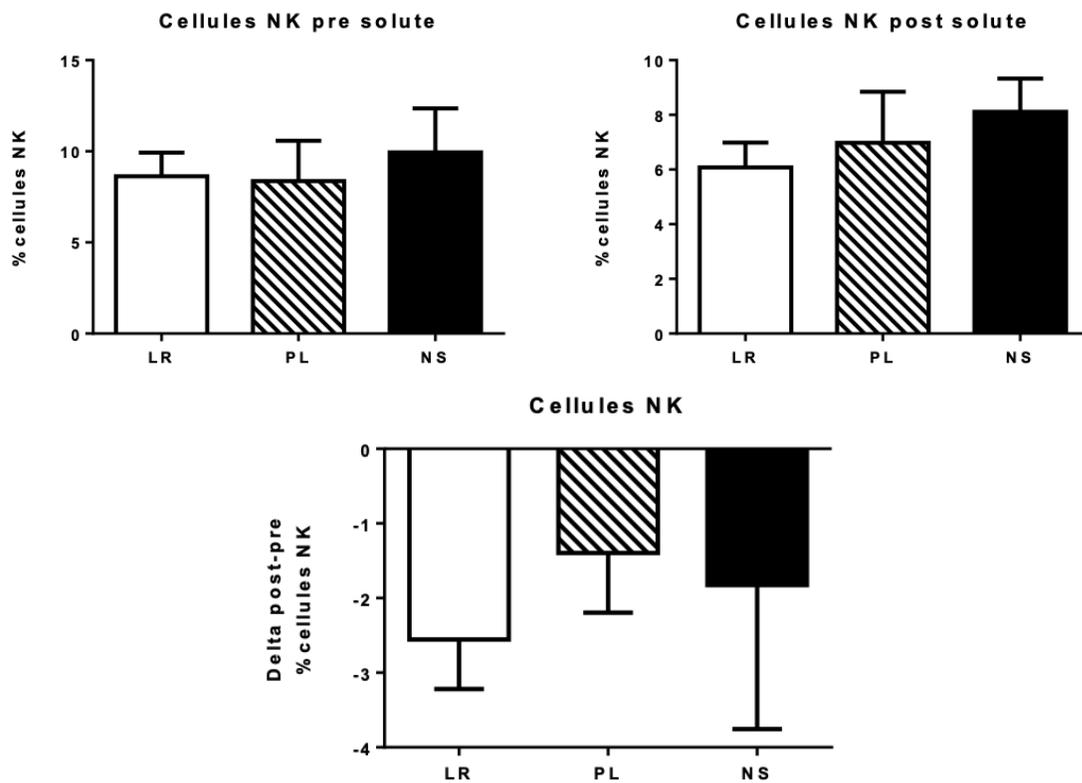
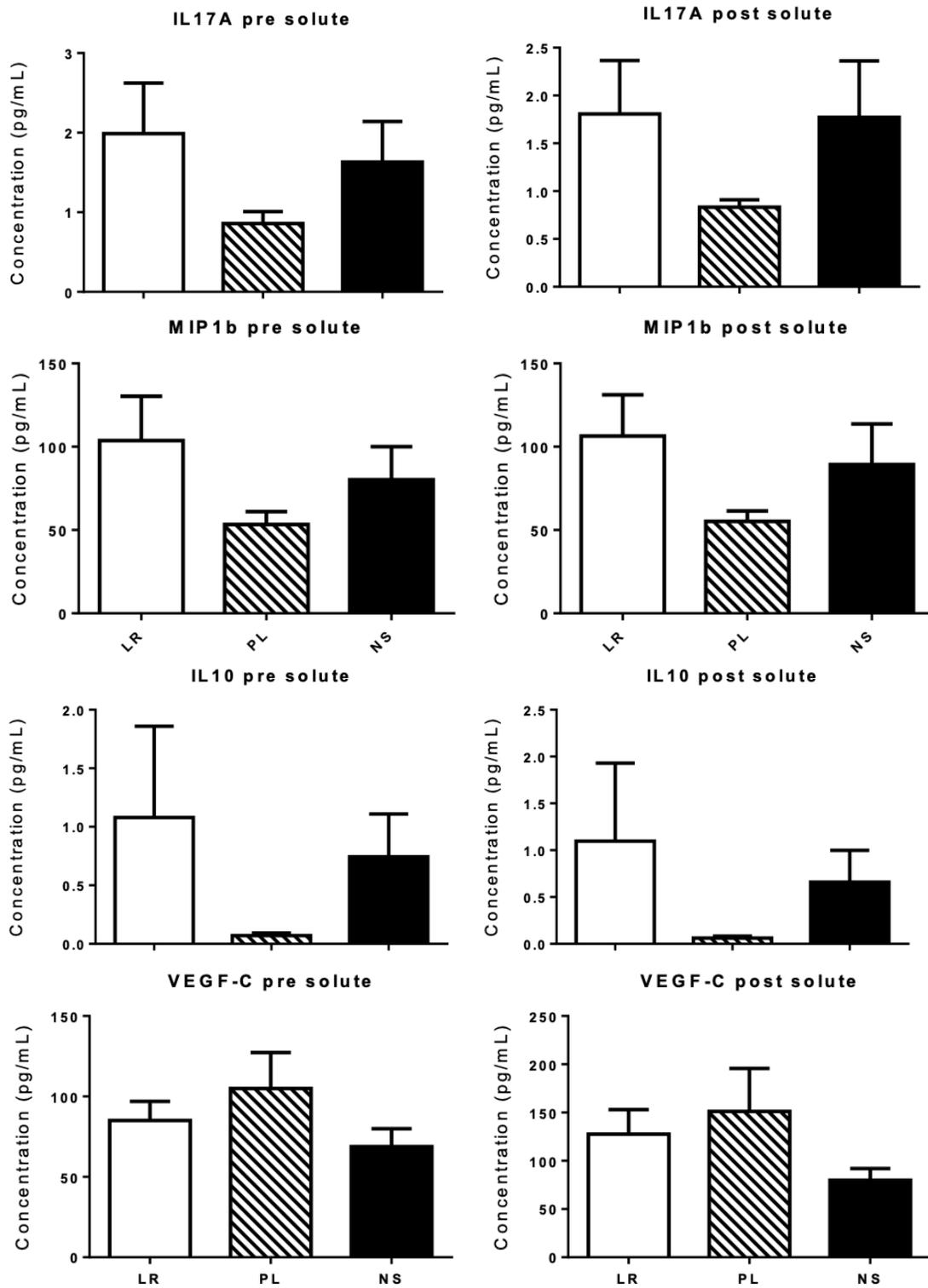


Figure 19. – Effets des solutés sur les lymphocytes NK

Haut : Pourcentages de lymphocytes NK ($CD3^+CD19^-CD14^-CD16^+CD56^+$) pré- et post- soluté par rapport aux PBMC vivantes.

Bas : Delta post-pré soluté des pourcentages de lymphocytes NK.



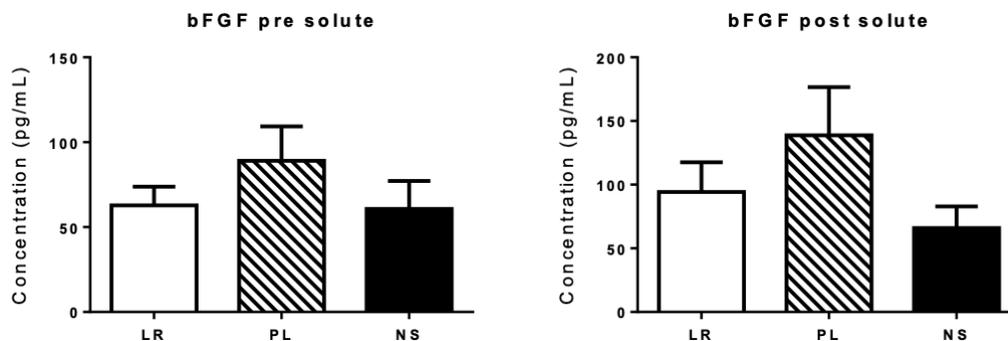


Figure 20. – Concentrations plasmatiques des cytokines pré- et post-soluté

De haut en bas :

- Concentrations pré- et post- soluté de la cytokine pro-inflammatoire IL17A.
- Concentrations pré- et post- soluté de la chimiokine pro-inflammatoire MIP-1 β .
- Concentrations pré- et post- soluté de la cytokine anti-inflammatoire IL10.
- Concentrations pré- et post- soluté de la cytokine pro-angiogénique VEGF-C.
- Concentrations pré- et post- soluté de la cytokine pro-fibrotique bFGF.

Les niveaux de base de certaines cytokines variaient de façon importante entre les groupes. Cela semble être dû au fait que les niveaux de cytokines obtenus varient beaucoup entre les individus et même entre les échantillons pris à différents moments pour le même individu. Afin de minimiser l'impact de ces variations, l'analyse des cytokines a été faite avec la moyenne des ratios de la valeur post-soluté sur la valeur pré-soluté pour chaque couple de donnée plutôt que des deltas qui peuvent être influencés par l'ordre de grandeur des valeurs.

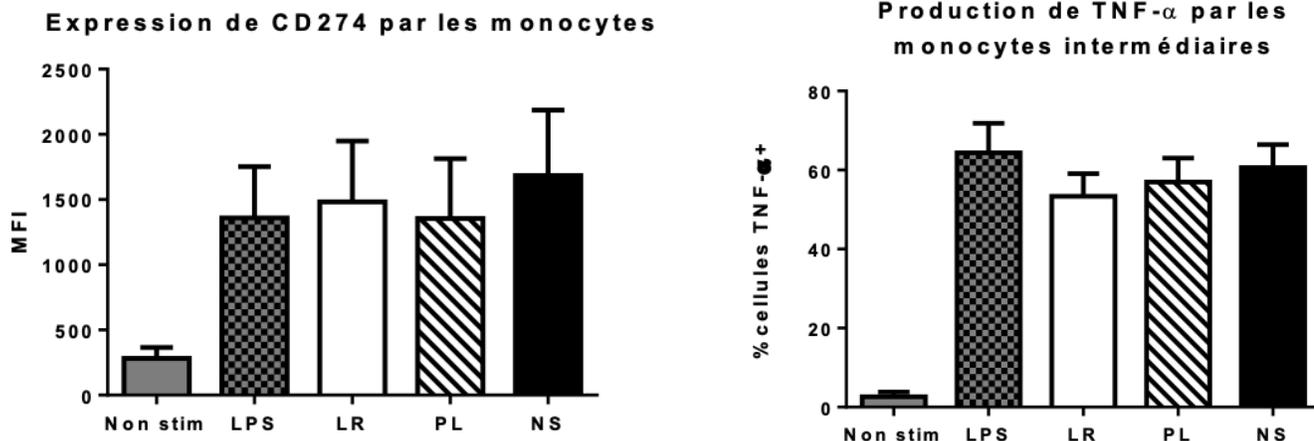


Figure 21. – Effet des solutés sur l'état d'activation des monocytes

À gauche : Quantification de l'effet des solutés sur l'expression de CD274 par les monocytes. Elle augmente nettement après la stimulation au LPS (MFI LPS= 1360; MFI Non stim=282). Alors que l'expression de CD274 reste stable après le LR (MFI=1482) et le PL (MFI=1355) par rapport au LPS seul, l'ajout de NS semble augmenter son expression (MFI=1684).

À droite : Quantification de l'effet des solutés sur la production de TNF- α par les monocytes intermédiaires. Elle augmente nettement après la stimulation au LPS (% LPS=64,4%; %Non stim=2,7%). Alors que la proportion de cellules TNF- α ⁺ diminue après le LR (%LR=53,3%) et le PL (%PL=57,0%) par rapport au LPS seul, l'ajout de NS semble maintenir cette proportion stable (%NS=60,7%).

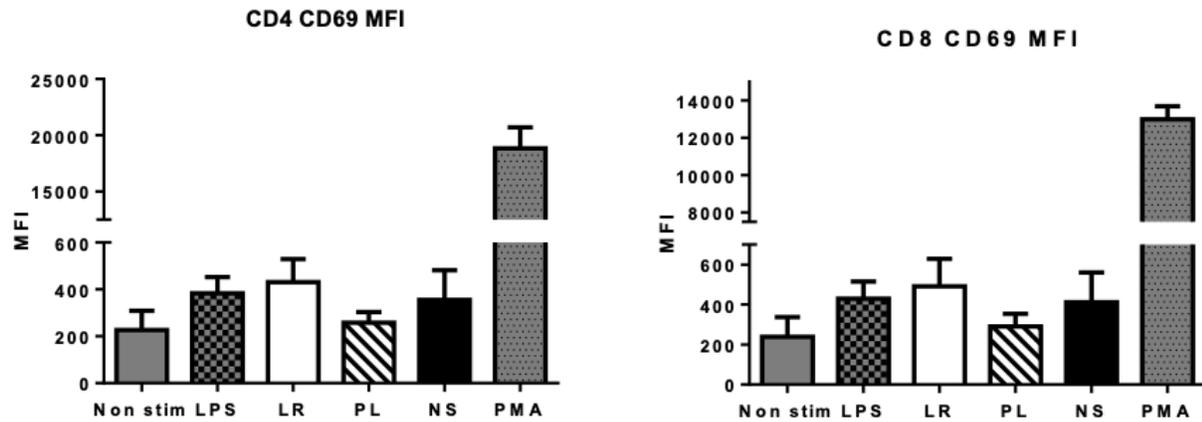


Figure 22. – Effet des solutés sur l'état d'activation des lymphocytes T

À gauche : Quantification de l'effet des solutés sur l'expression de CD69 par les lymphocytes T CD4. Elle augmente nettement après la stimulation au LPS (MFI LPS= 383,8; MFI Non stim=226). Alors que l'expression de CD69 reste stable après le LR (MFI=430,3) et le NS (MFI=355,0) par rapport au LPS seul, l'ajout de PL semble diminuer son expression (MFI=258,3).

À droite : Quantification de l'effet des solutés sur l'expression de CD69 par les lymphocytes T CD8. Elle augmente nettement après la stimulation au LPS (MFI LPS=429,3; MFI Non stim=238,6). Alors que l'expression de CD69 reste stable après le LR (MFI=491,3) et le NS (MFI=411,8) par rapport au LPS seul, l'ajout de PL semble diminuer son expression (MFI=290,5).

Annexe 2 – Tableaux

DONNÉE	UNITÉS	DONNÉE	UNITÉS
BIOCHIMIE GÉNÉRALE			
Hémolyse	Positif/négatif	Calcium total corrigé	mmol/L
Ictère	Positif/négatif	Osmolalité calculée	mmol/Kg
Lipémie	Positif/négatif	Acide urique	μmol/L
Albumine	g/L	Chlorure	mmol/L
Co₂ total	mmol/L	Magnésium	mmol/L
Créatinine	μmol/L	Gap anionique	mmol/L
Glucose	mmol/L	Débit filt. Glom. Calc.¹	ml/min
Phosphore	mmol/L	GAZ VEINEUX	
Potassium	mmol/L	Pco₂ veineux	mmHG
Urée	mmol/L	Po₂	mmHG
Sodium	mmol/L	Hco₃ actuel	mmol/L
Calcium total		Sat. O₂ veineux²	%

Débit filt. glom. calc. : Débit de filtration glomérulaire calculé

Sat. O₂ Veineux : Saturation veineuse en oxygène

Tableau 2. – Liste des données biochimiques analysées par les laboratoires du CHUM

ANTICORPS*	FLUOROCHROME	NUMÉRO DE LOT	VOLUME PAR RÉACTION (μ L)
CD11b	APC-CY7	7082517	0,3125
CD14	PERCP CY5.5	7145710	0,625
CD16	PECF594	7137681	0,156
CD33	APC	7075567	1,67
CD66b	PE	7096813	1,25
HLA-DR	PE CY7	7159873	0,3125
CD62L	BV421	6300729	0,156
CD10	BUV395	5357956	0,375
Live/dead**	Aqua		0,5

*Tous les anticorps proviennent de BD Biosciences.

** Le live/dead n'est pas un anticorps, mais un marqueur de mortalité cellulaire

Tableau 3. – Panel d'anticorps pour le phénotypage des neutrophiles par cytométrie en flux

ANTICORPS	FLUOROCHROME	NUMÉRO DE LOT	VOLUME PAR RÉACTION (μ L)
CD3	AF700	7145618	0,625
CD4	V450	7080517	1,250
CD8	APC-H7	7354859	1,250
CD25	APC	7094883	5,000
CD69	PerCP.Cy5.5	7152760	2,500
CD62L	PE-CF594	7138843	0,625
CD45RA	FITC	7055682	5,000
CCR7	PECy7	7306715	1,250
CD278	PE	6183847	20
Live/dead	Aqua		0,500

Tableau 4. – Panel 1(Lymphocytes T)

ANTICORPS	FLUOROCHROME	NUMÉRO DE LOT	VOLUME PAR RÉACTION (μ L)
CD3	AF700	7145618	0,625
CD4	FITC	4118723	2,500
CD8	APC-H7	7354859	1,250
CD25	PerCP.Cy5.5	4220904	0,625
CD279	Pe	4237589	10,000
CD127	PE-CF594	4283836	5,000
Live/dead	Aqua		0,500
<i>FoxP3</i>	V450	4073636	5,000
<i>CD152</i>	APC	4261686	5,000

En italique : marqueurs intracellulaires (suivant la perméabilisation)

Tableau 5. – Panel 2 (Lymphocytes Treg)

ANTICORPS	FLUOROCHROME	NUMÉRO DE LOT	VOLUME PAR RÉACTION (μ L)
CD3	AF700	7145618	0,625
CD4	V450	7080517	1,250
CD8	APC-H7	7354859	1,250
Live/dead	Aqua		0,500
<i>Granzyme B</i>	FITC	7097563	20,000
<i>IL4</i>	APC	7277582	5,000
<i>IL17A</i>	PE	7097563	10,000
<i>IFNγ</i>	PE-CF954	7277582	0,625

En italique : marqueurs intracellulaires (suivant la perméabilisation)

Tableau 6. – Panel 3 (Lymphocytes T et cytokines)

ANTICORPS	FLUOROCHROME	NUMÉRO DE LOT	VOLUME PAR RÉACTION (μL)
CD3	AF700	7145618	0,625
HLA-DR	PECy7	7159873	0,31
CD19	PE	5020997	10,00
CD56	FITC	7258613	0,63
CD11b	APC-Cy7	7082517	0,3125
CD16	PE-CF594	7137681	0,156
CD11c	V450	7069867	0,156
CD14	PerCP.Cy5.5	7145710	0,625
CD33	APC	7207567	0,625
Live/dead	Aqua		0,500

Tableau 7. – Panel 4 (Populations de leucocytes)

ANTICORPS	FLUOROCHROME	NUMÉRO DE LOT	VOLUME PAR RÉACTION (μL)
CD86	AF700	7047748	2,500
CD11c	V450	7069867	0,156
CD80	APC-H7	7201899	5,000
CD66b	PE	7096813	1,25
CD14	PerCP Cy5.5	7145710	0,625
CD16	PeCF594	7137681	0,156
CD206	FITC	6308887	10,000
CD274	PECy7	7033968	1,250
CD23	APC	7107921	2,500
Live/dead	Aqua		0,500

Tableau 8. – Panel 5 (Monocytes)

ANTICORPS	FLUOROCHROME	NUMÉRO DE LOT	VOLUME PAR RÉACTION (µL)
CD11c	V450	7069867	0,156
CD14	PerCP Cy5.5	7145710	0,625
CD16	PeCF594	7137681	0,156
Live/dead	Aqua		0,500
TNF-α	APC		2,000

En italique : marqueur intracellulaire (suivant la perméabilisation)

Tableau 9. – Panel 5.2 (Monocytes et TNF-α)

ANTICORPS	FLUOROCHROME	NUMÉRO DE LOT	VOLUME PAR RÉACTION (µL)
CD3	FITC	6285760	5,000
CD14	FITC	7062641	2,500
CD56	FITC	7258613	0,63
CD38	PE	6321886	10,000
CD43	APC	7264516	5,000
CD11b	V450	7062807	0,625
IgD	PE-CF594	7124614	2,500
CD19	PerCP.Cy5.5	7243677	1,250
CD24	PECy7	7270908	1,25
CD27	AF 700	7313708	1,250
CD20	APC-H7	7285657	1,250
Live/dead	Aqua		0,500

Tableau 10. – Panel 6 (Lymphocytes B)

IFN- γ	IL-1 β	IL-2	IL-4
IL-6	IL-8	IL-10	IL-12p70
IL-13	TNF- α	IL-5	IL-7
GM-CSF	IL-1 α	IL-16	IL-17A
IL-12/IL-23p40	IL-15	Eotaxin	MIP-1 β
TNF- β	VEGF-A	IP-10	MIP-1 α
Eotaxin-3	TARC	MDC	MCP-4
IL-8(HA)	MCP-1	SAA	CRP
VEGF-C	VEGF-D	Tie-2	Flt-1
VCAM-1	ICAM-1	PlGF	bFGF

Tableau 11. – Liste des cytokines, chimiokines et facteurs solubles périphériques détectables par Multiplex MSD

Annexe 3 : Solutions

INGRÉDIENTS	CONCENTRATION (mM)	g/1000 ml
NaCl	138	8
KCl	5	0,373
Na ₂ HPO ₄	0,34	0,048
KH ₂ PO ₄	0,4	0,054
NaHCO ₃	4,2	0,353
Glucose	5,6	1,110
Hepes	10	2,383
Citrate de sodium	12,9	3,794
Dextran	250	30

Tableau 12. – Solution de Dextran 3%

INGRÉDIENTS	CONCENTRATION (% VOLUME TOTAL)	VOL/500 ml
RPMI 1640	85%	425ml
FBS (OU SÉRUM AUTOLOGUE)	10%	50ml
PEN/STREP	1%	5ml
L-GLUTAMINE	1%	5ml
ACIDES AMINÉS NON-ESSENTIELS	1%	5ml
HEPES	1%	5ml
PYRUVATE DE SODIUM	1%	5ml
β-MERCAPTOÉTHANOL	0,01%	50µl

Tableau 13. – Milieu R10

INGRÉDIENTS	CONCENTRATION (% VOLUME TOTAL)	g/100 ml
PBS 1X	-	-
BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA)	0,5%	0,500
AZIDE DE SODIUM	0,1%	0,100

Tableau 14. – FACS Buffer