

Université de Montréal

**Interaction entre ventilation mécanique et traumatisme à la
moelle épinière: réponses inflammatoires pulmonaires et
médullaires**

par

Karine Truflandier

Département Sciences-Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Docteur
En Sciences Biomédicales

02 Septembre 2014

© Karine Truflandier, 2014 Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Interaction entre ventilation mécanique et traumatisme à la moelle épinière : réponses
inflammatoires pulmonaires et médullaires**

Présentée par :

Karine Truflandier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jadranka Spahija, directrice de recherche
Dr. Éric Beaumont, co-directeur
Dr. Karim Maghni, co-directeur
Dr. Simon Rousseau, examinateur externe
Dr. Emmanuelle Brochiero, examinateur interne
Dr. Yves Berthiaume, président du jury

Résumé

Le traumatisme de la moelle épinière est à l'origine d'une inflammation locale importante caractérisée par l'augmentation massive des cellules inflammatoires et la présence de réactions oxydatives. Cette inflammation locale peut déclencher une réponse inflammatoire systémique par voie hématogène. Au niveau cervical, les lésions médullaires peuvent entraîner des faiblesses ou la paralysie des muscles respiratoires. Le patient, qui ne peut plus respirer de façon autonome, doit avoir recours à un support respiratoire. Bien que la ventilation mécanique soit la thérapie traditionnellement appliquée aux blessés médullaires souffrant d'insuffisance respiratoire, les études ont démontré qu'elle pouvait contribuer à promouvoir une réponse inflammatoire ainsi que des dommages pulmonaires. L'interaction entre le traumatisme médullaire et la ventilation mécanique, indispensable au maintien de l'équilibre des échanges respiratoires, est inconnue à ce jour. En voulant protéger les tissus, cellules et organes, l'organisme met en œuvre toute une panoplie de réponses inflammatoires à différents endroits. Nous pensons que ces réponses peuvent être altérées via l'interaction entre ce traumatisme et cette ventilation mécanique, sous l'influence de la principale source cellulaire de cytokines pour la défense de l'hôte, le macrophage, récemment classé en deux phénotypes principaux: 1) l'activation classique de type M1 et 2) l'activation alternative de type M2. Le phénotype M1 est conduit par le facteur GM-CSF et induit par l'interféron IFN- γ ainsi que le lipopolysaccharide. Le phénotype M2 quant à lui, est conduit par le facteur M-CSF et induit par les interleukines IL-4, IL-13 ou IL-21. M1 relâche principalement IL-1 β , IL-6, TNF- α et MIP-1 α tandis que M2 principalement IL-10 et MCP-1. Toutefois, nous ignorons actuellement par quel type d'activation se manifestera cette réponse immunitaire et si l'application de support respiratoire pourrait entraîner un risque inflammatoire additionnel au site du traumatisme. Nous ignorons également si la ventilation mécanique affecterait, à distance, les tissus de la moelle épinière via une inflammation systémique et amplifierait alors le dommage initial. Il n'existe pas à ce jour, de thérapie qui ait montré d'effet bénéfique réel envers une récupération fonctionnelle des

patients blessés médullaires. Il paraît donc essentiel de déterminer si la ventilation mécanique peut moduler l'inflammation post-traumatique à la fois au niveau pulmonaire et au site de la lésion.

Ce travail visait à caractériser les liens entre l'inflammation issue du traumatisme médullaire et celle issue de la ventilation, dans le but de fournir une meilleure compréhension des mécanismes inflammatoires activés dans ce contexte. L'étude a été menée sur un modèle animal. Elle consistait à évaluer : 1) si le traumatisme médullaire influençait les réponses inflammatoires pulmonaires induites par la ventilation mécanique, y compris le phénotype des macrophages alvéolaires et 2) si la ventilation pouvait altérer à distance, les tissus de la moelle épinière. L'impact de la blessure médullaire sur l'inflammation pulmonaire et locale, induite par la ventilation fut interprété grâce à l'analyse des cellules inflammatoires dans les lavages broncho-alvéolaires et dans les tissus prélevés à l'endroit de la blessure après 24 heures. Ces analyses ont démontré un profil spécifique des cytokines pulmonaires et médullaires. Elles ont révélé que la ventilation mécanique a engendré un environnement pro-inflammatoire en faveur d'un phénotype M1 chez les animaux ayant bénéficié de la thérapie respiratoire. Inversement, l'atteinte thoracique chez les animaux sans ventilation, a montré qu'une réponse immunitaire avait été activée en faveur d'un environnement anti-inflammatoire de phénotype M2. La lésion cervicale quant à elle a induit un profil de cytokines différent et les réponses au stress oxydatif dans le poumon induites par la ventilation ont été réduites significativement. De plus, une lésion médullaire a augmenté l'expression d'IL-6 et la ventilation a diminué l'IL-1 β et augmenté le TNF- α dans les tissus de la moelle. Finalement, ces données ont fourni les premières évidences que la ventilation a induit d'avantage à un phénotype pulmonaire M1 et que le traumatisme médullaire a impacté spécifiquement les réponses inflammatoires et oxydatives dans le poumon. La ventilation a contribué non seulement à distance à une inflammation des tissus médullaires lésés mais aussi des tissus sains.

Mots-clés : Ventilation mécanique, traumatisme médullaire, interaction, inflammation, cytokines, macrophage, phénotype, stress oxydatif.

Abstract

Spinal cord injury is a major cause of excessive local inflammation characterized by a massive increase in inflammatory cells and oxidative reactions. It can also enhance systemic inflammatory response through the bloodstream. Cervical spinal cord lesions can result in respiratory failure due to weakness or paralysis of respiratory muscles and may lead a patient to require respiratory support. Although mechanical ventilation is the current therapy of choice applied to injured patients for respiratory insufficiency, evidence has shown that it can directly contribute to inflammatory response and lung damage. Currently, interplay between spinal cord injury and mechanical ventilation, essential to maintain the balance of respiratory exchanges, is unknown. To protect tissues, cells and organs, the body implements a wide range of inflammatory responses in various locations. We believe that the immune response can be modulated by this interplay under the influence of the main cellular source of cytokines for host defense; the macrophage. Macrophages have recently been classified into two phenotypes: 1) classical activation (M1) and 2) alternative activation (M2) and, as of today, it is unknown through which activation profile the immune response manifests itself. M1 phenotype is GM-CSF-driven, and also induced or primed by interferon- γ and lipopolysaccharide. In contrast, M2 phenotype is M-CSF-driven and induced also by IL-4 and IL-13 or IL-21. M1 release mainly IL-1 β , IL-6, TNF- α and MIP-1 α whereas M2 produce mainly IL-10 and MCP-1. The application of respiratory support may lead to an additional inflammatory risk to the injury site that may affect distal spinal cord tissues via the systemic inflammatory responses thus amplifying damage to the spine. There is currently no therapy which has shown beneficial effects towards a real functional recovery of spinal cord injury. It seems important to determine if and how mechanical ventilation may affect the post-traumatic inflammation in both lung and at injury site.

This work was aimed to better characterize the relationship between inflammation induced by a spinal cord injury and ventilation thus providing a deeper understanding of the

activated inflammatory mechanisms in this context. The study was conducted in an animal model and we wanted to evaluate: 1) if spinal cord injury impacts lung inflammatory responses induced by mechanical ventilation including alveolar macrophage phenotype and 2) determine whether mechanical ventilation may alter inflammatory responses of distal spine tissues. Interplay between spinal cord injury and inflammation-induced by mechanical ventilation on lung and local spine was interpreted through analyses of inflammatory cells in broncho-alveolar lavages and spinal cord tissues after 24 hours. These analyses have shown a specific cytokines profiles both in the lung and at local site of injury. It also revealed that the application of mechanical ventilation induced a pro-inflammatory environment favoring the M1 phenotype. Conversely, a thoracic spinal cord injury in non-ventilated animals, showed that an immune response had been activated favoring an anti-inflammatory environment M2 phenotype in the lung. Cervical lesion also induced a different cytokine profile and oxidative stress responses in the lung induced by ventilation have been reduced significantly. In addition, spinal cord injury induced pro-inflammatory cytokines IL-6 expression and mechanical ventilation has been decreased IL-1 β and increased TNF- α in spine tissues. In retrospect, this work provide the first evidence that ventilation induced a predominant M1 phenotype and that spinal cord injury modulated specific inflammatory and oxidative stress responses in the lung. In addition, mechanical ventilation not only contributed to local inflammation in distal spinal injured tissues but also in healthy tissues.

Keywords: Mechanical ventilation, spinal cord injury, interaction, inflammation, cytokines, macrophage, phenotype, oxidative stress.

Table des matières

CHAPITRE 1. INTRODUCTION	16
CHAPITRE 2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	20
2.1. LE TRAUMATISME DE LA MOELLE ÉPINIÈRE	21
2.1.1. Définition et classification.....	21
2.1.2. Conséquences fonctionnelles : altération du système nerveux.....	25
2.1.3. Conséquences inflammatoires post-traumatisme	38
2.2. LA VENTILATION MÉCANIQUE	49
2.2.1. Concepts de base	49
2.2.2. Complications : bio traumatisme pulmonaire.....	52
2.2.3. Propagation: inflammation systémique	58
2.2.4. Mécanismes responsables des complications pulmonaires	60
2.3. LE MACROPHAGE	67
2.3.1. Un rôle central	67
2.3.2. Différenciation et phénotype	78
CHAPITRE 3. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	83
CHAPITRE 4. MATÉRIEL ET MÉTHODES	86
4.1. MISE EN PLACE DU MODÈLE	87
4.1.1. Préparation des animaux.....	87
4.1.2. Ventilation mécanique.....	88
4.1.3. Contusion de la moelle épinière.....	89
4.2. MESURES ET ANALYSES PULMONAIRES	89
4.2.1. Euthanasie, lavages broncho-alvéolaires et prélèvements.....	89
4.2.2. Comptages cellulaires total et différentiel.....	90
4.2.3. Détermination des facteurs et des marqueurs de phénotype M1 et M2	92
4.2.4. Détermination des marqueurs des dommages pulmonaires	93
4.2.5. Évaluation des réponses oxydatives	93
4.3. MESURES ET ANALYSES DES TISSUS MÉDULLAIRES	94
4.3.1. Mesure des concentrations protéiques des échantillons de moelle épinière.....	94
4.3.2. Détermination des cytokines des tissus médullaires.....	95

4.4. ANALYSES STATISTIQUES.....	95
CHAPITRE 5. RÉSULTATS DES TRAVAUX DE RECHERCHE	97
5.1. RÉSULTATS DE LA MISE EN PLACE DU MODÈLE	98
5.1.1. <i>Choix des animaux vivants</i>	98
5.1.2. <i>Obstacles rencontrés</i>	100
5.2. RÉSULTATS DE L'ÉTUDE	104
5.2.1. <i>Résultats d'analyses au niveau du poumon</i>	104
5.2.2. <i>Résultats d'analyses au niveau de la moelle épinière</i>	113
CHAPITRE 6. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	117
CHAPITRE 7. CONCLUSIONS.....	138
CHAPITRE 8. BIBLIOGRAPHIE.....	141
CHAPITRE 9. ANNEXES	CLXI
9.1. CERTIFICATS COMITÉ D'ÉTHIQUES.....	CLXII
9.2. CURRICULUM VITAE	CLXIV
9.3. ARTICLE 1: MODULATION OF LUNG INFLAMMATORY MECHANISMS IN VENTILATED RATS IN RESPONSE TO SPINAL CORD INJURY.....	CLXIX
9.4. MECHANICAL VENTILATION IN HEALTHY LUNG CAN MODULATE INFLAMMATORY CYTOKINES EXPRESSION IN SPINAL CORD TISSUE.....	CXCVIII

Liste des tableaux

TABLEAU 1. RÉCAPITULATIF DES ANIMAUX UTILISÉS POUR L'ENSEMBLE DES EXPÉRIMENTATIONS.....	98
TABLEAU 2. RÉSUMÉ DES PARAMÈTRES VITAUX CHEZ LES ANIMAUX VENTILÉS ET NON-VENTILÉS MÉCANIQUEMENT.....	99
TABLEAU 3. COMPTAGE CELLULAIRE TOTAL ET DIFFÉRENTIEL ET MARQUEURS DE DOMMAGES PULMONAIRES.	106
TABLEAU 4. CYTOKINES ET CHIMIOKINES RELIÉES AUX POLARISATIONS SPÉCIFIQUES M1 ET M2.....	110
TABLEAU 5. EFFETS DE LA LÉSION ET DE LA VENTILATION MÉCANIQUE SUR L'EXPRESSION DES CYTOKINES DANS LA MOELLE ÉPINIÈRE.....	115

Liste des figures

FIGURE 1. SCHÉMAS ANATOMIQUES DE LA MOELLE ÉPINIÈRE ET DES VERTÈBRES	21
FIGURE 2. INNERVATION DES MUSCLES RESPIRATOIRES	22
FIGURE 3. ORGANISATION SCHÉMATIQUE DU SYSTÈME NERVEUX AUTONOME AU NIVEAU MÉDULLAIRE	25
FIGURE 4. LA SUPPRESSION IMMUNITAIRE LORS DE L'ACTIVATION DE LA CASCADE INFLAMMATOIRE	28
FIGURE 5. RÉSUMÉ SCHÉMATIQUE DES ÉTUDES SELON LE NIVEAU DE BLESSURE MÉDULLAIRE	30
FIGURE 6. ILLUSTRATION DU PLÉIOTROPISME ET DE LA REDONDANCE D'UN MACROPHAGE	35
FIGURE 7. CASCADE DES COMPOSANTS INTERACTIFS SUITE AU TRAUMATISME MÉDULLAIRE	39
FIGURE 8. ÉVOLUTION DANS LE TEMPS DE LA CASCADE INFLAMMATOIRE APRÈS UN TRAUMATISME MÉDULLAIRE	44
FIGURE 9. VENTILATION MÉCANIQUE ET RÉPONSE INFLAMMATOIRE	59
FIGURE 10. SCHÉMA SIMPLIFIÉ DE LA FORMATION DES ISOPROSTANES	63
FIGURE 11. DIFFÉRENTIATION DES MONOCYTES EN MACROPHAGES	70
FIGURE 12. ACTIVATION ET POLARISATION DES MACROPHAGES	78
FIGURE 13. NEUTROPHILES ET MACROPHAGES DANS LES POUMONS	105
FIGURE 14. EFFETS DE LA VM ET DE LA LÉSION MÉDULLAIRE SUR L'EXPRESSION DES CYTOKINES PULMONAIRES	108
FIGURE 15. LA VM INDUIT DES RÉPONSES OXYDATIVES	111
FIGURE 16. L'HÈME OXYGÉNASE-1 DANS LES EXTRAITS CELLULAIRES PULMONAIRES	113
FIGURE 17. EFFETS DE LA LÉSION ET DE LA VENTILATION MÉCANIQUE SUR L'EXPRESSION DES CYTOKINES DANS LA MOELLE ÉPINIÈRE	116
FIGURE 18. SCHÉMA HYPOTHÉTIQUE DE LA POLARISATION M1/M2 DU MACROPHAGE ALVÉOLAIRE DANS UN CONTEXTE DE VENTILATION MÉCANIQUE APRÈS UN TRAUMATISME MÉDULLAIRE	132

Liste des sigles et abréviations

AAM	macrophage activé de façon alternative (alternatively activated macrophage)
ACTH	Acétylcholine
ADN	acide désoxyribonucléique
AP	alcaline phosphatase
ASIA	association américaine de lésion médullaire (American Spinal Injury Association)
ATP	adénosine triphosphate
BSA	sérum bovin/albumine
Ca 2+	ion calcium
CAM	macrophage activé classiquement (classically activated macrophages)
CD163	récepteur membranaire d'anticorps CD163
CD115	récepteur membranaire d'anticorps
CD4+	lymphocytes T auxiliaires, (T helper)
Cl-	ion chlorure
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CO ₂ exp	dioxyde de carbone expiré
COX-2	isoenzyme 2 formant la cyclo-oxygénase
CXC	Chémokines
d	Diem (jour)
ELISA	immuno absorption enzymatique (Enzyme-linked Immune Sorbent Assay)
FIZZ	protéine sécrétée dans une zone inflammatoire (found in inflammatory zone protein)
GM-CSF	facteur stimulant la formation de colonies de granulocyte/macrophage (granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
GRO-KC	(growth related oncogene/keratinocyte-derived cytokine)
HO-1	hème oxygénase-1
HPA	axe hypothalamo-hypophysaire surrénalien
HRA	hyper réflexie autonome
IFN- γ	interféron gamma
IgG1	immuno globuline 1
IL-	interleukine
iNOS	oxyde nitrique synthétase (inducible nitric oxide synthetase)
IP-10	interféron gamma induit la protéine-10 (interferon gamma-induced protein-10)
IROs	intermédiaire réactifs de l'oxygène
JAK	Janus Kinase
LBA	lavage broncho-alvéolaire
LDL	Low Density Protein
LDH	lactate déshydrogénase
LPS	lipopolysaccharide

LT	Lymphocytes T
M1	macrophage de type 1
M2	macrophage de type 2
MCP-1	monocyte/protéine chimiotactique-1 (monocyte chemotactic protein-1)
M-CSF	facteur stimulant la formation de colonie de macrophages (macrophage colony-stimulating factor)
MIP-1 α	protéine-1 inflammatoire macrophage (macrophage inflammatory protein-1)
MIP-2	protéine-2 inflammatoire macrophage (macrophage inflammatory protein-2)
MMP-9	matrix metallo proteinase 9
Na ²⁺	ion sodium
NF κ B	protéine de la famille des facteurs de transcription (Nuclear factor kappa B)
NO	oxyde nitrique
PBS	solution tampon phosphate et saline
PEEP	pression positive de fin d'expiration (positive end expiratory pressure)
RELM	famille de protéines (resistin like molecule)
RhoA	famille Ras de gene homologue (Ras homolog gene family, member A)
RPM	rotation par minute (revolution per minute)
SCI	lésion médullaire (spinal cord injury)
SDOM	syndrome de défaillance d'organes multiple
SDRA	syndrome de détresse respiratoire aigu
SNA	système nerveux autonome
SNC	système nerveux central
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TLR	récepteur protéinique de classe toll (toll like receptors)
TNF- α	facteur de nécrose tumorale alpha (tumor necrosis factor alpha)
TNF- β	facteur de nécrose tumorale bêta (tumor necrosis factor beta)
VAC	ventilation assistée contrôlée
VM	ventilation mécanique
V _T	volume courant

Dédicace

À Guy, mon père, Éliane, ma mère, Adrien, mon grand-père et à mes grands-mères, Anne et Thérèse.

Vous êtes mes racines et la source de mes plus grandes inspirations.

Remerciements

Ce projet est l'aboutissement du travail conjoint de plusieurs personnes et je tiens à les remercier chaleureusement.

Je tiens à remercier tout d'abord les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail. Je les remercie pour l'intérêt et la considération apportés à ces travaux.

Je voudrais remercier du fond du cœur ma directrice de thèse, Madame le Docteur Jadranka Spahija pour m'avoir non seulement transmis sa passion pour la recherche mais aussi sa détermination et sa patience. Je la remercie de m'avoir entourée quelque fut le chemin emprunté dans ce milieu unique qu'est la recherche. Je la remercie également de m'avoir transmis sa passion pour l'enseignement. Ce fut un véritable privilège que d'enseigner ses cours de cardio-respiratoire à l'Université McGill lors de ces fameux hivers canadiens. J'en garde un souvenir impérissable. Enfin, je la remercie pour avoir toujours témoigné d'une grande confiance à mon égard et de m'avoir guidé par ses commentaires critiques. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Je voudrais également remercier Monsieur le Docteur Éric Beaumont pour la codirection de ce travail et sa présence tout au long de ce processus. Je lui suis particulièrement reconnaissante d'avoir partagé avec moi son expertise et ses connaissances en chirurgie. Je lui adresse mes plus sincères remerciements.

Je remercie Monsieur le Docteur Karim Maghni pour avoir codirigé également ce travail et sans qui je ne serais allée aussi loin dans ce beau projet. Je le remercie pour tout l'intérêt qu'il a voué à ce travail, pour sa confiance et ses judicieux conseils qui ont contribué considérablement à l'amélioration de ce travail. Je lui adresse ma profonde reconnaissance.

Je remercie Monsieur le Docteur Michel De Marchie et Madame le Docteur Emmanuelle Brochiero pour avoir accepté d'examiner ce manuscrit. Je leur exprime ma haute considération et tous mes remerciements.

Un merci du fond du cœur pour le travail méticuleux et l'aide experte de Madame Lucero Castellanos, Monsieur le Docteur Guy Rousseau et Madame Caroline Bouchard. Je voudrais également remercier Madame Lori Willett et Madame Sadia Daheb pour toutes ces nuits où nous avons veillé sur mes petites bêtes au sous-sol du Centre de Biomédecine.

L'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal représente pour moi de formidables équipes de médecins, chercheurs, infirmières, et autres professionnels de la santé.

Je remercie Madame Le Docteur Mélanie Welman, pour son expertise, ses judicieux conseils, mais aussi sa patience pour m'avoir tout appris au laboratoire. Elle a fortement contribué à l'ambiance et à mes études. Qu'elle soit assurée de ma sincère reconnaissance.

Je remercie toute l'équipe ainsi que les étudiants du Centre de Recherche, plus particulièrement Madame Jocelyne Normandin, Madame Diane Provost, Madame Stéphanie Dollé, Madame Anne-Julie Frenette, Madame Audrey-Anne Gosselin, Monsieur Guillaume Lacoste, Madame Simone Chaboillez, Madame Ana Moga, Madame Myrella Bergeron-Prevost, Madame Khadije Jizi, Monsieur Marc-André Déry, Madame Nicole Rutamucero, Monsieur le Docteur David Miedinger, Monsieur le Docteur Stephan Troyanov, Monsieur le Docteur Martin Albert, et je leur souhaite la meilleure chance dans leurs carrières respectives futures qui seront, j'en suis persuadée, jalonnées de succès.

Je tiens à remercier la Fondation J.A DeSèves, la Faculté de Médecine, le Département des Sciences Biomédicales, ainsi que la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal pour leurs généreux soutiens financiers.

Je souhaite remercier Monsieur le Docteur François Madore pour m'avoir permis de réaliser ces travaux dans son centre de recherche de l'Hôpital Sacré-Cœur de Montréal.

Il est très important pour moi de pouvoir remercier chaleureusement tous les miens.

Merci à mon grand-père, mon père et mon frère, des hommes de caractère et de convictions, intelligents et généreux, avec qui j'ai grandi; à mes grands-mères et à ma mère, des femmes hors du commun, fortes, battantes et avant-gardistes, qui donnent le goût d'outrepasser nos limites. Merci à mes oncles et tantes pour leur douceur et leur amour qui m'entourent et me ramènent à mes racines. Merci du fond du cœur pour m'avoir accompagné et soutenue, surtout supportée, sous toutes les formes que ce soit pendant ces belles années de travail. Elles sont synonymes de rencontres et de merveilleuses amitiés qui se sont consolidées au fil du temps. J'ai appris grâce à vous, qu'un ami est quelqu'un qui vous connaît bien, et qui vous aime quand-même. Merci à ceux et celles qui ont contribué, de près comme de loin. Joe, Marie, Phanie, Erwan, Hélène, Virginie, Fred, Pierrot, Geneviève, Marie-Ève, Sandra, Valérie-Anne, Isa, Jeanne, Martine, Céline, Blandine, Marie-Claude, Sandrine, Bertrand, Carole, Ève, Shaï, Yonat. Je vous remercie pour toute l'affection et l'amour que vous me témoignez depuis toutes ces années, parfois avouons-le, rocambolesques. Vous savez que la vie peut se montrer capricieuse mais qu'elle n'éloigne pas ceux et celles qui s'aiment inconditionnellement. Je pense que vous savez à quel point vous m'êtes cher.

Enfin, merci du fond du cœur à mon complice et allié de tous les jours. Phil, tu es une personne extraordinaire. Je n'aurai pas traversé cette aventure sans toi... Tu as su me porter dans les derniers milles. Merci de veiller à notre équilibre et à notre liberté. Merci pour ton soutien, ton intelligence, ta force et ta bonne humeur incontestable tout au long de ce processus. Merci pour tous les sacrifices que cela a pu demander, pour ta confiance en moi et en l'avenir.

Avant-propos

« Du chaos naissent les étoiles »
Charlie Chaplin

Basse-Terre, Antilles Françaises, mars 2004.

Quelle surprise quand je vis au bout du chemin, sous cette chaleur accablante, que mon nouveau patient attendait ma venue avec impatience, bien calé dans sa chaise. Il se tenait là, sous ce magnifique flamboyant de Guadeloupe. Franz, rescapé d'un violent accident de voiture plusieurs années auparavant outre-mer, n'en est pas ressorti indemne. Oui, il a survécu. Mais violemment blessé à la colonne vertébrale cervicale et sevré depuis peu de son respirateur artificiel, il est totalement dépendant de sa famille pour chaque petit geste du quotidien. Dès le tout début de ma pratique libérale en tant que physiothérapeute (kinésithérapeute), Franz contribuera à m'apprendre considérablement au niveau professionnel mais bien plus encore sur les rapports humains et il deviendra un précieux complice loin de l'hexagone français.

Franz est l'unique raison qui a motivé mon choix d'aller vers la recherche et de choisir ce projet de doctorat.

J'ai choisi ce sujet dans le but de rappeler qu'un trauma médullaire est un handicap lourd à tous les niveaux. C'est une épreuve difficile moralement, non seulement pour la personne qui souffre, quelque soit le niveau de traumatisme à la moelle, mais aussi pour son entourage. Des mois durant, Franz, sa famille, le personnel médical et moi-même, avons travaillé fort tant physiquement que psychologiquement au maintien de son équilibre.

De ces merveilleux moments partagés pendant tout ce temps, est née la conviction d'essayer de faire quelque chose à ma façon, pour toutes les personnes comme Franz touchées par la vie.

Chapitre 1. Introduction

Le système nerveux contrôle et assure de manière directe ou indirecte toutes les fonctions vitales de l'organisme, les messages et les signaux sensori-moteurs. Sur le plan anatomique, il comporte des structures centrales (cerveau et moelle épinière) et des structures périphériques dépendantes du cerveau (nerfs moteurs et sensoriels, ganglions, plexus) et autonomes avec des contrôles neuroendocriniens. Une altération de ces structures anatomiques peut mener à des dysfonctionnements du système. C'est le cas d'un traumatisme médullaire issu d'une atteinte traumatique de la moelle épinière ou encore conséquence d'une maladie. Le terme *paraplégie* inclut les atteintes à la colonne vertébrale comprenant les lésions thoraciques, lombaires ou sacrées, avec la perte de motricité des membres inférieurs. Le terme *tétraplégie* quant à lui réfère aux lésions cervicales avec la perte de motricité des quatre membres.

De nos jours, au Canada et aux États-Unis, plus d'un million de personnes vivent avec un traumatisme médullaire et on estime l'incidence à 4 259 nouveaux cas par année au Canada (Rick Hansen Institute 2010). Une lésion de la moelle épinière a des conséquences dévastatrices sur la vie de l'individu accompagnée d'une augmentation de la morbidité et de mortalité. Elle représente par ailleurs un coût important pour le système de soins de santé (environ trois milliard de dollars au Canada) (Krause et al. 2006; Pickett et al. 2006).

Introduction

Parmi l'ensemble des symptômes liés à la physiologie de l'atteinte médullaire (les troubles fonctionnels neurologiques), les troubles respiratoires, infectieux et inflammatoires, qu'ils soient temporaires ou permanents, sont élevés lors de la première année post-traumatique (DeVivo et al. 1999). Les causes spécifiques de décès sont dues notamment aux maladies respiratoires (28,1% des cas), cardio-vasculaires (22,4%) (Furlan et al. 2008) et aux infections urinaires (40%) (Garcia Leoni 2003). Ces troubles dépendent de la sévérité, de la gravité et du niveau de la lésion. En effet, plus l'atteinte lésionnelle est haute dans la colonne vertébrale, plus l'impact sur les mécaniques respiratoires causé par l'atteinte des muscles inspiratoires et expiratoires est important. Si la lésion cervicale s'avère être au-dessus de C3, alors un support ventilatoire devient typiquement impératif à long terme (A William Sheel 2006). Les lésions cervicales plus basses, quant à elles, impliquent également une atteinte des nerfs phréniques mais requièrent un support à plus court terme, conduisant alors le patient à être éventuellement sevré (A William Sheel 2006).

Ce support respiratoire artificiel invasif, appelé ventilation mécanique (VM), peut s'imposer dans le but de suppléer aux muscles respiratoires qui ne permettent plus à la personne de respirer de façon autonome (A William Sheel 2006). Cependant, l'application de cette thérapeutique n'est pas dénuée d'effets secondaires. Il a été montré qu'elle pouvait engendrer un phénomène inflammatoire et des réponses oxydatives importants au niveau pulmonaire (Tremblay et al. 1997; Bailey et al. 2008). Même si le concept demeure un sujet de controverse, les effets invasifs de la ventilation pourraient se propager à la circulation sanguine, au-delà du poumon, créant ainsi une inflammation systémique capable d'endommager les organes distaux (Slutsky et al. 1998). De plus, bien que l'étirement mécanique répété des alvéoles apparaisse comme un facteur important d'induction du stress oxydatif (Grembowicz et al. 1999; Vlahakis et al. 2003), il a également été montré qu'il pouvait induire l'activation des macrophages (Biswas et al. 2008; Wu et al. 2013). La population de macrophages étant la principale source de cytokines pour la défense de l'hôte, elle fait partie intégrante de la réaction immunitaire face aux agents envahisseurs ou des

stimuli potentiellement dangereux pour l'organisme (Mege et al. 2011). Bien plus encore, la population de macrophages peut exprimer des phénotypes dichotomisés en fonction de l'expression des cytokines ou chémokines secrétées (Mosser et al. 2008). De ce fait, ils ont été classés principalement en deux différents sous-types basés sur leurs phénotypes qui se rapportent à une expression spécifique de certains gènes (Gordon 2003). La réponse immunitaire, sous l'influence de cellules inflammatoires environnantes et de divers stimuli, induira soit une activation dite « classique » (phénotype M1), ou une activation dite « alternative » (phénotype M2) des macrophages (Mantovani 2006). De plus, le déclenchement de cette réaction immunitaire au niveau pulmonaire est susceptible d'avoir un impact sur l'inflammation locale initiale causée par le traumatisme à la moelle épinière. Ce traumatisme est reconnu pour déclencher une forte réponse inflammatoire locale avec notamment une infiltration massive de neutrophiles au site lésé (Fleming et al. 2006). Une étude récente a montré que ces neutrophiles circulants étaient capables de migrer jusqu'aux poumons et d'augmenter les enzymes pro-inflammatoires (myeloperoxydases) ainsi que les réponses oxydatives (Gris et al. 2008). Conséquemment, lorsque survient un accident à la moelle épinière et que la ventilation mécanique est indispensable au maintien des échanges respiratoires, l'organisme va mettre en jeu toute une panoplie de réponses inflammatoires encore mal connues à ce jour et ce, à différents endroits, dans le but de protéger ses tissus, ses cellules et ses organes. De ce fait, nous pensons qu'il est primordial de mieux connaître l'impact d'un traumatisme médullaire sur la réponse immunitaire ainsi que la modulation produite par la ventilation mécanique, et vice versa. À l'heure actuelle, nous ignorons quelle activation de macrophage va être induite par cette réponse immunitaire. Advenant que l'activation soit classique de phénotype M1 associé à un caractère pro-inflammatoire, alors elle pourrait recruter d'autres cellules inflammatoires circulantes. Celles-ci, en se propageant de façon hématogène, pourraient endommager, à distance, les tissus de la moelle et entraîner un dommage inflammatoire additionnel au site du traumatisme. Il n'existe pas de thérapie à ce jour ayant prouvé une efficacité réelle dans l'amélioration fonctionnelle chez le patient après une blessure à la moelle épinière. De ce fait, il semble

probable que différentes approches thérapeutiques soient requises pour les différents types de dommages et les différents niveaux d'atteintes médullaire. Il paraît très important de déterminer par quels mécanismes la ventilation mécanique peut moduler l'inflammation post-traumatique et de quelle façon le traumatisme médullaire et la ventilation interagissent sur les réponses inflammatoires à la fois pulmonaire et au site local de la lésion. Sont-elles susceptibles d'amplifier le bio traumatisme dans le poumon et à la moelle épinière? Est-il possible que la réponse immunitaire se dirige vers un profil d'activation classique de type M1 dans le poumon? Est-il envisageable que d'autres organes, cellules, tissus sains ou lésés au préalable tels que ceux de la moelle épinière, soient affectés en périphérie par ces réponses inflammatoires?

L'objectif principal de ce projet était d'évaluer l'interaction entre le traumatisme médullaire et la thérapie du support respiratoire. Il consistait plus particulièrement à évaluer si la blessure médullaire pouvait influencer l'inflammation pulmonaire induite par la ventilation et à déterminer si ce support respiratoire pouvait altérer à distance l'inflammation des tissus sains ou lésés. Dans les chapitres de cet ouvrage, nous développerons surtout les effets de l'altération du système nerveux suite à un traumatisme médullaire sur les réponses inflammatoires, ainsi que l'impact de la thérapie de ventilation mécanique sur la réponse immunitaire. Nous décrirons aussi les mécanismes susceptibles de déclencher des dommages pulmonaires tels que le stress mécanique, un facteur important d'activation du macrophage alvéolaire, principale cellule source de cytokines. De fait, la revue de littérature porte une attention particulière à cette population de cellules immunitaires qui va produire d'autres médiateurs inflammatoires en réponse à l'étirement alvéolaire répété induit par la ventilation mécanique. Enfin, nous discuterons des mécanismes susceptibles d'être à l'origine du changement phénotypique des macrophages alvéolaires.

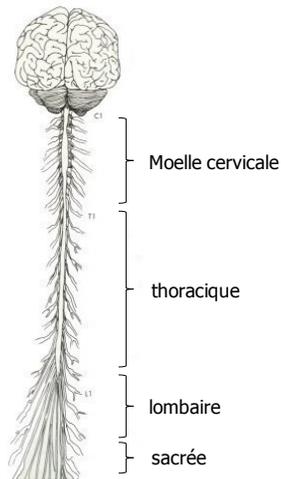
Chapitre 2. Revue bibliographique

Ce chapitre décrit le traumatisme médullaire et les conséquences que peuvent engendrer l'altération du système nerveux autonome. Il présente l'implication des systèmes sympathique et parasympathique, ainsi que l'effet du niveau de la blessure médullaire sur la réponse immunitaire. La section se poursuit par une révision de l'inflammation déclenchée par le traumatisme de la moelle, telle que les réponses inflammatoires locales, systémiques et pulmonaires. La seconde section revoit la ventilation mécanique comme thérapie requise selon le niveau d'atteinte médullaire, ses conséquences sur le système pulmonaire et l'infiltration des cellules inflammatoires pouvant mener à une inflammation systémique et enfin, les mécanismes responsables des dommages éventuels au poumon. Finalement, le chapitre se conclue par une description des connaissances actuelles sur les macrophages, leurs caractéristiques et les mécanismes responsables de leurs changements phénotypiques.

2.1. Le traumatisme de la moelle épinière

2.1.1. Définition et classification

2.1.1.1. Moelle épinière

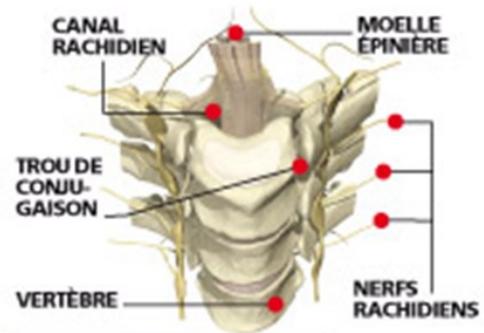


La moelle épinière, ou moelle spinale, est un lieu de relais de l'information nerveuse synaptique entre la périphérie et le système nerveux central (SNC). Elle a pour rôle l'intégration des activités motrices involontaires (réflexes ostéotendineux ou de retrait) et volontaires provenant du cerveau (Franck 1990) et sensorielles. Elle constitue la partie du SNC qui se prolonge en dessous du tronc cérébral au niveau du bulbe rachidien.

Figure 1. Schémas anatomiques de la moelle épinière et des vertèbres

Figure adaptée d'après Réf (Antoine Micheau MD 2009).

Elle est composée de substance grise (neurones) et blanche (axones) ainsi que de cellules gliales. Le canal que forment les foramens des vertèbres juxtaposées la soutient et la protège (Franck 1990).

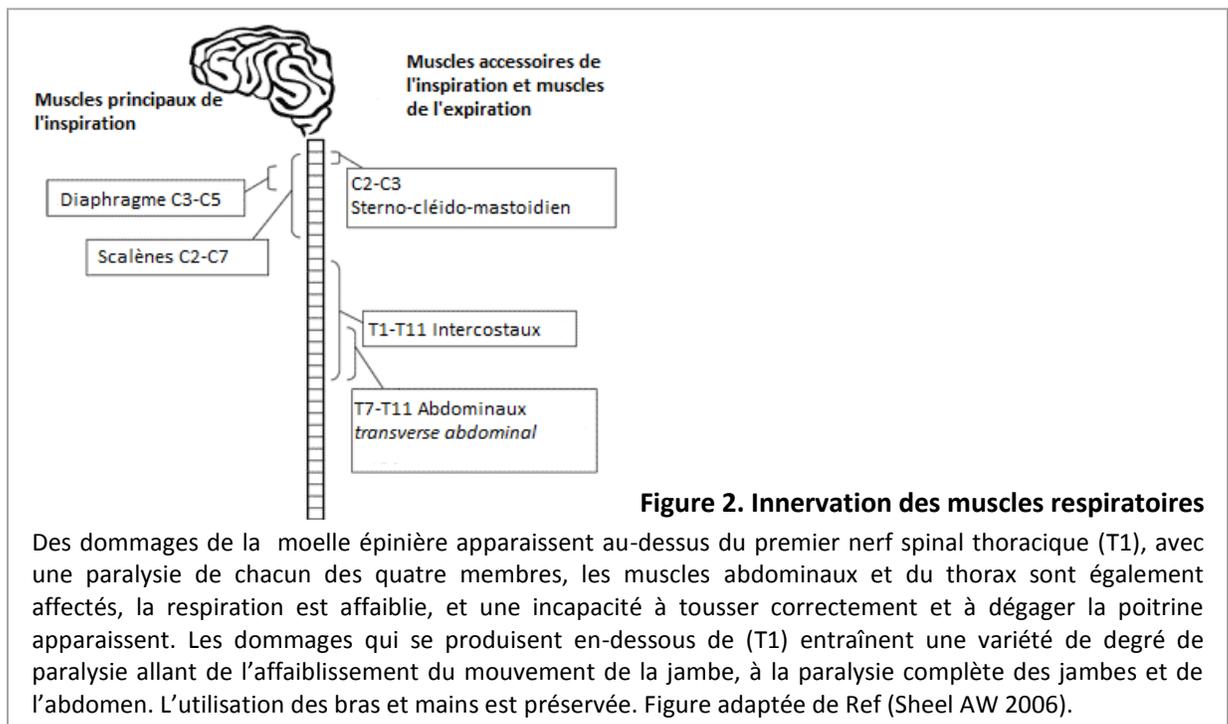


2.1.1.2. Traumatisme de la moelle épinière

Un traumatisme médullaire débute par une lésion qui s'établit en tant que lésion primaire et détermine la gravité ainsi que le déficit neurologique immédiat lié à l'atteinte de la moelle épinière. Cette lésion évolue ensuite en lésion dite secondaire (Ditunno et al. 1994) qui

englobe à la fois l'extension ischémique de la zone hémorragique et une cascade d'évènements biochimiques complexes, avec invasion des cellules inflammatoires au site de la blessure. L'action de ces cellules a pour conséquence une aggravation des lésions tissulaires primaires (Catania et al. 2009). La gravité de l'atteinte et le type de déficit neurologique varient selon le niveau de la lésion. Ce sont des facteurs déterminant dans le degré de déficience sensitif et moteur et dans le degré de l'atteinte à la fonction de certains organes, tel que le système respiratoire (Waters et al. 1991).

2.1.1.2.1. Exemple du type d'atteinte



Si la lésion est de haut niveau dans la colonne cervicale (C3-C5 ou plus), alors la personne présentera une tétraplégie, c'est-à-dire une paralysie des membres supérieurs et inférieurs, incluant les muscles respiratoires. L'atteinte des nerfs phréniques entraîne la faiblesse ou la paralysie des muscles respiratoires principaux tels que le diaphragme, intercostaux, scalènes, spinocostaux ainsi que les muscles respiratoires accessoires et extrinsèques (*i.e.*

grand et petit pectoral, subclavier, dentelé antérieur, région latérale du cou, grand dorsal et la paroi antérolatérale de l'abdomen) (**Figure 2**). Une lésion au-dessus de C3 entraîne quant à elle une paralysie respiratoire complète. À ce stade, la ventilation mécanique immédiate et permanente est nécessaire pour assurer l'oxygénation et les échanges gazeux dans le sang (A William Sheel 2006). Une personne paraplégique, présentant une blessure de niveau thoracique ou inférieur, aura une atteinte des muscles respiratoires (intercostaux et abdominaux) ainsi que de ses membres inférieurs (A William Sheel 2006). Le traumatisme médullaire n'a pas à ce jour de traitement curatif. La pratique clinique courante veut que la ventilation mécanique soit le traitement clinique standardisé pour les patients souffrant d'insuffisance respiratoire.

2.1.1.2.2. Application clinique de la ventilation mécanique

Cette thérapie permet d'assister ou de suppléer le travail respiratoire du patient quand celui-ci n'est plus en mesure d'adapter la ventilation de façon autonome à ses besoins. Une insuffisance respiratoire se manifeste puisque ses muscles respiratoires ne peuvent pas générer une force musculaire respiratoire suffisante pour assurer une ventilation minimale (Maccagno 1965; Wong 2012). Il existe diverses modalités d'application de la VM (définies plus loin dans la section 2.2) parmi lesquels la ventilation assistée contrôlée (VAC) et la ventilation en mode spontané (VS) sont largement appliquées (Jean-Bernard Michotte 2009). Malgré les effets bénéfiques de cette thérapie, nous traiterons plus loin des complications pulmonaires telle que l'inflammation, susceptibles d'être induites par la ventilation mécanique (dos Santos et al. 2000). De façon générale, la VM est indiquée comme thérapie dans le cas où le patient doit être ventilé de façon optimale (coma, blessure médullaire, fatigue musculaire, insuffisance respiratoire aiguë suivant une exacerbation de la maladie pulmonaire obstructive chronique ou encore dans un contexte de pneumonie), tout en maintenant une hémodynamique correcte. Elle se définit comme support ventilatoire permettant d'assurer totalement ou partiellement le travail respiratoire et les échanges gazeux chez le patient en défaillance respiratoire.

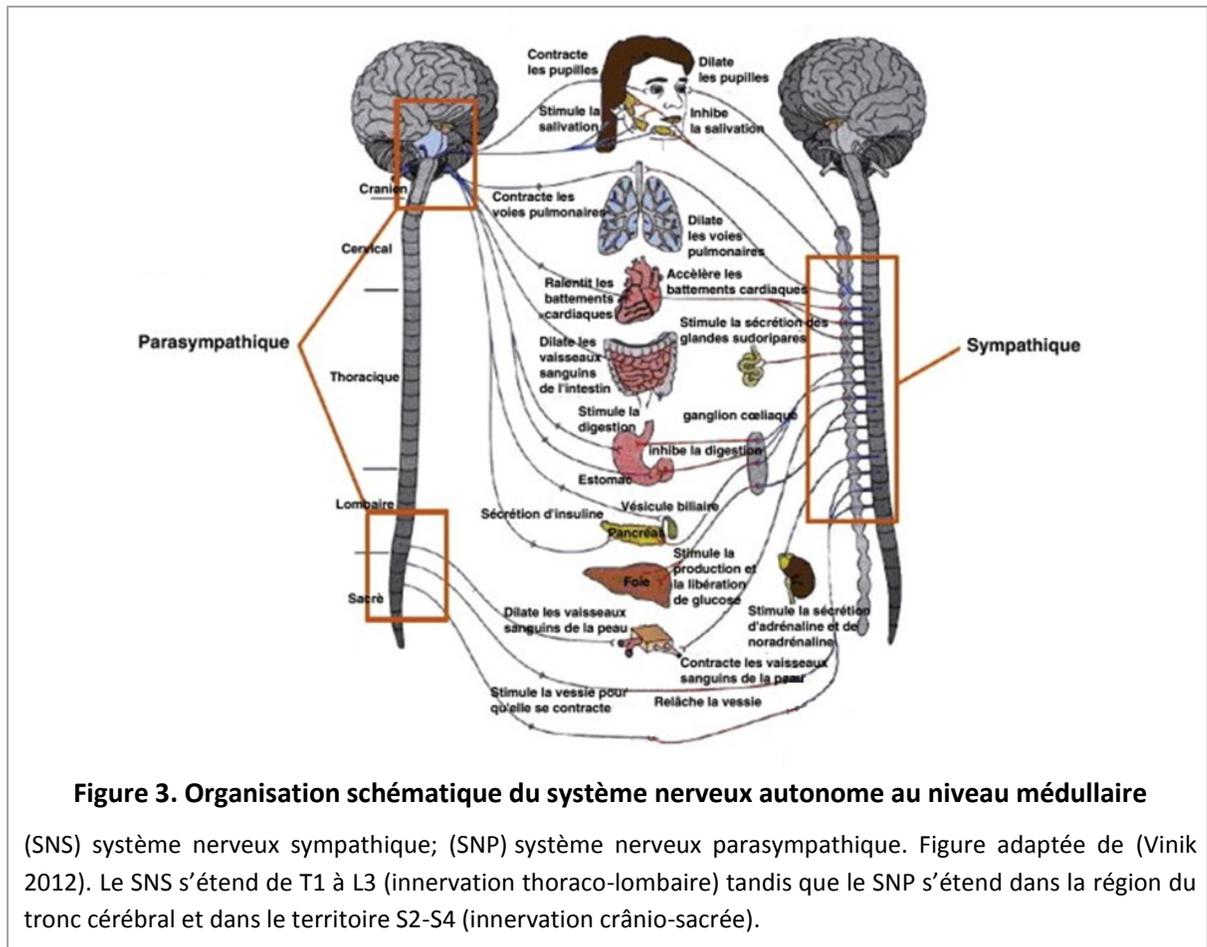
2.1.1.2.3 Principales altérations de la fonction pulmonaire chez les patients blessés médullaires

Il existe chez les patients blessés médullaires, à cause de la perturbation des fonctions des muscles inspiratoires et expiratoires, une réduction de la capacité vitale, des volumes de réserve inspiratoire et expiratoires, ainsi que des pressions statiques mesurées à la bouche (Linn et al. 2000; Linn et al. 2001). Par association, les blessés médullaires de haut niveau présentent des modifications de la cinétique costo-vertébrale (rigidité de la cage thoracique accompagnée de mouvements paradoxaux de la poitrine et d'une distension des muscles abdominaux) (Haas et al. 1985; De Troyer et al. 1986), de la compliance pulmonaire, de la limitation de la cinétique diaphragmatique (par la pression des viscères abdominaux et la répartition inégale des contraintes) (Estenne et al. 1985; Brown et al. 2006). La fonction de la majorité des muscles expiratoires étant compromise chez ces patients (De Troyer et al. 1991), elle peut entraîner une toux inefficace qui tend à la rétention de mucus, à l'encombrement trachéo-bronchique et souvent associée à la survenue d'atélectasies (Slonimski et al. 2001). De plus, les sujets tétraplégiques démontrent une hyperréactivité des voies aériennes par exemple en réponse à de l'eau distillée nébulisée par ultrasons (Grimm et al. 1999). Une des explications de ces résultats est que le rétrécissement préexistant de calibre des voies aériennes induit par un agent broncho-constricteur, produirait une grande augmentation de résistance de ces voies (Cockcroft et al. 2006). D'autres mécanismes peuvent aussi contribuer à la réduction des voies aériennes. C'est le cas dans l'asthme où le rétrécissement a été attribué entre autre, au remodelage des voies respiratoires causé par l'inflammation (Cockcroft et al. 2006). Dans le cas du traumatisme médullaire, la contribution de l'inflammation pour l'hyperréactivité des voies respiratoires, si tel est le cas, ne semble pas avoir été étudiée. Par ailleurs, les changements ultra-structuraux et/ou histologiques au niveau pulmonaire chez ce type de patient restent à étudier.

2.1.2. Conséquences fonctionnelles : altération du système nerveux

« Comme si la nature avait trouvé le moyen d'éloigner ses fonctions importantes des caprices d'une volonté imprudente »
 Claude Bernard (Bernard 1966)

2.1.2.1. Innervation des systèmes sympathiques et parasympathiques



2.1.2.1.1. Généralités

Le système nerveux autonome (SNA) contrôle les fonctions vitales de l'organisme (rythme cardiaque, tension artérielle, rythme respiratoire, motricité digestive) et module le diamètre ainsi que le tonus des vaisseaux sanguins (Segal 2003). La partie motrice du SNA est

Le traumatisme de la moelle épinière

divisée en deux entités distinctes qui fonctionnent en complémentarité: le système parasympathique (SNP) et le système sympathique (SNS) (**Figure 3**). A chaque instant, l'activité de chaque organe est adaptée aux besoins de l'organisme et aux stimuli qui lui sont présentés. Les systèmes sympathiques et parasympathiques exercent des effets antagonistes sur la fonction de ces mêmes organes cibles.

2.1.2.1.2. Organisation anatomique

L'organisation du sympathique (fonction essentiellement excitatrice) et du parasympathique (système vagal) repose sur des considérations anatomiques et physiologiques (Koopman et al. 2011). Leur double innervation, qu'elle soit d'origine cervicale ou thoracique, agit sur les structures périphériques telles que les muscles, les organes vitaux, les structures glandulaires (**Figure 3**) ou encore les cellules qui possèdent des fonctions dans l'immunité, aboutissant ainsi à l'existence d'un contrôle très précis de l'organe effecteur. Dépendamment du système impliqué, la modulation de la fonction des organes et des cellules peut être plus ou moins rapide (Meisel et al. 2005; Lucin et al. 2007). Les structures centrales (cerveau et moelle épinière) envoient un influx nerveux aux organes, par les racines ventrales de la moelle grâce aux terminaisons nerveuses effectrices, appelées voies efférentes du SNA. Les corps cellulaires des neurones du système sympathique, appelés neurones pré-ganglionnaires sympathiques, sont localisés dans le SNC entre la 1^{ière} vertèbre thoracique (T1) et la 3^{ième} vertèbre lombaire (L3). Leurs axones sortent du SNC pour se connecter à un ganglion (amas de neurones), dans lequel ils vont entrer en contact avec d'autres neurones; les neurones post-ganglionnaires, qui eux, envoient leurs axones à l'organe cible (Koopman et al. 2011).

Les neurones pré-ganglionnaires du système parasympathique, sont localisés dans les cellules du cerveau (tronc cérébral) et dans le territoire de la seconde vertèbre sacrée à la quatrième (S2-S4). Les axones parasympathiques du tronc cérébral rejoignent les fibres du nerf vague (X^{ième} nerf crânien) innervant les organes thoraco-abdominaux ainsi que d'autres

nerfs crâniens qui innervent les organes céphaliques (cerveau, salivaire inférieur et supérieur, muco-lacrymo-nasal et pupilles) (Koopman et al. 2011). Outre la position topographique des deux systèmes, on peut également les distinguer grâce à la libération d'un médiateur chimique (ou neurotransmetteur) qui agit sur un organe effecteur lors de la transmission de l'influx nerveux entre un ou deux neurones jusqu'à l'effecteur. Bien que les axones pré-ganglionnaires du SNS et du SNP vont sécréter tous deux l'acétylcholine au contact des cellules post-ganglionnaires, les relais au niveau des fibres post-ganglionnaires (effecteurs) par contre, sont réalisés à l'aide de l'adrénaline et la noradrénaline pour les fibres du SNS (noradrénergiques) et l'acétylcholine pour les fibres du SNP (cholinergiques) (Rasouli et al. 2011).

Au niveau cardiaque, le cœur est innervé à la fois par le SNS et le SNP. Lorsque l'activité du système sympathique cardiaque ne contrebalance plus ou pas suffisamment l'activité du centre du système parasympathique (le cas pour une personne souffrante de blessure médullaire), il existe de forts risques d'accidents vagues, incluant des asystolies (Popa et al. 2010). Lors d'une altération du SNC, plus le niveau de lésion sera haut, plus le système sera endommagé avec des troubles du fonctionnement du SNA (brusques élévations de la tension artérielle, tachycardie, céphalées, sudation avec érythèmes, etc.) (Grigorean et al. 2009). Enfin, il a été montré qu'un traumatisme médullaire altérant le SNA pouvait influencer la réponse immunitaire puisqu'il comprend l'innervation de structures jouant un rôle essentiel dans l'immunité (Catania et al. 2009).

2.1.2.2. Système nerveux autonome et réponse du système immunitaire

Le système immunitaire est un système complexe de moyens de défenses naturelles de l'organisme. Une de ses principales propriétés est sa capacité à reconnaître les substances étrangères au corps et à déclencher des mesures de défense. Si ce système de protection est altéré, alors l'équilibre de l'organisme tout entier est compromis.

informations provenant de la périphérie et concernant l'état du système immunitaire selon trois principales voies de signalisations (Campagnolo et al. 1997; Eskandari et al. 2003) : a) l'axe hypothalamo-hypophysaire (AHH); b) le SNS; et c) le SNP (**Figure 4**). Ces voies de signalisation ont été identifiées comme neuronales, principalement contrôlées par le nerf vague (voie cholinergique) et humorales (Pavlov et al. 2003; Vinik 2012).

2.1.2.2.2. Modulation de l'AHH et du SNS par l'hypothalamus

L'hypothalamus reçoit les informations de toutes les régions du SNC et module l'AHH ainsi que le SNS (Catania et al. 2009). Il peut répondre directement aux médiateurs libérés des molécules impliquées dans la réponse immunitaire, telles que les cytokines (i.e. TNF- α , IL-6, IL-10), lorsque survient un dommage, un stress ou une infection dans l'organisme. Celles-ci, lors de leur apparition, peuvent activer elles-mêmes l'AHH ainsi que le SNS (**Figure 4**) (Haour et al. 1995; Kariagina et al. 2004). En réponse à un stress quelconque, l'AHH produit de façon naturelle des hormones de type anti-inflammatoire et immunosuppresseur: les glucocorticoïdes (Dong et al. 1989). Elles préviennent l'inflammation en supprimant la production de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires incluant les cytokines, telles que l'interleukine-1 β (IL-1 β), le facteur de croissance tumorale α (TNF- α), les chimiokines (interleukine-8) (Kwon et al. 1994) et l'oxyde nitrique (NO) (Szabo et al. 1994). A l'inverse, les glucocorticoïdes peuvent augmenter la production des médiateurs anti-inflammatoires IL-10 ainsi que le facteur de croissance tumorale- β (TGF- β) (Hodge et al. 1999). Ces glucocorticoïdes ont des effets importants sur les lymphocytes et les leucocytes (Liu et al. 1999). D'une part, ils sont capables de bloquer la différenciation des lymphocytes Th1 à travers l'inhibition des monocytes/macrophages (diminuer la capacité des monocytes/macrophages à présenter les antigènes aux lymphocytes). D'autre part, ils peuvent promouvoir la différenciation des lymphocytes TH2, augmentant de fait la production d'IL-10 (Barrat et al. 2002). Le dialogue entre les récepteurs sympathiques adrénergiques (alpha-2 et bêta), cholinergiques et le système immunitaire témoigne d'une forte influence de l'activité du SNS (Nance et al. 2007). En effet, il a été démontré que

l'activation du SNS provoque le relâchement de neurotransmetteurs appelés catécholamines. Ceux-ci sont stimulés par les fibres nerveuses sympathiques, telles que l'adrénaline (glandes médullosurrénales) (Rinner et al. 1998). La production de ces catécholamines a rapidement augmenté le nombre de lymphocytes circulant dans le sang en mobilisant les cellules issues de la rate et du poumon.

2.1.2.2.3. Influence de la fonction immunitaire par le niveau d'activité du SNS

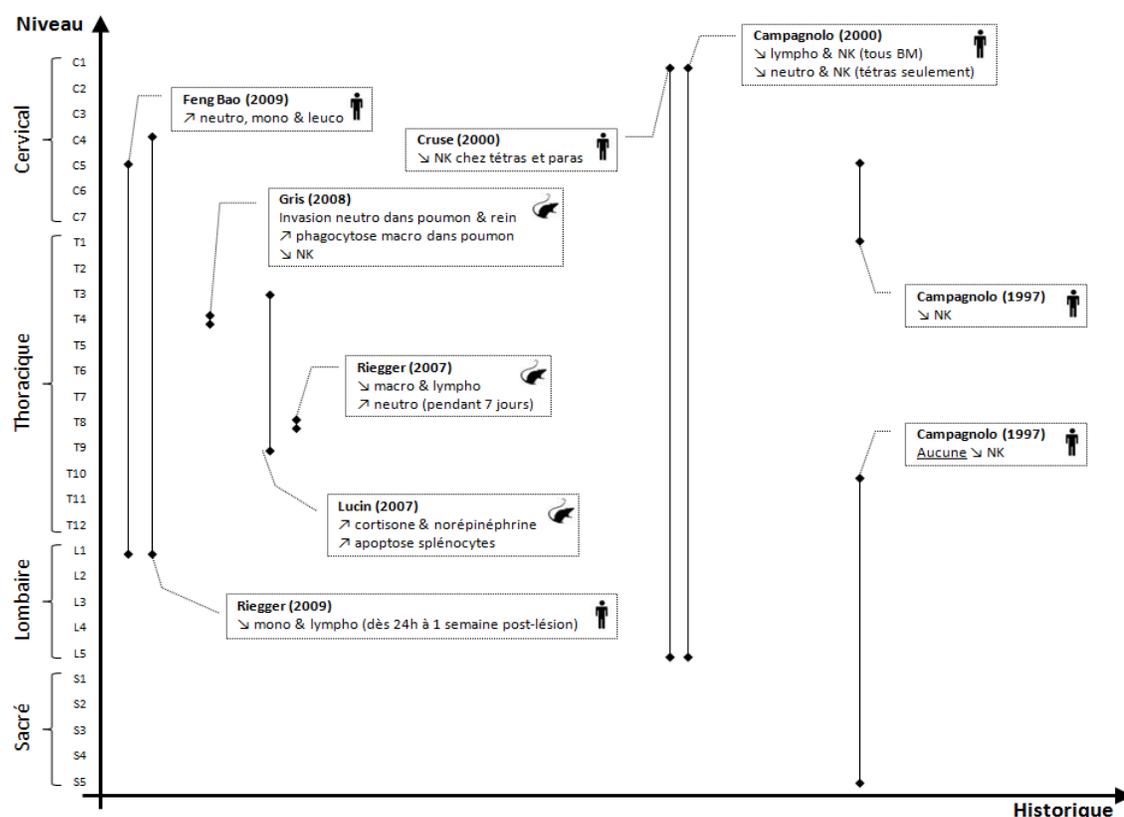


Figure 5. Résumé schématique des études selon le niveau de blessure médullaire

Neutro: neutrophiles; Macro: macrophages; Mono: monocytes; Lympho : lymphocytes; NK : lymphocytes cytotoxiques natural killers; Tétras: tétraplégiques; Para: paraplégiques.

La réponse immunitaire risque d'être fortement influencée par le niveau de traumatisme puisqu'il est lui-même étroitement lié au territoire étendu du SNS (innervation T5-T9). En englobant les organes lymphoïdes (*i.e.* thymus, moelle osseuse, rate, ganglions lymphatiques), le SNS et le système endocrinien sont les modulateurs de la fonction immunitaire (Vinik 2012). Pour certains auteurs (Campagnolo et al. 1994), une des explications aux incidences des infections serait la dérégulation du SNS présente chez des sujets tétraplégiques (C6-C7) et paraplégiques (lésion haute) en comparaison à des sujets paraplégiques de lésion de bas niveau (T10 et moins) présentant un traumatisme survenu de 3 mois à plusieurs années. Une personne blessée au niveau cervical et thoracique haut aurait donc un risque accru d'altération immunitaire. Les travaux de Campagnolo et al, ont montré une diminution dans le sang des lymphocytes naturellement tueurs (*natural Killer cells*, NK) ainsi que de l'habileté fonctionnelle des neutrophiles à phagocyter les bactéries (Campagnolo et al. 2000) (**Figure 5**). Sur une période de 60 à 120 minutes, ces auteurs ont mesuré le nombre de staphylocoques détruits dans le surnageant obtenus des neutrophiles lysés. La capacité à phagocyter des neutrophiles issus du groupe de tétraplégiques a alors diminuée alors que les paraplégiques n'ont montré aucune différence significative. Pour d'autres (Bao et al. 2009), le niveau de lésion ne ferait pas de différence puisque les neutrophiles, monocytes et lymphocytes augmentent dans le sang des patients et ce, à tout niveau de lésion confondus (C5 à L1) de 6 heures à 2 semaines post-lésion. D'autres études montrent que les cellules NK ont diminué dans le sang à partir de 2 semaines à 3 mois. De plus, les monocytes et lymphocytes ont diminués pendant 7 jours post-lésion autant chez les tétraplégiques que les paraplégiques (Cruse et al. 2000) lorsqu'ils étaient comparés à des sujets dépourvus de lésion médullaire (Riegger et al. 2009). L'impact du niveau de la lésion médullaire sur le poumon ou sur la moelle épinière nécessite d'avantage de travaux. Cependant, Gris et al. ont montré qu'une lésion (T4) chez des rats a entraînée une forte augmentation des neutrophiles circulants dans le sang et le poumon comparés à ceux dépourvus de blessure (Gris et al. 2008). Riegger et al., quant à eux ont montré qu'une lésion T8 a entraîné la diminution des monocytes et des lymphocytes circulants dans le

2.1.2.2.6. Cytokines

L'équilibre de la réponse immunitaire est délicat et régit par des médiateurs d'origine cellulaire qui concernent essentiellement les cytokines. Ces molécules, dont IL-1 β , IL-6, IL-10 et le TNF- α , étudiées dans le cadre de ce projet sont produites à l'origine d'une cascade de médiateurs indispensables à la mise en place et à l'entretien de la réponse immunitaire.

2.1.2.2.6.1 Les familles de cytokines

Les cytokines sont des protéines solubles de faible poids moléculaire, qui transmettent des signaux entre les cellules impliquées dans différents processus physiologiques tels que la prolifération, la différenciation cellulaire, l'activation cellulaire ou encore l'apoptose (Strieter et al. 2002). Au niveau pulmonaire, elles sont produites par les cellules épithéliales, les macrophages alvéolaires et les neutrophiles présents dans les alvéoles et dans les bronches (Toews 2001). Dans la moelle épinière, elles seraient produites par les cellules de la glie, telles que les astrocytes et les microgliocytes (Pannu et al. 2007; Hirokazu Saiwai 2010). Elles peuvent être regroupées en cinq grandes familles dépendamment de leurs fonctions ou des types de cellules capables de les sécréter :

- Les interleukines sont sécrétées par les leucocytes et les cellules épithéliales. Elles assurent les échanges d'informations entre cellules. On appelle lymphokines celles qui sont sécrétées par les lymphocytes et monokines, celles issues des monocytes/macrophages (Saunders 2003). Aujourd'hui, on compte environ 35 types qui ont été identifiés;
- Les interférons (IFN-) constituent une classe qui comprend treize sous-types, avec les plus communs, IFN- α , β , γ , et ω , dont les principaux rôles sont l'inhibition de la réplication virale dans les cellules infectées et la modulation de la réponse immunitaire. Ils peuvent inhiber ou initier la production d'anticorps par les lymphocytes B, activer

les macrophages, les cellules NK et les lymphocytes T (présentation de l'antigène) (Decker et al. 2002);

- Les facteurs de croissance hématopoïétiques stimulent le renouvellement et la différenciation des cellules sanguines de la moelle osseuse. On distingue notamment le *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) et le *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF). Le GM-CSF est spécifique à la prolifération et à la différenciation de cellules souches qui donneront des granulocytes et le M-CSF va activer la différenciation de ces cellules souches en macrophages (Kaushansky 2006);
- Les facteurs de nécrose tumorale (TNF- α et TNF- β) sont des cytokines impliquées dans les réactions inflammatoires de phase aiguë et systémique (section 2.1.3.4) dont les propriétés biologiques sont multiples : antitumorales, antivirales, antiparasitaires, etc. Elles stimulent la lipolyse, la glycogénolyse musculaire et contrôlent la formation et l'entretien du tissu conjonctif (Revillard 2001);
- Les chimiokines contrôlent la migration cellulaire (monocytes-macrophages, lymphocytes, polynucléaires) dans les conditions physiologiques ainsi que lors de réactions inflammatoires (Zlotnik et al. 2000), grâce à leur pouvoir chimiotactique abordé dans la section 2.3.1.4.

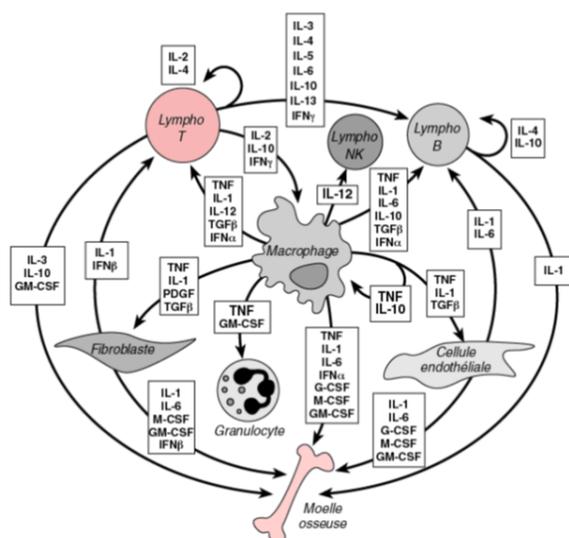
2.1.2.2.6.2 Fonctions différentes et caractéristiques communes

Les cytokines expriment des fonctions différentes avec néanmoins des caractéristiques générales communes. La plupart d'entre elles sont produites à l'issue d'une activation cellulaire par l'antigène, avec pour conséquence le recrutement des lymphocytes T. Les monocytes et les macrophages produisent un panel de médiateurs dits pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires:

- Les cytokines pro-inflammatoires IFN- γ , TNF- α , IL-1 β et l'IL-6 participent à la mise en place et à l'entretien de l'inflammation (Stout et al. 2005);

- Les cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10 et TGF- β) ont un potentiel de protection des tissus et des cellules en permettant de limiter l'action des médiateurs pro-inflammatoires (Donnelly et al. 1996; Armstrong et al. 1997; Torre et al. 2000).

Agissant rarement seules, les cytokines démontrent différents modes d'action leur permettant de communiquer avec d'autres cellules : 1) le mode autocrine, une action sur les cellules elles-mêmes sécrétrices; 2) le mode paracrine, une action locale sur d'autres cellules et; 3) le mode endocrine circulant à travers le système sanguin et pouvant agir sur des cellules éloignées (Coondoo 2012). La cytokine peut renforcer l'action d'une autre cytokine (mode additif), multiplier (mode synergique) ou inhiber (mode antagoniste) l'effet de cette dernière (Foster 2001). Elle fait partie d'un réseau de communication qui est propre à ce type de cellule: la double ubiquité. Une même cytokine peut être produite par différents types de cellules tandis qu'une seule cellule est capable de sécréter différentes cytokines.



Par ailleurs, les cytokines peuvent induire différents effets sur des types de cellules cibles distincts. Ce phénomène se nomme la pléiotropie (**Figure 6**) (Foster 2001). À l'inverse, plusieurs cytokines sont capables d'exercer un même effet sur un même type cellulaire. C'est la redondance.

Figure 6. Illustration du pléiotropisme et de la redondance d'un macrophage

Le macrophage est une cellule principale productrice de cytokines. D'après Ref. (CHATENOUD. 2002).

2.1.2.2.6.3 Molécules inflammatoires d'intérêt

Du fait de leurs rôles dans le processus inflammatoire, les cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 et IL-10 ont été mesurées dans le cadre de ce projet.

- L'interleukine-8 (IL-8) n'a pas été mesurée mais elle est un médiateur indispensable de l'activité inflammatoire des neutrophiles du fait de son rôle de chimioattracteur. C'est une des plus petites chimiokines principalement sécrétée par les monocytes/macrophages activés, les fibroblastes et les cellules épithéliales (Mukaida 2003);
- Le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) participe à la phase aiguë de l'inflammation. Le TNF- α est libéré principalement par les leucocytes, les lymphocytes T activés et en moindre mesure par les cellules épithéliales. TNF- α possède une action pro-inflammatoire. Cette cytokine stimule la phagocytose des macrophages mais aussi la production d'IL-1 et d'IL-6 sur divers organes ou cellules, tels que le foie et les macrophages (Barbara et al. 1996);
- L'interleukine-1 (IL-1) est une cytokine de 159 acides aminés possédant sept ligands avec une activité agoniste de formes moléculaires homologues α et β , trois récepteurs antagonistes (IL-1Ra, IL-36Ra, IL-38) et une cytokine anti-inflammatoire (IL-37) (Garlanda et al. 2013). C'est une cytokine pro-inflammatoire considérée comme une molécule d'alarme. L'IL-1 α et l'IL-1 β se lient aux mêmes récepteurs. L'IL-1 est rapidement produite par les macrophages et également par les neutrophiles, les cellules endothéliales et les lymphocytes B et T. Elle est produite en réponse à différents stimuli tels que le TNF- α , l'IFN, les LPS (Lipopolysaccharides), les virus et tout autre antigène. Elle est considérée comme un médiateur incontournable de la réponse immunitaire et un puissant inducteur de l'inflammation en phase aiguë (adhésion des monocytes et neutrophiles, chimio-attracteur des leucocytes, activation des lymphocytes T, rôle d'activation de IL-2) (Dinarello 2002);

- L'interleukine-6 (IL-6) est une cytokine pro-inflammatoire et le médiateur le plus important lors de la phase aiguë de l'inflammation (fièvre, mobilisation des leucocytes) qui induit la production de protéines par les hépatocytes (cellules de Kupffer) (Heinrich et al. 1990). Majoritairement sécrétée par les monocytes/macrophages, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les lymphocytes B et T stimulés, elle a la particularité d'inhiber l'action de l'IL-1 et du TNF- α , mettant ainsi en valeur sa capacité à avoir des propriétés anti-inflammatoires (Tilg et al. 1994);
- L'interleukine-10 (IL-10) possède des effets anti-inflammatoires et elle est sécrétée par les lymphocytes B et T, les cellules NK ainsi que les monocytes/macrophages (voir section 2.3.2.1). Elle inhibe entre autre, la sécrétion d'IL-1, IL-6 et TNF- α par les monocytes et induit la prolifération des lymphocytes B et la production d'anticorps, régulant de ce fait l'immunité innée (Moore et al. 2001). Elle oriente donc la réponse immunitaire vers une réponse à dominante humorale (Mege et al. 2006).

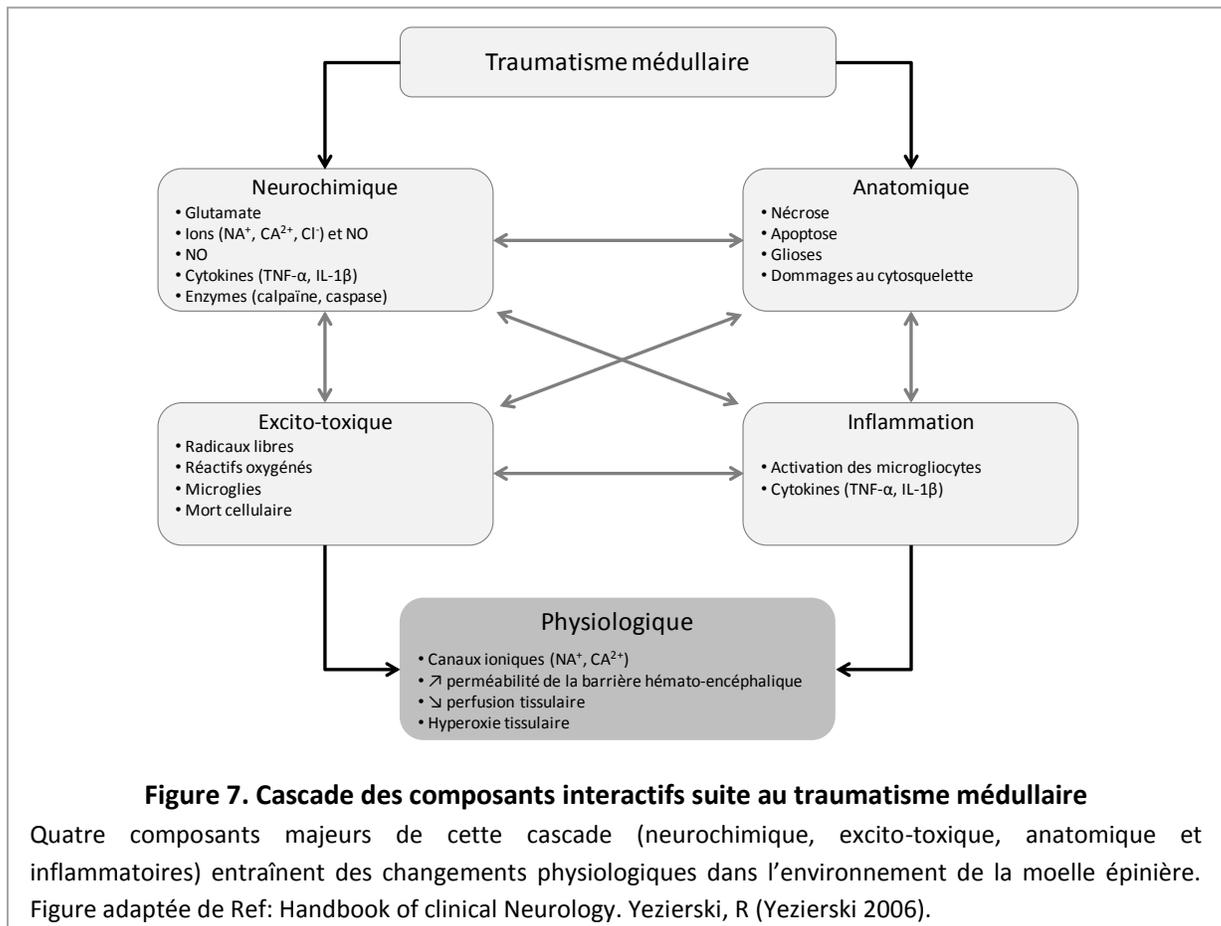
2.1.2.2.6.4 Récepteurs de cytokines

Les cytokines agissent grâce à leurs récepteurs membranaires (glycoprotéines transmembranaires) qui se fixent sur des cellules cibles. Certains auteurs ont montré qu'il se produisait une activation de seconds messagers intracellulaires (les kinases intracytoplasmiques de la famille des JAK-STAT) suivie d'une chaîne de réactions biochimiques qui aboutit à l'effet désiré de la cytokine (Decker et al. 2002). Les JAK-STAT, (Janus Kinases and Signal Transducers and Activators of Transcription) sont des voies de signalisation intra-cytoplasmiques qui jouent un rôle majeur dans la chaîne de phosphorylation de transduction du signal (Foster 2001).

2.1.3. Conséquences inflammatoires post-traumatisme

2.1.3.1. Phase post-traumatique immédiate

La période post-traumatique se divise en deux phases : 1) la phase primaire caractérisée par la lésion initiale à la colonne vertébrale entraîne des lésions neuronales de la moelle épinière et 2) la seconde phase qui est la période de destruction tissulaire secondaire aux processus inflammatoires et cytotoxiques. La phase post-traumatique est caractérisée par le fait que la barrière hémato-encéphalique de la moelle épinière devient permissive à toute cellule circulante, risquant ainsi d'augmenter les dommages initiaux (Dumont et al. 2001; Baptiste et al. 2006). Bien que les mécanismes soient encore mal compris à ce jour, des études récentes ont révélé que l'apparition des lésions secondaires impliquait plusieurs processus qui entraînent la mort cellulaire tels que l'excitotoxicité, le stress oxydatif et l'inflammation au site lésé (Degos et al. 2008; Dery et al. 2009). Il a été observé que la rupture de la micro-vascularisation entraîne une hypoxie et une ischémie du tissu neuronal endommagé (Degos et al. 2008; Sharma 2011). De plus, en l'absence d'apport suffisant en glucose et en oxygène, la production d'ATP chute et bloque la pompe sodium-potassium dépendante de l'ATP qui veille au maintien de la différence du potentiel membranaire dans les conditions normales (Lipton 1999). La membrane neuronale étant dépolarisée, un acide aminé neurotoxique (glutamate) est libéré massivement dans la fente synaptique et dans l'espace extra synaptique contribuant à l'excitotoxicité neuronale (**Figure 7**). Dès lors, les canaux ioniques à sodium et calcium s'ouvrent chez le neurone via les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (Agrawal et al. 1996). D'une part l'augmentation des concentrations intracellulaires de sodium va mener à l'œdème cellulaire et d'autre part celle du calcium va activer plusieurs enzymes dont les protéases, les lipases et l'oxyde nitrique synthase neuronale (Kwon et al. 2004; Degos et al. 2008). La barrière hémato-encéphalique de la moelle épinière ne peut donc plus assurer son rôle de protection du SNC puisqu'elle ne filtre plus les agents pathogènes, les toxines ou les hormones véhiculées par les vaisseaux sanguins (**Figure 7**).



Après l'arrêt ou la baisse du débit circulatoire, la période de reperfusion médullaire s'installe (Guha et al. 1989). C'est lors de cette période que les dommages s'aggravent avec la formation de radicaux libres (anions superoxydes) contribuant ainsi à l'oxydation des protéines et à la dégradation de l'ADN (Degos et al. 2008). La peroxydation lipidique va entraîner la lyse membranaire des cellules neuronales dans la moelle épinière (Kwon et al. 2004) et les dommages survenus aux mitochondries peuvent conduire à la relâche d'une petite protéine à hème, le cytochrome c, qui est associée à la membrane interne de la mitochondrie. Celle-ci formera un complexe avec d'autres protéines entrant dans la composition de l'apoptosome afin de permettre la libération de la caspase-9 qui joue un rôle

dans l'activation de la caspase-3. Cette dernière va déclencher l'apoptose cellulaire en partie responsable de la dégénération neuronale (Kakinohana et al. 2011).

2.1.3.2. Inflammation, mécanisme de défense naturel

2.1.3.2.1. Définition

Pour assurer sa protection, l'organisme dispose de mécanismes de défense mis en place non seulement dans le but de faire face aux agressions exogènes, mais aussi pour aider à la reconstruction de tissus lésés (Thomas A. Wynn 2012). L'inflammation fait partie intégrante de ce phénomène que ce soit au niveau pulmonaire ou bien dans toute autre partie vascularisée de l'organisme. La réaction inflammatoire est induite et entretenue par de nombreux médiateurs sécrétés par les cellules du système immunitaire, à savoir au niveau pulmonaire: les macrophages alvéolaires et les cellules immunitaires du système circulatoire. L'effet principal de ce phénomène physiologique complexe est d'attirer ces cellules du système immunitaire sur le lieu de l'inflammation. Bien que les mécanismes inflammatoires aient pour objectif de protéger le système, ils peuvent s'avérer responsables de lésions tissulaires et de maladies en l'absence de stimulation immunitaire (Martinez et al. 2009; Gordon et al. 2010). La réponse inflammatoire doit alors être évaluée selon deux perspectives distinctes, puisqu'elle comporte des aspects à la fois bénéfiques et délétères.

2.1.3.2.2. Immunité innée et adaptative

2.1.3.2.2.1 Immunité innée

La réponse immunitaire innée constitue la première ligne de défense contre les microbes et les agents pathogènes durant la phase d'infection. Les mécanismes de protection de l'hôte reposent sur la reconnaissance immédiate de la part de motifs moléculaires spécifiquement associés aux microorganismes, nommés PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). La reconnaissance des PAMPs par les phagocytes se fait par un ensemble de récepteurs, les PRRs (*pattern recognition receptors*) (Mogensen 2009). Les PRRs regroupent plusieurs familles de récepteurs, notamment les TLR (Receptor Toll-like) et les récepteurs

scavengers. Suite à l'invasion du pathogène, une réponse pro-inflammatoire est enclenchée grâce à ses éléments cellulaires et biochimiques (Trivedi et al. 2006). Cette réponse est caractérisée principalement par les mécanismes effecteurs tels que la phagocytose médiée par les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles. Au-delà de l'attaque des agents pathogènes, l'immunité innée peut également entraîner la production de molécules favorisant la prolifération de cellules immunitaires et la différenciation de cellules aussi bien de l'immunité innée que de l'immunité adaptative à travers la synthèse de cytokines (Lacy et al. 2011).

2.1.3.2.2 Immunité adaptative

L'immunité adaptative vient compléter la première défense mise en place. C'est un mécanisme de défense retardé hautement spécifique pour un antigène, et dirigée uniquement contre le pathogène ou l'antigène qui a été au préalable en contact avec l'organisme (Parham Peter 2003). Elle est diversifiée, comprend un mécanisme de mémorisation de reconnaissance de ses cellules, et elle inclut la production de cytokines et chimiokines avec recrutement de lymphocytes. Les acteurs cellulaires sont les cellules T et les cellules B. Cette réponse est classée en réponse humorale et en réponse cellulaire :

- La réponse humorale est la seconde ligne de défense durant laquelle les lymphocytes B jouent un rôle indispensable. Ils possèdent de multiples fonctions (synthèse et libération de divers isotypes et d'anticorps, production de cytokines) (Garraud et al. 2012);
- La réponse cellulaire est caractérisée par les lymphocytes T ($CD4^+$, $CD8^+$), elle est activée en réponse aux signaux spécifiques d'un antigène. La fonction principale des cellules T est de s'activer, de générer des cellules mémoires et de faire coopérer toutes les cellules de l'immunité acquise entre elles. Elles sécrètent de nombreuses cytokines ainsi que des médiateurs cellulaires permettant une action locale et à courte distance sur les cellules environnantes. Ces lymphocytes jouent un rôle primordial dans le système

de défense adaptatif. Selon le type de production de cytokines, la réponse cellulaire peut être déclinée en réponse Th1, Th2, Treg, Th17 et Th9 (Mosmann et al. 1986).

Les cellules Th1 produisent principalement de l'interféron- γ , du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-2. En stimulant les cellules B de façon à produire des Immunoglobuline G, elles jouent un rôle majoritaire dans la protection contre les pathogènes intracellulaires. De plus, elles favorisent l'activation des macrophages (Scharton et al. 1993). Les cellules Th2 produisent de l'IL-4, de l'IL-9, de l'IL-13, de l'IL-5 et de l'IL-10 pour combattre les organismes extracellulaires (Chen et al. 2003; Min et al. 2004). Les Treg quant à eux régulent l'activité des cellules T auxiliaires et interviennent dans la tolérance immune. Ils expriment la cytokine IL-10, une molécule impliquée dans l'immunosuppression (Sundstedt et al. 2003) et le TGF- β . Les cellules Th17 sont associées essentiellement à la production d'IL-17 et régulent les mécanismes de défenses de l'hôte face à certaines infections de pathogènes extracellulaires (Dong 2013). Enfin les cellules Th9 produisent de l'IL-9 et de l'IL-10. Elles sont surtout impliquées dans la contraction et l'élimination intestinale (Khan et al. 2003).

Beck et al, ont observé que dans le cas d'un traumatisme à la moelle épinière, la réaction inflammatoire en phase aiguë consistait essentiellement à éliminer les débris cellulaires et contribuait à la réparation tissulaires (Beck et al. 2010). L'accumulation excessive de cytokines pro-inflammatoires produites lors de ce processus peut néanmoins endommager les tissus sains (Bethea 2000). Le déséquilibre entre les stimuli pro- et anti-inflammatoires pourrait alors entraîner un désordre physiologique impliquant que l'inflammation doit être envisagée sous deux perspectives distinctes (Stout et al. 2005). Dans le contexte d'une blessure médullaire, les cytokines vont donc jouer un rôle essentiel.

2.1.3.3. Réponse inflammatoire locale

D'un point de vue physiologique, la moelle épinière est composée d'une population de neurones et de cellules gliales (Hansson et al. 2003). On distingue deux classes de cellules

gliales : les cellules de la macroglie et les cellules de la microglie. On les différencie par leur localisation dans le système nerveux central ou dans le système périphérique. La macroglie est considérée comme un réseau complexe composé de populations cellulaires différentes comprenant les *astrocytes* et les *oligodendocytes*. Les *astrocytes* ont une forme étoilées avec de nombreux prolongements. Ce sont les plus grosses cellules du tissu nerveux. Ils synthétisent des neurotransmetteurs et assurent un lien fonctionnel entre les vaisseaux sanguins et les neurones (Delacour 1998). La microglie quant à elle est composée de *microgliocytes* qui jouent un rôle important dans la phagocytose. Toutes ces cellules gliales veillent au bon fonctionnement des neurones et du SNC. Bien que ce système soit doté d'une importante protection immunitaire, son état lors d'une blessure à la moelle a pu altéré par l'infiltration des cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 (Pineau et al. 2007). L'activation des cellules résidentes telles que les *astrocytes* et les *microgliocytes* est aussi observée. Faulkner et al, ont relaté que les cellules immunitaires les plus abondantes du SNC, les *astrocytes*, s'hypertrophiaient et proliféraient dès 12 heures après le traumatisme autour de la jonction qui délimite la lésion et le tissu sain (**Figure 8**) (Faulkner et al. 2004). Ils ont pour rôle de colmater les lésions présentes dans la barrière hémato-encéphalique qui est devenue permissive aux facteurs neurotoxiques et inflammatoires arrivant par la circulation sanguine (McTigue et al. 2011). Le mur cellulaire formé, appelé cicatrice gliale, permettrait de rétablir l'homéostasie dans le milieu et il serait essentiel pour protéger les neurones (Mucke et al. 1993; Kernie et al. 2001; Pannu et al. 2005; Sofroniew 2009).

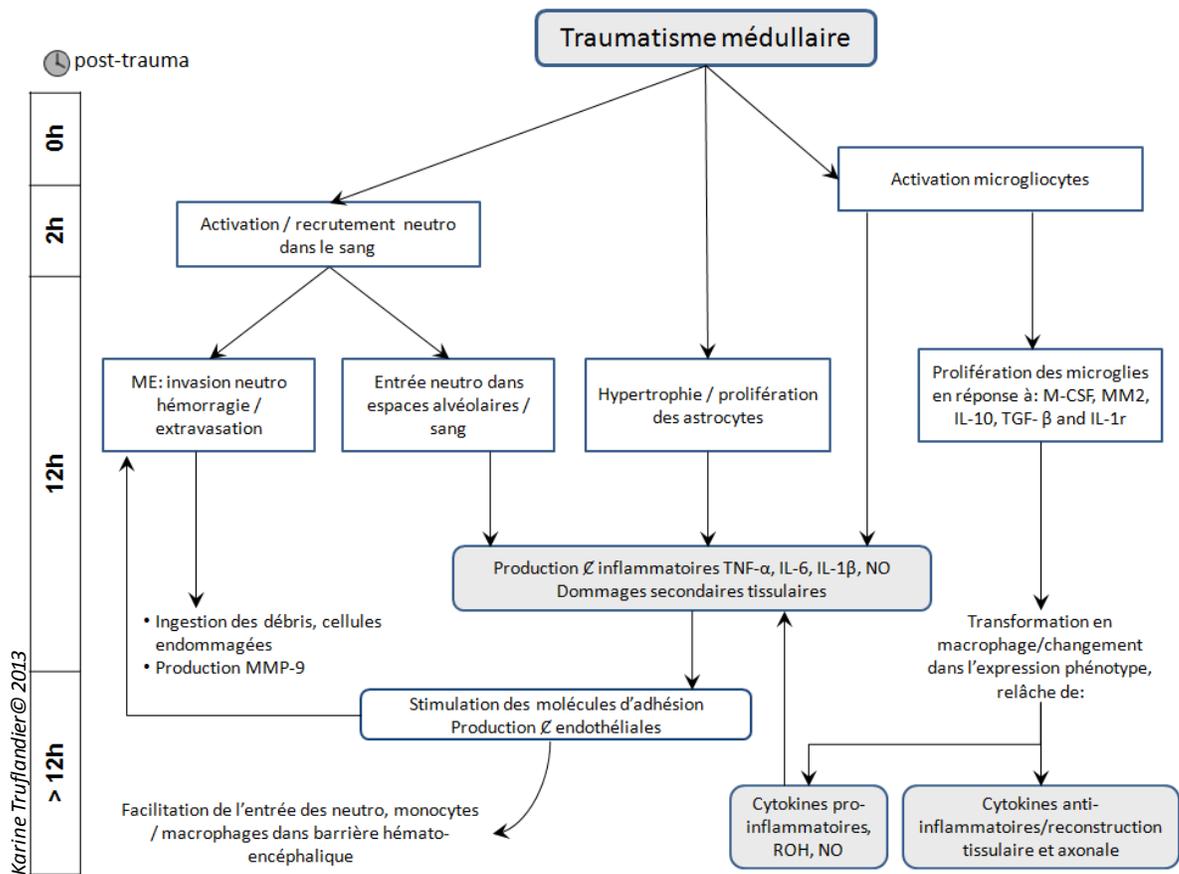


Figure 8. Évolution dans le temps de la cascade inflammatoire après un traumatisme médullaire

Schéma illustrant l'évolution temporelle des interactions entre les différentes populations cellulaires dans le sang, le poumon et au site local de la moelle épinière à la suite d'un traumatisme médullaire. Les neutrophiles vont ingérer les débris tissulaires et relâcher des enzymes oxygénés (MPO) dans le but de nettoyer la zone lésée, mais leur nombre accru va contribuer fortement au dommage secondaire de la moelle. Neuro; neutrophiles, ζ ; cellules, ROH; réactifs oxygénés, NO; oxyde nitrique, MMP9; métalloprotéinases.

Les sentinelles du SNC, les *microgliaocytes* sont largement distribués dans le cerveau et la moelle épinière (Wake et al. 2009). Nombreuses sont les études qui ont montré que ces cellules étaient activées dans les quelques minutes suivant l'accident dans le but de pallier aux dommages et répondre aux médiateurs émis par les cellules endommagées tels que le M-CSF et l'ATP. Elles prolifèrent donc immédiatement au site lésionnel (Giulian et al. 1991; Honda et al. 2001). Des études ont également montré qu'en se transformant en

Le traumatisme de la moelle épinière

macrophages, les microgliocytes relâchent soit des cytokines pro-inflammatoires, des réactifs oxygénés et de l'oxyde nitrique qui vont conduire aux dommages secondaires tissulaires, soit des cytokines anti-inflammatoires menant à la reconstruction des tissus lésés et de la régénération axonale (**Figure 8**) (Popovich et al. 1997; Fleming et al. 2006). Les astrocytes et les microgliocytes, activés par les réponses immunitaires innée et adaptative, apparaissent comme essentiels pour protéger les neurones (Hansson et al. 2003; Town et al. 2005). Ils sont une source de cytokines pro- (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-1 et IL-12) et anti-inflammatoires (IL-10 et TGF- β) dans les processus de guérison (Town et al. 2005).

Ces astrocytes et ces microgliocytes seraient la cause principale de l'augmentation des dommages locaux car ils intensifieraient la réponse inflammatoire locale dans le tissu lésé (Hirokazu Saiwai 2010; Loane et al. 2010; Masanori Yoneyama 2011). En contrepartie, l'IL-10 produite atténuerait la majorité des réponses des microgliocytes/macrophages (O'Farrell et al. 1998). Elle réduirait la synthèse d'une variété de cytokines pro-inflammatoires, notamment le TNF- α produit par les astrocytes à la suite du traumatisme médullaire (Hausmann 2003). Quant aux neutrophiles, Kigerl et al, ont indiqué qu'ils infiltraient les tissus lésés de la moelle par hémorragie ou par extravasation dès 6 heures suivant le traumatisme (Kigerl et al. 2006) alors que d'autres études ont observé après 12 heures post-lésion (**Figure 8**) (Hirokazu Saiwai 2010). Bien que la mobilisation de ces cellules se produise en grand nombre entre 1 et 3 jours pour nettoyer les débris cellulaires, elles peuvent demeurer dans les tissus médullaire jusqu'à 10 jours (Fleming et al. 2006). Leur présence persistante dans les tissus enflammés, reflétant une inflammation locale importante, leur permettrait d'attirer les macrophages dérivés des monocytes (Popovich et al. 1997) et d'évoluer à travers l'ensemble de l'organisme (Furlan 2006; Catania et al. 2009). Les neutrophiles vont générer autant de réactifs oxygénés, d'enzymes oxydatifs que de cytokines pro-inflammatoires qui consolideront le recrutement des monocytes/macrophages (Noble et al. 2002; Qiao et al. 2010) dans le but de nettoyer la zone tissulaire infectée et de la préparer pour une éventuelle guérison (Fleming et al. 2006).

Cependant, une étude a montré que le nombre accru de neutrophiles aurait un rôle déterminant dans les dommages secondaires aux tissus médullaires (Qiao et al. 2010), notamment en se propageant par voie hématogène (Noble et al. 2002). Enfin, il est possible que quelques lymphocytes T (CD4+ et CD8+) se retrouvent dans les tissus de moelle de personnes blessées médullaires (Fleming et al. 2006). La capacité de réparation ou d'endommagement tissulaire secondaire des lymphocytes T et le moment où ils entrent dans la zone lésée de la moelle, reste un sujet discuté (Jones et al. 2005).

2.1.3.4. Réponse inflammatoire systémique

Un autre problème serait certainement celui de l'activation des cellules inflammatoires dans la circulation sanguine qui endommageraient les tissus en dehors de la moelle. Les neutrophiles sont les premières cellules activées et recrutées dans la circulation sanguine dès deux heures suivant le traumatisme (**Figure 8**) (Fleming et al. 2006; Gris et al. 2008). En produisant des facteurs et des médiateurs pro-inflammatoires, ils seraient la source de lésions dites secondaires à la moelle épinière en raison de leur activité qui reste très élevée dans le sang jusqu'à 7 jours post-traumatisme (Gris et al. 2008). De plus, ils contribueraient à aggraver les dommages préalablement créés (Fleming et al. 2006; Donnelly et al. 2008). Les cytokines produites lors la réponse inflammatoire locale pourraient avoir accès au centre de contrôle du SNC, en passant par la barrière hémato encéphalique de la moelle épinière lésée via la circulation sanguine et entraîner une inflammation susceptible de s'étendre à tout l'organisme (Meisel et al. 2005). L'inflammation systémique serait susceptible d'aggraver la sévérité de la lésion (Fleming et al. 2006; Donnelly et al. 2008; Furlan et al. 2008). Effectivement, l'infiltration des cellules immunitaires ne se limiterait pas aux tissus de la moelle. Les organes ou systèmes physiologiques fortement vascularisés, tels que le cœur, le rein, le foie ainsi que les intestins pourraient également être infiltrés (Sunil et al. 2002; Gris et al. 2008). L'inflammation, l'infection ou l'hypoxie tissulaire peuvent suractiver le système immunitaire de l'hôte. Si les molécules anti-inflammatoires produites (IL-1r, IL-4, IL-10 et IL-13) n'arrivent pas à contrebalancer

l'activité des réactifs oxygénés relâchés par les neutrophiles, les macrophages ou encore les cytokines pro-inflammatoires, alors une puissante réponse inflammatoire systémique peut apparaître, entraînant dans certains cas le décès (Chung et al. 2010; Leon et al. 2010).

2.1.3.5. Réponse inflammatoire pulmonaire

Les neutrophiles joueraient un rôle majeur dans l'initiation et la propagation de la réponse inflammatoire. Ils migreraient directement de la circulation sanguine vers les poumons où infiltreraient rapidement les espaces alvéolaires et interstitiels, et les reins douze heures après la blessure médullaire (en effet, le poumon reçoit 5 litres de sang à la minute et 23% du débit cardiaque va aux reins) (Gris et al. 2008).

Gris et al, ont observé une nette augmentation du nombre de cellules dans les espaces alvéolaires de rats ayant subi une lésion médullaire (T4). La morphologie de ces cellules était typique du macrophage et du neutrophile. Après avoir comparé les poumons de rats sans lésion à ceux d'animaux ayant une lésion médullaire, ils ont observé à 12 heures et à 3 jours post-traumatisme, une activité significative de phagocytose chez les macrophages. Ce phénomène de phagocytose qu'ils ont traduit par l'expression de marqueurs cellulaires spécifiques activant les macrophages (ED-1) dans le poumon, a diminué après 7 jours post-lésion pour rejoindre un taux normal aux poumons d'animaux dépourvus de lésion (Gris et al. 2008).

Les mécanismes de l'inflammation pulmonaire suite à une blessure médullaire sont mal connus. Les espaces interstitiels péri-alvéolaires deviendraient une source de cytokines inflammatoires suite à l'activation des macrophages alvéolaires, qui conduiraient à l'expression d'enzymes oxydatives (Sunil et al. 2002; Yan et al. 2004). De plus, l'altération du SNC entraînerait l'activation du système SNS, produirait des protéines et des cytokines entre autre hépatiques qui seraient diffusées depuis le foie pour se répandre dans la circulation (Gris et al. 2008). L'infiltration lymphocytaire quant à elle serait plus tardive que celle des neutrophiles ou les macrophages, mais les données dans la littérature impliquant directement la présence des lymphocytes dans les tissus pulmonaires suite à un

traumatisme médullaire sont pauvres. Cependant, les lymphocytes entreraient dans le poumon et émettraient un signal aux autres cellules par l'entremise du mécanisme de leurs récepteurs ligands. Ils se répandraient ensuite au site initial de la blessure, amplifiant alors le dommage (Fleming et al. 2006).

2.2.3.6 Récapitulatif du profil de stress oxydatif rencontré chez les patients blessés médullaires

La pléiade de réactions inflammatoires que nous venons d'aborder suite à un traumatisme médullaire, qu'elles soient; neurochimiques (libération de glutamate, activation d'enzymes protéases, lipases et d'oxydes nitriques synthésases neuronales) (Kwon et al. 2004); excitotoxiques (formation d'anions superoxydes et de radicaux libres) (Degos et al. 2008) ou encore physiologiques (diminution de la perfusion tissulaire et apparition d'hyperoxie) (Yeziarski 2006), va entraîner des changements physiologiques majeurs dans l'environnement de la moelle épinière. Ces derniers participent à la dégénération neuronale. La réponse inflammatoire locale, mise en place initialement pour protéger les tissus endommagés suite à l'accident (Faulkner et al. 2004), contribue non seulement à la production de réactifs oxygénés et d'oxyde nitrique au site local (Fleming et al. 2006), mais également au recrutement des neutrophiles et des macrophages dans le sang et les espaces alvéolaires (Gris et al. 2008). Ainsi, le poumon stimulé par une entrée massive de médiateurs inflammatoires, devient une source de cytokines conduisant à l'expression d'enzymes oxydatives et protéolytiques néfastes pour le système (Yan et al. 2004; Gris et al. 2008).

La façon dont ces réponses inflammatoires vont interagir lors de l'application de la ventilation mécanique suite à une blessure médullaire est inconnue. Sont-elles susceptibles d'amplifier ou non le traumatisme induit par les médiateurs inflammatoires dans le poumon et au site initial de la blessure?

2.2. La ventilation mécanique

2.2.1. Concepts de base

2.2.1.1. Généralités

Le système respiratoire fonctionne selon des lois physiques et chimiques, permettant la diffusion et le transport de l'oxygène, du poumon vers toutes les cellules de l'organisme (West 2000). Il permet de déverser dans les alvéoles, selon un itinéraire inverse, le principal produit de déchet de notre métabolisme, le dioxyde de carbone. Une situation pathologique qui atteint une des structures du système pulmonaire peut être responsable d'une défaillance respiratoire (Y. Skar 2005) requérant un support artificiel tel que la ventilation mécanique (VM). La VM est un outil indispensable à la survie des patients qui nécessite une assistance respiratoire. En tentant de suppléer ou d'assister la ventilation naturelle quand la personne est dans l'incapacité de respirer de façon autonome, elle a deux objectifs principaux: 1) assurer l'oxygénation avec une ventilation pulmonaire et des échanges gazeux adéquats; 2) permettre la diminution du travail des muscles respiratoires. Un patient souffrant d'insuffisance respiratoire dépense un effort inspiratoire d'environ quatre fois à six fois sa valeur comparé à un individu normal (Tobin 2001). Bien qu'elle soit la clé du traitement de l'insuffisance respiratoire, les études ont révélé que la VM pouvait engendrer des inconvénients et contribuer à des complications pulmonaires telles que la détérioration de la fonction pulmonaire avec une baisse de la compliance (Soni et al. 2008; Tomicic et al. 2011) ou de l'inflammation pulmonaire (Tremblay et al. 1997; Dreyfuss et al. 1998). En quelques heures d'application seulement, le support respiratoire serait capable de déclencher ou aggraver des lésions pulmonaires, des altérations morphologiques cellulaires (Ranieri et al. 1999), de l'inflammation ou encore entraîner une dysfonction diaphragmatique (Dos Santos et al. 2000; Levine et al. 2008).

Documentée notamment dans la pathologie appelée *syndrome de détresse respiratoire aigüe* (SDRA) et selon la stratégie respiratoire appliquée, la sur-distension alvéolaire (qui

La ventilation mécanique

excède le volume normal alvéolaire) peut initier ou contribuer à la propagation de dommages au poumon. Parmi les études sur les complications pulmonaires secondaires à la ventilation, on retrouve : 1) les *barotraumatismes*, se référant à la rupture des alvéoles due à la pression trans-alvéolaire trop élevée (pression alvéolaire moins la pression adjacente à l'espace interstitiel), qui peuvent entraîner des pneumothorax (Dreyfuss et al. 1998); 2) les *volu-traumatismes*, ou *volu-traumatismes*, un traumatisme alvéolaire du à de très hauts volumes de ventilation (Dreyfuss et al. 2004; Albaiceta et al. 2011) et enfin; 3) les *bio-traumatismes* caractérisés par la production de molécules inflammatoires en réponse à l'étirement répété mécanique du tissu pulmonaire (Tremblay et al. 1997; Halbertsma et al. 2005).

La ventilation induisant un dommage pulmonaire, traduit de l'anglais *Ventilator-induced lung injury*, est un concept dérivé des études animales ayant montré que la VM appliquée avec des hautes pressions (pression de pointe élevée ou pression moyenne plus grande que 30 cm d'H₂O) et des hauts volumes dans les voies aériennes entraînaient rapidement des dommages alvéolaires et une inflammation sévère (Dreyfuss et al. 1998). Ce chapitre a pour but de réviser les effets de l'application de la VM sur les réponses inflammatoires pulmonaires ainsi que les mécanismes susceptibles d'être responsable de dommages éventuels au poumon via l'activation des cellules inflammatoires.

2.2.1.2. Mode de ventilation mécanique

2.2.1.2.1. Modes traditionnels

D'une façon générale, il faut distinguer les modes de VM contrôlés des modes spontanés, mais quelque soit ce mode, l'oxygénation sera réglée selon la fraction d'oxygène inspiratoire (FiO₂), la pression de fin d'expiration positive (Positive End-Expiratory Pressure, PEEP) et le niveau d'assistance. Les modes respiratoires les plus couramment utilisés sont: 1) la ventilation assistée contrôlée (VAC), qui comprend deux modalités différentes soit le volume contrôlé (VC) et la pression contrôlée (PC); et 2) la ventilation

spontanée (VS), soit de type hybride volumétrique, soit de type barométrique (représentée par une VS en pression positive continue (CPAP), en aide inspiratoire (AI) et en ventilation assistée proportionnelle (PAV) (Jean-Bernard Michotte 2009).

2.2.1.2.2. Notion de ventilation stratégique : mode de protection pulmonaire

Lorsque la thérapie de ventilation est requise pour des périodes de temps plus ou moins longues, il est important de protéger le poumon (sain ou pathologique) des effets invasifs éventuels du support respiratoire sur les tissus pulmonaires. Dès lors, le mode de ventilation, le niveau d'assistance, la PEEP ou encore le temps d'exposition de la VM, vont intervenir dans la stratégie de ventilation à adopter. Les chapitres qui vont suivre ont pour but d'aborder les effets du support respiratoire selon différentes stratégies, tant sur le poumon sain qu'endommagé. Nous verrons que même avec une stratégie physiologique de protection du poumon, il est possible que la VM soit capable d'induire un bio-traumatisme pouvant développer des dommages pulmonaires.

2.2.1.2.3. Ventilation avec volume courant haut, traditionnel ou bas chez les patients blessés médullaires

La stratégie ventilatoire à adopter chez un blessé médullaire va dépendre du type d'atteinte et beaucoup d'efforts ont été mis afin d'optimiser cette thérapeutique et éviter les complications respiratoires. Si les poumons ne sont pas endommagés, la pratique clinique courante est d'appliquer un volume courant normal de $V_T=8-10$ mL/kg de poids théorique, avec une PEEP de 5 à 6 cm H₂O (Chang et al. 2013). Par contre, si les poumons sont déjà endommagés, par exemple si le patient présente un SDRA, le consensus suite à l'étude publiée en l'an 2000 par le *New England Journal of Medicine* est de réduire la ventilation à un volume courant bas de $V_T=6-8$ mL/kg avec une PEEP variable (7-8 cm H₂O) pour améliorer l'oxygénation. Des pressions ventilatoires moyennes (< 30 cm H₂O) sont alors appliquées dans le but de protéger le poumon endommagé (N.Eng.J.Med 2000).

Bien souvent, le risque de complications respiratoires chez le patient blessé médullaire est élevé et on préfère ventiler ces patients à larges volumes. De nombreux articles ont pourtant décrit qu'il fallait craindre ces larges volumes en raison des barotraumatismes qu'ils engendrent, mais la stratégie recommandée peut aller jusqu'à un volume courant élevé de $V_T=20$ mL/kg chez un blessé médullaire (Peterson et al. 1999; Wong 2012). Cette stratégie est apparue comme bénéfique pour stabiliser les ventilations respiratoires, éviter majoritairement l'apparition d'atélectasies et de pneumonies chez des patients tétraplégiques atteints de lésions complètes (Peterson et al. 1994). Cette approche est donc basée sur l'étude rétrospective de Peterson et al, qui a comparé des hauts volumes entre eux dans le but de réduire le risque d'atélectasies ($V_T=25$ mL/kg vs. $V_T=15$ mL/kg). Les patients (C3-C4) ventilés à haut volume pendant deux semaines consécutives auraient ainsi montré une résolution d'atélectasies ainsi qu'un sevrage du ventilateur plus rapide. Toutefois, l'étude ne relate aucune information concernant les critères d'application d'une VM à haut volume ou du maintien des volumes courants jusqu'au sevrage chez ce type de patient. De plus, seuls les patients qui ont été sevrés avec succès ont été randomisés dans cette étude. Finalement, des études prospectives sur les protocoles de ventilation ainsi que de sevrage sont nécessaires pour déterminer la meilleure façon d'évaluer et de traiter les patients atteints de blessure médullaire et qui nécessitent une ventilation mécanique.

2.2.2. Complications : bio traumatisme pulmonaire

2.2.2.1. Infiltration pulmonaire des neutrophiles et des macrophages

Les neutrophiles font partie des cellules effectrices importantes du système immunitaire. Des études indiquent qu'ils sont recrutés et attirés dans le poumon dans les heures suivant l'application de VM (Razavi et al. 2004; Bailey et al. 2008). En raison du lien manifeste entre les neutrophiles et les dommages pulmonaires dans les modèles expérimentaux de ventilation mécanique (Imanaka et al. 2001; Lim et al. 2003; Li et al. 2004), ils ont été identifiés comme agents susceptibles d'être responsable de dommages pulmonaires. Leur

migration s'effectuerait dans les espaces alvéolaires grâce à la coopération des cytokines avec les macrophages induits par l'étirement mécanique répété des alvéoles (Quinn et al. 2002). D'après Han et al, l'application de hautes pressions (45 cm H₂O) comparée aux basses pressions (7 cm H₂O) serait à l'origine de cette infiltration de neutrophiles au niveau pulmonaire (Bing HAN 2002). Les cytokines et les chimiokines telles que l'IL-8, joueraient un rôle chimio-attractif sur les neutrophiles dans les voies aériennes. Cette interaction entre les récepteurs ligands des chimiokines et ceux des neutrophiles serait en partie responsable du déclenchement ou de l'aggravation de dommages pulmonaires (Belperio et al. 2002; Puneet et al. 2005). Les macrophages peuvent également être très influents dans l'environnement pulmonaire, notamment en produisant de l'IL-1 β (Pugin et al. 1998; Wu et al. 2013). On sait aujourd'hui qu'ils peuvent exprimer un phénotype qui leur est propre lorsqu'ils évoluent dans un environnement pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire (Mantovani et al. 2004). Leurs caractéristiques seront détaillées dans la dernière partie.

2.2.2.2. Les stratégies ventilatoires

2.2.2.2.1. Effets sur le poumon sain

2.2.2.2.1.1 Assistance avec volumes courants bas et normaux

La ventilation mécanique appliquée avec un volume courant conventionnel (normal) semble avoir un impact non négligeable sur la production de cytokines pro-inflammatoires et contribuerait même au développement de dommages pulmonaires chez des patients dépourvus de pathologie pulmonaire. Determann et al, ont montré que l'application d'un volume courant normal ($V_T=10$ mL/kg) avait fortement augmenté l'expression de l'IL-6 dans le plasma des patients comparés à ceux ventilés à bas volume ($V_T= 6$ mL/kg) (Determann et al. 2010). Comme le souligne le modèle de Vaneker et al, une VM à volume courant normal ($V_T=8$ mL/kg) a entraîné progressivement l'augmentation de cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α et IL-10) selon la durée de ventilation (30, 60, 120 et 240 minutes), néanmoins réversible à l'arrêt du support respiratoire. Cette ventilation à volume courant normal ($V_T= 8$ mL/kg et PEEP= 4 cm H₂O) n'a par contre entraîné aucune altération

histologique ou dommage alvéolaire et a préservé l'intégrité des tissus pulmonaires (Vaneker et al. 2007). De plus, dans l'étude de Wilson et al, l'application de volumes courants normaux ($V_T=9$ mL/kg) n'a entraîné que de modestes changements des niveaux de MIP-2 dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) de souris (Wilson et al. 2005). Ce modèle offre l'opportunité d'étudier l'effet de la durée de la VM sur la physiologie pulmonaire. Il est également possible que la VM à volume courant normal et à basse pression de fin d'expiration puisse être délétère pour le tissu pulmonaire au même titre que les hauts volumes ou pressions inspiratoires, due à l'ouverture et la fermeture excessive des alvéoles. Il en résulte qu'après application de PEEP différentes sur les poumons de rats isolés, une ventilation avec une PEEP de 4 cm H₂O aurait plus de chance d'endommager les sacs alvéolaires alors que l'absence de PEEP aurait tendance à entraîner des dommages aux bronchioles (Muscedere et al. 1994). Dès lors selon ces résultats, la PEEP semble constituer un facteur déterminant quant au site du dommage au poumon. En admettant que la ventilation à volume courant normal n'endommagerait pas à elle seule un poumon sain, elle serait capable d'augmenter les réponses inflammatoires pulmonaires. Enfin d'après Altemeier et al, cette stratégie ventilatoire à volume courant conventionnel pourrait augmenter fortement la réponse immunitaire dans le poumon face à une infection bactérienne systémique et pourrait intervenir dans le déclenchement de dommages pulmonaires (Altemeier et al. 2004).

2.2.2.2.1.2 Assistance à haute ventilation

Syrkina et al, ont observé chez des animaux sains ventilés à hauts volumes ($V_T=20$ mL/kg) l'apparition de réponses oxydatives ainsi que des cytokines inflammatoires (IL-6; TNF- α) dans les LBA comparés à ceux d'animaux ventilés à bas volumes ($V_T=7$ mL/kg) (Syrkina et al. 2008). D'autres modèles ont montré que le TNF- α avaient des taux élevés dans les LBA lors de l'application de hauts volumes avec une PEEP absente (Tremblay et al. 1997) ou une pression positive (von Bethmann et al. 1998). En ce sens, dans la plupart des études expérimentales qui utilisent les hauts volumes comme stratégie ventilatoire, les LBA des

animaux sains ont montré une forte production d'IL-1 β , d'IL-6 et de MIP-2 comparés aux bas volumes (Tremblay et al. 1997; Ricard et al. 2001; Bailey et al. 2003; Copland et al. 2003; Gurkan et al. 2003). De même, la ventilation à haute pression (45 cm H₂O avec une PEEP à 0 cm H₂O) a semblé conduire au concept de la « *ventilation induisant des dommages pulmonaires* » caractérisé par de sévères lésions, par l'infiltration de neutrophiles ainsi que par de fortes productions d'IL-1 β et des MIP-2 non seulement dans les lavages pulmonaires, mais aussi dans le plasma (Hoegl et al. 2008). En revanche, les réponses inflammatoires pulmonaires associées à l'augmentation d'IL-1 β et de MIP-2 induites dans le poumon de rats suivant l'application de hautes pressions pendant 20 minutes (P=45 cm H₂O et PEEP= 0 cm H₂O), ont pu être réduites par l'administration au préalable d'IL-10 par nébulisation pendant 40 minutes. Aussi, l'étude a montré que cette inhalation d'IL-10 a réduit l'oxyde nitrique (NO) relâchés par les macrophages (Hoegl et al. 2009). L'aérosolthérapie étant un traitement local de la même manière que l'administration médicamenteuse, elle permet d'obtenir une meilleure délivrance du médicament à l'arbre respiratoire, et donc un meilleur dépôt au niveau du tissu pulmonaire (Fink et al. 2000). Bien plus encore, des dommages pulmonaires pourraient survenir aux poumons sains ventilés à hauts volumes, via des réponses inflammatoires véhiculées par la circulation sanguine. Chez des souris qui ont contracté un sepsis au préalable par ligamentation caecale, la ventilation avec des pressions moyennes (P=27 cm H₂O et PEEP=0 cm H₂O), a conduit à une forte augmentation d'IL-6 et du TNF- α dans leurs LBA de poumons sains, même en l'absence au préalable d'inflammation dans le poumon (Uematsu et al. 2013).

2.2.2.2.1.3 Temps d'exposition de la VM

Au même titre que le niveau d'assistance, la stratégie de ventilation à adopter va aussi dépendre du temps d'exposition du support respiratoire. Une étude chez des sujets adultes ayant bénéficié d'une chirurgie électorale (non-urgente, thoracique ou abdominale) sans pathologie pulmonaire, et ventilés de courte durée (3 heures) à bas volume, a révélé que les changements dans les concentrations pulmonaires des médiateurs étudiés (TNF- α , IL-6, IL-

1 β , IL-8, IL-12 et IL-10) étaient restés modestes quelque fut le volume courant appliqué, bas ou haut ($V_T=6$ ou $V_T=15$ mL/kg) (Wrigge et al. 2004). L'ordre de grandeur pour le TNF- α était de 10 pg/mL, de 50 pg/mL pour l'IL-6, de 80 pg/mL pour IL-1 β , 600 pg/mL pour l'IL-8, 8 pg/mL pour l'IL-12 et 10 pg/mL pour l'IL-10. Une étude plus récente chez des sujets sains ventilés entre 1h30 et 5h30, a montré que l'IL-6 avait augmenté de 5 à 8 pg/mL respectivement dans leurs LBA mais sans différence significative lorsque les niveaux de PEEP avaient été augmentés (Meier et al. 2008). Une étude chez l'animal a montré quant à elle, que lors d'une stratégie à volume courant conventionnel ($V_T=8$ mL/kg) appliquée de façon prolongée (24 heures) chez des animaux sains, la réponse inflammatoire avait été déclenchée par l'infiltration de neutrophiles et la production d'IL-6 dans leurs LBA avoisinant 700 pg/mL (Bailey et al. 2008).

Les concentrations de TNF- α dans l'étude de Ricard et al, n'ont pas été détectées (0 pg/mL) dans les LBA quelque soit la stratégie appliquée sur des poumons sains isolés de rats, avec un volume normal ou haut ($V_T=7$ mL/kg ou $V_T=42$ mL/kg) pendant 2 heures. Malgré leur faible taux, les quantités d'IL-1 β et de MIP-2 par contre étaient plus élevées avec un volume courant élevé, avec l'IL-1 β à 50 pg/mL et MIP-2 à 300 pg/mL (Ricard et al. 2001). Hormis le fait que des réponses inflammatoires peuvent survenir au poumon sain lors de courte période de ventilation, il apparait que la production de TNF- α soit aussi restée inchangée dans les LBA de rats sains ventilés à basse pression (6 cm H₂O) ou bien à haute pression inspiratoire (32 cm H₂O) pendant 1h 30 ou 4 heures (TNF- α avoisinant 0 pg/mL) (Verbrugge et al. 1999). Dans l'étude de Gurkan et al, ces taux de TNF- α n'ont pas été détectés non plus avec des volumes courants bas ($V_T=6$ mL/kg) ou hauts ($V_T=17$ mL/kg) pendant 4 heures (Gurkan et al. 2003). Tremblay et al, ont révélé quant à eux que les TNF- α pouvaient être fortement augmentés avec un volume courant haut ($V_T=15$ mL/kg; PEEP=0 cm H₂O; TNF- α =1000 pg/mL). Celui-ci fut comparé à un volume moyen ($V_T=7$ mL/kg; PEEP=3 cm H₂O; TNF- α =150 pg/mL) chez des poumons de rats isolés pendant 2 heures, avec un pic à 30 minutes de VM (Tremblay et al. 1997). Les niveaux de

TNF- α dans les poumons sains semblent donc assez mitigés selon la durée de ventilation et peu importe la stratégie adoptée. A l’opposé, d’autres médiateurs inflammatoires sont largement augmentés même avec des volumes courants bas et élevés ($V_T= 7$ mL/kg; PEEP= 3 cm H₂O vs. $V_T= 15$ mL/kg; PEEP=0 cm H₂O) appliqués pendant 5 heures *versus* 12 heures. Quelque soit le volume appliqué pour 12 heures de VM, le nombre de neutrophiles, de macrophages, d’IL-1 β et d’IL-6 a plus que doublé dans les LBA de souris (Hegeman et al. 2013). Par contre, pour chacun d’entre eux, il n’y a pas eu d’augmentation pour 5 heures de ventilation. Les effets délétères de la VM sur le poumon dépendraient donc de son temps d’exposition, mais également de la résistance caractéristique que possède chaque espèce face à l’évolution du dommage pulmonaire (Caironi et al. 2011).

2.2.2.2.2. Effets sur le poumon malade

2.2.2.2.2.1 Ventilation à volumes courants bas et normaux

Selon l’étude de Ranieri et al, chez les patients souffrant de SDRA ventilés avec un volume courant normal ($V_T= 7,6$ mL/kg; PEEP= 1,8 cm H₂O), les niveaux d’IL-6 et d’IL-1 β mesurés dans les LBA étaient significativement plus bas que ceux des patients ventilés avec un volume un plus élevé ($V_T= 11,1$ mL/kg; PEEP= 6,5 cm H₂O) (Ranieri et al. 1999). Les taux plasmatiques de TNF- α chez des patients avec des lésions pulmonaires préexistantes, ventilés à bas volume ($V_T= 6$ mL/kg), étaient plus bas que ceux des patients ventilés avec un volume courant élevé ($V_T= 12$ mL/kg) (Parsons et al. 2005). Par ailleurs dans un modèle expérimental de sepsis chez des rats les taux restaient fortement élevés avec un volume courant normal (7 mL/kg) (Whitehead et al. 2004). De plus, il a été démontré que l’application de volumes conventionnels chez les sujets sains (10-12 mL/kg) était étroitement liée à la mortalité chez des patients SDRA (N.Eng.J.Med 2000). En effet, les taux de mortalité étaient plus bas chez les patients ayant bénéficiés de bas volume ($V_T= 6$ mL/kg) comparé à ceux qui ont été soumis à des volumes élevés ($V_T=12$ mL/kg). Certains auteurs (Meduri et al. 1995; Park et al. 2001; Meduri et al. 2002) pensent que ce résultat est

relié à la persistance élevée de TNF- α , IL-1 β et IL-6 dans le plasma et les lavages pulmonaires de ce type de patients.

2.2.2.2.2 Assistance à haute ventilation

L'application des hauts volumes ou des hautes pressions sur des poumons malades doit soigneusement être prise en considération si on veut éviter de les endommager d'avantage (Tobin 2001; Dreyfuss et al. 2004) ou de contribuer à une inflammation pulmonaire supplémentaire. On considère désormais que les hauts volumes appliqués sur des poumons comportant des lésions préexistantes entraînent une réponse pulmonaire importante (*i.e.* production de TNF- α et MIP-2) comparés à des volumes courants normaux ($V_T= 8,8$ mL/kg) (Chiumello et al. 1999; Held et al. 2001; Wilson et al. 2003).

Pour toutes ces raisons, qu'un poumon soit sain ou endommagé initialement, il paraît donc important d'opter préférentiellement pour l'utilisation de bas volumes si l'on souhaite minimiser les dommages pulmonaires éventuels (Schultz et al. 2007).

2.2.3. Propagation: inflammation systémique

Les études ont révélé que la VM pouvait déclencher une réponse inflammatoire pulmonaire et provoquer une inflammation véhiculée par le sang (Slutsky et al. 1998; Chiumello et al. 1999; Ranieri et al. 1999). Hong et al, n'ont observé aucun changement dans leur récente étude sur les marqueurs systémiques d'animaux sains ventilés (Hong et al. 2012). Les cytokines TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 et IL-10 ont été mesurées dans le sang pulmonaire avant et après 8 heures de ventilation ($V_{T1}= 15$ mL/kg avec PEEP=3 cm H₂O; $V_{T2}=6$ mL/kg avec PEEP=3 cm H₂O; $V_{T3}=6$ mL/kg avec PEEP=10 cm H₂O). Les niveaux d'IL-6 et d'IL-1 β oscillaient entre 0-20 pg/mL, ceux de TNF- α sont restés à 50 pg/mL et IL-8 ainsi que IL-10 n'ont pas été détectés. Chez des patients adultes sains, ayant bénéficié d'une chirurgie électorale, les changements des taux plasmatiques de TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 et IL-12 étaient restés modestes quelque soit le volume appliqué ($V_T= 6$ ou $V_T=15$ mL/kg)

La ventilation mécanique

(Wrigge et al. 2000). Dans les études de Parsons et al, chez des patients présentant des lésions pulmonaires notamment, la diminution du volume courant a été associée à la diminution des concentrations plasmatiques de TNF- α (Parsons et al. 2005; Parsons et al. 2005). De plus, l'inflammation pulmonaire induite par la VM chez l'animal a pu se propager à la circulation, telle que l'a montré l'augmentation des concentrations de TNF dans le sérum d'animaux ventilés à hauts volumes, ayant des lésions pulmonaires préexistantes (Chiumello et al. 1999). D'autres ont montré une augmentation de ces taux mais sans différence significative (Bueno et al. 2002).

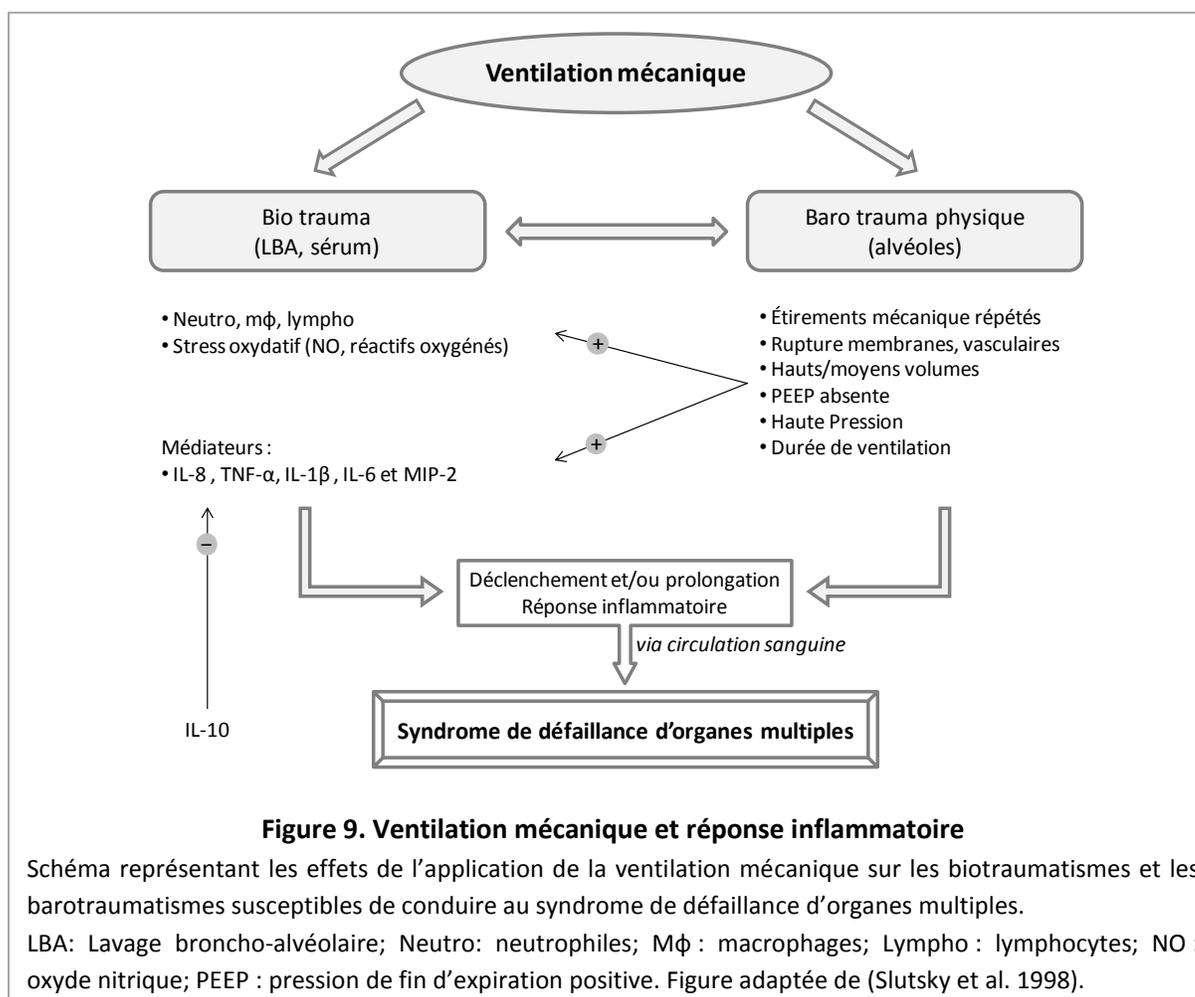


Figure 9. Ventilation mécanique et réponse inflammatoire

Schéma représentant les effets de l'application de la ventilation mécanique sur les biotraumatismes et les barotraumatismes susceptibles de conduire au syndrome de défaillance d'organes multiples.

LBA: Lavage broncho-alvéolaire; Neutro: neutrophiles; M ϕ : macrophages; Lympho : lymphocytes; NO : oxyde nitrique; PEEP : pression de fin d'expiration positive. Figure adaptée de (Slutsky et al. 1998).

D'un point de vue anatomique et physiologique, les poumons sont bien localisés pour influencer les organes distaux, tel que le cœur ou le rein (Netter Deuxième édition). Le système vasculaire pulmonaire reçoit non seulement le débit cardiaque, mais il abrite aussi un grand réservoir de neutrophiles (Hogg 1994). Il existe par conséquent un risque potentiel que le poumon interagisse avec ces organes plus ou moins éloignés, en favorisant la circulation des cellules inflammatoires (von Bethmann et al. 1998; Chiumello et al. 1999; Held et al. 2001; Ricard et al. 2001).

2.2.4. Mécanismes responsables des complications pulmonaires

2.2.4.1. Nature des mécanismes

Plusieurs mécanismes susceptibles d'être responsable de la libération des médiateurs inflammatoires ont été identifiés suite à l'application de la ventilation. Le premier mécanisme, la *décompartmentalisation*, est un stress mécanique qui a été défini par certains auteurs comme étant un traumatisme directement lié à la rupture de la membrane plasmique alvéolaire et qui entraînerait la libération des cytokines à la fois dans les espaces alvéolaires et dans la circulation sanguine (Grembowicz et al. 1999; Vlahakis et al. 1999; Mourgeon et al. 2000; Halbertsma et al. 2005). Le second mécanisme, le phénomène de *mécanotransduction*, a été associé aux différentes activités cellulaires de l'épithélium alvéolaire. Lorsque les cellules pulmonaires sont étirées mécaniquement par exemple, une augmentation de la production de la protéine MIP-2 (IL-8 chez l'homme), un médiateur important dans les réactions inflammatoires, a été observée (Mourgeon et al. 2000). L'application de hauts volumes dans les modèles expérimentaux ou un étirement mécanique répété ont permis aux cellules pulmonaires telles que les macrophages alvéolaires et les cellules endotrachéales de répondre à cette sur-distension en produisant des cytokines inflammatoires (Tremblay et al. 1997; von Bethmann et al. 1998; Grembowicz et al. 1999). La déformation cyclique à 12, 24 et 48 heures a ainsi été capable de déclencher une production de médiateurs inflammatoires (IL-8) par l'épithélium

alvéolaire, avec ou sans dommage pulmonaire au préalable. Le cytosquelette lui-même est identifié comme structure importante dans ce mécanisme de mécanotransduction (Vlahakis et al. 1999). Malgré l'identification des phénomènes susceptibles d'être responsables de la libération de médiateurs inflammatoires, ces mécanismes ainsi que la traduction en signaux intracellulaires sont encore mal connus.

2.2.4.2. Réponse oxydative à l'étirement mécanique répété

2.2.4.2.1. Le stress oxydatif

La réponse inflammatoire au niveau du poumon serait médiée par le stress oxydatif (Kelly 2003). Ce stress oxydatif a été identifié comme médiateur dans la réponse des cellules face à l'application du support ventilatoire. En effet, l'étirement mécanique alvéolaire des cellules épithéliales est la cause de la présence active de cytokines inflammatoires, notamment l'IL-8 et le TNF- α . De plus, il serait un facteur important d'activation de stress oxydatif dans le poumon (Pugin et al. 1998; Vlahakis et al. 1999). Les réactions d'oxydation dans les cellules sont des phénomènes habituels et conditionnent leur bon fonctionnement. Au cours de la respiration, chacune de nos cellules transforme l'oxygène en eau. Parfois, une partie de cet oxygène échappe à la transformation complète et donne une forme d'oxygène réactive et toxique, l'anion super oxyde (O_2^-), caractéristique des radicaux libres (Imlay 2008). Il existe d'autres espèces chimiques radicalaires qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés, telles que le radical hydroxyle (OH^\cdot), le monoxyde d'azote (NO^\cdot), le radical peroxyde (ROO^\cdot) ou encore le radical alkoxyde (RO^\cdot). Ces espèces vont réagir avec les molécules qui sont proches de leur lieu de production (Bielski BHI 1995). Le stress oxydatif devient anormal si les cellules sont dépassées par la quantité de radicaux libres (nommés également espèces réactives oxygénées, *Reactive Oxygen Species*, ROS) à éliminer ou si elles ne disposent pas de suffisamment de ressources anti-oxydantes (les vitamines A, C et E, les oligoéléments ou les systèmes enzymatiques tels que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et glutathion peroxydase (GPX)) pour les éliminer (Kelly 2003).

2.2.4.2.2. *Dommmages membranaires*

Il a été démontré que le stress oxydatif est un facteur important de dommages cellulaires car il est capable de participer aux lésions tissulaires et à l'inflammation chronique si les défenses enzymatiques ne pouvaient pas éliminer normalement ces radicaux (Grembowicz et al. 1999; Vlahakis et al. 2003). La production de cellules inflammatoires a également montré qu'elles pouvaient être une source importante de stress oxydatif. La présence de ces cellules, principalement les neutrophiles et les macrophages, peut conduire à l'augmentation de la consommation en oxygène et à la transformation de celui-ci en ROS susceptibles d'attaquer les tissus sains (Thannickal et al. 2000).

2.2.4.2.3. *Isoprostane: reflet du statut oxydatif*

L'isoprostane est un important vasoconstricteur pulmonaire et un facteur stable en tant que marqueur oxydatif. Appartenant à la famille des lipides et plus exactement du métabolisme de l'acide arachidonique, il est impliqué dans de nombreuses maladies humaines. Il permet la mesure de peroxydation lipidique et offre un moyen d'évaluer le stress oxydatif au niveau du poumon (Janssen et al. 2002; Morrow et al. 2002). Les études humaines ainsi que les modèles expérimentaux ont tous deux révélé que les taux d'isoprostane augmentent autant dans les maladies avec de l'inflammation chronique (Basu et al. 2001), du diabète (Davi et al. 2003), de l'athérosclérose (Pratico et al. 1997), que les maladies pulmonaires (Carpenter et al. 1998; Montuschi et al. 1999; Cracowski et al. 2001). Les isoprostanes sont capables d'exercer des réactions dans les cellules où ils sont formés. Leur formation nécessite principalement de l'acide arachidonique, de l'oxygène moléculaire et des radicaux libres. Ils sont formés avec des phospholipides de tissus et ensuite libérés sous forme d'acide libre après hydrolyse, vraisemblablement par des phospholipases (Sodergren et al. 2000).

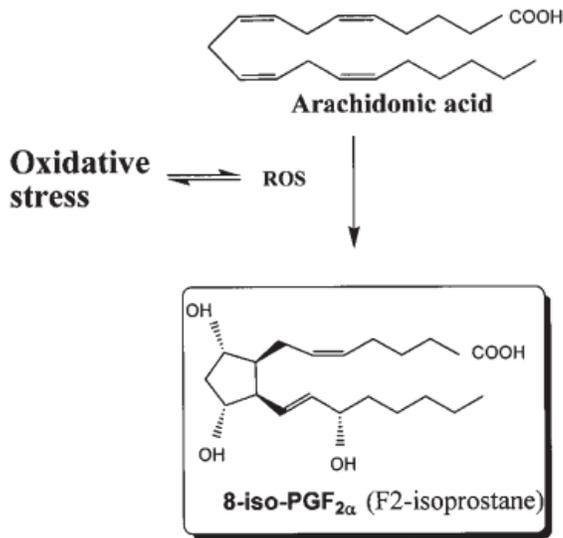


Figure 10. Schéma simplifié de la formation des isoprostanes.

Formation de F2-isoprostane à partir de l'acide arachidonique par catalyse de trois radicaux libres (Basu 2007). ROS; reactive oxygen species; PGF; prostaglandin F.

Il a également été montré que la ventilation mécanique augmentait significativement la concentration d'isoprostane dans les lavages pulmonaires (Haitsma et al. 2000; Lucin et al. 2007). Une peroxydation lipidique (réaction des ROS, plus particulièrement les OH avec des lipides des membranes cellulaires) serait également plus importante chez les animaux ventilés de part l'augmentation des radicaux libres dans les poumons.

2.2.4.2.4. Défenses naturelles

2.2.4.2.4.1 Antioxydants

Il existe dans l'organisme des défenses naturelles spécifiques mises en place et capables de limiter ou de détruire les radicaux libres produits par la cellule, telles que les systèmes enzymatiques antioxydants (super-oxyde dismutase ou *SOD*, l'hème-oxygénase-1 ou *HO-1*, la catalase, la glutathion peroxydase ou *GPX*) et les agents antioxydants (vitamines A, C et E). Ainsi, une série de réactions enzymatiques va diminuer le potentiel oxydant de l' $O_2^{\cdot-}$ et aboutir à la formation d' H_2O . Le glutathion réduit (GSH) va contribuer à la transformation de H_2O_2 (substrat très endommageable pour les cellules et les tissus) issu de l'oxydation de l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O , par une réaction enzymatique catalysée par la *GPX*. Celle-ci va conduire à la production de la forme oxydée du glutathion (le glutathion disulfide, GSSH).

La ventilation mécanique

sera en retour réduit en GSH par une réaction catalysée par la glutathion réductase (GR) (Thannickal et al. 2000). Il existe donc un équilibre entre les deux formes GSH et GSSG dont les proportions respectives sont fonction du potentiel redox propre à la cellule. Enfin, ce rapport GSH/GSSG est considéré comme un indicateur pertinent du degré de stress oxydatif subi par la cellule (Baeza et al. 2007).

2.2.4.2.4.2 Mécanismes

Lorsque le niveau de stress oxydatif est faible, les processus enzymatiques permettent de restaurer le déséquilibre redox de la cellule. Dans un modèle d'agression oxydative chez des animaux ventilés, l'enzyme anti-oxydante super-oxyde dismutase, capable de détruire les radicaux libres dans la cellule, a été mesurée en moindre quantité chez les animaux ventilés à plus long terme que ceux ventilés à court terme. Cette étude a permis d'émettre l'hypothèse que la diminution des défenses anti-oxydantes pouvaient entraîner la production de radicaux libres oxygénés en plus grande quantité (Jaber et al. 2005).

L'HO-1 (*stress protein hem oxygenase-1*), est une enzyme dont l'expression est induite rapidement lorsque survient un stress oxydatif et constitue de ce fait, un bon marqueur de stress. L'HO-1 a été révélé comme étant une des deux formes d'enzyme hème oxygénase qui procure à l'organisme un mécanisme de défense important face à l'agression oxydative du poumon et aux cytokines (Poss et al. 1997). Une déficience en HO-1 pourrait entraîner une augmentation de la molécule hème dans la circulation et par conséquent une agression oxydative au niveau vasculaire, des lésions tissulaires et de l'inflammation (Yachie et al. 1999). HO-1 possède des fonctions antioxydantes et cytoprotectrices du fait qu'elle dégrade l'hème en fer, puis en bilirubine et biliverdine (Otterbein et al. 2000; Chung et al. 2009) (Jansen et al. 2012).

Des études chez les macrophages ont montré que l'HO-1 semble être capable de réduire le taux de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α) et d'augmenter la production des cytokines anti-inflammatoires (IL-10) (Wagener et al. 2003; Philippidis et al. 2004; Xia et al. 2007).

Selon Koch et *al*, l'IL-10 semble effectivement avoir un lien étroit avec l'expression de HO-1 dans des cultures cellulaires de monocytes humains. L'IL-10 a induit une forte augmentation de HO-1 et inversement, l'inhibition de l'activité de cette dernière au cours de l'incubation d'IL-10 a réduit presque complètement l'effet protecteur de celle-ci (Koch et al. 2009). L'induction d'HO-1 faciliterait la protection par l'IL-10 issue de la lyse cellulaire. De plus, les résultats expérimentaux de Sierra-Filardi et *al*, suggèrent que l'HO-1 semble être un facteur important pour l'activité anti-inflammatoire des facteurs de croissances des macrophages (M-CSF) liés à la polarisation de type M2. Le lien entre les récepteurs membranaires du macrophage, l'HO-1 et l'IL-10 contribuerait à un environnement immunosuppresseur dans le tissu tumoral (Sierra-Filardi et al. 2010). Par ailleurs, le monoxyde de carbone (CO) issu du catabolisme de l'hème par l'oxygénase aurait des effets anti-inflammatoires puissants. Le traitement au CO et l'expression HO-1 a augmenté la production d'IL-10 dans les macrophages à la suite d'un stimulus pro-inflammatoire (LPS) (Otterbein et al. 2000). Inversement, la production de HO-1 semblerait nécessaire à l'action anti-inflammatoire de l'IL-10 (Lee et al. 2002). Lee et *al*, ont montré que l'IL-10 avait induit l'expression de HO-1 dans des macrophages murins, par l'intermédiaire de la protéine kinase p38. L'inhibition de HO-1 a eu un effet significatif sur l'IL-10 en inversant son effet inhibiteur sur la production de TNF- α , induit par du LPS. La relation entre l'HO-1 et l'IL-10 semble alors être très proches de par leur propriétés anti-inflammatoires, notamment sur la suppression immunitaire des macrophages (Bogdan et al. 1991; de Waal Malefyt et al. 1991).

Quand le déséquilibre entre les pro- et antioxydants s'avère plus important, les voies de signalisations des facteurs de transcriptions MAPKs, Nf κ B, qui sont sensibles au potentiel redox de la cellule, sont activées. Ces facteurs ont montré qu'ils avaient participé au déclenchement de la réponse inflammatoire en activant l'expression de cytokines et des molécules d'adhésion (Imrich et al. 2007; Li et al. 2008). Enfin, en cas de stress oxydatif important, traduit par un déséquilibre prononcé dans le rapport GSH/GSSG vu

précédemment, un effet toxique est mesurable. En effet, on note des perturbations de la perméabilité des mitochondries qui conduisent à une désorganisation de la chaîne de transport d'électrons. Cette altération de la chaîne respiratoire mitochondriale entraîne l'apoptose de la cellule par relargage de facteurs pro-apoptotiques de la part des mitochondries (Imrich et al. 2007; Li et al. 2008). L'activation des cellules immunitaires telles que les macrophages est aussi une source importante de production de ROS. La présence d'agents étrangers va activer ces macrophages et entraîner une augmentation de la consommation d'oxygène. Dès lors, par l'action de processus enzymatiques, cet oxygène va être transformé en radicaux libres qui vont s'attaquer à la fois à l'agent étranger et à la fois aux tissus sains (Thannickal et al. 2000).

L'étirement mécanique répété des alvéoles peut être un facteur important d'activation aussi bien de stress oxydatif que du macrophage et la réponse oxydative en elle-même peut également provenir des macrophages activés (Mourgeon et al. 2000; Mosser 2003; Wu et al. 2013).

2.3. Le macrophage

Le macrophage est reconnu pour être une population cellulaire importante dans la défense de l'hôte. Il est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que l'inflammation et les infections. Le macrophage est une cellule dynamique qui joue un grand rôle d'effecteur dans la réponse immunitaire où il a une place centrale (Gordon 2007).

2.3.1. Un rôle central

2.3.1.1. Origine et propriétés

Identifiées en tant que grandes cellules mononuclées retrouvées dans les tissus de l'organisme, le terme de macrophage fut employé pour la première fois en 1905 par Élie Metchnikoff (Epps 2005). Par la suite, les travaux de Georges Mackaness furent les premiers en 1962, à leur conférer une spécificité de « *tueur* » de cellules dans les réactions immunitaires (Epps 2005). Le macrophage est une cellule d'origine sanguine qui provient de la différenciation d'un monocyte, une sous population de cellules de la moelle osseuse. Il agit comme un système large et diversifié de phagocytes mononuclées tout au long de la vie de l'individu (Brancato et al. 2011). Les étapes de cette différenciation du monocyte en macrophage sont essentiellement dépendantes de l'action de l'IL-3, puis du GM-CSF et du M-CSF (Gordon et al. 2010). Cette différenciation va permettre au macrophage d'effectuer trois fonctions principales : 1) la phagocytose (ingestion de bactéries, levures, débris cellulaires), 2) l'activité de sécrétions (cytokines par exemple) et, 3) la coopération cellulaire (cellules présentatrices d'antigènes en relation avec les lymphocytes).

2.3.1.2. Distribution

2.3.1.2.1 Tissus sains de l'organisme

Les études ont amplement relaté que le macrophage était une cellule hétérogène non seulement de par les mécanismes qui gouvernent sa différenciation, mais également de par sa distribution dans les différents tissus de l'organisme ainsi que par sa capacité à réagir en fonction du stimulus et de l'environnement tissulaire (Gordon et al. 2010; Murray et al. 2011). En l'absence d'inflammation, il a été montré que les macrophages résidaient dans les différents organes de l'organisme en tant que véritables sentinelles pour les blessures et les infections. Ils peuvent différer morphologiquement et porter différents noms (Brancato et al. 2011). Leur distribution s'étend de la peau (cellules de Langerhans), au cerveau (cellules microgliales), relativement protégé et peu accessible, aux intestins, aux poumons (macrophages alvéolaires), au foie (cellules de Kupffer), à la rate (macrophages spléniques), aux reins (cellules mésangiales), aux tissus connectifs (histiocytes) ou encore aux os (ostéoclastes). Les macrophages des différents tissus peuvent avoir des fonctions spécialisées mais ils contribuent tous au maintien de l'homéostasie tissulaire en éliminant les cellules mortes et autres débris (Geissmann et al. 2010). Ils migrent à travers différents compartiments du corps, y compris la moelle osseuse, le sang, les organes lymphoïdes, et tous les tissus hématopoïétiques.

2.3.1.2.2 Présence du macrophage dans le modèle de traumatisme médullaire

Gris et al, ont observé que les poumons de rats sans lésion médullaires contiennent peu de marqueurs cellulaires spécifiques aux macrophages ED-1, qui activent les macrophages distribués dans les espaces interstitiels péri-alvéolaires (Gris et al. 2008). Entre 12 heures et 3 jours post-traumatiques, ils ont observé que les poumons de rats lésés contenaient cette fois, une augmentation de la détection des marqueurs spécifiques aux macrophages ED-1, à l'activité phagocytaire dans les espaces alvéolaires. L'expression de ces ED-1 dans les homogénats de poumons était aussi supérieure à celle des animaux témoins (sans lésion) à 12 heures et 3 jours post-traumatique. Ces animaux témoins n'ont présenté aucune

influence sur l'expression de ces marqueurs cellulaires dans les poumons. De plus, les macrophages alvéolaires ont un niveau constant d'activité métabolique qui correspond aux niveaux de myéloperoxydases (MPO), retrouvée dans la plupart des poumons des rats sans lésion médullaire (Gris et al. 2008). Les auteurs pensent que l'augmentation d'activité des MPO dans les poumons d'animaux blessés médullaires serait donc due à l'activation des macrophages dans le poumon.

Toutefois au niveau de la moelle épinière, le bénéfice des effets des macrophages dans la réparation tissulaire est un sujet contesté. On attribue souvent une connotation néfaste au phénomène de l'inflammation puisque ces cellules immunitaires sont aussi connues pour libérer des radicaux oxygénés ainsi qu'une variété de cytokines et de chimiokines, capables d'endommager d'avantage les tissus lésés (Gal et al. 2009). Leur présence défavorable dans le poumon serait due à celle des neutrophiles et à l'entrée des macrophages activés (Gris et al. 2008). Les recherches sur les approches thérapeutiques ont commencé à les caractériser en fonction de leur localisation et leur fonctionnement afin de mieux comprendre leur rôle dans la réponse immunitaire (Trivedi et al. 2006) et d'élucider leur évolution sur la récupération fonctionnelle locomotrice (Knoller et al. 2005).

2.3.1.3. Morphologie

2.3.1.3.1. Composante biologique

Il existe des différences morphologiques entre les monocytes et les macrophages malgré que tous deux possèdent un noyau rond ou en forme de rein, un cytoplasme et une membrane ondulée. Les macrophages expriment notamment une molécule de surface, le CD68, associé à la phagocytose. Le macrophage a une taille plus grande que le monocyte (25 à 50 μm et 12 à 15 μm respectivement) et sa teneur en ADN et sa composition en organites intracellulaires est enrichie (regorgeant de mitochondries et de lysosomes). Les monocytes quant à eux, possèdent un ou deux nucléoles, qui seront perdus lors de la différenciation en macrophage, laissant place à un volumineux nucléole et la présence de vacuoles de phagocytose, qui leur confèrent une grande capacité de phagocytose. La

Le macrophage

locomotion du macrophage semble assurée par un cytosquelette bien développé et formé de microtubules (Evans et al. 2003).

2.3.1.3.2. Composante phénotypique

Les populations de macrophages constituent une famille de cellules ayant un phénotype très hétérogène, marqué par leur capacité à reconnaître un stimulus endogène ou exogène auquel ils sont soumis. Ils ont été classés selon deux différents sous-types basés sur l'expression polarisée de leurs cytokines (Mantovani 2006; Murray et al. 2011).

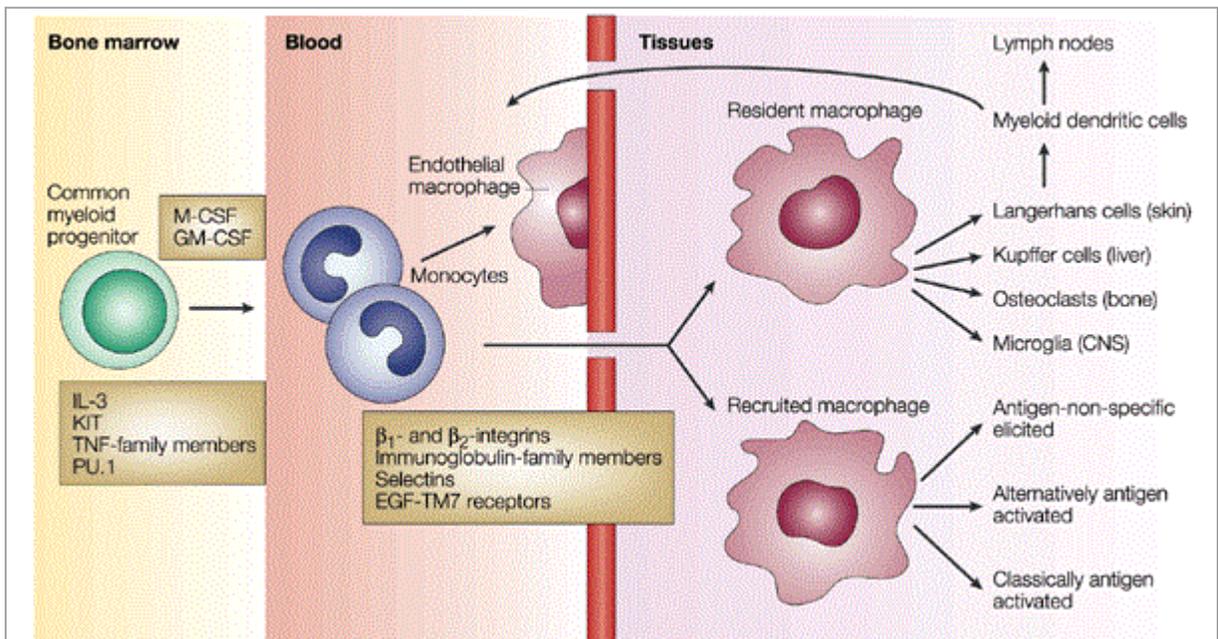


Figure 11. Différentiation des monocytes en macrophages

Les macrophages résidents dans les tissus sont soumis à une activation en réponse à une variété de stimuli inflammatoires. Le recrutement des monocytes et précurseurs s'effectue dans la moelle osseuse. Les macrophages élus ont été classés comme antigènes non spécifiques à une réponse envers un envahisseur pathogène de l'organisme, ou envers un agent inflammatoire, ou bien ont été classés comme étant activés de façon classique ou de façon alternative par un antigène spécifique de la réponse immunitaire. À l'origine, les cellules s'adaptent à un microenvironnement particulier, il est donc difficile de distinguer les macrophages résidents de ceux récemment recrutés. D'après Ref. (Gordon 2003).

Ils reconnaissent le stimulus grâce à leur vaste arsenal de molécules de surface qui déclenchent des signaux cellulaires et des changements complexes au niveau de l'expression des gènes (section 2.3.1.3). La dichotomie phénotypique a été traduite par la diversité de leurs rôles et de leurs fonctions (section 2.3.1.4). Le concept d'activation des macrophages a été caractérisé par la nature de l'agent activateur, des gènes et des fonctions exprimées en réponse à cette activation.

2.3.1.3.3. Récepteurs de surface

Les macrophages remplissent une multitude de fonctions à l'aide d'un vaste arsenal de molécules de surface, que ce soit dans les conditions normales ou dans des états pathologiques, tels que l'inflammation (Murray et al. 2011). Ces récepteurs varient en nombre et en nature selon son degré de différenciation, son activité et l'environnement dans lequel il évoluera (infection, inflammation ou blessure) (Mege et al. 2011; Murray et al. 2011). Considérant le large répertoire de récepteurs du surface, voici les principaux groupes de molécules de surface:

- Les immunoglobulines (Ig), dont le rôle principal est l'attachement et la phagocytose des particules recouvertes d'anticorps (microbes, cellules tumorales);
- Les récepteurs des molécules du Complément (CR, *Complement Receptor*) impliqués dans la phagocytose (Griffin et al. 1975);
- Les adhésines (sélectines/intégrines) permettant aux macrophages d'adhérer aux cellules environnantes et à la matrice extracellulaire. La liaison des sélectines aux cellules endothéliales va permettre le ralentissement des monocytes dans le vaisseau sanguin (Jandrot-Perrus et al. 2000). Les intégrines permettent une forte liaison des monocytes/macrophages avec les cellules endothéliales (Ammon et al. 2000);
- Les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de classe I et de classe II nécessaires à la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Le CMH (I) permet la

liaison avec les lymphocytes T cytotoxiques via la molécule CD8 et le CMH (II) celle avec les lymphocytes T auxiliaires via le CD4 (Charles A. Janeway 2003);

- Les récepteurs pour de nombreux facteurs de croissance et cytokines (GM-CSF, M-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, TNF- α , interféron IFN). Les facteurs de croissance permettent la différenciation, discutée dans la section 1.1.1, tandis que les cytokines vont provoquer leur activation (section 2.1.2.2.6);
- Les récepteurs de chimiokines; ces chimiokines, abordées dans la section 2.3.1.4.2, sont de très petits peptides chimio-attractants produits par les cellules hématopoïétiques de même que par les kératinocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et épithéliales. Elles favorisent le chimiotactisme des cellules hématopoïétiques vers le site d'inflammation (Mahalingam et al. 1999);
- Les glycoprotéines (lectine) permettent la liaison aux oligosaccharides (mannose, galactose) et aident à la phagocytose (Ezekowitz et al. 1990);
- Les récepteurs « éboueurs » (scavenger), vont permettre la reconnaissance des lipoprotéines LDL (*Low Density Lipoprotein*). Ils sont impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose de bactéries, de cellules apoptotiques ainsi que dans l'adhésion cellulaire (Nikolic et al. 2011); et enfin,
- Les récepteurs TLR (Toll-like receptors, TLR) qui jouent un rôle important dans l'immunité innée, notamment dans la défense des microorganismes en provoquant l'induction du TNF- α , du NO et de l'IL-12 (Werling et al. 2004).

2.3.1.4. Rôle dans la réponse immunitaire

2.3.1.4.1. Généralités

D'une façon générale, les macrophages participent et jouent de nombreux rôles tant dans la réponse immunitaire innée qu'adaptative. Un de leurs principaux rôles, hors inflammation, est d'éliminer les débris cellulaires et tout autre corps pathogène, par phagocytose notamment. Grâce à ce phénomène et à l'activation de médiateurs inflammatoires, les macrophages conduisent à la synthèse de cytokines et de facteurs de croissance. Les

récepteurs TLR des macrophages peuvent aussi reconnaître les composants spécifiques présents chez les microorganismes pathogènes dénommés PAMP (pour pathogen-associated microbia pattern). Parmi ces PAMP on retrouve des composants des parois bactériennes comme les LPS, la flagelle de certaines bactéries, de l'ADN bactérien ou encore de l'ADN viral. Les macrophages vont alors pouvoir recruter les phagocytes circulants (neutrophiles) par la sécrétion d'IL-8, conduisant alors à l'induction de l'inflammation (Foster 2001). Ces fonctions trophiques (phagocytose) et toxiques contrôlées par leurs récepteurs (Mege et al. 2011) vont leur permettre de combattre les agents pathogènes (Cros et al. 2010). Par ailleurs, leur capacité de digestion constitue un lien important entre l'immunité innée et adaptative. Les macrophages peuvent conduire à la stimulation des lymphocytes T et déclencher une réponse immunitaire spécifique (Mosser 2003).

2.3.1.4.2. Rôle dans l'immunité innée

2.3.1.4.2.1 Production d'agents antiseptiques

Le macrophage utilise la phagocytose dans le but d'éliminer débris, cellules tumorales et agents pathogènes. Ceux-ci se retrouvent dans une vacuole, qui a pour nom, phagosome (Labrousse et al. 2011). Les enzymes lysosomales, produites par le macrophage et le plus souvent contenues dans une autre vacuole appelée lysosome, permettent la digestion de la particule ingérée, lui conférant ses capacités antimicrobiennes. Cette mobilité chez les lysosomes pourrait être un processus cellulaire clé dans la phagocytose pour l'activité antibactérienne. Celle-ci serait alors ralentie par l'activation des récepteurs de phagocytose (Labrousse et al. 2011). Plusieurs messagers secondaires et facteurs de transcription semblent participer au mécanisme d'activation du macrophage. Il existe par exemple de la voie de signalisation JAK/STAT (Kleinert et al. 1998) et des MAP Kinases (Mitogen-Activated Protein Kinases) (Chakravorty et al. 2001; Chan et al. 2001). Lowenstein et al, ont évoqué que certains facteurs de transcription appelés NF- κ B, pouvaient s'associer à ces kinases et intervenir dans le mécanisme d'action du macrophage (Lowenstein et al. 1993).

Grâce à leurs puissants ensembles de protéines membranaires, Biswas et al, ont reporté que les macrophages généraient des réactifs oxygénés dont les métabolites azotés, jouant ainsi un rôle dans la réponse immunitaire innée (Biswas et al. 2008). Même si les réactions d'oxydation produites par les macrophages semblent être des phénomènes habituels et conditionner leur bon fonctionnement, le fait de produire du monoxyde d'azote (NO) et des métabolites de l'oxygène, n'est pas sans danger puisque tout dérèglement peut entraîner du stress oxydatif, comme nous l'avons vu précédemment à la section 2.2.4.2.2. Les études ont montré que le NO était une molécule importante qui intervenait dans le système immunitaire et que la signalisation intracellulaire responsable de sa production était complexe. Les actions du NO sont diverses et il est reconnu d'une part pour son effet antimicrobien chez les bactéries, les parasites, les virus ou les champignons (Kang et al. 2012) et, d'autre part, pour son effet anti-tumoral. Il peut inhiber certaines enzymes essentielles à la croissance des cellules tumorales telles que celles de la chaîne respiratoire (Pervin et al. 2001). Cependant, le NO semble capable d'endommager les cellules et les tissus sains par la dégradation de la matrice cellulaire en recrutant des cellules inflammatoires, et conduisant à une inflammation chronique (Kang et al. 2012). Les radicaux libres de l'oxygène produits par le stress oxydatif sont un moyen de défense important chez les phagocytes (monocytes/macrophages) ou les neutrophiles. De la même façon que le NO, les métabolites de l'oxygène sont très utiles dans la destruction des pathogènes et des cellules tumorales, mais peuvent aussi conduire à des effets irréversibles sur les cellules et les tissus sains environnants. Impliqués dans la signalisation intracellulaire, ces métabolites peuvent aboutir à un déséquilibre et possiblement jouer un rôle délétère intrinsèque puisque qu'ils s'attaquent aux membranes cellulaires et peuvent entraîner des ruptures et les rendre perméables. Ils provoquent des altérations à la fois à la cellule et aux organites intra-cytoplasmiques.

2.3.1.4.2.2 Sécrétions de cytokines

De nombreuses études ont montré que les macrophages avaient la capacité de sécréter une quantité impressionnante de médiateurs solubles tels que les cytokines (section 2.1.3.2) et

Le macrophage

d'activer différents types moléculaires: enzymes antibactériennes et protéolytiques, chimiokines, cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et le facteur de nécrose tumorale β , TNF- β) (Kolackova et al. 2008; Mege et al. 2011) et cytokines pro-inflammatoires l'IL-6, l'IL-1 β et le TNF- α (Martinez 2011). Ces dernières ont pour fonction commune d'induire de la fièvre avec la production de protéines hépatiques (fibrine) dans le plasma sanguin en phase aiguë. La fibrine a été observée comme jouant un rôle déterminant dans la coagulation et l'obturation de la plaie et l'IL-1 et l'IL-6 favoriseraient l'activation des lymphocytes T et B ainsi que les cellules NK (Charles A. Janeway 2003). Les modes d'actions et de régulations de ces cellules sont complexes comme en témoignent le pléiotropisme et la redondance (**Figure 6**). Enfin, le macrophage peut sécréter plusieurs facteurs de croissance, tels que le M-CSF et le GM-CSF (Figure 11). Ceux-ci vont permettre la prolifération des précurseurs hématopoïétiques des monocytes de la moelle osseuse et ainsi aider les phagocytes déjà présents à l'endroit de la blessure.

2.3.1.4.2.3 Chimiotactisme

Les chimiokines, évoquées précédemment à la section 2.1.3.2.2, sont des protéines qui ont des propriétés chimio attractantes. Elles peuvent induire le recrutement cellulaire en trois étapes : 1) stimulation de l'expression d'adhésines à la surface des cellules endothéliales vasculaires, permettant l'attachement des leucocytes et leur migration dans les tissus ; 2) production d'un gradient de concentration entre les chimiokines, les guidant vers la lésion, et 3) activation des fonctions des leucocytes par liaison avec leur récepteurs spécifiques, induisant l'activation de la signalisation intracellulaire (Mege et al. 2011). Certaines études ont aussi largement observé que les macrophages produisaient d'autres chémokines telles que IL-8 (chez l'homme), MIP-2 (homologue fonctionnel le plus proche chez la souris, Macrophage Inflammatory Protein 2), IP-10 (Interferon-inductible Protein 10), MCP (Monocyte Chemoattractant Protein) et MIP-1 α et β , qui leur permettraient d'exercer leur pouvoir attractant (Murray et al. 2011).

2.3.1.4.3. Rôle dans l'immunité adaptative

2.3.1.4.3.1 Cellules présentatrices d'antigène

En plus d'éliminer les débris cellulaires ou tout envahisseur étranger, les macrophages ont un rôle essentiel dans la réponse immunitaire adaptative médiée par les lymphocytes T. Ils sont capables de présenter des antigènes (Charles A. Janeway 2003). Ce seraient les molécules du CMH, l'une de classe I, exprimée chez presque toutes les cellules nucléées de l'organisme, et l'autre de classe II, spécifique aux cellules présentatrices (macrophages, lymphocytes B, cellules dendritiques), qui permettraient la présentation de l'antigène. La molécule de classe I serait responsable de reconnaître les protéines à dégrader en peptides avant de les présenter. Le complexe CMH (I) / Ag serait ensuite exporté à la surface via l'appareil de Golgi (Martinez-Kinader et al. 1995). Le CMH (II) quant à lui, serait responsable de la présentation d'antigènes acquis par phagocytose. Ce complexe serait donc très important pour la reconnaissance de pathogènes intracellulaires confinés dans des vacuoles (Lin et al. 2008). Enfin, les cellules présentatrices d'antigènes migreraient aux ganglions lymphatiques drainants afin d'activer les lymphocytes T.

2.3.1.4.3.2 Activation des lymphocytes T

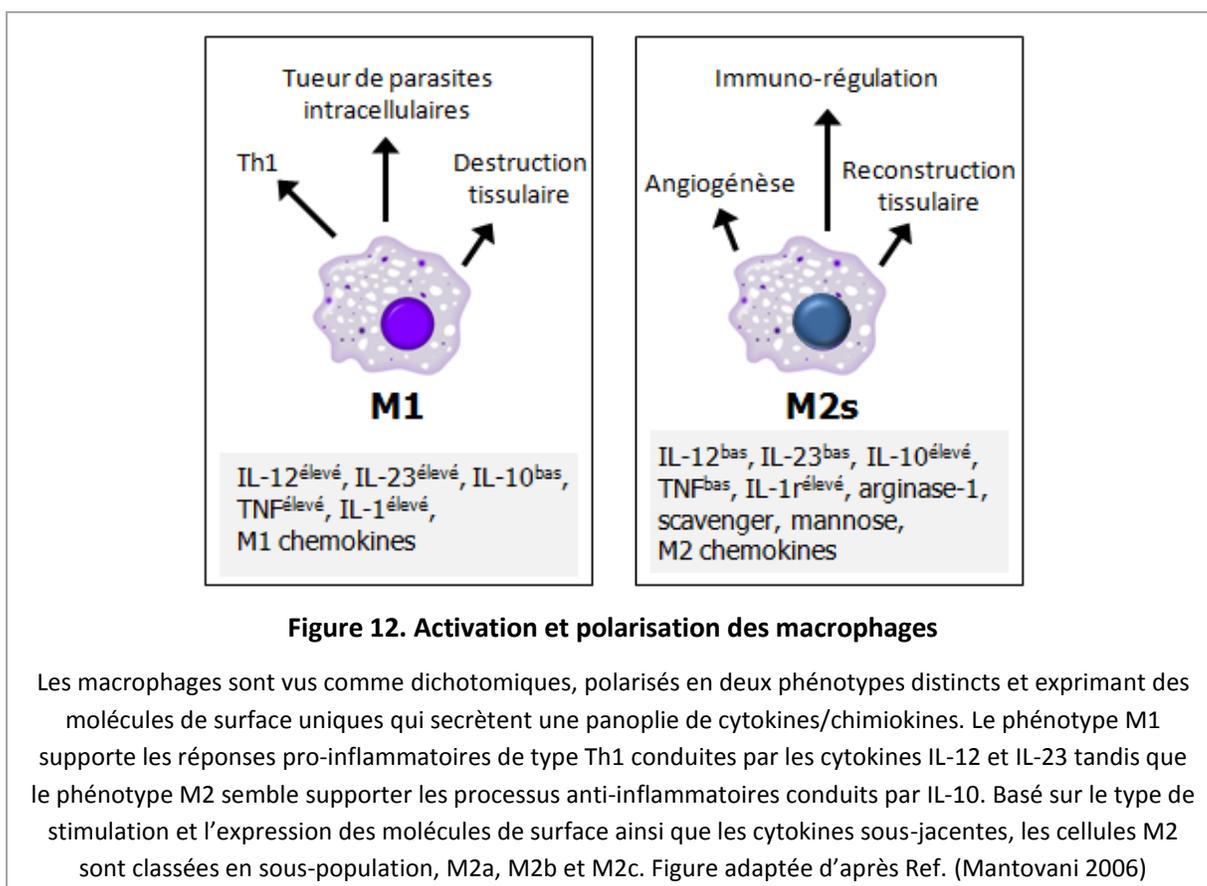
Les cellules présentatrices d'antigène sont reconnues pour entrer en contact avec les lymphocytes T naïfs au niveau du cortex dans le ganglion lymphatique. En premier lieu, la molécule de surface du lymphocyte T (CD3) reconnaît l'Ag et la molécule de CMH de la cellule présentatrice. Le renforcement des interactions de ces deux molécules, va se faire grâce à l'union des glycoprotéines membranaires (récepteurs) telles que les CD4 (lymphocytes T auxiliaires) ou les CD8 (lymphocytes cytotoxiques) à la molécule de CMH. L'expansion clonale du lymphocyte T naïf se produit alors (Racioppi et al. 1993). Le CD8 va se lier à la molécule de CMH de classe I tandis que les lymphocytes T CD4⁺ ne se lieraient qu'aux cellules exprimant le CMH II. Les CD4⁺ peuvent être polarisés en plusieurs sous-populations, connues sont les noms de Th1 et Th2, en fonction du patron de cytokines qu'ils vont exprimer. Les réponses Th1/Th2 ont été caractérisées par une

inflammation différente avec plutôt une balance de profil inflammatoire en faveur de Th1 ou Th2 et plusieurs autres phénotypes pourraient possiblement être situés entre les deux. Les auteurs ont révélé que la sous-population Th1 semblait activer les macrophages et augmenter les capacités microbicides de ces derniers (NO, métabolites de l'oxygène, phagocytose) (Mosmann et al. 1986). La sous-population Th2 quant à elle, semblait responsable de l'activation des lymphocytes B (réponse humorale spécifique aux infections) et éosinophiles, de la sécrétion d'Ig ainsi que de la suppression de la réponse de type Th1 (Mosmann et al. 1986).

2.3.2. Différenciation et phénotype

2.3.2.1. Activation des macrophages : mécanismes et fonctions

Évoquée comme étant le miroir de la nomenclature des profils d'activation des réponses Th1/Th2, la polarisation des macrophages a été initialement classée en deux sous-groupes; les macrophages M1 induits par les cytokines Th1, IFN- γ et TNF- α et les macrophages M2 qui sont induits par les cytokines TH2, IL-4 et IL-13.



2.3.2.1.1. Activation classique

Les macrophages M1 correspondent à une activation « classique » des macrophages (classically activated macrophages, CAMs). La différenciation de type 1 s'effectue en

réponse au signal de l'IFN- γ qui est associé à un stimulus microbien tel que les LPS (Gordon et al. 2010), ou aux cytokines IL-1, l'IL-2, l'IL-3, l'IL-5, l'IL-12, l'IL-18 (Bang BR 2011), le TNF- α ou le GM-CSF (John et al. 1998). Ils semblent ainsi induire une réponse de type cellulaire à tendance pro-inflammatoire et seraient bactéricides (Mege et al. 2011). De plus, la voie de signalisation mise en jeu par l'IFN- γ au niveau du macrophage a été évoquée comme étant essentiellement la voie JAK-STAT.

Les macrophages de type M1 expriment un phénotype qui reflète des niveaux d'**IL-10**^{faible}, **IL-12**^{élevé} et **IL-23**^{élevé} (Martinez 2011). Ils ont aussi été décrits comme étant influencés par le GM-CSF et constamment exposés à différentes concentrations de médiateurs inflammatoires. Ils sont aussi caractérisés par la production d'une grande quantité de molécules effectrices (réactifs de l'oxygène) ainsi que des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β , TNF- α , IL-6, MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein-1*) (Goerdt et al. 1999; Martinez 2011). Le phénotype M1 sécrète des chimiokines et exprime de l'IP-10 (*interferon gamma-induced protein 10*) en réponse à l'IFN- γ (Biswas et al. 2008). Les macrophages de type M1 sont par ailleurs activés lors de la polarisation de la réponse immunitaire Th1 et combattent les bactéries (*Escherichia coli*, LPS) et les maladies infectieuses (sepsis, typhoïde, tuberculose active) (Mege et al. 2011). Par conséquent, ils peuvent favoriser la réponse immunitaire de type cellulaire, entraîner des dommages tissulaires (**Error! Reference source not found.**) et contribuer à la pathogénèse de certaines maladies pulmonaires (Mege et al. 2011). À l'inverse, la réponse immunitaire peut aussi passer par une toute autre activation que celle dite « classique » des macrophages : l'activation alternative est un concept qui a vu le jour depuis quelques années.

2.3.2.1.2. Activation alternative

La polarisation dite M2 est un nom utilisé initialement pour différentes formes d'activation des macrophages autres que l'activation « classique » et ils sont reconnus en tant que

polarisation distinctes. Les macrophages M2 correspondent à une activation « alternative » des macrophages (alternatively activated macrophage, AAM) et jouent un rôle important dans l'inflammation en produisant des médiateurs anti-inflammatoires (**Figure 12**). Ils ont été décrits comme « extincteurs » de l'activation M1. Le phénotype M2 est responsable de la résolution des réponses inflammatoires à piéger les débris et à réparer les tissus contrairement au M1 (Mege et al. 2011). Les macrophages de phénotype M2 ont un rôle dans la réparation des tissus et celle du système nerveux (nettoyage des débris) et dans l'amélioration du pronostic chez les patients atteints de maladies inflammatoires ou cancéreuses (Biswas et al. 2008). Ils favorisent les réactions allergiques et contribuent à la mise en place d'une réponse inflammatoire à médiation humorale (Gordon et al. 2010).

Le terme « générique » M2 regroupe ainsi toutes les formes d'activations autres que celles issues de M1. Une nomenclature a été proposée afin de nuancer ces formes d'activations selon la fonction des signaux inducteurs et celles développées par les macrophages soit par toute activation de l'IL-4, l'IL-13, des complexes immuns et de l'IL-10 (Mantovani 2006). Plusieurs sous-types de macrophage M2 ont été alors distingués selon la molécule d'activation.

- Macrophage M2a: la présence d'IL-4 et d'IL-13 est responsable de l'activation alternative du macrophage sous une forme polarisée appelée M2a. Ces cytokines, produites par les lymphocytes Th2 inhibent l'activation classique et favorisent le développement d'une forme alternative (Gordon et al. 2010). Cette activation conditionne l'expression de récepteurs Scavengers, tels que le CD36 (Biswas et al. 2010; Murray et al. 2011).
- Macrophage M2b: les complexes immuns associés aux ligands des Toll Like Receptors (section 2.3.1.3) ou du récepteur IL-1r (interleukine anti-inflammatoire) conduisent à une activation M2b (Stout et al. 2005; Gordon et al. 2010).

- Macrophage M2c: la forme alternative M2c correspond à la polarisation du macrophage par l'IL-10, c'est-à-dire plus proche d'un macrophage anti-inflammatoire de réparation (Stout et al. 2005; Benoit et al. 2008). Parallèlement à cette production d'IL-10, les macrophages peuvent être essentiellement producteurs de TGF- β correspondant à un phénotype M2c (Gordon et al. 2010).

Les M2, producteurs d'IL-10, partagent certaines propriétés fonctionnelles comme une faible capacité de production d'IL-12. Ils expriment un phénotype selon les concentrations IL-10^{élevé}, IL-12^{faible}, IL-23^{faible}, et conservent leurs propriétés anti-inflammatoires malgré leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 et IL-6 (Murray et al. 2011).

Les macrophages de phénotype M2 expriment d'une façon générale, un vaste arsenal de molécules membranaires (**Figure 12**) incluant les récepteurs mannose, les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH de classe II), les récepteurs Scavengers, les Dectine-1 ainsi que le CD23. Des études ont identifié d'autres marqueurs d'activation M2 médiés par l'IL-4 et inhibés par l'IFN- γ . Ces marqueurs sont strictement murins et appartiennent à la famille de protéines FIZZ1 (*Found in Inflammatory Zone Protein* ou *RELM Resistin Like Molecules*) ou encore des YM1 (*macrophage protein produite lors de l'infection parasitaire*) et YM2 (protéine proche de YM1) (Stout et al. 2005; Murray et al. 2011). Les macrophages humains présentent également des marqueurs propres d'activation alternative que l'on retrouve dans les récepteurs nucléotidiques associés aux protéines G (Goerdts et al. 1999).

Par ailleurs, le marqueur M-CSF est associé au phénotype M2 ainsi que les facteurs tels que le *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), le *growth related oncogene/keratinocyte-derived chemokine* (GRO-KC), la protéine CD163 et l'arginase-1 (enzyme contenant du manganèse exprimée uniquement par les neutrophiles chez l'humain) (Munder et al. 2005;

Munder 2009). L'expression du CD163, membre de la famille des *scavenger receptors*, semble être induite par le M-CSF (Onofre et al. 2009) et activée par les interleukines IL-6 et IL-10 alors que l'IFN- γ et le TNF- α vont réprimer son expression. Malgré le développement de technologies de pointe en microbiologie, qui a permis d'augmenter considérablement les connaissances en matière de description des macrophages et de leur activation, le concept de polarisation reste complexe et nécessite davantage de recherches (Gordon et al. 2010). Les stades d'activation du macrophage semblent d'ailleurs apparaître comme l'étendue d'un spectre au large éventail d'expression de récepteurs, variant en fonction de leur environnement et dans lequel M1 et M2 apparaîtraient aux extrémités (Mosser et al. 2008). Néanmoins, il existe deux approches distinctes pour l'étude des phénotypes M1 et M2. La première découle de la reconnaissance du récepteur à travers la transduction du signal, de l'expression des gènes et des protéines. La seconde consiste à déduire l'initiation du mécanisme par l'analyse des marqueurs phénotypiques. C'est cette dernière approche que nous avons retenue dans le cadre de notre étude.

Lorsque survient un accident à la moelle épinière et que la ventilation mécanique devient indispensable pour maintenir les échanges respiratoires, des réponses inflammatoires vont prendre place à différents endroits de l'organisme, via une activation spécifique du macrophage. Ce phénotype que nous ignorons, risque d'influencer fortement l'orientation de la réponse immunitaire.

Chapitre 3. Hypothèses et objectifs de recherche

Un traumatisme médullaire de niveau cervical, peut entraîner une insuffisance respiratoire due à la faiblesse ou la paralysie des muscles respiratoires (A William Sheel 2006). Elle oblige par conséquent la personne qui ne peut plus respirer de façon autonome, à recourir à la VM comme support ventilatoire. Malgré ses bénéfices, l'application de la VM comme thérapeutique est capable de déclencher dans un contexte de SDRA, une forte réaction inflammatoire pulmonaire et systémique (dos Santos et al. 2000). Pour protéger les alvéoles pulmonaires qui subissent un étirement mécanique répété, l'organisme va répondre en favorisant la libération de cellules inflammatoires et de réactifs oxygénés (Tremblay et al. 1997; Halbertsma et al. 2005). Ce stress mécanique est un facteur important notamment pour l'activation de la principale cellule source de cytokines dans la défense de l'hôte : le macrophage. Ce dernier va réagir en relâchant des médiateurs inflammatoires (Thannickal et al. 2000) et une réponse immunitaire va se mettre en place en activant un profil spécifique de macrophages (Biswas et al. 2010). Au moment où ce travail de thèse a débuté, nous ignorions par quelle activation celle-ci pouvait évoluer. Nous pensions toutefois que la ventilation mécanique était capable de promouvoir un environnement pro-inflammatoire associé à un profil spécifique. De plus, l'élaboration de thérapies nouvelles en matière de blessure médullaire relève d'un véritable défi car les lésions médullaires sont

Hypothèse et objectifs

très hétérogènes en ce qui à trait à leur sévérité et leur niveau de lésion. La réponse immunitaire risquait d'être fortement influencée par ce niveau lésionnel, lui-même étroitement lié au territoire étendu du système sympathique, qui englobe les organes lymphoïdes (thymus, moelle osseuse, rate, etc.) (Vinik 2012). Certaines études cliniques ont d'ailleurs révélé qu'un dysfonctionnement du système immunitaire était lié au niveau d'atteinte (Campagnolo et al. 1994). Une personne souffrante de lésion cervicale serait dans ce cas d'avantage à risque de développer une réaction inflammatoire accrue comparé à celle blessée au niveau thoracique bas (Campagnolo et al. 2000; Cruse et al. 2000). Une étude récente a montré que la lésion avait eu un impact sur la réponse inflammatoire pulmonaire (Gris et al. 2008). La lésion thoracique (T4) avait entraîné une forte augmentation de neutrophiles et de macrophages circulants, accompagnée d'une forte activité oxydative (Gris et al. 2008). L'étude de Riegger et al, a montré quant à elle, qu'une lésion (T8) conduisait à une diminution des globules blancs dans le sang des animaux (Riegger et al. 2007). Il n'existe pas de thérapie à ce jour qui ait prouvé une efficacité réelle dans l'amélioration fonctionnelle chez le patient après une blessure de la moelle épinière. La façon dont ces réponses inflammatoires vont interagir lors de l'application de la thérapie de ventilation lors d'une blessure médullaire est inconnue. Nous pouvions supposer qu'elles seraient susceptibles d'amplifier le bio-traumatisme au poumon et à la moelle épinière. Il nous paraissait alors important de déterminer non seulement si, mais aussi comment la ventilation mécanique pouvait moduler l'inflammation post-traumatique et ce, à différents niveaux de lésion. Nous ignorions toutefois de quelle façon la réponse immunitaire allait se manifester face à l'application du support respiratoire suivant le traumatisme, mais nous pensions que la réponse inflammatoire aurait été principalement sous l'influence de la principale source cellulaires de cytokines : le macrophage. Cette réponse inflammatoire pourrait se propager à travers la circulation et endommager à distance d'autres organes et/ou tissus de l'organisme, tels que ceux de la moelle épinière, amplifiant alors le dommage initial. Dans ce contexte et à la lumière de ces observations, les objectifs suivants ont découlés dans notre projet :

Objectif 1- Évaluer si la ventilation mécanique appliquée dans un contexte de traumatisme médullaire module les réponses inflammatoires pulmonaires, en identifiant le phénotype de macrophage dans la réponse immunitaire.

Cet objectif est développé dans le "Chapitre 5. Résultats des travaux de recherche". Ce chapitre traite de l'importance de l'application de la thérapie respiratoire dans un contexte de traumatisme à la moelle et du rôle qu'elle peut avoir sur la réponse immunitaire au niveau du poumon. Ce chapitre démontre également qu'il existe une interaction entre le couple traumatisme médullaire et ventilation qui va tendre soit vers un environnement pro-inflammatoire associé à un phénotype spécifique de macrophages, soit vers un profil anti-inflammatoire selon le contexte. De plus, la blessure médullaire va agir sur les réponses pulmonaires en inhibant les réponses oxydatives.

Objectif 2- Évaluer l'importance de la ventilation mécanique lorsqu'elle est appliquée lors d'un traumatisme à différents niveaux de lésion de la moelle épinière ou en l'absence de lésion, et si elle est susceptible d'altérer les réponses inflammatoires des tissus sains ou lésés de la moelle.

Le "Chapitre 5. Résultats des travaux de recherche" présente également l'impact de la ventilation mécanique après 24 heures sur les réponses inflammatoires locales à la moelle épinière non seulement des tissus lésés, mais également si ceux-ci sont sains.

Chapitre 4. Matériel et Méthodes

Ce projet est basé sur l'évaluation expérimentale de l'altération du système nerveux en fonction du niveau de la lésion et de l'application de la ventilation mécanique comme thérapeutique suppléante aux muscles respiratoires dans un modèle de traumatisme médullaire chez le rat. L'évaluation fut effectuée à l'aide de l'analyse des cellules immunitaires et des médiateurs inflammatoires après 24 heures d'application de VM. Les évaluations furent réalisées à la fois sur le poumon et sur les tissus de la moelle épinière.

Toutes les procédures du protocole ont été effectuées conformément aux recommandations du Conseil canadien de la protection des animaux et ont été approuvées par le Comité d'éthique de l'expérimentation animale du Centre de recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal.

4.1. Mise en place du modèle

4.1.1. Préparation des animaux

4.1.1.1. Échantillons

Trente-trois rats femelles adultes Sprague-Dawley (225-250g, Charles River, St-Constant, Québec, Canada) ont été utilisés dans ce projet. Le rat est un modèle de choix pour l'étude des blessures médullaires. La morphologie et la physiologie de sa moelle épinière est très semblable à la condition neurophysiologique humaine (Wrathall et al. 1985). Les animaux ont été randomisés en cinq groupes distincts. Trois groupes ont reçu un support ventilatoire tandis que deux groupes n'ont pas bénéficié de ventilation mécanique, tel que décrit ci-dessous:

- Animaux ventilés avec une lésion médullaire cervicale C4-C5, N=7
- Animaux ventilés avec une lésion médullaire thoracique T10, N=7
- Animaux ventilés dépourvus de lésion médullaire, N=7
- Animaux non-ventilés avec une lésion médullaire thoracique T10, N=6
- Animaux non-ventilés dépourvus de lésion médullaire, N=6

Afin de minimiser le stress des animaux, les expérimentations ont débuté 48h suivant leurs arrivées à l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal. Le plan expérimental fut établi comme suit: deux expérimentations de 36 heures chacune, sans interruption, ont pris place chaque semaine en durant les années académiques 2009, 2010, 2011 et 2012. Chaque expérimentation était effectuée sur deux animaux randomisés. La chirurgie débutait à 09 :00 AM, la stabilisation, l'observation et la collecte des paramètres vitaux étaient enregistrés manuellement à toutes les heures (aux deux heures pendant la nuit) pendant 24 heures, jusqu'au lendemain matin. Enfin, les analyses se terminaient le lendemain au laboratoire aux alentours de 03:00 PM. La durée totale de chaque expérimentation s'évaluait donc à trente heures consécutives pour deux animaux.

4.1.1.2. Préparation anesthésiée et paramètres vitaux

Les animaux furent initialement anesthésiés avant toute intervention chirurgicale avec une dose de kétamine/xylazine (90/10 mg/kg) par voie intramusculaire. Le dosage de ces deux agents fut ajusté grâce à un cathéter placé initialement dans la veine jugulaire de chaque animal et de façon à être délivré à 0.9 ml/h pendant 24 heures. Les animaux furent placés sur une couverture chauffante rétro-contrôlée pendant la totalité des 24 heures afin de prévenir l'hypothermie avec une chute de la température corporelle. Cette température corporelle fut continuellement surveillée à l'aide d'un thermomètre anal et maintenue entre 37 ° C et 39 ° C. La fréquence cardiaque fut contrôlée sans interruption en utilisant des électrodes sous-cutanées (Nihon Kohden) insérées dans les pattes de l'animal. La saturation fut surveillée de la même façon que les paramètres précédents à toutes les heures à l'aide d'un saturomètre placé aux pattes de l'animal. Chaque animal a reçu toutes les 4 heures durant 24 heures, les procédures suivantes : 1) une mobilisation des extrémités inférieures pour compenser la perte de retour veineux et, 2) un massage manuel abdominal de la vessie pour empêcher les stases rénales. Enfin, un gel oculaire à base de vaseline blanche et d'huile minérale (80.0 et 30.0% respectivement, DuoLube, Baush&Lomb, Markham, Ontario, Canada) fut utilisé pour prévenir la xérophtalmie due à l'anesthésie.

4.1.2. Ventilation mécanique

Chez les animaux ventilés, les réglages du ventilateur (Kent scientifiques, Topo) ont été fixés pendant 24 heures afin de délivrer un bas volume courant approprié ($V_T = 6 \text{ mL/kg}$) selon le nomogramme de Kleinman et Radford (Kleinman et al. 1964). Les réglages ont été maintenus avec les constantes suivantes: 1) une basse pression des voies aériennes inspiratoire de pointe (PIP) à 10 cm H₂O, 2) une fréquence respiratoire (RR) de 60 respirations par minute, 3) un rapport d'inspiration à l'expiration de 1:3 avec l'inspiration réglée à 35%, et 4), un volume expiré de dioxyde de carbone (CO₂) maintenu entre 2.5 à 3.6%, mesuré à l'aide d'un analyseur d'air expiré et placé pendant une minute à la sortie du

ventilateur (Capstar-100 CO₂). Les animaux non ventilés ont reçu quant à eux un supplément d'oxygène (0,1L/min) afin de palier à une éventuelle désaturation.

4.1.3. Contusion de la moelle épinière

Après rasage de la région dorsale, les animaux furent installés en décubitus ventral sur un support stéréotaxique recouvert de la couverture chauffante rétro-contrôlée. Une laminectomie, stabilisée par quatre pinces stéréotaxiques en position caudale, rostrale et bilatérale, fut réalisée au niveau; 1) de la vertèbre C4 pour les animaux randomisés avec une lésion cervicale et, 2) de la vertèbre T9 pour ceux randomisés pour une lésion thoracique afin d'exposer les segments de la région C5 et T10 de la moelle épinière, respectivement. Ensuite, une lésion médullaire modérée a été produite par la chute d'un poids de 5g d'une hauteur de 6 cm directement sur la moelle épinière, créant ainsi un impact de 30g*cm, soit $0.005\text{kg} \times 0.006 = 2.94 \times 10^{-3}$ Joules. L'hémorragie observée par microscope au niveau des vaisseaux sanguins permettait de confirmer la réalisation de la lésion médullaire. Les muscles et la peau furent ensuite suturés. Pour les animaux dépourvus de lésion médullaire, toutes les procédures chirurgicales ont été effectuées à l'exception de la laminectomie et de l'impact sur la moelle épinière. Les muscles et la peau furent suturés de la même façon.

4.2. Mesures et analyses pulmonaires

4.2.1. Euthanasie, lavages broncho-alvéolaires et prélèvements

Vingt-quatre heures après la lésion médullaire, les animaux anesthésiés furent euthanasiés par exsanguination. Une trachéotomie fut réalisée afin d'insérer un tube endotrachéal en forme de « Y » dans la trachée et maintenu en place à l'aide de fils chirurgicaux pour les animaux qui n'avaient pas reçu de ventilation mécanique. Après occlusion de la bronche droite, cinq lavages successifs du poumon gauche furent réalisés en introduisant à chaque

fois 2.5 mL de tampon phosphate salin (PBS, phosphate buffered saline) contenant 0.5 % d'albumine de sérum bovin (BSA) dans l'une des extrémités du tube trachéal et aspiré par une seringue de 5 mL placée à l'autre extrémité. Le liquide recueilli lors du premier lavage a été injecté dans un tube de 15 mL distinct tandis que les quatre lavages subséquents ont été transférés dans un second tube. Les deux tubes ont été placés immédiatement sur glace afin de maintenir les cellules en vie (Maxeiner et al. 2007) pour les mesures des comptages cellulaires, des médiateurs inflammatoires ainsi que des réponses oxydatives. Finalement, les tissus de la moelle épinière au niveau du site lésionnel furent prélevés, déposés sur un carré de papier d'aluminium, plongés dans de l'azote liquide puis congelés à -80°C pour l'analyse subséquente des médiateurs inflammatoires. Le poumon gauche demeuré intact ainsi que le diaphragme furent également prélevés, déposés sur un carré de papier d'aluminium et plongés dans de l'azote liquide avant d'être congelés à -80°C pour de futures analyses.

4.2.2. Comptages cellulaires total et différentiel

4.2.2.1. Comptage cellulaire à l'hématocytomètre

Les échantillons des lavages broncho-alvéolaires ont été traités tel que décrit précédemment (Maghni et al. 2000). L'échantillon du premier lavage a d'abord été centrifugé pendant dix minutes à 4°C à 350g (IEC 21000R, International equipment company). Le surnageant fut recueilli et divisé en huit aliquots (tubes Eppendorf) avant d'être maintenus à -80°C pour l'analyse subséquente des médiateurs inflammatoires. Le culot contenant les cellules a été remis en suspension avec 1 mL du contenu du second tube renfermant les échantillons du deuxième, troisième, quatrième et cinquième lavage pulmonaire. La suspension a ensuite été remise dans le second tube qui a été centrifugé à 350g pendant 10 minutes à 4°C . Le surnageant fut jeté tandis que le culot cellulaire a été re-suspendu avec 1 mL de PBS. Une quantité de 100 μL du mélange de PBS et de cellules en suspension contenu dans le second tube fut prélevé et déposé dans un autre tube avec 20 μL de bleu de trypan, un test de colorant qui permet d'identifier les cellules mortes. La chambre d'un hématocytomètre

placée sous microscope optique fut alors remplie de la préparation colorée. Les cellules vivantes se retrouvant dans deux lignes de quatre carrés de l'hématocytomètre furent identifiées et comptées. Enfin, la formule suivante fut appliquée afin d'obtenir le nombre total de cellules vivantes : nombre de cellules vivantes $\times 8 \times 3000 \times 1.2$ (facteur de dilution).

4.2.2.2. Fixation des cellules sur lames microscopiques

A partir de la préparation de cellules en suspension dans le tampon phosphate salin, six lames microscopiques ont été préparées par échantillon. Une quantité de 100 μL de cette préparation fut déposée sur les lames qui a ensuite été fixée à l'aide d'une centrifugeuse cytologique (modèle Cystospin 3, Shandon, Pittsburg, PA) pendant six minutes à 450 rpm et à température ambiante. Par la suite, les comptes différentiels des lavages broncho-alvéolaires ont été réalisés grâce aux caractéristiques morphologiques propres à chaque types de leucocytes rencontrés (neutrophiles, macrophages et lymphocytes). Afin de visualiser les noyaux caractéristiques de ces leucocytes lors des observations en microscopie optique, les lames ont été préalablement colorées au Giemsa (Accustain Giemsa satin modified, 0.4%) dans une solution tampon au méthanol (ph=6.9, Sigma diagnostics, St-Louis, Missouri, États-Unis). Trois mesures ont été prises par échantillon. L'analyse des lames des LBA par microscopie comprenait des descriptions qualitatives de l'extravasation des leucocytes étudiés, soit les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes. Les neutrophiles furent identifiés à l'aide de leur noyau segmenté (polynucléaire) caractéristique. Les macrophages quant à eux furent identifiés en tant que cellules plus grandes de formes irrégulières, ramifiées et au noyau situé à la périphérie. Enfin, les lymphocytes furent observés en tant que cellules rondes plus petites que les macrophages et possédant de grands noyaux ovoïdes à la chromatine condensée. Les pourcentages de chacune de ces cellules furent également déterminés sous microscopie.

4.2.3. Détermination des facteurs et des marqueurs de phénotype M1 et M2

L'analyse des concentrations des cytokines IL-6, IL-1 β , TNF- α et IL-10 a été déterminée comme marqueurs pour des phénotypes M1 et M2, à partir des six tubes obtenus après centrifugation du premier lavage broncho-alvéolaire qui furent entreposés à -80°C. À l'aide des kits multiplex commerciaux (Millipore Corporation, Billerica, MA01821, États-Unis) basés sur la technologie Luminex du système Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories, Inc., Mississauga, ON, CA), les lavages ont pu être analysés comme décrit précédemment (Kaminska et al. 2009). Cette technologie qui utilise des microbilles en polystyrène auxquelles un ratio précis de deux fluorochromes a été incorporé lors de leur fabrication, s'appuie sur des principes de cytométrie en flux à deux lasers. Les billes, initialement mélangées, se séparent le long de la veine liquide. Près de la sortie de cette dernière, deux lasers excitent alors les particules qui émettent par la suite une fluorescence secondaire. Un laser rouge permet la reconnaissance de la bille : lorsqu'excitée, celle-ci réémet des fluorescences rouge et infrarouge d'une intensité qui lui est propre, constituant son «code couleur». De plus, un laser vert interagit avec les fluorochromes couplés aux anticorps de capture, liés de manière covalente avec les microbilles, qui s'agglutinent avec les protéines à identifier. Un capteur et un photomultiplicateur à la sortie permettent de capter les ondes émises par les fluorochromes (Moalic V 2004). Les facteurs reliés au phénotype spécifique M1 ont été déterminés avec les concentrations de GM-CSF et les marqueurs avec la mesure de la chimiokine MIP-1 α , IL-12p70 et IP-10 dans les LBA. Les facteurs M-CSF et les marqueurs cellulaires MCP-1 étaient reliés au phénotype M2. Le facteur de stimulation M-CSF a été déterminé à partir des lavages pulmonaires en utilisant un kit d'analyse M-CSF ELISA selon les instructions du fabricant (NovaTeinbio, Inc. Cambridge, MA 02138, États-Unis).

4.2.4. Détermination des marqueurs des dommages pulmonaires

La phosphatase alcaline (PA) ainsi que la lactate déshydrogénase (LDH) ont été mesurées à partir des six tubes obtenus après centrifugation du premier lavage broncho-alvéolaire qui furent entreposés à -80°C. AP et LDH ont été mesurés comme décrit précédemment (Noel et al. 2012). Ils sont généralement utilisés en tant que marqueurs de dommages pulmonaires, c'est-à-dire comme indicateur général de l'existence et de la sévérité d'un dommage tissulaire. L'enzyme PA est également un marqueur des cellules alvéolaires de type II (Kalina et al. 1990). Les niveaux de PA furent quantifiés à l'aide du kit QuantiChrom™ phosphatase alcaline (dosage Gentaur, Genprice Inc. Santa Clara, CA, USA) tandis que ceux de LDH furent évalués en utilisant la détection cytotoxique grâce au kit^{plus} de Roche Diagnostics GmbH (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne). Une absorbance spécifique de 1 a été définie pour une unité arbitraire (UA).

4.2.5. Évaluation des réponses oxydatives

Afin d'évaluer l'existence de réponses oxydatives, les niveaux du 8-isoprostane ont été mesurés à partir des six tubes obtenus après centrifugation du premier lavage broncho-alvéolaire qui furent entreposés à -80°C. Le 8-isoprotane, un marqueur de peroxydation lipidique exprimé lors d'une réponse au stress oxydatif, fut déterminé à l'aide du kit immunologique de dosage de la prostaglandine F2 8-iso (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) tel que décrit précédemment (Noel et al. 2012). Pour compléter l'évaluation des réponses oxydatives dans le poumon, l'expression de l'hème oxygénase (HO-1) a été quantifiée à partir des extraits cellulaires obtenus des lavages pulmonaires. Ces extraits cellulaires furent obtenus par la lyse des cellules à partir de la solution (Cell Lytic Sigma) qui contenait des inhibiteurs de protéases. L'enzyme intracellulaire HO-1, impliquée dans la défense pulmonaire en protégeant les cellules et les tissus pulmonaires contre le stress et les blessures fut mesurée à l'aide du kit pour rat ImmunoSet™ HO-1 ELISA (Enzo Life Sciences Inc, Farmingdale NY, USA).

4.3. Mesures et analyses des tissus médullaires

4.3.1. Mesure des concentrations protéiques des échantillons de moelle épinière

Les échantillons de tissus médullaires analysés furent collectés au site lésionnel et entreposés à -80 °C. Les mesures des concentrations de protéines furent effectuées grâce à la méthode de l'essai standard de Bradford, telle que décrit précédemment (Dery et al. 2009). Premièrement, afin d'obtenir la masse des tissus de moelle épinière, les échantillons spinaux (30-40 mg) furent collectés puis transférés rapidement dans les tubes Eppendorf pré-pesés vides, gardés sur glace. La masse de chaque échantillon a été obtenue en soustrayant la masse du contenant vide à la masse totale (masse du contenant et masse de l'échantillon). Un tampon de lyse de 1 mL a ensuite été ajouté à tous les tubes qui ont été soumis aux ultrasons une à deux fois pendant 5 à 10 seconds (Ultra Sonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, Illinois, États-Unis) afin d'extraire les protéines. Par la suite, les tubes ont été incubés à 4°C pendant 30 minutes sur une plaque agitatrice, puis soumis à trois cycles de gel et de dégel, en les plongeant en alternance dans de l'azote liquide et de l'eau chaude à 37°C. Ils ont ensuite été mélangés au vortex pendant 5 secondes avant d'être centrifugés à 4°C pendant 10 minutes à vitesse maximale (13 000 rpm, Heraeus Biofuge Pico, Mandel Scientific Co Ltd.) afin d'obtenir le surnageant. Ce surnageant fut prélevé délicatement et transféré dans un nouveau tube identifié. Finalement, pour chaque lysat, des dilutions ont été préparées en triplicata (795 µl de H₂O + 5 µl d'échantillon + 200 µl de réactif de Bradford). À l'aide d'un spectrophotomètre (Varian Cary 50 Bio UV-Visible spectrophotometer, Varian Inc.), la concentration en protéines de chaque surnageant provenant des échantillons de tissus médullaires a été mesurée par dosage colorimétrique selon les instructions de la méthode de Bradford (Standard Bradford Assay Method). Cette méthode se base sur le changement de la valeur de l'absorbance, ou densité optique (DO), du bleu de Coomassie. Ce colorant, dont la valeur maximale d'absorbance se situe à une longueur d'onde de 595 nm, a la propriété de

changer de couleur lorsque qu'il est lié à une protéine (Bradford 1976). Les concentrations pour chaque échantillon furent mesurées à trois reprises et la moyenne des données obtenues a été considérée.

4.3.2. Détermination des cytokines des tissus médullaires

Les concentrations des cytokines IL-6, IL-10, IL-1 β and TNF- α furent déterminées grâce aux homogénats des tissus de la moelle épinière obtenus à partir de la méthode standard de Bradford. Ces homogénats ont ainsi été soumis à la technologie luminex du système Bio-Plex (Bio-Plex 2200 System, Bio-Rad Laboratories, Inc., Mississauga, ON, CA) selon les instructions du fabricant.

4.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel SPSS Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago: SPSS Inc.). Les comparaisons des valeurs moyennes des comptes cellulaires pulmonaires, des médiateurs inflammatoires issus des LBA et des échantillons tissulaires de la moelle épinière, ainsi que des réponses oxydatives, pour les trois groupes ventilés mécaniquement ont été faites en utilisant une analyse de variance à un facteur (one-way Anova) suivie d'un test de Tukey (Tukey's post-hoc test). De plus, l'effet de la ventilation mécanique ainsi que la présence de la lésion (thoracique) furent évalués en utilisant une analyse de variance à deux facteurs (two-way Anova), avec comme variables (ventilation mécanique x lésion médullaire) suivi par un test non-apparié (unpaired t-test for post-hoc test). Les différences statistiques ont été considérées comme significatives à $P < 0.05$ et extrêmement significative à $P < 0.001$. Toutes les données sont présentées comme moyenne \pm erreur type de la moyenne (SEM).

Enfin, les analyses statistiques furent réalisées sur les cinq groupes d'animaux. Le groupe ventilé mécaniquement ayant subi une lésion cervicale ne peut avoir un groupe témoin avec

lésion cervicale dépourvu de ventilation. En effet, ce niveau de lésion C4-C5 qui entraîne une paralysie des muscles de la respiration, requiert automatiquement une assistance respiratoire si l'on désire maintenir l'animal en vie. Il fut donc été impossible d'inclure un groupe lésion cervicale sans ventilation dans ce projet.

Chapitre 5. Résultats des travaux de recherche

5.1. Résultats de la mise en place du modèle

5.1.1. Choix des animaux vivants

5.1.1.1. Nature et effectifs

Le rat est par définition un excellent modèle et un animal de choix pour les études sur les lésions médullaires. Le rat est un modèle de fiabilité pour la condition neurophysiologique humaine : le fonctionnement et la morphologie de la moelle épinière sont très semblables aux personnes souffrant d'un traumatisme médullaire (Wrathall et al. 1985). L'administration d'anesthésique a été autorisée en intraveineuse pour le confort de l'animal.

Espèce et souche	Rat Sprague Dawley (SD) femelle adulte
Poids des animaux	225-250g
Types d'expériences	Aigues
Nombre d'animaux demandé au comité d'éthique	73
Nombre d'expérimentations effectuées	52 (dont 2 pilotes de 4 heures)
Nombre d'animaux vivants	37
Nombre d'animaux décédés	13
Nombre d'animaux non utilisés	5
Nombre total d'animaux commandés	55
Euthanasie	Sous anesthésie, animal euthanasié par exsanguination

Tableau 1. Récapitulatif des animaux utilisés pour l'ensemble des expérimentations.

Les animaux furent commandés au fur et à mesure des protocoles dans le but de conserver à la fois leur poids d'arrivée au Centre de Biomédecine ainsi qu'une linéarité dans leur âge. Un total de cinquante-cinq animaux a ainsi été commandé.

5.1.1.2. Paramètres vitaux chez les animaux ventilés et non-ventilés

Les facteurs susceptibles d'influer sur les changements des réponses inflammatoires furent soigneusement évités en ajustant une pression inspiratoire de pointe constante (entre 10 et 12 cm H₂O) sur toute la période de 24 heures afin de maintenir un niveau de CO₂ expiré normal de 3%. Ainsi, les paramètres vitaux de l'ensemble des groupes d'animaux, résumés dans le tableau 2 ci-dessous, devaient restés stables tout au long du protocole. Il était primordial que les animaux bénéficient initialement d'une ventilation de protection du poumon avec un mode de ventilation à basse pression, correspondant à un volume courant de bas niveau. Il n'y a eu aucune différence entre le CO₂ expiré, la pression de crête inspiratoire, le rythme respiratoire, la fréquence cardiaque et la température parmi tous les groupes. Il

	Groups				
	MV-NL	MV-CL	MV-TL	NV-NL	NV-TL
CO ₂ Exp (%)	3.0 (0.3)	2.9 (0.3)	3.6 (0.5)	-	-
Peak insp pressure (cm H ₂ O)	11.1 (0.1)	11.6 (0.3)	10.9 (0.2)	-	-
Respiratory rate (breaths / min)	63.1 (1.4)	62.9 (1.0)	61.0 (0.4)	72.9 (6.8)	74.5 (4.9)
Heart rate (bpm)	248.2 (17.8)	239.6 (13.0)	229.1 (9.5)	248.0 (9.6)	224.5 (6.0)
Temperature (°C)	36.8 (0.1)	36.8 (0.1)	36.8 (0.1)	36.6 (0.1)	36.8 (0.2)

Tableau 2. Résumé des paramètres vitaux chez les animaux ventilés et non-ventilés mécaniquement.

Les valeurs sont les moyennes ± erreur-type (SEM) des animaux dans chacun des groupes. Exp: expiratory; Insp: inspiratory; MV: mechanical ventilation; NL: no lesion; CL: cervical lesion; TL: thoracic lesion; NV: no ventilation.

5.1.2. Obstacles rencontrés

5.1.2.1. Détermination du point limite de l'expérience

Un point limite acceptable permettant de diminuer la souffrance et/ou la détresse au minimum tout en obtenant des résultats scientifiques acceptables avait été défini au préalable en accord avec le comité d'éthique. Dans le cas où l'expérimentation pouvait présenter de la souffrance et/ou de la détresse chez l'animal, par exemple si celui-ci présentait des réflexes au niveau oculaire (clignements), un changement rapide de l'électrocardiographie, avec une augmentation soudaine des battements cardiaques, une respiration contre la pompe ou encore une nette augmentation ou diminution du niveau du dioxyde de carbone expiré, alors une augmentation de la dose d'anesthésiant fut réalisée et le rythme respiratoire ajusté.

Afin d'éviter une perte de sang ou de liquide corporel et de maintenir les animaux hydratés tout au long de l'expérience, une compensation avec du chlorure de sodium à 0.9% fut administré sous intraveineuse. La pompe d'anesthésiant délivrait en continue un mélange de 1.25 mL de kétamine/xylazine avec 18.75 mL de saline à l'aide d'une seringue de 20 mL.

Étant donné que l'expérimentation durait 24 heures pour une partie sur des animaux vivants, j'ai pu en tout temps durant l'expérimentation même pendant la nuit, m'assurer que les animaux furent anesthésiés correctement et que leurs conditions physiques ainsi que leur bien-être furent adéquats.

5.1.2.2. Suivi des animaux et mortalité

Lors des premières expérimentations, les obstacles furent nombreux, mis en évidence par différents facteurs, notamment des paramètres vitaux anormaux et des problèmes d'ordre plus technique :

- Augmentation du rythme cardiaque à 300-400, voir 800 battements/minute
- Augmentation du CO₂ expiré à 6-7%
- Respiration de l'animal contre la pompe (signe d'une détresse respiratoire)
- Température corporelle anormale (trop basse ou trop élevée)
- Pression inspiratoire instable
- Réveil de l'animal
- Couverture chauffante défaillante (éteinte)
- Pompe anesthésiant stoppée durant la nuit ou arrêtée toutes les deux heures

Les causes de mortalité quant à elles, furent variées notamment au tout début de la mise en place du protocole et presque toutes identifiées lors de la dissection de l'animal. À aucun moment dans toute la durée de l'étude, elles n'ont été liées à la quantité d'anesthésie délivrée, la chirurgie de la lésion médullaire en elle-même ou encore le mode de ventilation mécanique correspondant à un bas volume courant. Les causes de décès furent donc diverses :

- Hémorragie
- Cathéter délivrant l'anesthésiant à partir de la veine jugulaire mal positionné (distance au cœur non adéquate ou pas assez profonde)
- Coagulation de sang dans le cathéter de la veine jugulaire
- Hypothermie
- Manque d'oxygène pour un animal non ventilé mécaniquement
- Asphyxie liée au tube endotrachéal bouché
- Autre : inconnue pour un seul animal (numéro 10 qui présentait à l'origine un rythme cardiaque bas-180/minute)

5.1.2.3. Modifications apportées au protocole pour améliorer le modèle

Il est important de noter comment les principales difficultés ont été résolues, notamment grâce à l'apprentissage au fil des expériences, des lectures et des échanges avec d'autres qui

ont pu apporter leur aide. Dans un premier temps, des efforts furent réalisés sur la justesse des points limites. Les solutions adoptées pour les paramètres anormaux furent par exemple de mesurer en premier lieu le CO₂ expiré de l'animal à l'aide d'un petit ballon confectionné spécialement, relié à un analyseur d'air expiré et placé pendant une minute à la sortie du respirateur. Un protocole fut établi comme suit :

- En cas d'augmentation du CO₂ au-delà de 3.5 % et du rythme cardiaque à 300-400 minimum, un animal qui présentait des réflexes au niveau oculaire (yeux qui clignaient) ou une respiration contre la pompe, alors l'anesthésiant délivré en continu par la pompe était augmenté à 1.1 mL/h ou 1.2 mL/h pendant une heure maximum, puis retour à 0.9 mL/h
- En cas de réveil, avec par exemple des moustaches qui commencent à bouger, alors l'anesthésiant était augmenté à 5 mL/h pendant cinq minutes et surveiller minutieusement avec un chronomètre pour ne pas dépasser le temps alloué et éviter une mort certaine
- Si à l'inverse, le CO₂ expiré diminuait à 2% et moins, alors l'anesthésiant délivré était diminué à 0.8 mL/h pendant au moins une heure
- Si l'animal ventilé mécaniquement montrait un signe d'intolérance ou de détresse respiratoire, notamment en respirant contre la pompe ou si la pression inspiratoire augmentait, alors le rythme respiratoire était ajusté et augmenté ainsi que le volume d'air (+ 0.1 mL). Si cet ajustement ne résolvait pas le problème, l'anesthésiant était à nouveau diminué à 0.8 mL/h pendant dix minutes
- Si l'animal n'était pas ventilé mécaniquement et qu'il montrait des signes de réveil, alors un agent anesthésique volatile tel que l'isoflurane était délivré (5 mL pendant deux minutes) à l'aide d'un ventimasque

- Autre précaution, par exemple pour prévenir la stase rénale, les extrémités des pattes étaient mobilisées, suivie d'un massage abdominal toutes les quatre heures
- En cas de panne électrique (ce fut le cas unique pendant une nuit), la pompe délivrant l'anesthésiant n'étant pas branchée sur secteur rouge d'urgence, elle s'était arrêtée par manque d'alimentation inévitablement. Lors des expériences qui ont suivi, elle fut par conséquent branchée automatiquement sur la prise rouge.

Dans un second temps, d'autres techniques furent développées face au problème survenu de mortalité. L'anesthésie durant 24 heures, l'environnement et le bien-être de chaque animal n'ayant pas reçu de ventilation mécanique, a du être enrichi afin d'éviter son décès. Un supplément en oxygène fut délivré via un ventimasque soigneusement élaboré et ajusté au museau de l'animal pour pallier à une désaturation, abolir une détresse respiratoire, améliorant dès lors sa condition. La méthode fut validée par la prise de la saturation via un saturomètre à la patte postérieure de l'animal. De plus, le problème de l'hypothermie découvert chez certains animaux, avait été spécifiquement lié à la couverture chauffante assignée à la seconde salle de chirurgie. Celle-ci avait la particularité de s'éteindre toutes les deux heures, probablement par mesure de sécurité. Lorsque ce problème fut enfin identifié, une alarme, une lampe chauffante ainsi qu'un linge enveloppant délicatement l'animal furent installés.

Un autre problème majeur dans la réalisation de cette étude, à été l'évaluation de l'inflammation systémique. En effet, lors de l'élaboration du protocole expérimental, après l'étude de la littérature concernant à la fois la lésion médullaire et la ventilation mécanique, l'étude de l'inflammation véhiculée par le sang était apparue comme essentielle. Le protocole expérimental comportait ainsi la collecte des échantillons sanguins. Le comité d'éthique avait approuvé cette mesure réalisée, à l'époque, avec une prise de sang de 0.5 mL via le cathéter placé dans la veine jugulaire aux temps 2h, 4h, 8h, 10h et 24h après la

lésion médullaire. Le but était d'analyser les molécules inflammatoires telles que les cytokines et chimiokines ainsi que les neutrophiles circulants. Or, les difficultés des prises de sang furent irrémédiables ou tout simplement impossibles à réaliser adéquatement: faibles collectes dans les quantités d'échantillons, impossibilité d'extraction à certain temps, bouchon fatale au niveau du cathéter positionné la veine jugulaire. Dans ce cas-ci spécifiquement, il fallait arrêter la pompe délivrant l'anesthésiant, pour pouvoir pratiquer la collecte du sang, ce qui ne facilitait pas le bien-être de l'animal, entraînant même son décès. La solution adoptée fut alors la collecte de sang via la veine de la queue, mais bien plus invasive. Finalement, le manque du nombre d'échantillons sanguins réalisés à des temps anarchiques ne nous a pas permis de réaliser des analyses statistiques convenables à l'étude.

Enfin, la difficulté principale de toute l'étude fut l'étendue du design expérimental, notamment les 24h en continu de monitoring propre à chaque animal. Si l'animal avait eu de la difficulté à s'endormir avant la chirurgie, alors une dose supplémentaire d'anesthésiant lui était attribué. Ainsi, sa surveillance et son monitoring notamment la nuit, s'avéraient inévitablement plus complexes comparativement celui qui s'était endormi rapidement.

5.2. Résultats de l'étude

5.2.1. Résultats d'analyses au niveau du poumon

5.2.1.1. Effets de la lésion médullaire et de la VM sur l'infiltration de neutrophiles et sur les dommages pulmonaires

La ventilation mécanique a induit une augmentation des taux de neutrophiles ainsi que du nombre total de cellules dans les lavages pulmonaires. Elle n'a cependant pas affecté le nombre de macrophages alvéolaires ni le nombre de lymphocytes (Table 3). Les

Résultats des travaux de recherche

neutrophiles et les macrophages sont visibles à partir des lames obtenues des lavages broncho-alvéolaires chez les animaux ventilés et non-ventilés pendant 24 heures (**Figure 13**).

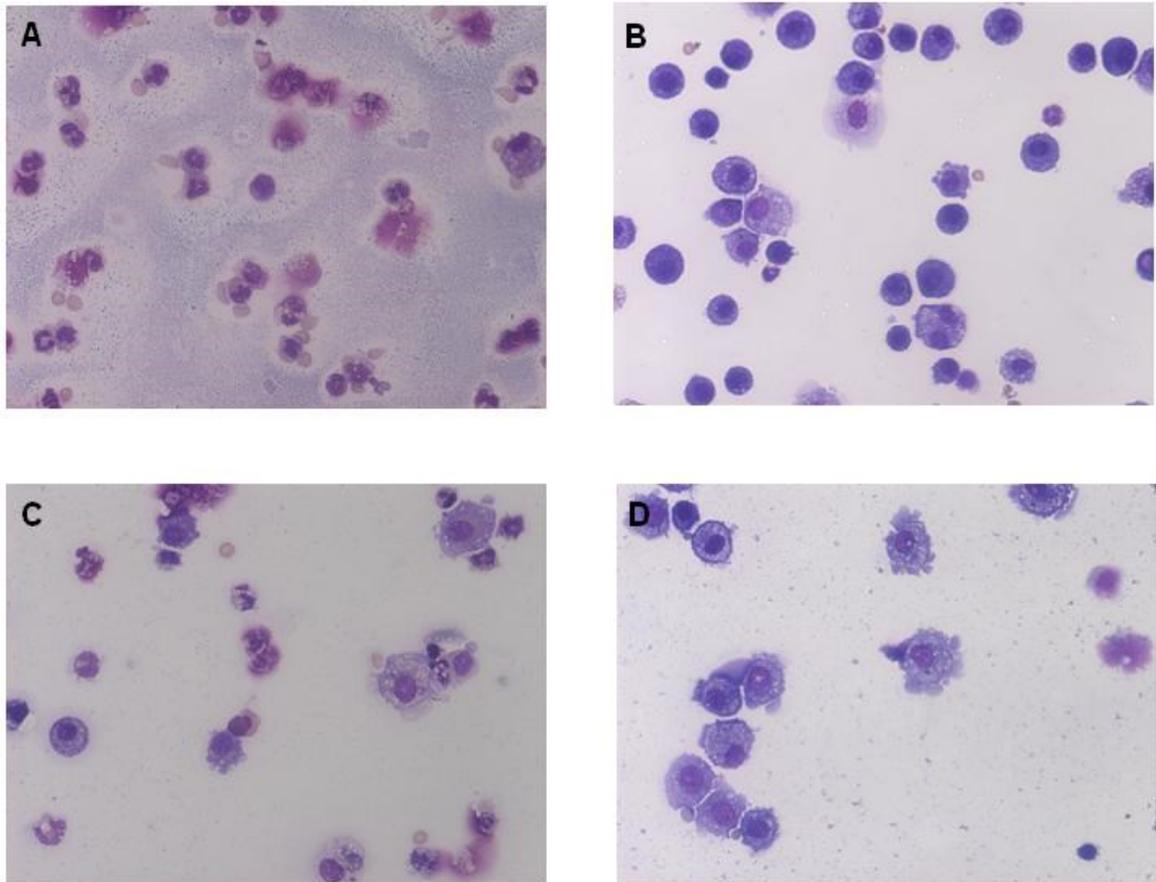


Figure 13. Neutrophiles et macrophages dans les poumons.

Photographies des lames issues des lavages broncho-alvéolaires; (A) Groupe MV-NL, rat numéro 28. On peut y voir les neutrophiles polynucléaires aux noyaux globuleux et les macrophages qui sont des cellules de plus grande taille en forme irrégulière, ramifiées au noyau périphérique; (B) Groupe NV-NL, rat numéro 37 avec ses macrophages; (C) Groupe MV-TL, rat numéro 1. On peut observer les neutrophiles ainsi que les macrophages. (D) Groupe NV-TL, rat numéro 39 avec ses macrophages.

Les niveaux d'activité de la phosphatase alcaline (PA) mesurés en tant que marqueurs de dommages tissulaires au niveau du poumon dans les lavages étaient significativement plus élevés dans les groupes ventilés, à la fois dépourvu de lésion (MV-NL) et avec une lésion

thoracique (MV-TL), comparativement à leurs groupes contrôles respectifs (NV-NL et NV-TL). La ventilation mécanique a donc eu un effet sur ce marqueur de dommages tissulaires. Il n'y a pas eu de changement significatif concernant les taux de lactate déshydrogénase (LDH) considéré également comme indicateur général de l'existence et de la sévérité de dommage tissulaire, parmi l'ensemble des groupes d'animaux. La présence d'une lésion cervicale ou thoracique chez les rats ventilés n'a eu d'effet ni sur le décompte cellulaire total et différentiel, ni sur les dommages pulmonaires mesurés dans les lavages. Il n'y a donc pas eu d'évidence de dommage pulmonaire chez les animaux blessés médullaires.

	Groups								
	MV-NL	MV-CL	MV-TL	P 1-way		NV-NL	NV-TL	P 2-way	P 2-way
				ANOVA	(lesion)			ANOVA	ANOVA (MV)
Total	3.7 (0.7)	5.2 (0.9)	4.2 (0.6)	0.400		2.0 (0.3)	2.6 (0.6)	0.331	0.011
Macro	1.5 (0.4)	3.0 (0.6)	1.8 (0.5)	0.172		1.7 (0.3)	1.9 (0.3)	0.505	0.749
Neutro	2.5 (0.4)	2.6 (0.4)	3.4 (0.1)	0.926		0.1 (0.0)*	0.2 (0.2)‡	0.982	<0.001
Lympho	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.1 (0.0)	0.345		0.1 (0.0)	0.3 (0.2)	0.322	0.123
AP (pg/ml)	36.0 (9.3)	22.6 (3.6)	38.8 (7.0)	0.293		8.2 (1.3)*	10.2 (0.6)†	0.720	<0.001
LDH (AU)	3.1 (2.7)	0.3 (0.2)	0.6 (0.4)	0.432		5.5 (3.5)	0.1 (0.0)	0.081	0.656

Tableau 3. Comptage cellulaire total et différentiel et marqueurs de dommages pulmonaires.

Les valeurs sont les moyennes \pm erreur-type (SEM) des animaux dans chacun des groupes. Les comptages cellulaires totaux et différentiels sont exprimés en millions de cellules. MV: mechanical ventilation (ventilation mécanique); NL: no lesion (sans lésion); CL: cervical lesion (lésion cervicale); TL: thoracic lesion (lésion thoracique); NV: no ventilation (sans ventilation). Macro: macrophages; Neutro: neutrophils; Lympho: lymphocytes; AP: alkaline phosphatase (phosphatase alcaline); LDH: lactate dehydrogenase; AU: arbitrary units.

*, $P < 0.05$ for post-hoc contrasts vs. MV-NL.

†, $P < 0.05$ and ‡ $P < 0.001$ for post-hoc contrasts vs. MV-TL.

5.2.1.2. Effets de la ventilation et de la lésion médullaire sur l'expression des cytokines

Le profil des cytokines des animaux non-ventilés et dépourvus de lésion médullaire (NV-NL) était $IL-10^{\text{haut}}$, $IL-1\beta^{\text{bas}}$, TNF^{bas} , $IL-6^{\text{bas}}$ versus $IL-10^{\text{bas}}$, $IL-1\beta^{\text{haut}}$, TNF^{haut} , $IL-6^{\text{haut}}$ chez les animaux ventilés dépourvus de lésion (MV-NL) (Figure 14). La lésion thoracique T10 chez les animaux non-ventilés n'a pas eu d'effet significatif sur l'expression de cytokines pulmonaire comparée au groupe dépourvu de lésion médullaire (NV-NL). Cependant, la lésion cervicale (C4-C5) a changé l'expression des cytokines chez les animaux ventilés pour le profil suivant : $IL-10^{\text{bas}}$, $IL-1\beta^{\text{bas}}$, TNF^{haut} , $IL-6^{\text{haut}}$. Étant donné que les profils des cytokines pour les groupes NV-NL et MV-NL semblaient refléter un phénotype M2 et M1 respectivement, les marqueurs spécifiques pour chaque phénotype furent par la suite évalués à partir des lavages broncho-alvéolaires. Ces résultats seront analysés dans le « Chapitre 6. Discussion générale et perspectives ».

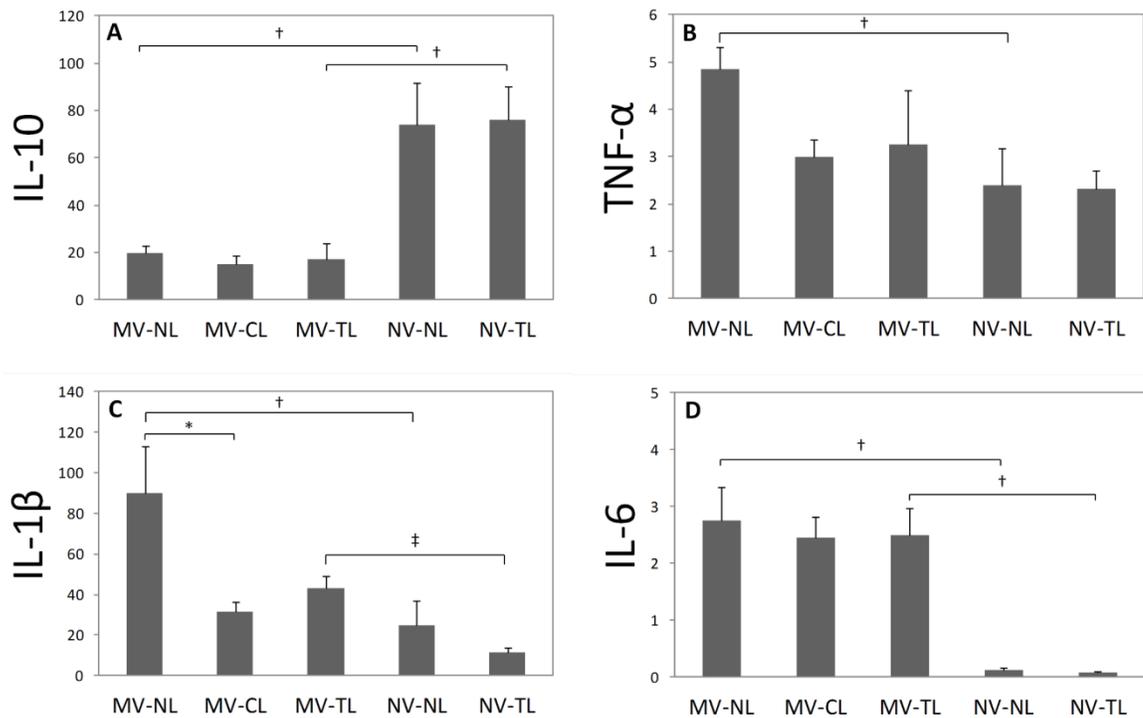


Figure 14. Effets de la VM et de la lésion médullaire sur l'expression des cytokines pulmonaires.

Les valeurs sont les moyennes \pm erreur-type (SEM) des animaux dans chacun des groupes. (A) Interleukine-10 en pg/ml, (B) TNF- α en pg/ml, (C) Interleukine-1 β en pg/ml, (D) Interleukine-6 en μ g/ml; MV: mechanical ventilation (ventilation mécanique); NL: no lesion (sans lésion); CL: cervical lesion (lésion cervicale); TL: thoracic lesion (lésion thoracique); NV: no ventilation (sans ventilation).

*, $P < 0.05$ for post-hoc contrasts (1-way ANOVA).

†, $P < 0.05$ and ‡, $P < 0.001$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA).

5.2.1.3. Détermination des phénotypes M1 et M2 dans les groupes d'animaux respectifs

Tout d'abord, l'expression de MIP-1 α , une chimiokine identifiée préalablement dans des études in vitro en tant que marqueur du phénotype M1 (Goerdts et al. 1999). L'analyse de ce médiateur à partir des lavages pulmonaires a révélé que la ventilation mécanique a eu un effet significatif sur les niveaux de MIP-1 α , de telle sorte que les taux des deux groupes

MV-NL et MV-TL étaient significativement plus élevés que ceux des groupes NV-NL et NV-TL, respectivement (table 4).

En revanche, la ventilation mécanique n'a pas eu d'effet sur les taux pulmonaires de GM-CSF, IL-12p70 et IP-10, des médiateurs précédemment identifiés dans des études *in vitro* en tant que marqueurs spécifiques du phénotype M1 (Martinez et al. 2009). Nos données indiquent également que les niveaux de MIP-1 α ont été modifiés ni par la lésion médullaire, ni par le niveau de la lésion, que l'animal ait été ventilé ou non. Par ailleurs, il n'y a pas eu de différence dans les niveaux de GM-CSF, IL-12p70 et IP-10 parmi ces groupes.

Concernant les marqueurs liés au phénotype M2, les niveaux de M-CSF furent plus élevés dans le groupe ayant subi une lésion thoracique comparé à celui dépourvu de lésion, mais uniquement parmi les animaux non-ventilés. Ensuite, les niveaux de MCP-1, une chimiokine également identifiée précédemment dans des études *in vitro* comme un marqueur spécifique du phénotype M2 furent évalués dans les lavages pulmonaires. Nos données indiquent que les taux de MCP-1 étaient significativement plus élevés dans les groupes ayant reçu une ventilation mécanique alors qu'il n'y a pas eu de différence entre les groupes ayant subi ou non une lésion médullaire ou avec des niveaux différents de lésion.

	Groups						<i>P</i> 2-way ANOVA (lesion)	<i>P</i> 2-way ANOVA (MV)
	MV-NL	MV-CL	MV-TL	<i>P</i> 1-way ANOVA (lesion)	NV-NL	NV-TL		
M1 phenotype								
GM-CSF	1.2 (0.9)	5.3 (3.3)	0.5 (0.5)	0.133	1.2 (1.2)	2.9 (1.8)	0.659	0.303
MIP-1 α	136.1 (12.9)	110.7 (17.2)	114.5 (18.9)	0.514	0.0 (0.0) [†]	27.1 (20.5) [‡]	0.863	<0.001
IL-12p70	3.8 (1.8)	0.7 (0.5)	7.1 (2.3)	0.098	5.2 (2.2)	4.3 (1.2)	0.545	0.710
IP-10	0.0 (0.0)	3.9 (3.9)	1.0 (1.0)	0.373	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.368	0.368
M2 phenotype								
M-CSF	2.7 (1.8)	8.0 (7.9)	13.7 (8.4)	0.516	6.3 (1.8)	25.7 (2.8)	0.009	0.160
MCP-1	498.4 (115.8)	202.5 (48.7)	420.6 (82.0)	0.126	5.8 (4.5) [*]	11.6 (8.7) [§]	0.646	<0.001

Tableau 4. Cytokines et chimiokines reliées aux polarisations spécifiques M1 et M2

Les valeurs sont les moyennes \pm erreur-type (SEM). Concentrations des cytokines et chimiokines exprimées en pg/ml. MV: mechanical ventilation(ventilation mécanique); NL: no lesion (sans lesion); CL: cervical lesion (lésion cervicale); TL: thoracic lesion (lésion thoracique); NV: no ventilation (sans ventilation); GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor; M-CSF: macrophage colony-stimulating factor; MIP-1 α : macrophage inflammatory protein-1; IL-12p70: interleukin-12p70; MCP-1: monocyte chemotactic protein-1; IP-10: interferon gamma-induced protein 10.

^{*}, $P < 0.05$ and [†], $P < 0.001$ for post-hoc contrasts vs. MV-NL.

[‡], $P < 0.05$ and [§], $P < 0.001$ for post-hoc contrasts vs. MV-TL.

^{||}, $P < 0.001$ for post-hoc contrasts vs. NV-NL.

5.2.1.4. La ventilation mécanique et la lésion médullaire induisent des réponses oxydatives

Les niveaux de 8-isoprostane, un marqueur de la peroxydation des lipides en réponse à un stress oxydatif (Fritsch-Decker et al. 2011), furent tout d'abord examinés afin d'évaluer les réponses oxydatives dans les lavages pulmonaires. Telle que l'illustre la figure 15 ci-dessous, les niveaux de 8-isoprostane étaient significativement plus élevés chez les animaux ventilés en comparaison aux animaux non-ventilés. De plus, des niveaux significativement plus faibles de 8-isoprostane ont été observés en présence d'une lésion thoracique T10, aussi bien chez les animaux ventilés que non-ventilés. Enfin, la lésion cervicale a également montré un niveau de 8-isoprostane significativement inférieur dans les lavages pulmonaires comparés au groupe ventilé dépourvu de lésion (MV-NL).

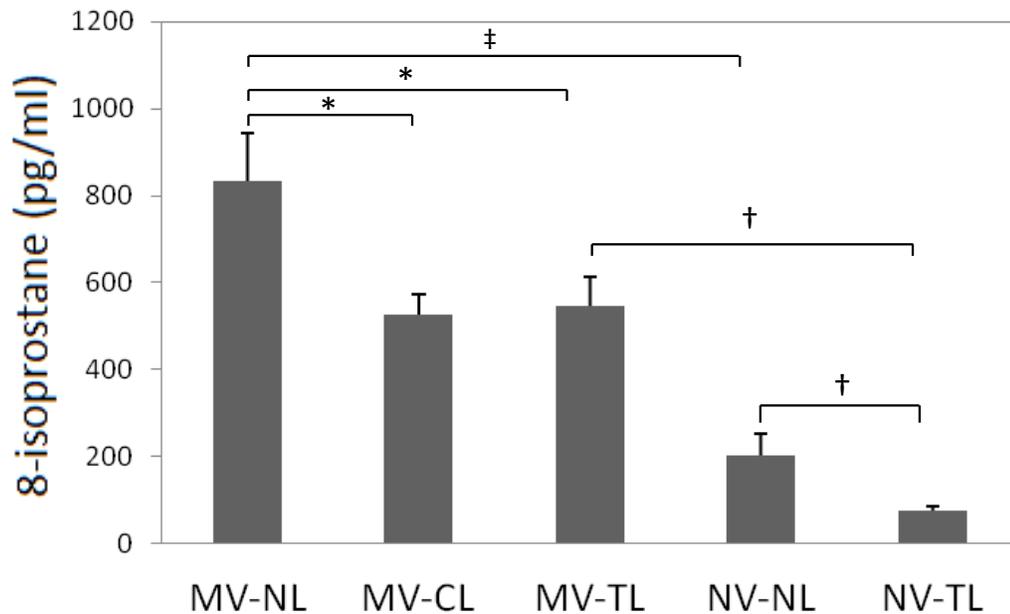


Figure 15. La VM induit des réponses oxydatives

Les valeurs sont les moyennes \pm erreur-type (SEM) du 8-isoprostane en pg/ml des animaux dans chacun des groupes d'animaux. MV: mechanical ventilation (ventilation mécanique); NL: no lesion (sans lésion); CL: cervical lesion (lésion cervicale); TL: thoracic lesion (lésion thoracique); NV: no ventilation (sans ventilation).

*, $P < 0.05$ for post hoc contrasts (1-way ANOVA).

†, $P < 0.05$ and ‡, $P < 0.001$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA).

Afin d'évaluer d'avantage les réponses oxydatives pulmonaires induites à l'application de la ventilation mécanique et de la lésion médullaire, l'expression de la protéine hème oxygénase-1 (HO-1), une enzyme intracellulaire impliquée dans la défense pulmonaire en protégeant les cellules et les tissus pulmonaires contre le stress oxydatif et les dommages (Ryter et al. 2006), fut examinée à partir des extraits cellulaires des lavages broncho-alvéolaires. Les taux de HO-1 dans le groupe NV-NL ont montré une tendance à l'augmentation par rapport au groupe MV-NL, même si la différence n'est pas atteint un seuil significatif (Figure 16). La lésion thoracique T10 chez les animaux non-ventilés a entraîné un niveau HO-1 significativement plus élevé comparativement à l'absence de lésion médullaire (NV-TL versus NV-NL). De plus, les taux de HO-1 n'étaient pas significativement différents chez les animaux ventilés avec ou sans lésion thoracique (MV-TL versus MV-NL). Finalement, la lésion cervicale a eu un impact sur le taux d'HO-1 en augmentant significativement son expression en comparaison des deux autres groupes d'animaux ventilés mécaniquement (MV-NL et MV-TL).

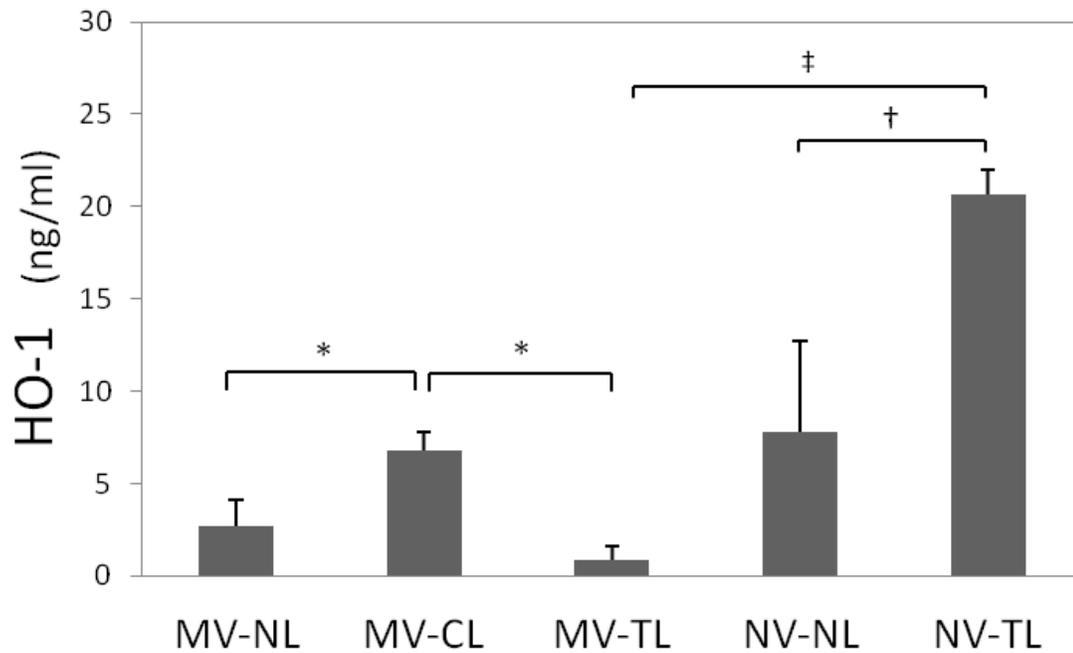


Figure 16. L'hème oxygénase-1 dans les extraits cellulaires pulmonaires.

Les valeurs sont les moyennes \pm erreur-type (SEM) de HO-1 en ng/ml; MV: mechanical ventilation (ventilation mécanique); NL: no lesion (sans lésion); CL: cervical lesion (lésion cervicale); TL: thoracic lesion (lésion thoracique); NV: no ventilation (sans ventilation).

*, $P < 0.05$ for post hoc contrasts (1-way ANOVA).

†, $P < 0.05$ and ‡, $P < 0.001$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA).

5.2.2. Résultats d'analyses au niveau de la moelle épinière

5.2.2.1. Effets de la lésion sur l'expression des cytokines dans les tissus médullaires

La lésion médullaire n'a pas changé l'expression des cytokines IL-10, IL-1 β et TNF dans les groupes d'animaux, qu'ils aient reçu la ventilation mécanique ou non, à l'exception du profil de l'IL-6. Plus précisément, la lésion cervicale et la lésion thoracique ont toutes deux augmenté significativement les concentrations d'IL-6 au niveau du site lésionnel local chez les animaux ventilés en comparaison des animaux ventilés dépourvus de lésion (MV-

NL; $P= 0.002$). Une analyse de variance à deux facteurs a ensuite été effectuée dans le but de distinguer l'effet de la lésion thoracique et celui de la ventilation mécanique sur les tissus de la moelle épinière. Cette analyse a révélé qu'une lésion thoracique T10 avait augmenté significativement les niveaux d'IL-6 chez les animaux non-ventilés en comparaison du groupe non-ventilé mais dépourvu de lésion (NV-TL versus NV-NL; $P < 0.001$; Figure 17).

5.2.2.2. Effets de la ventilation mécanique sur l'expression des cytokines

L'analyse des tissus de la moelle épinière a également révélé que le profil des cytokines chez les animaux non-ventilés dépourvus de lésion (NV-NL) était IL-10^{bas}, IL-1 β ^{haut}, TNF^{bas}, IL-6^{bas} versus IL-10^{bas}, IL-1 β ^{bas}, TNF^{haut}, IL-6^{bas} chez les animaux ventilés dépourvus de lésion (MV-NL). En effet, la ventilation mécanique a diminué significativement à elle seule l'expression d'IL-1 β dans les tissus de la moelle épinière, comparativement au groupe d'animaux dépourvu de lésion et de support respiratoire ($P < 0.05$). Par ailleurs, la ventilation mécanique a augmenté significativement les niveaux de la cytokine pro-inflammatoire TNF dans les tissus médullaires locaux, que les animaux aient subis ou non une lésion thoracique (MV-NL et MV-TL), comparé aux groupes sans support respiratoire (NV-NL et NV-TL). Bien qu'ils n'aient pas atteint un seuil significatif, les taux de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ont été diminués dans le groupe ventilé avec une lésion thoracique en comparaison avec le groupe non-ventilé ayant subi une lésion thoracique (NV-TL; $P=0.088$). Enfin, nos données indiquent que la ventilation a diminué de façon non significative les taux d'IL-6 dans les tissus de la moelle des animaux ayant subi une lésion thoracique, comparés à ceux qui n'ont pas été ventilés (NV-TL; $P=0.082$).

	Groups							
	MV-NL	MV-CL	MV-TL	1-way ANOVA	NV-NL	NV-TL	2-way ANOVA (lesion)	2-way ANOVA (MV)
IL-10	0.048 (0.012)	0.052 (0.011)	0.054 (0.015)	0.948	0.067 (0.019)	0.098 (0.028)	0.308	0.088
TNF-α	0.033 (0.011)	0.039 (0.007)	0.033 (0.009)	0.853	0.005§ (0.001)	0.002**(0.000)	0.848	0.002
IL-1β	0.006 (0.003)	0.007 (0.002)	0.007 (0.002)	0.940	0.022 § (0.004)	0.011 (0.004)	0.172	0.008
IL-6	0.103 (0.020)	2.110* (0.570)	2.740* (0.520)	0.002	0.023 (0.007)	4.390 (0.660)	<0.001	0.082

Tableau 5. Effets de la lésion et de la ventilation mécanique sur l'expression des cytokines dans la moelle épinière.

Les valeurs sont les moyennes \pm erreur-type (SEM) pour chacun des groupes en pg/ug. (A) Interleukin-1 β , (B) TNF- α , (C) Interleukin-10, (D) Interleukin-6; NV: no ventilation (sans ventilation); NL: no lesion (sans lésion); MV: mechanical ventilation (ventilation mécanique); TL: thoracic lesion (lésion thoracique) and CL: cervical lesion (lésion cervicale). *, $P < 0.05$ for post-hoc contrasts (1-way ANOVA) vs. MV-NL; §, $P < 0.05$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA) vs. MV-NL; , $P < 0.001$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA) vs. NV-NL and, **, $P < 0.05$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA) vs. MV-TL.

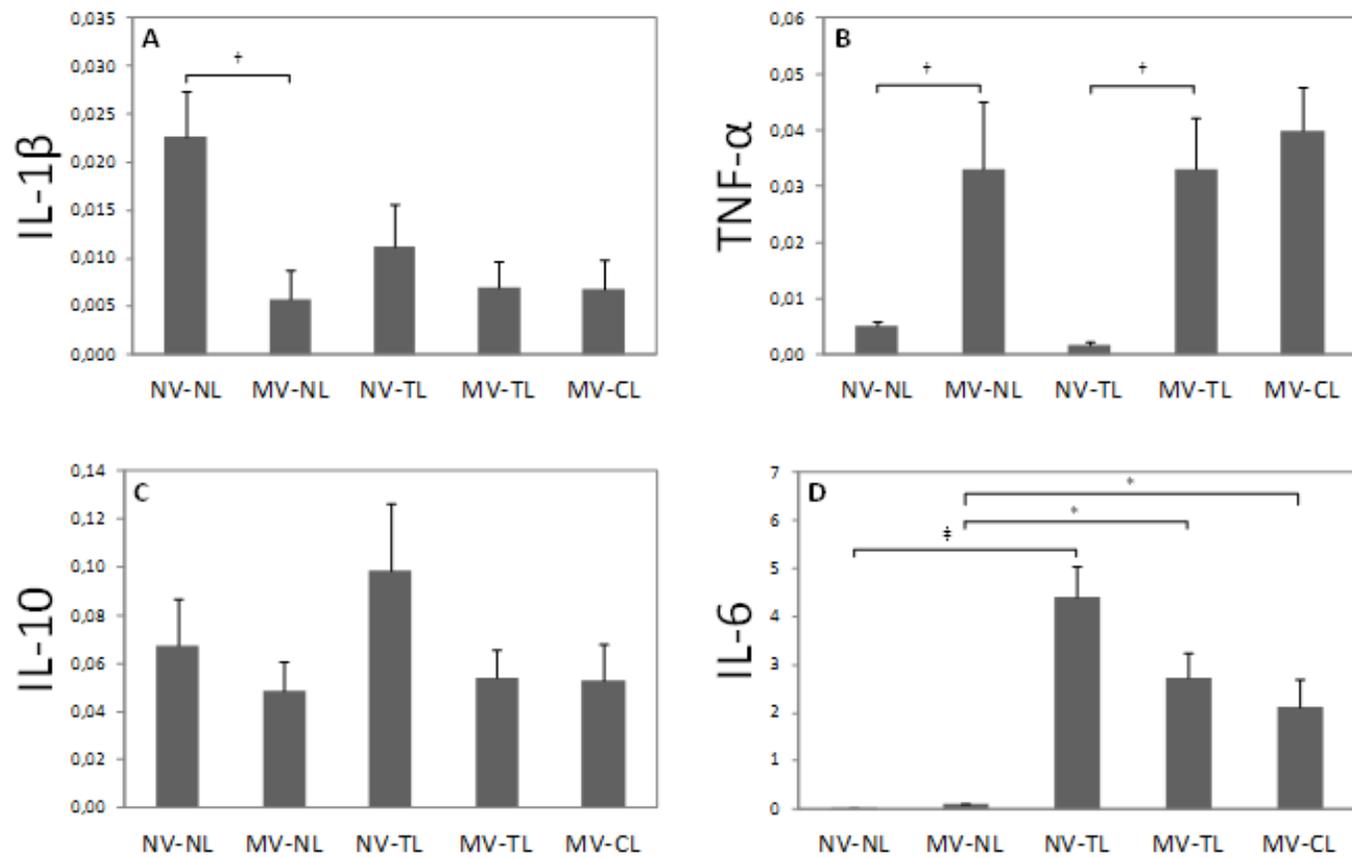


Figure 17. Effets de la lésion et de la ventilation mécanique sur l'expression des cytokines dans la moelle épinière.

Les valeurs sont les moyennes \pm erreur-type (SEM) pour chacun des groupes en pg/ μ g. (A) Interleukin-1 β , (B) TNF- α , (C) Interleukin-10, (D) Interleukin-6; NV: no ventilation (sans ventilation); NL: no lesion (sans lésion); MV: mechanical ventilation (ventilation mécanique); TL: thoracic lesion (lésion thoracique) and CL: cervical lesion (lésion cervicale). *, $P < 0.05$ for post-hoc contrasts (1-way ANOVA); †, $P < 0.05$ and ‡, $P < 0.001$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA).

Chapitre 6. Discussion générale et perspectives

L'inflammation locale survenant après un traumatisme médullaire n'est plus à démontrer aujourd'hui et certains auteurs ont montré qu'elle pouvait se propager à travers la circulation sanguine jusqu'à atteindre les organes vitaux dont le poumon (Bao et al. 2004; Gris et al. 2008). La ventilation mécanique peut elle aussi conduire à des réponses inflammatoires locales (Ranieri et al. 1999; Syrkina et al. 2008) et elle pourrait également conduire à une inflammation systémique capable d'endommager à distance les organes vitaux (Slutsky et al. 1998). L'organisme voulant alors protéger ses organes, cellules et tissus, va mettre en place tout un arsenal de cellules inflammatoires, telles que les neutrophiles et les macrophages, principale source de cytokines. L'exacerbation de ces réponses inflammatoires peut ainsi aggraver les dommages au site lésionnel. Comme largement mentionné dans l'introduction de ce projet, il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour les patients souffrant d'un traumatisme médullaire. Ce travail avait donc pour but une meilleure compréhension des facteurs inflammatoires qui contribuent à la réponse inflammatoire suite à la ventilation et dans un contexte de lésion médullaire. Il paraissait important de déterminer si la VM pouvait moduler l'inflammation pulmonaire et médullaire. Selon la littérature, la réponse immunitaire mise en jeu peut conduire à deux

types d'environnements, soit pro-inflammatoire associé à la voie classique d'activation des macrophages alvéolaires (M1), soit anti-inflammatoire dite alternative (M2) (Mosser et al. 2008).

Ainsi, dans le premier article, nous avons comme hypothèse que l'inflammation locale issue du dommage initial à la colonne vertébrale pouvait influencer ou moduler l'inflammation pulmonaire induite par la thérapie de ventilation mécanique, par l'entremise des interleukines pro-inflammatoires majoritaires. Cette interaction dans les réponses inflammatoires pulmonaires pouvait par conséquent augmenter le dommage local préalablement établi. Notre étude montre pour la première fois que les voies respiratoires saines peuvent exprimer un phénotype prédominant M2, alors que la ventilation mécanique contribue principalement à une expression phénotypique M1. Par ailleurs, nos données ont montré pour la première fois également qu'une lésion T10 en particuliers, a conduit à un phénotype M2 chez les animaux non-ventilés et à des réponses anti-oxydantes dans les poumons. Ces réponses anti-oxydatives furent maintenues chez les animaux ventilés en dépit des réponses oxydatives induites par la ventilation mécanique en elle-même.

La littérature témoigne qu'un mode de ventilation mécanique moyen ou élevé est connu pour engendrer des dommages pulmonaires, principalement caractérisés par une infiltration massive de neutrophiles et une élévation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α (Tremblay et al. 1997; Bailey et al. 2008). Le degré d'inflammation et de dommages au poumon furent évalués lorsque les animaux furent ventilés avec des paramètres de ventilation choisis soigneusement. Fort de constater que, par rapport aux animaux non-ventilés, les poumons des animaux ventilés ont montré principalement un afflux de neutrophiles, une augmentation des niveaux de la cytokine pro-inflammatoire IL-6, ainsi que du marqueur de la peroxydation lipidique, l'8-isoprostane. Il n'y a pas eu de preuve suffisante de dommages aux tissus pulmonaires importants lorsque les taux de LDH et de phosphatases alcalines ont été évalués. Toutefois, les données concernant les marqueurs de LDH n'ont probablement pas été suffisantes pour écarter la présence de

lésions pulmonaires. Nous ne pouvons pas écarter cette possibilité et d'autres études seront alors nécessaires. Les paramètres vitaux n'étaient pas différents entre les animaux ventilés et non-ventilés mécaniquement. Par conséquent, les animaux ventilés avec les paramètres sélectionnés de ventilation mécanique ont développé des réponses inflammatoires pulmonaires semblables à d'autres rapportés dans des modèles animaux expérimentaux (Chiumello et al. 1999). Les réponses inflammatoires déterminées dans notre modèle animal reflètent étroitement l'inflammation du poumon observée chez les patients ventilés mécaniquement avec le syndrome de détresse respiratoire aiguë (Ranieri et al. 1999).

Il existe plusieurs preuves de données que les macrophages, agissant comme cellules clés de la réponse immunitaire innée dans les poumons, sont les premières cellules immunitaires à aller à la rencontre des allergènes et des agents pathogènes. Les macrophages peuvent surtout basculer d'une cellule tantôt à caractère pro- à une cellule anti-inflammatoire s'il s'agit de la destruction ou de la réparation des tissus. Récemment, ces propriétés versatiles conférées aux macrophages, ont été attribuées à différents phénotypes de macrophages avec des fonctions bien distinctes; l'induction sous le contrôle de réponses immunitaires distinctes, soit d'un macrophage classiquement activé (M1), soit de façon alternative (M2). Les macrophages de type M1 présentent des propriétés antimicrobiennes, peuvent promouvoir de fortes réponses Th1 médiées par l'IL-12 tandis que les macrophages de type M2 réduisent principalement l'expression des cytokines pro-inflammatoires et participent à la résolution de l'inflammation grâce à leurs hautes capacités d'endocytose (Stout et al. 2005; Mantovani et al. 2007; Martinez et al. 2008; Gordon et al. 2010; Murray et al. 2011; Sica et al. 2012).

Au meilleur de notre connaissance, les mécanismes qui induisent l'inflammation pulmonaire engendrée par la ventilation mécanique et capable de faire basculer un macrophage alvéolaire en un phénotype spécifique sont inconnus. La prédominance d'interleukines qui définirait un environnement pro- ou anti-inflammatoire lié à un phénotype cellulaire, fut alors évoquée. La question se tourna du côté de la polarisation de

la réponse immunitaire, à savoir, par quel phénotype elle aurait pu s'exprimer. En d'autres termes, pouvait-elle avoir un impact sur la réponse de type M1 ou M2. Nous avons été en mesure de définir pour la première fois l'existence de phénotypes spécifiques de macrophages par l'évaluation de l'expression de cytokines sélectionnées dans les lavages pulmonaires. Une réponse M2 fut exprimée de façon prédominante dans les voies respiratoires saines tandis que la ventilation a conduit principalement vers un phénotype M1. En effet, le profil des cytokines des animaux dépourvus de ventilation et de lésion (NV-NL) fut IL-10^{haut}, IL-1 β ^{bas}, TNF^{bas}, IL-6^{bas}, un profil cohérent avec un phénotype M2. Les macrophages des animaux ventilés sans lésion ont donc produit moins d'IL-10 et plus d'IL-1 β , de TNF- α et d'IL-6 par rapport aux animaux non-ventilés sans lésion. L'expression prédominante de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 par rapport aux autres cytokines mesurées chez les animaux (NV-NL) peut alors être protectrice au niveau du poumon contre l'infection et les dommages pulmonaires. En revanche, chez les animaux ventilés mécaniquement et sans lésion (MV-NL), le profil des cytokines fut IL-10^{bas}, IL-1 β ^{haut}, TNF^{haut}, IL-6^{haut} suggérant une polarisation de phénotype M1. Dans un modèle expérimental, la nébulisation d'IL-10 précédant l'injection en intraveineuse d'endotoxine, avait provoqué une nette diminution des taux d'IL-1 β , TNF et IL-6 dans les lavages broncho-alvéolaires chez les rats (Hofstetter et al. 2005). Un autre fait intéressant est que l'augmentation des niveaux d'IL-10 a été rapportée dans les voies respiratoires saines d'animaux ventilés et chez des patients sous ventilation mécanique souffrant d'un début de syndrome de détresse respiratoire (Donnelly et al. 1996; Armstrong et al. 1997; Xia et al. 2011). Par ailleurs, l'IL-10 inhalée a non seulement réduit les niveaux des médiateurs inflammatoires dans les lavages broncho-alvéolaires mais aussi la mortalité dans un modèle de ventilation mécanique induisant des dommages pulmonaire chez le rat (Hoegl et al. 2009).

D'un point de vue quantitatif, l'abondance des cytokines se situe dans une zone biologiquement fonctionnelle si l'on compare d'autres études. L'étude de Von Bethmann et al. par exemple, a montré que la production d'IL-6 obtenue à partir de poumon de souris

isolé et hyperventilé ($P=25$ cm d' H_2O) était supérieure à 1500 pg/mL (von Bethmann et al. 1998). A l'inverse, ces taux d'IL-6 avoisinaient les 22 pg/mL chez des souris ventilées à bas volumes courant ($V_T=6$ mL/kg) pendant 4 heures (Gurkan et al. 2003). L'étude de Bailey et al. quant à elle, qui a évalué les lavages pulmonaires de rats, ventilés pendant 24 heures avec toutefois un volume courant moyen ($V_T=8$ mL/kg), notait un niveau d'IL-6 avoisinant les 700 pg/mL (Bailey et al. 2008). Si l'on regarde notre présente étude de 24 heures à bas volume courant, on note des taux d'IL-6 qui ont avoisiné 250-300 pg/mL, pour les groupes ventilés. Bien que certains niveaux semblent d'amplitude modérée (3-5 pg/mL) dans notre étude où de petits animaux ont été enrôlés, en particulier ceux de TNF, ils apparaissent suffisants pour interagir avec les autres interleukines et atteindre un seuil de comparaison significatif. Par ailleurs, certaines études ont montré que ces mêmes taux furent impossibles à détecter dans les poumons d'animaux ventilés à bas volumes courants ($V_T=6$ mL/kg) (Verbrugge et al. 1999; Ricard et al. 2001; Gurkan et al. 2003). De plus, Tremblay et al. ont observé des niveaux d'IL-1 β avoisinant 30 pg/mL dans les poumons sains d'animaux ventilés à bas volume ($V_T=7$ mL/kg) et 25 pg/mL dans des poumons ayant été traités au préalable avec du LPS. En se basant sur ces derniers résultats, une étude expérimentale *ex vivo* sur des poumons isolés de rats a obtenu des résultats contradictoires avec ceux des auteurs précédents. En effet, Ricard et al. ont montré une augmentation des taux d'IL-1 β allant de 10 pg/mL chez des animaux sains ventilés pendant 2 heures à $V_T=7$ mL/kg, à 350 pg/mL chez des animaux ayant été traité au LPS au préalable et ventilés avec un volume courant élevé de 42 mL/kg (Ricard et al. 2001). Finalement une étude plus récente a été orientée spécifiquement sur la durée de ventilation mécanique appliquée chez des souris saines, avec un volume de niveau conventionnel ($V_T=7$ mL/kg) *versus* un volume courant élevé ($V_T=15$ mL/kg). Les données ont montré pour une durée de 5 heures et de 12 heures associées à la VM de bas niveau, un taux d'IL-1 β avoisinant 700 pg/mL tandis que les taux d'IL-1 β avoisinaient 1000 et 1300 pg/mL, pour 5 heures et 12 heures de ventilation mécanique élevée, respectivement (Hegeman et al. 2013). Notre modèle expérimental montre des résultats d'IL-1 β inférieurs avec un taux de 90 pg/mL mesurés

dans les poumons sains du groupe ventilé correspondant à un mode de ventilation également plus bas.

Enfin, l'étude clinique de Wrigge et al, chez des sujets adultes sains qui avaient bénéficié d'une chirurgie élective thoracique ou abdominale, sous respirateur artificiel de courte durée (3 heures), avait révélé que les changements dans les concentrations pulmonaires d'IL-10 étaient restés inchangés quelque fut le volume courant appliqué, bas ou haut ($V_T=6$ ou $V_T=15$ mL/kg) (Wrigge et al. 2004). L'abondance de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 était de 10 pg/mL. Dans un modèle expérimental de rats sains ventilés selon trois stratégies de ventilation pendant 4 heures avec soit; 1) une pression de crête inspiratoire élevée (PIP=32 cm H₂O/PEEP=0 cm H₂O); 2) une PIP=32 cm H₂O/PEEP=6 cm H₂O; et 3) une PIP basse (PIP=14 cm H₂O/PEEP=6 cm H₂O), la production d'IL-10 mesurée dans les poumons avait diminué significativement avec la première stratégie de VM. Les animaux ventilés avec des pressions basses présentaient des niveaux pulmonaires d'IL-10 avoisinant 600 pg/mL tout comme le groupe de référence qui n'avait pas bénéficié de support respiratoire. Les animaux ventilés à haute pression et PEEP, montraient des niveaux approximatifs de 100 pg/mL tandis que ceux ventilés à haute pression sans PEEP, avaient des niveaux diminués jusqu'à 50 pg/mL (Vreugdenhil et al. 2004). Nos données expérimentales semblent donc d'avantage rejoindre ceux de l'étude concernant les patients qui ont bénéficié d'une chirurgie élective et ventilés pendant 3 heures (Wrigge et al. 2004). Notre modèle présente des niveaux pulmonaires d'IL-10 à 20 pg/mL chez nos trois groupes ventilés (MV-NL; MV-CL et MV-TL) alors que ceux dépourvus de ventilation mécanique ont avoisiné 80 pg/mL (NV-NL et NV-TL). Par contre, à l'inverse de Wrigge et al, le support ventilatoire a diminué significativement les concentrations pulmonaires d'IL-10.

Les résultats sont donc très variables d'une étude à l'autre. Il est tout à fait probable que même si certaines études ont montré une augmentation de cytokines pro-inflammatoires après l'application de ventilation, l'existence d'un effet inflammatoire isolé n'est pas certaine à 100% dans toutes les études. Beaucoup de modèles expérimentaux vont stimuler

le poumon au préalable (LPS) afin d'obtenir cette augmentation tandis que d'autres utilisent des modes stratégiques de haut niveau, endommageant ainsi le poumon de l'animal.

Plusieurs associations entre le profil de cytokines exprimés et le phénotype M1 *versus* M2 peuvent avoir de nombreuses autres explications. Aujourd'hui les macrophages ne sont plus limités à la seule fonction caractéristique « d'éboueurs » dans le phénomène de phagocytose. Leurs fonctions fondamentales et nécessaires correspondent à un retour à l'homéostasie à l'échelle des tissus et de l'organisme lorsque divers stress se produisent. La classification des macrophages selon un spectre correspond à un continuum de fonctions qui, nous l'avons vu, a trois objectifs fondamentaux; la défense de l'hôte, la réparation et la régulation de la réponse immunitaire (Mantovani et al. 2007; Mosser et al. 2008). Lors de divers stress, comme par exemple une infection, l'organisme se doit de résoudre l'inflammation. Il va donc réagir grâce à une réponse inflammatoire associée par une activation classique M1 pour combattre l'infection. Si l'inflammation persiste, elle va engendrer des dommages tissulaires et la mise en place des mécanismes anti-inflammatoires est donc nécessaire à la survie de l'hôte. La polarisation M2 étant capable d'inhiber la polarisation M1, un équilibre est nécessaire entre ces deux réponses pour permettre une séquence bénéfique telle que « stress, inflammation, résolution, réparation ». Ainsi, les macrophages sont classés en sous-types M1-M2a-M2b-M2c couvrant un large spectre d'activation compris entre les extrêmes de polarisation M1 et M2 liés aux cytokines (Mantovani et al. 2004). Leur adéquation est fonction du pathogène et correspond à la persistance ou la résolution de l'infection, l'inflammation engendrée par un stress quelconque (Mosser et al. 2008). Dans notre étude, nous avons défini que l'inflammation produite provenait du stress oxydatif dû à la perturbation de l'équilibre entre les deux réponses de polarisation M1 et M2. L'effet de la ventilation mécanique même à caractère protecteur (étirements mécaniques répétitifs des alvéoles), ainsi que le contexte de la blessure médullaire ont engendré ce déséquilibre. La VM en elle-même peut être un deuxième « coup » pour l'intégrité des alvéoles lorsqu'un dommage existe quelquepart ailleurs dans l'organisme (Vaneker et al. 2007).

Divers stress peuvent expliquer cette perturbation dans des contextes de maladies spécifiques telles que les infections virales, bactériennes, parasitaire, le cancer, le diabète, les allergies ou encore l'obésité. En général, la résolution de l'inflammation et la reconstruction sont le résultat d'un phénotype majoritaire M2. Mais dans d'autre contexte, d'autres associations entre les profils de cytokines exprimés peuvent avoir une autre explication, comme par exemple : l'inflammation péritonéale correspond d'avantage à un phénotype unique mixte M1-M2 tandis que les ulcères veineux chroniques chez l'humain correspondante à l'échec de la réussite du passage de M1 en M2. L'allergie quant à elle est associée aux cellules Th2 de la polarisation M2. Les infections virales (herpes, bronchiolite, HIV) dépendent de la différenciation M2 qui va réduire l'inflammation ainsi que les dommages épithéliaux dans le poumon. Enfin, la transition de l'inflammation de phase aiguë en phase chronique est le balancement de M1 à M2 qui fournissant la protection contre une inflammation non-contrôlée (Mantovani et al. 2007; Murray et al. 2011; Sica et al. 2012).

Bien que les données de nos travaux aient démontré une expression majoritaire du phénotype M2 chez les animaux NV-NL envers un phénotype M1 chez les animaux ventilés et dépourvus de lésion médullaire (MV-NL), il n'est pas exclu que les cytokines évaluées dans les lavages pulmonaires ne soient exclusivement produites par les macrophages. Elles peuvent être dérivées d'autres phagocytes (polynucléaires neutrophiles) ou cellules pulmonaires telles que les cellules structurelles des voies aériennes (épithéliales, endothéliales, fibroblastes) ou encore les lymphocytes (cellules NK) et les pneumocytes II (Claude Gillot 2014). L'expression d'autres marqueurs sélectionnés correspondant au phénotype d'activation classique et alternative de macrophages fut alors abordée. La polarisation des macrophages de type M1 est conduite par le GM-CSF (Mosser et al. 2008) et les cellules libèrent principalement de l'IL-12p70, IP-10 et le MIP-1 α (Mosser 2003). Aucune augmentation des niveaux GM-CSF, IL-12p70 et IP-10 ne fut décelée chez les animaux MV-NL en comparaison au groupe NV-NL. Cependant, les niveaux de MIP-1 α

furent significativement augmentés chez les animaux MV-NL et totalement absente chez les animaux NV-NL. La polarisation des macrophages de type M2 quant à elle, est conduite par le M-CSF (Mantovani et al. 2007), et les cellules libèrent préférentiellement de l'IL-10 et le MCP-1 (Murray et al. 2011) ainsi que l'enzyme anti-oxydante HO-1 (Ryter et al. 2006).

Nos données ont révélé une faible production de GM-CSF accompagnée d'une forte production de MCP-1 chez les animaux ventilés qui est en opposition avec un profil classique M1. Effectivement, on aurait dû s'attendre à ce que les taux de GM-CSF chez l'animal ventilé soient significativement élevés, or cela n'a pas été le cas. Les productions d'IL-1 β , TNF- α et IL-6, les interleukines spécifiques et majoritaires d'un profil M1, ont montré un niveau élevé. Serait-ce la lésion elle-même qui interviendrait dans les faibles quantités de GM-CSF? La lésion cervicale diminue la production d'IL-1 β et on ne retrouve pas d'IL-10 en grandes quantités dans ce groupe ventilé. Il semblerait que la VM inverse la production de l'IL-1 β sans toutefois inverser la production d'IL-10. On devrait alors s'attendre à une inversion de polarisation, non spécifique à M1 ou M2. Considérant que l'IL-10 est protectrice, au niveau neuronal et inflammatoire, cette protection est absente dans un contexte de VM. Nous gardons donc comme hypothèse que la lésion jouerait un rôle dans les résultats de GM-CSF car elle compense l'augmentation de l'IL-1 β induite par la VM. Par ailleurs, ces faibles résultats de GM-CSF pourraient également être expliqués par une durée d'exposition à la VM de 24 heures, effectivement trop courte.

L'analyse des lavages broncho-alvéolaires a révélé un niveau élevé d'expression M-CSF chez les animaux non-ventilés dépourvus de liaison (NV-NL), mais pas significativement différents de ceux chez les animaux ventilés sans lésion (MV-NL). De façon étonnante, les niveaux de MCP-1 chez les animaux NV-NL étaient très faibles mais furent nettement augmentés chez les animaux MV-NL. Bien qu'ils aient été non significativement différents, les niveaux de HO-1 furent plus élevés chez les animaux NV-NL que ceux des animaux MV-NL. Indépendamment des variations dans les niveaux de médiateurs inflammatoires et

anti-inflammatoires, nous avons fourni la première preuve que les voies respiratoires des animaux sains (dépourvus de liaison) expriment un phénotype en faveur du type M2 tandis que la ventilation mécanique provoque un phénotype M1 préférentiellement. L'importance des phénotypes des macrophages a été abordée récemment dans la pathogénèse du poumon dans un modèle d'asthme murin expérimental. Cette étude a révélé que l'équilibre entre les phénotypes des macrophages est fonction de la sévérité de l'asthme; l'expression du phénotype M1 fut augmentée chez la souris souffrant d'allergie inflammatoire moins sévère des voies respiratoires (Draijer et al. 2013). Dans notre étude, la détermination de marqueurs de phénotypes M1 et M2 dans les lavages pulmonaires a également révélé des phénotypes mixtes au regard de l'expression des chimiokines. Ce résultat est en accord avec d'autres rapports in vivo qui démontrent la coexistence de plusieurs phénotypes reflétant la complexité des changements dynamiques cellulaires dans les tissus et les organes (Sica et al. 2012).

Nous avons ensuite examiné si la lésion médullaire en elle-même ou bien combinée avec la ventilation mécanique, avait pu moduler l'afflux des cellules inflammatoires dans les voies respiratoires, ainsi que des dommages pulmonaires et la polarisation des macrophages dans les poumons. Nous avons abordé en premier lieu l'effet de la lésion thoracique T10 seule. Nous avons constaté que les animaux non-ventilés ayant subi une lésion T10 (NV-TL) n'ont montré aucun signe d'inflammation ou de dommage pulmonaire dans les voies respiratoires. La lésion thoracique a induit un profil de cytokines similaire au groupe NV-NL, concernant les expressions d'IL-10, IL-1 β , TNF et IL-6. Par contre, la lésion T10 seule a provoqué une augmentation significative des niveaux de M-CSF dans les lavages. Cette nouvelle découverte pourrait suggérer que les lésions médullaires pourraient favoriser un phénotype M2 chez les animaux NV-TL et ainsi moduler la réponse immunitaire au niveau du poumon. Cependant, nos données ont révélé que cette lésion T10 pouvait également induire une augmentation de MIP-1 α , indicateur d'un phénotype M1. En ce sens, il est fort possible qu'une lésion T10 puisse conduire à la fois à un phénotype M1 et un phénotype M2 dans le poumon des animaux NV-NL. Nous avons examiné par conséquent si une

polarisation de phénotype spécifique avait été induite chez les animaux souffrant de lésions T10 et ventilés mécaniquement. En accord avec notre hypothèse, nous avons constaté que la lésion T10 a induit les deux phénotypes M1 et M2, tel qu'illustré par la diminution des niveaux d'IL-1 β et d'IL-10, et ce malgré un niveau d'IL-6 non significatif chez les animaux MV-TL. Toutefois, la lésion T10 n'a pas causé d'infiltration de neutrophiles ou de dommages dans les poumons des animaux MV-TL.

Puis nous avons cherché à déterminer si la localisation de la blessure médullaire pouvait moduler différemment l'inflammation induite par la ventilation mécanique basculant en faveur d'un phénotype prédominant M1. Nous avons constaté que la lésion cervicale C4-C5 chez les animaux ventilés a provoqué une modulation similaire sur l'expression des cytokines de la même façon que la lésion thoracique l'a fait, avec néanmoins aucune différence dans le nombre de neutrophiles ou de dommages pulmonaires. Il semblerait que ce groupe d'animaux présente un niveau de macrophages plus élevé que les autres groupes ventilés sans toutefois atteindre un seuil de différence quelconque significatif. Pris dans leur ensemble, nos résultats mettent en lumière un nouveau concept quant au rôle que la lésion médullaire joue sur la modulation des réponses immunitaires spécifiques, mais pas sur l'afflux des cellules inflammatoires ou encore des dommages pulmonaires, dans les poumons d'animaux ventilés mécaniquement.

Enfin, nous avons examiné l'impact de la lésion médullaire sur les réponses au stress oxydatif du poumon. Pour répondre à cette question, nous avons examiné deux paramètres pour déterminer le niveau du stress oxydatif, soit la peroxydation des lipides et l'activité anti-oxydante exprimée par HO-1. L'enzyme HO-1, une des trois formes de l'hème oxygénase est exprimée dans différents types cellulaires, y compris les macrophages alvéolaires (Mege et al. 2011; Murray et al. 2011). Des études expérimentales précédentes ont mis en évidence le rôle de HO-1 lors de lésions pulmonaires en montrant que l'administration de cette enzyme avait réduit les niveaux de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-8. Par contre, HO-1 a augmenté les niveaux de la cytokine anti-

inflammatoire IL-10 dans un modèle expérimental de dommages pulmonaires induits par la ventilation mécanique (An et al. 2011). L'expression de HO-1 est également induite rapidement en réponse à un stress oxydatif et par des cytokines pro-inflammatoires, prodiguant dès lors un mécanisme important de défense pulmonaire (Yet et al. 1997; Ryter et al. 2006). Fait intéressant, l'expression de HO-1 dans la polarisation des macrophages de type M2 conduite par M-CSF contribue à la production d'IL-10 après stimulation par du LPS (Sierra-Filardi et al. 2010). Les niveaux intracellulaires de HO-1 dans les lavages broncho-alvéolaires furent donc déterminés en tant que marqueur des réponses oxydatives. Nous avons alors constaté que la ventilation mécanique avait modulé les réponses oxydatives en augmentant les niveaux d'8-isoprostane tout en diminuant ceux d'HO-1. Notre nouveau concept quant au rôle de la lésion médullaire en tant que promoteur positif de la défense du poumon est renforcé par le fait que notre modèle montre que la lésion T10 est en mesure de réduire les niveaux d'8-isoprostane tout en augmentant ceux d'HO-1 chez les animaux NV-NL. De plus, nous avons observé que les lésions médullaires, à la fois cervicale et thoracique, ont tenté de rétablir un état anti-oxydatif dans le poumon chez les animaux ventilés mécaniquement, en diminuant le stress oxydatif tout en influençant positivement des réponses anti-oxydatives. Le fait que les lésions cervicales et thoraciques aient été capables de déclencher l'augmentation de HO-1 chez les animaux ventilés suggère fortement que la lésion médullaire puisse promouvoir d'avantage un phénotype prédominant M2 par rapport au phénotype M1 chez ces animaux ventilés. Ce nouveau concept est soutenu par notre modèle expérimental qui montre que la lésion thoracique à réduit spécifiquement les niveaux d'IL-1 β par rapport aux autres cytokines tout en augmentant l'expression d'HO-1 chez les animaux NV-NL et MV-NL. La lésion cervicale quant à elle, avec des niveaux faibles d'IL-1 β a également réduit également les réponses au stress oxydatif (diminution du 8-isoprostane et augmentation d'HO-1). Ces trois facteurs (lésion cervicale, HO-1 et IL-10) semblent fortement inter reliés et impactent le système en général en accentuant la présence d'un phénotype M1 et M2. Le mécanisme spécifique induit par la lésion cervicale n'est pas connu et d'autres recherches seront indispensables dans ce contexte. Néanmoins, il est possible que les macrophages, connus pour leurs

propriétés soient de réparations tissulaires sous l'influence spécifique de l'IL-10, soient dommageables sous influence de TNF- α , puissent nous montrer un tout autre profil s'inscrivant dans un panel situé entre le phénotype M1 et le celui de M2.

Aujourd'hui, il est reconnu que la lésion médullaire induit une forte réponse inflammatoire au site endommagé, caractérisée par une infiltration d'une variété de cellules immunitaires (Fleming et al. 2006). De plus, certains auteurs ont témoigné d'un intérêt pour l'effet que pourrait avoir la ventilation mécanique au-delà du poumon (Slutsky et al. 1998). Si ce support respiratoire, qui est indispensable lors de lésions cervicales, a eu tendance à favoriser une réponse immunitaire avec un environnement pro-inflammatoire M1 dans un poumon sain, alors est-il réellement possible que la VM ait pu agir à distance sur d'autres organes vitaux, ou simplement sur les tissus lésés de la moelle épinière? Le second travail de ce projet a donc examiné le profil inflammatoire des cytokines dans les tissus de la moelle épinière 24 heures après l'application de la ventilation lors d'une blessure médullaire. Il a fourni la preuve que la VM était capable d'agir à distance non seulement sur les tissus lésés mais aussi sur les tissus sains de la moelle, risquant allant de contribuer à une réaction inflammatoire supplémentaire.

L'analyse des tissus collectés au site local de la lésion a indiqué une hausse de l'expression de l'IL-6 induite par la blessure médullaire. Nos données concordent avec les études antérieures qui ont révélé qu'une hausse significative d'IL-6 se produisait dans les tissus de la moelle épinière suite à un traumatisme (Van Wagoner et al. 1999; Hausmann 2003). Suite à un traumatisme médullaire, les macrophages résidents (microglie) ont été signalés comme étant principalement activés dans la réponse immunitaire dans le but de favoriser la régénération axonale (Hansson et al. 2003; Giger et al. 2010). Utilisant des anticorps monoclonaux pour un blocage temporaire de la production d'IL-6, une étude récente a montré que la réponse inflammatoire avait été réduite et que la réparation tissulaire avait été secondaire à l'inactivation du phénotype M1, favorisant une voie alternative anti-inflammatoire de type M2 (Guerrero et al. 2012). Récemment, la récupération fonctionnelle a été montrée qu'elle corrélait non seulement avec des axones conservés ou une diminution

de la formation du tissu cicatriciel, mais aussi avec la transplantation des cellules mésenchymateuses. Ces cellules dérivées de la moelle osseuse sont connues pour leur effet sur l'activation des macrophages de la moelle épinière lésée (Nakajima et al. 2012). Ainsi, la transplantation de ces cellules a réduit significativement les niveaux d'IL-6 et de TNF- α dans les tissus médullaires exprimant préférentiellement un phénotype M2 au détriment d'un phénotype M1. Les macrophages sont donc à la fois une source bénéfique quant il s'agit de processus de réparations tissulaires et à la fois une source dommageable lors d'une réponse inflammatoire excessive (Horn et al. 2008). Les effets contradictoires des macrophages ont été rapportés dans une étude récente en ce qui concerne la réponse inflammatoire dans la pathologie du traumatisme médullaire lors de la réponse. Nous retrouvons, tout comme dans le poumon, deux populations correspondantes aux deux différents phénotypes liés à l'activation de signaux cellulaires spécifiques (Kigerl et al. 2009). Il a également été rapporté que le déséquilibre des médiateurs inflammatoires est capable de favoriser soit un environnement pro-inflammatoire M1 avec la production de TNF- α et d'IL-1 β , empêchant la régénération axonale, soit un environnement anti-inflammatoire M2 conduit principalement par l'IL-10 menant par conséquent à une réparation tissulaire (Mantovani et al. 2004; Mosser et al. 2008).

En ce qui concerne la VM, nos résultats ont clairement montré qu'elle était capable de moduler l'expression des cytokines pro-inflammatoires dans les tissus de la moelle avec notamment avec une forte production de TNF- α et une diminution d'IL-1 β . Ces résultats sont surprenants car ils mettent en évidence pour la première fois qu'une application sur une période prolongée, la VM joue un rôle non négligeable dans la hausse des cytokines inflammatoires dans les tissus de la moelle épinière. Or, elle peut également inhiber l'expression de l'IL-1 β à distance chez les animaux dépourvus de lésion médullaire. Des études sur des poumons endommagés au préalable, ont rapporté que la VM avait augmenté considérablement la concentration de cytokines inflammatoires dans le sang suggérant alors que ce support ventilatoire pourrait jouer un rôle éventuel à distance sur les organes vitaux de l'organisme (Slutsky et al. 1998; dos Santos et al. 2000; Parsons et al. 2005). Nos

propres résultats pourraient donc s'expliquer par le fait que l'inflammation induite par la VM au préalable au niveau pulmonaire aurait été probablement véhiculée par la circulation sanguine pour atteindre finalement la moelle épinière et ce même si les profils inflammatoires observés dans les tissus médullaires sont différents de ceux observés au niveau pulmonaire.

Il existe des évidences que les populations de macrophages activent l'expression d'IL-1 β afin de favoriser l'inflammation ou améliorer la régénération neuronale (Mantovani et al. 2004; Gordon 2007). Une étude a récemment rapporté que l'IL-1 β avait contribué à la fois une activation classique mais aussi à une activation alternative des macrophages (Sato et al. 2012). Ils ont déterminé si l'IL-1 β avait eu un impact dans un modèle expérimental de sectionnement médullaire (T9-T10). Afin de déterminer un phénotype d'activation de macrophages, ils ont regardés les niveaux de TNF- α et ont exposé une culture de macrophages issus de souris adultes à l'IL-4 en présence ou non d'IL-1 β . Dès lors, la production de TNF- α fut supprimée significativement dans les tissus lésés des souris traitées avec l'IL-1 β et leur activité locomotrice fut améliorée. Un phénotype d'activation alternatif caractérisé par l'expression significative des marqueurs YM1 et arginase-1 après l'exposition au co-traitement avec l'IL-4 et l'IL-1 β fut observé. En fin de compte, ils ont conclu que l'IL-1 β avait réduit la réponse inflammatoire induite par la lésion médullaire et avait participé à l'activation classique et alternative des macrophages *in vitro*. Dans notre modèle *in vivo*, ni la lésion cervicale ni la lésion thoracique n'ont eu un impact sur les niveaux d'IL-1 β dans les tissus de la moelle. Cependant, nos données montrent clairement que la ventilation mécanique a induit une inhibition significative d'IL-1 β (MV-NL versus NV-NL) malgré ses faibles niveaux. D'autres recherches sont nécessaires pour élucider ce mécanisme.

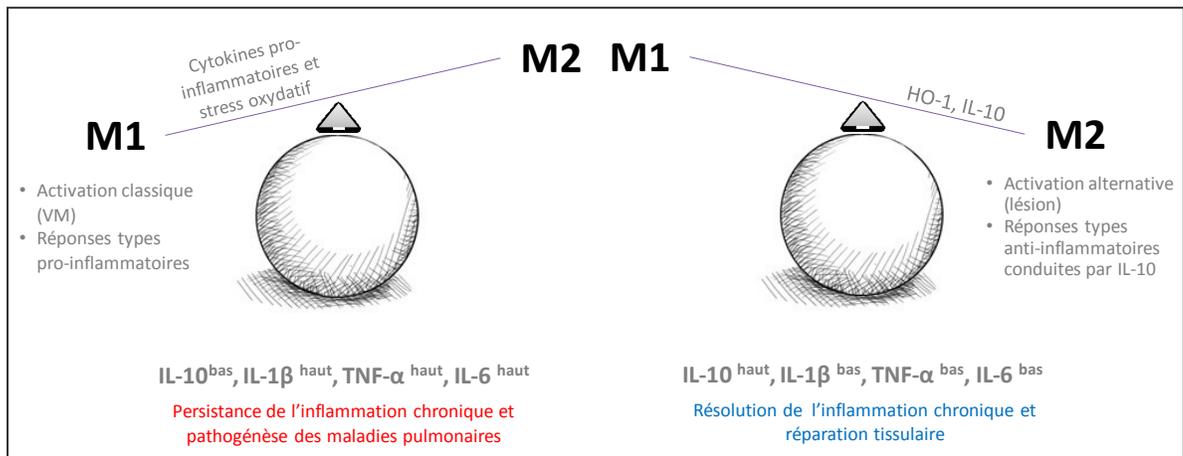


Figure 18. Schéma hypothétique de la polarisation M1/M2 du macrophage alvéolaire dans un contexte de ventilation mécanique après un traumatisme médullaire.

En présence d'une lésion à la moelle épinière et en l'absence de ventilation mécanique, l'expression de HO-1 semble agir en concordance avec l'IL-10, conduisant alors à un environnement anti-inflammatoire M2 dans un poumon sain. À l'inverse, la répression de leurs propriétés anti-inflammatoires semblent être contrebalancée par les cytokines pro-inflammatoires et le stress oxydatif qu'induit la VM. Un environnement pro-inflammatoire s'installe dès lors, mené par une activation classique M1. Le balancement vers l'un ou l'autre phénotype montre la tentative de l'organisme à vouloir résoudre l'inflammation et si la lésion médullaire tend vers un phénotype M2, c'est probablement que celui-ci reflète les caractéristiques d'une réparation tissulaire éventuelle. Le résultat d'un phénotype propre au contexte dans lequel le système se trouve impliqué, semble être étroitement lié à l'équilibre entre les cytokines pro-inflammatoires, le stress oxydatif, l'HO-1 et l'IL-10.

Étant donné que l'inflammation induite par la VM est très souvent reliée aux paramètres du support respiratoire (Greenfield et al. 1964), nous avons pris soin de minimiser les facteurs d'ordre mécanique tels que les étirements excessifs des alvéoles qui auraient pu influencer les changements dans les réponses inflammatoires. Les modes du support respiratoire furent ajustés de façon constante.

Il est cependant important de noter que le présent projet a fait face à quelques limitations.

Premièrement, le mode de ventilation en pression contrôlée, délivré par le support ventilatoire a été choisi dans le but d'étirer tous les poumons avec la même pression

Discussion générale et perspectives

inspiratoire afin d'éviter d'endommager le poumon par étirements alvéolaires excessifs. En fixant une pression inspiratoire basse délivrée de manière constante (10 cm H₂O) tout en contrôlant le CO₂ expiré selon les normes établies pour le modèle du rat (3%), nous avons appliqué une ventilation physiologique aux poumons des animaux. Même si la pression barométrique délivrée est peu élevée et que le respirateur artificiel ajuste le volume courant, notre modèle expérimental a été restreint à la physiologie de l'animal et non celle de l'homme.

Deuxièmement, les mécanismes respiratoires du rat peuvent être différents de ceux de l'homme (Soutiere et al. 2004). D'après une revue de littérature sur l'évaluation du design expérimental de différentes espèces de mammifères aux poumons sains, les espèces plus grandes ont montré une meilleure résistance à la ventilation mécanique capable d'induire des dommages pulmonaires en comparaison aux espèces plus petites. Ainsi, les petites espèces telles que les souris, les rats et les lapins semblent être plus susceptibles aux dommages induits par la ventilation mécanique que les espèces plus grandes telles que les chèvres et les cochons (Caironi et al. 2011). Ce qui implique que malgré une pression inspiratoire peu élevée, celle-ci peut avoir un effet plus important sur le poumon de l'animal que celui de l'homme. Toutes ces différences dans la physiologie respiratoire peuvent avoir un impact quant à l'application des résultats du présent projet à la condition humaine.

Troisièmement, le manque d'échantillons sanguins des animaux a constitué une limite à notre travail puisque nous n'avons pas pu explorer l'évolution dans le temps des cellules telles que les neutrophiles et macrophages. Nous avons néanmoins été en mesure de collecter quelques échantillons pour chaque animal et ce, à des temps variables, mais en quantité insuffisante pour nos analyses de sang. Il aurait été intéressant de mener à bien l'analyse des échantillons sanguins à des temps différents, reflet de l'évolution de l'inflammation systémique.

Et quatrièmement, l'interaction entre la blessure médullaire et la VM a été étudiée sur les réponses inflammatoires de poumons sains et de tissus sains et lésés mais seulement sur une durée de 24 heures. Il est fort possible que cette interaction puisse varier selon la durée d'exposition de la VM.

Beaucoup de données rapportées dans notre modèle animal sont en accord avec des études expérimentales effectuées au préalable, notamment en ce qui concerne l'expression des cytokines. Ainsi, l'abondance des cytokines observées dans ce travail se situe dans une zone fonctionnelle comparable aux autres études. Le lien entre le phénotype des macrophages et l'inflammation pulmonaire engendrée par divers stress tels que la VM et la lésion médullaire est encore rarement rapporté dans les études. Des recherches complémentaires sont donc nécessaires. Les résultats obtenus dans les études cliniques quant à elles, sont très variables d'une étude à l'autre puisque différentes variables vont entrer en compte; avec principalement les modes stratégiques différents de ventilation bas-moyen-élevé ainsi que le temps d'exposition du support respiratoire, mais surtout l'état du poumon au préalable (sain ou endommagé). L'existence d'un effet inflammatoire isolé sur le poumon n'est pas absolument certaine dans ces études qui considèrent souvent un poumon malade au préalable. Au regard de l'impact inflammatoire de la lésion médullaire sur le poumon, on retrouve encore peu de données décrites chez les patients atteints de blessure médullaire.

Enfin, l'ensemble de ces résultats permettent de mettre en évidence des perspectives sur l'importance de l'application de la VM en tant que modulatrice de la réponse immunitaire.

Étant donné qu'il n'existe pas de thérapie à ce jour ayant prouvé une efficacité réelle dans l'amélioration fonctionnelle chez le patient après une blessure de la moelle épinière, étudier la modulation de l'inflammation post-traumatique et la façon dont le traumatisme médullaire interagit avec la VM sur les réponses inflammatoires, à la fois pulmonaires et au

site local, est important. En effet, toute stratégie thérapeutique qui réduit les dommages inflammatoires secondaires survenant à la moelle épinière est susceptible d'avoir des répercussions considérables quant au système sensori-moteur du traumatisé médullaire. Autrement dit, une toute petite différence dans la protection de la moelle épinière lui permettrait d'atteindre un niveau de performance locomoteur et fonctionnel supérieur. Une amélioration du contrôle de l'inflammation locale constituerait donc une approche de traitement neuroprotecteur. En définitive, nos résultats sont susceptibles d'être pertinents pour des approches thérapeutiques utilisées chez les patients ventilés mécaniquement en soins aigus présentant une lésion cervicale de haut niveau. En effet, une VM à caractère protecteur pourrait influencer la réponse immunitaire en favorisant une activation phénotypique (M2) qui contribue à un environnement anti-inflammatoire. De plus, à la vue du manque d'information dans la littérature sur les effets à la moelle épinière de la VM, non pas seulement dans le cas d'une lésion médullaire mais également sur des tissus sains, d'autres études permettraient de :

1. Déterminer comment la blessure médullaire est capable de favoriser un milieu anti-inflammatoire de phénotype M2 dans le poumon et de réduire les réponses au stress oxydatif en analysant par exemple d'autres médiateurs spécifiques à l'activation de la réponse M2 (l'enzyme arginase-1 et Ym1 une protéine produite par les macrophages lors d'une infection parasitaire). Des cultures primaires de macrophages produits par des rats adultes pourraient être également exposées à de l'IL-4 en présence ou non d'IL-1 β . De plus, l'oxyde nitrique pourrait être mesuré dans les cellules en suspension suite au traitement de l'IL-4 et de l'IL-1 β . Une augmentation de l'expression des marqueurs Ym1 et de l'arginase pourrait être ou non observée, représentatif ou non d'une réponse M2. Ainsi, les expérimentations pourraient déterminer si oui ou non l'expression d'IL-1 β est capable de supprimer les processus induits par la lésion médullaire en réduisant les réponses inflammatoires.

2. Identifier un sous-type de phénotype (M2a, M2b et M2c) induit par la lésion et par la ventilation mécanique à partir de l'analyse de l'IL-4 et IL-13, des récepteurs TLR ainsi que IL-10 respectivement, dans les lavages pulmonaires et les tissus de la moelle. Un phénotype prédominant dans un rat au poumon sain ou dans ses tissus médullaire permettrait de définir ou non quel est le type spécifique d'environnement anti-inflammatoire.
3. Examiner le lien entre les mécanismes de la réponse immunitaire impliqués dans le changement phénotypique des macrophages et le stress oxydatif. Le domaine des réponses oxydatives étant vaste, des essais simples avec la mesure de potentiel antioxydant comme par exemple la super-oxydase dismutase (SOD), pourraient être effectués en lien avec le phénotype des macrophages et l'IL-10. La mesure de ces paramètres permettrait d'observer si la lésion médullaire peut balancer l'activité antioxydante et donnerait une bonne image du stress oxydatif.
4. Évaluer à des temps différents, les quantités des cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages alvéolaires), la sécrétion des cytokines ainsi que les réponses oxydatives dans le sang des patients (sains ventilés mécaniquement, blessés médullaires ventilés, sains non ventilés et non ventilés blessés médullaires). Des analyses histologiques des poumons pourront être effectuées en mesurant dans les lavages broncho-alvéolaires de ces patients, la quantité de neutrophiles et de macrophages. De plus, les mesures de la phosphatase alcaline et le LDH permettraient d'évaluer d'éventuels dommages pulmonaires dans les LBA. Cela permettrait de comprendre le lien entre les réponses inflammatoires pulmonaires et médullaires, notamment si la réponse inflammatoire a bel et bien transitée par la circulation sanguine.
5. Mettre en lumière les modes de ventilation mécanique capables de protéger les poumons, organes vitaux ou autres tissus à distance et de réduire l'inflammation induite par le support respiratoire tout en permettant à l'environnement homéostatique de rester

optimal. Les nouveaux concepts de technologies depuis l'an 2000 a pour but de répondre aux besoins du patient, telle que la mise au point de nouvelles thérapies qui adaptent mieux la ventilation artificielle à la physiologie des muscles respiratoires. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer l'impact de la ventilation mécanique avec intelligence artificielle basée sur l'électromyogramme du diaphragme, appelée NAVA (Neurally Adjusted Ventilatory Assist) sur la réponse inflammatoire pulmonaire et médullaire. En effet, cette ventilation artificielle se base sur le début de chaque effort du patient pour déclencher l'aide respiratoire qui lui sera délivrée. Étant donné que la VM conventionnelle contribue à la réponse inflammatoire pouvant conduire à une altération du poumon, il serait intéressant de déterminer si l'optimisation du NAVA est possible à différents niveaux de lésion. Dès lors, l'objectif serait de comparer l'effet du NAVA à la VM conventionnelle sur l'inflammation pulmonaire, systémique et médullaire. Les cellules immunitaires (neutrophiles et macrophages), les différents marqueurs inflammatoires (IL-6, TNF, IL-1 β et IL-10) et le profil des macrophages alvéolaires seraient alors déterminés dans les lavages pulmonaires, les échantillons sanguins ainsi que les échantillons de tissus de moelle épinière.

Chapitre 7. Conclusions

Ce projet est le premier à notre connaissance à montrer que la VM peut agir sur les réponses inflammatoires au niveau pulmonaire, avec un phénotype prédominant M1 par rapport à M2 chez des animaux sains, mais aussi à distance sur les tissus de la moelle épinière, en présence ou en l'absence d'un traumatisme médullaire. D'une part elle induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de type M1, de manière significativement différente que celle des animaux non-ventilés et augmente les taux de MIP-1 α , un marqueur spécifique du profil M1. D'autre part, elle est capable d'inverser la polarisation des cellules immunitaires en modulant les réponses au stress oxydatif tels que de hauts niveaux d'isoprostane et bas niveaux d'HO-1. Ainsi, la surexpression de certaines cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1 β , semble être directement liée aux bas niveaux de l'expression enzymatique HO-1 et de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, diminuant alors fortement leur rôle protecteur chez les animaux ventilés.

Notre modèle expérimental a également révélé un nouveau concept quant au rôle que peut exercer la blessure médullaire sur les réponses à la fois immunitaires et oxydatives. En tentant de rétablir des conditions normales dans les poumons, elle joue un rôle de « promoteur » dans la défense pulmonaire. En effet, la lésion thoracique est capable d'inhiber les taux de 8-isoprostane et d'augmenter les niveaux de HO-1 comparés aux animaux NV-NL. Nos résultats ont montré que les lésions cervicale et thoracique

Conclusions

établisent un état antioxydant dans les poumons d'animaux ventilés en diminuant les réponses oxydatives. Par ailleurs, nos données ont révélé que la lésion cervicale, tout comme la lésion thoracique, déclenchait la production d'HO-1 chez les animaux ventilés suggérant fortement que le traumatisme médullaire est plus enclin à un phénotype M2 qu'un phénotype M1.

Ce nouveau concept est supporté par notre modèle qui a révélé que la blessure médullaire a réduit les taux d'IL-1 β chez les animaux NV-NL et MV-NL alors qu'elle a augmenté ceux d'HO-1. Dès lors, l'expression de HO-1 inverse les effets de l'IL-1 β , procurant ainsi à l'organisme un mécanisme de défense important contre les réponses au stress oxydatif.

La VM, selon son mode de ventilation, semble susceptible d'entraîner une réponse inflammatoire sur les organes à distance et notre second travail a consisté à démontrer pour la première fois qu'il existait un lien manifeste entre la VM et les réponses inflammatoires locales des tissus de la moelle épinière, que celle-ci soit lésée ou non. Nos données ont montré que la VM a augmenté de façon très significative le TNF- α et diminué l'IL-1 β dans les tissus médullaires. La VM semble donc être capable d'effet invasif non seulement sur les organes vitaux mais aussi sur les tissus d'une moelle épinière saine. Il s'agit alors de mettre l'accent sur la limitation de ses effets puisque l'enjeu ne sera pas le même dans un contexte de traumatisme médullaire. De plus, malgré que la VM n'ait pas eu d'effet significatif sur l'inhibition de l'IL-10 dans notre modèle, nos données se rapprochent du seuil significatif ($p=0.08$). D'autres investigations doivent être menées pour vérifier si elle est capable d'inhiber significativement le pouvoir bénéfique et anti-inflammatoire de l'IL-10, dans les tissus de la moelle.

Finalement, notre projet a permis de répondre aux questions que nous nous posions au préalable, à savoir qu'elle était l'interaction entre le support respiratoire et le traumatisme médullaire sur l'inflammation au niveau pulmonaire et médullaire, si interaction il y avait. Ainsi, le traitement par VM est non seulement susceptible d'amplifier le bio traumatisme

dans le poumon mais peut aussi augmenter la sévérité de l'insulte à la moelle épinière. Nos résultats ont des implications cliniques car ils suggèrent fortement que le traitement efficace des patients ventilés souffrant d'une lésion médullaire, indépendamment de sa gravité, pourrait dépendre de la promotion d'un phénotype M2 par rapport à M1 au niveau du poumon. Une étude plus approfondie sur la polarisation des macrophages ainsi que les facteurs en lien avec les réponses inflammatoires, chez les patients ventilés mécaniquement, avec et sans blessure médullaire, serait donc intéressante pour adapter la réponse immunitaire à une approche thérapeutique éventuelle. L'application en clinique d'une VM à caractère protecteur pourrait alors constituer une stratégie de traitement. Combinée à un traitement neuroprotecteur pharmacologique, elle pourrait éventuellement préserver les poumons, les organes vitaux à distance ainsi que la moelle, de l'inflammation pulmonaire, systémique ou locale. Cette stratégie thérapeutique serait donc disposée à améliorer considérablement la qualité de vie d'une personne souffrant d'un traumatisme médullaire ou celle d'un patient souffrant d'insuffisance respiratoire qui a recours au support respiratoire. En définitive, ça serait éventuellement la combinaison de plusieurs traitements qui pourrait offrir des résultats en matière de récupération fonctionnelle suite à un traumatisme médullaire.

Chapitre 8. Bibliographie

- A William Sheel, W. D. R., Andrea Townson, Najib Ayas (2006). "Respiratory Management following Spinal Cord injury " Spinal Cord Injury Rehabilitation Evidence **8**: 1-27.
- Agrawal, S. K. and M. G. Fehlings (1996). "Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na⁺, Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase, the Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger, and the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger." J Neurosci **16**(2): 545-552.
- Albaiceta, G. M. and L. Blanch (2011). "Beyond volutrauma in ARDS: the critical role of lung tissue deformation." Crit Care **15**(2): 304.
- Altemeier, W. A., G. Matute-Bello, et al. (2004). "Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **287**(3): L533-542.
- Ammon, C., S. P. Meyer, et al. (2000). "Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells." Immunology **100**(3): 364-369.
- An, L., C. T. Liu, et al. (2011). "Protective effects of hemin in an experimental model of ventilator-induced lung injury." Eur J Pharmacol **661**(1-3): 102-108.
- Antoine Micheau MD, D. H. (2009). "Schémas anatomiques du rachis et du dos. Anatomie du rachis et de la moelle épinière. ." E-anatomy - Imaios. Cap Omega - CS 39521. MONTPELLIER CEDEX 2.
- Armstrong, L. and A. B. Millar (1997). "Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome." Thorax **52**(5): 442-446.
- Baeza, A. and F. Marano (2007). "[Air pollution and respiratory diseases: a central role for oxidative stress]." Med Sci (Paris) **23**(5): 497-501.

- Bailey, T. C., E. L. Martin, et al. (2003). "High oxygen concentrations predispose mouse lungs to the deleterious effects of high stretch ventilation." J Appl Physiol **94**(3): 975-982.
- Bailey, T. C., A. A. Maruscak, et al. (2008). "The effects of long-term conventional mechanical ventilation on the lungs of adult rats." Crit Care Med **36**(8): 2381-2387.
- Bang BR, C. E., Shim EJ, Lee HS, Lee SY, Cho SH, Min KU, Kim YY, Park HW. (2011). "Alveolar macrophages modulate allergic inflammation in a murine model of asthma." Experimental and Molecular Medicine **31**: 275-280.
- Bao, F., C. S. Bailey, et al. (2009). "Increased oxidative activity in human blood neutrophils and monocytes after spinal cord injury." Exp Neurol **215**(2): 308-316.
- Bao, F. and D. Liu (2004). "Hydroxyl radicals generated in the rat spinal cord at the level produced by impact injury induce cell death by necrosis and apoptosis: protection by a metalloporphyrin." Neuroscience **126**(2): 285-295.
- Baptiste, D. C. and M. G. Fehlings (2006). "Pharmacological approaches to repair the injured spinal cord." J Neurotrauma **23**(3-4): 318-334.
- Barbara, J. A., X. Van ostade, et al. (1996). "Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha): the good, the bad and potentially very effective." Immunol Cell Biol **74**(5): 434-443.
- Barrat, F. J., D. J. Cua, et al. (2002). "In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines." J Exp Med **195**(5): 603-616.
- Basu, S. (2007). "The enigma of in vivo oxidative stress assessment: isoprostanes as an emerging target." Scandinavian Journal of Food and Nutrition **51**(2): 48-61.
- Basu, S., M. Whiteman, et al. (2001). "Raised levels of F(2)-isoprostanes and prostaglandin F(2alpha) in different rheumatic diseases." Ann Rheum Dis **60**(6): 627-631.
- Beck, K. D., H. X. Nguyen, et al. (2010). "Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment." Brain **133**(Pt 2): 433-447.
- Belperio, J. A., M. P. Keane, et al. (2002). "Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury." J Clin Invest **110**(11): 1703-1716.
- Benoit, M., B. Desnues, et al. (2008). "Macrophage polarization in bacterial infections." J Immunol **181**(6): 3733-3739.
- Bethea, J. R. (2000). "Spinal cord injury-induced inflammation: a dual-edged sword." Prog Brain Res **128**: 33-42.
- Bielski BHJ, C. D. (1995). "Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. In : Active oxygen in chemistry." Foote CS, Valentine JS, Greenberg A, Liebman JL, eds, Blackie Academic & Professional, London, New York: 66-104.
- Bing HAN, M. L. (2002). "Cytokines and ventilator-induced acute lung injury." Acta Pharmacologica Sinica **23**: 39-43.
- Biswas, S. K. and A. Mantovani (2010). "Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm." Nat Immunol **11**(10): 889-896.

- Biswas, S. K., A. Sica, et al. (2008). "Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms." J Immunol **180**(4): 2011-2017.
- Bogdan, C., Y. Vodovotz, et al. (1991). "Macrophage deactivation by interleukin 10." J Exp Med **174**(6): 1549-1555.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brancato, S. K. and J. E. Albina (2011). "Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function." Am J Pathol **178**(1): 19-25.
- Brown, R., A. F. DiMarco, et al. (2006). "Respiratory dysfunction and management in spinal cord injury." Respir Care **51**(8): 853-868;discussion 869-870.
- Bueno, P. C., C. E. Bueno, et al. (2002). "Ventilation with high tidal volume induces inflammatory lung injury." Braz J Med Biol Res **35**(2): 191-198.
- Caironi, P., T. Langer, et al. (2011). "Time to generate ventilator-induced lung injury among mammals with healthy lungs: a unifying hypothesis." Intensive Care Med **37**(12): 1913-1920.
- Campagnolo, D. I., J. A. Bartlett, et al. (2000). "Influence of neurological level on immune function following spinal cord injury: a review." J Spinal Cord Med **23**(2): 121-128.
- Campagnolo, D. I., J. A. Bartlett, et al. (1997). "Impaired phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in complete tetraplegics." Am J Phys Med Rehabil **76**(4): 276-280.
- Campagnolo, D. I., S. E. Keller, et al. (1994). "Alteration of immune system function in tetraplegics. A pilot study." Am J Phys Med Rehabil **73**(6): 387-393.
- Carpenter, C. T., P. V. Price, et al. (1998). "Exhaled breath condensate isoprostanes are elevated in patients with acute lung injury or ARDS." Chest **114**(6): 1653-1659.
- Catania, A., C. Lonati, et al. (2009). "Detrimental consequences of brain injury on peripheral cells." Brain Behav Immun **23**(7): 877-884.
- Chakravorty, D., Y. Kato, et al. (2001). "The inhibitory action of sodium arsenite on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 267.4 macrophage cells: a role of Raf-1 in lipopolysaccharide signaling." J Immunol **166**(3): 2011-2017.
- Chan, E. D. and D. W. Riches (2001). "IFN-gamma + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38(mapk) in a mouse macrophage cell line." Am J Physiol Cell Physiol **280**(3): C441-450.
- Chang, J. E., S. H. Park, et al. (2013). "Successful weaning from mechanical ventilation in the quadriplegia patient with C2 spinal cord injury undergoing C2-4 spine laminoplasty -A case report." Korean J Anesthesiol **64**(6): 545-549.
- Charles A. Janeway, P., Mark Walport, Mark Shlomchik (2003). "Immunobiologie." De Boek Supérieur: 40-42.
- CHATENOUD. (2002). "Immunologie : de la biologie à la clinique. ." Médecine/science. Flammarion, Paris: 140-144.

- Chen, W., W. Jin, et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med **198**(12): 1875-1886.
- Chiumello, D., G. Pristine, et al. (1999). "Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome." Am J Respir Crit Care Med **160**(1): 109-116.
- Chung, F. T., H. C. Lin, et al. (2010). "Extravascular lung water correlates multiorgan dysfunction syndrome and mortality in sepsis." PLoS One **5**(12): e15265.
- Chung, S. W., S. R. Hall, et al. (2009). "Role of haem oxygenase-1 in microbial host defence." Cell Microbiol **11**(2): 199-207.
- Claude Gillot, R. P., Albert Policard. (2014). "L'appareil respiratoire- Anatomie." Encyclopædia Universalis France **Chapitre 3- L'épithélium des voies respiratoires.**
- Cockcroft, D. W. and B. E. Davis (2006). "Mechanisms of airway hyperresponsiveness." J Allergy Clin Immunol **118**(3): 551-559; quiz 560-551.
- Coondoo, A. (2012). "The role of cytokines in the pathomechanism of cutaneous disorders." Indian J Dermatol **57**(2): 90-96.
- Copland, I. B., B. P. Kavanagh, et al. (2003). "Early changes in lung gene expression due to high tidal volume." Am J Respir Crit Care Med **168**(9): 1051-1059.
- Cracowski, J. L., C. Cracowski, et al. (2001). "Increased lipid peroxidation in patients with pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **164**(6): 1038-1042.
- Cros, J., N. Cagnard, et al. (2010). "Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors." Immunity **33**(3): 375-386.
- Cruse, J. M., R. E. Lewis, et al. (2000). "Review of immune function, healing of pressure ulcers, and nutritional status in patients with spinal cord injury." J Spinal Cord Med **23**(2): 129-135.
- Davi, G., F. Chiarelli, et al. (2003). "Enhanced lipid peroxidation and platelet activation in the early phase of type 1 diabetes mellitus: role of interleukin-6 and disease duration." Circulation **107**(25): 3199-3203.
- De Troyer, A. and M. Estenne (1991). "The expiratory muscles in tetraplegia." Paraplegia **29**(6): 359-363.
- De Troyer, A., M. Estenne, et al. (1986). "Rib cage motion and muscle use in high tetraplegics." Am Rev Respir Dis **133**(6): 1115-1119.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, et al. (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." J Exp Med **174**(5): 1209-1220.
- Decker, T., S. Stockinger, et al. (2002). "IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms." J Clin Invest **109**(10): 1271-1277.
- Degos, V., N. Teissier, et al. (2008). "[Inflammation and acute brain injuries in intensive care]." Ann Fr Anesth Reanim **27**(12): 1008-1015.

- Dery, M. A., G. Rousseau, et al. (2009). "Atorvastatin prevents early apoptosis after thoracic spinal cord contusion injury and promotes locomotion recovery." Neurosci Lett **453**(1): 73-76.
- Determann, R. M., A. Royakkers, et al. (2010). "Ventilation with lower tidal volumes as compared with conventional tidal volumes for patients without acute lung injury: a preventive randomized controlled trial." Crit Care **14**(1): R1.
- DeVivo, M. J., J. S. Krause, et al. (1999). "Recent trends in mortality and causes of death among persons with spinal cord injury." Arch Phys Med Rehabil **80**(11): 1411-1419.
- Dinarello, C. A. (2002). "The IL-1 family and inflammatory diseases." Clin Exp Rheumatol **20**(5 Suppl 27): S1-13.
- Ditunno, J. F., Jr., W. Young, et al. (1994). "The international standards booklet for neurological and functional classification of spinal cord injury. American Spinal Injury Association." Paraplegia **32**(2): 70-80.
- Dong, W. J. a. C. (2013). "IL-17 cytokines in immunity and inflammation. ." Emerging Microbes and Infections **2**(e60; doi:10.1038/emi.2013.58).
- Dong, Y., M. Aronsson, et al. (1989). "The mechanism of cAMP-induced glucocorticoid receptor expression. Correlation to cellular glucocorticoid response." J Biol Chem **264**(23): 13679-13683.
- Donnelly, D. J. and P. G. Popovich (2008). "Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury." Exp Neurol **209**(2): 378-388.
- Donnelly, S. C., R. M. Strieter, et al. (1996). "The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome." Ann Intern Med **125**(3): 191-196.
- Dos Santos, C. C. and A. S. Slutsky (2000). "Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective." J Appl Physiol **89**(4): 1645-1655.
- dos Santos, C. C. and A. S. Slutsky (2000). "Mechanotransduction, ventilator-induced lung injury and multiple organ dysfunction syndrome." Intensive Care Med **26**(5): 638-642.
- Draijer, C., P. Robbe, et al. (2013). "Characterization of macrophage phenotypes in three murine models of house-dust-mite-induced asthma." Mediators Inflamm **2013**: 632049.
- Dreyfuss, D. and J. J. Rouby (2004). "Mechanical ventilation-induced lung release of cytokines: a key for the future or pandora's box?" Anesthesiology **101**(1): 1-3.
- Dreyfuss, D. and G. Saumon (1998). "Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies." Am J Respir Crit Care Med **157**(1): 294-323.
- Dumont, R. J., D. O. Okonkwo, et al. (2001). "Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms." Clin Neuropharmacol **24**(5): 254-264.
- Epps, H. L. V. (2005). "Macrophage activation unveiled." JEM © The Rockefeller University Press **202**(No. 7): 884.

- Eskandari, F., J. I. Webster, et al. (2003). "Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases." Arthritis Res Ther **5**(6): 251-265.
- Estenne, M. and A. De Troyer (1985). "Relationship between respiratory muscle electromyogram and rib cage motion in tetraplegia." Am Rev Respir Dis **132**(1): 53-59.
- Evans, J. G., I. Correia, et al. (2003). "Macrophage podosomes assemble at the leading lamella by growth and fragmentation." J Cell Biol **161**(4): 697-705.
- Ezekowitz, R. A., K. Sastry, et al. (1990). "Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells." J Exp Med **172**(6): 1785-1794.
- Faulkner, J. R., J. E. Herrmann, et al. (2004). "Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury." J Neurosci **24**(9): 2143-2155.
- Fink, J. B. and R. Dhand (2000). "Aerosol therapy in mechanically ventilated patients: recent advances and new techniques." Semin Respir Crit Care Med **21**(3): 183-201.
- Fleming, J. C., M. D. Norenberg, et al. (2006). "The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury." Brain **129**(Pt 12): 3249-3269.
- Foster, J. R. (2001). "The functions of cytokines and their uses in toxicology." Int J Exp Pathol **82**(3): 171-192.
- Franck, H., Netter (1990). "Anatomie de la moelle spinale." Maloine **2**: 142-153.
- Fritsch-Decker, S., T. Both, et al. (2011). "Regulation of the arachidonic acid mobilization in macrophages by combustion-derived particles." Part Fibre Toxicol **8**: 23.
- Furlan, A. J. (2006). "Time is brain." Stroke **37**(12): 2863-2864.
- Furlan, J. C. and M. G. Fehlings (2008). "Cardiovascular complications after acute spinal cord injury: pathophysiology, diagnosis, and management." Neurosurg Focus **25**(5): E13.
- Gal, P., P. Kravcukova, et al. (2009). "Chemokines as possible targets in modulation of the secondary damage after acute spinal cord injury: a review." Cell Mol Neurobiol **29**(6-7): 1025-1035.
- Garcia Leoni, M. E. a. R. A. E. D. (2003). "Management of urinary tract infection in patients with spinal cord injuries." Clinical Microbiology and Infection **9**: 780-785
- Garlanda, C., C. A. Dinarello, et al. (2013). "The interleukin-1 family: back to the future." Immunity **39**(6): 1003-1018.
- Garraud, O., G. Borhis, et al. (2012). "Revisiting the B-cell compartment in mouse and humans: more than one B-cell subset exists in the marginal zone and beyond." BMC Immunol **13**: 63.
- Geissmann, F., S. Gordon, et al. (2010). "Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity." Nat Rev Immunol **10**(6): 453-460.
- Giger, R. J., E. R. Hollis, 2nd, et al. (2010). "Guidance molecules in axon regeneration." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(7): a001867.
- Giulian, D., B. Johnson, et al. (1991). "A growth factor from neuronal cell lines stimulates myelin protein synthesis in mammalian brain." J Neurosci **11**(2): 327-336.

- Goerdt, S. and C. E. Orfanos (1999). "Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells." *Immunity* **10**(2): 137-142.
- Goerdt, S., O. Politz, et al. (1999). "Alternative versus classical activation of macrophages." *Pathobiology* **67**(5-6): 222-226.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." *Nat Rev Immunol* **3**(1): 23-35.
- Gordon, S. (2007). "The macrophage: past, present and future." *Eur J Immunol* **37** **Suppl 1**: S9-17.
- Gordon, S. and F. O. Martinez (2010). "Alternative activation of macrophages: mechanism and functions." *Immunity* **32**(5): 593-604.
- Greenfield, L. J., P. A. Ebert, et al. (1964). "Effect of Positive Pressure Ventilation on Surface Tension Properties of Lung Extracts." *Anesthesiology* **25**: 312-316.
- Grembowicz, K. P., D. Sprague, et al. (1999). "Temporary disruption of the plasma membrane is required for c-fos expression in response to mechanical stress." *Mol Biol Cell* **10**(4): 1247-1257.
- Griffin, F. M., Jr., J. A. Griffin, et al. (1975). "Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane." *J Exp Med* **142**(5): 1263-1282.
- Grigorean, V. T., A. M. Sandu, et al. (2009). "Cardiac dysfunctions following spinal cord injury." *J Med Life* **2**(2): 133-145.
- Grimm, D. R., E. Arias, et al. (1999). "Airway hyperresponsiveness to ultrasonically nebulized distilled water in subjects with tetraplegia." *J Appl Physiol* (1985) **86**(4): 1165-1169.
- Gris, D., E. F. Hamilton, et al. (2008). "The systemic inflammatory response after spinal cord injury damages lungs and kidneys." *Exp Neurol* **211**(1): 259-270.
- Guerrero, A. R., K. Uchida, et al. (2012). "Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice." *J Neuroinflammation* **9**: 40.
- Guha, A., C. H. Tator, et al. (1989). "Spinal cord blood flow and systemic blood pressure after experimental spinal cord injury in rats." *Stroke* **20**(3): 372-377.
- Gurkan, O. U., C. O'Donnell, et al. (2003). "Differential effects of mechanical ventilatory strategy on lung injury and systemic organ inflammation in mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**(3): L710-718.
- Haas, F., K. Axen, et al. (1985). "Temporal pulmonary function changes in cervical cord injury." *Arch Phys Med Rehabil* **66**(3): 139-144.
- Haitsma, J. J., S. Uhlig, et al. (2000). "Ventilator-induced lung injury leads to loss of alveolar and systemic compartmentalization of tumor necrosis factor-alpha." *Intensive Care Med* **26**(10): 1515-1522.
- Halbertsma, F. J., M. Vaneker, et al. (2005). "Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature." *Neth J Med* **63**(10): 382-392.
- Hansson, E. and L. Ronnback (2003). "Glial neuronal signaling in the central nervous system." *FASEB J* **17**(3): 341-348.

- Haour, F., C. Marquette, et al. (1995). "[Interleukin-1 receptors in the central nervous system: role in infection and in stress]." *J Psychiatry Neurosci* **20**(5): 357-363.
- Hausmann, O. N. (2003). "Post-traumatic inflammation following spinal cord injury." *Spinal Cord* **41**(7): 369-378.
- Hegeman, M. A., S. N. Hemmes, et al. (2013). "The extent of ventilator-induced lung injury in mice partly depends on duration of mechanical ventilation." *Crit Care Res Pract* **2013**: 435236.
- Heinrich, P. C., J. V. Castell, et al. (1990). "Interleukin-6 and the acute phase response." *Biochem J* **265**(3): 621-636.
- Held, H. D., S. Boettcher, et al. (2001). "Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids." *Am J Respir Crit Care Med* **163**(3 Pt 1): 711-716.
- Hirokazu Saiwai, Y. O., Hisakata Yamada, Hiromi Kumamaru, Akihito Harada, Hideyuki Okano, Takehiko Yokomizo, Yukihide Iwamoto, and Seiji Okada (2010). "The LTB4-BLT1 Axis Mediates Neutrophil Infiltration and Secondary Injury in Experimental Spinal Cord Injury." *The American Journal of Pathology* **176**, No. 5: 2352-2366.
- Hodge, S., G. Hodge, et al. (1999). "Methyl-prednisolone up-regulates monocyte interleukin-10 production in stimulated whole blood." *Scand J Immunol* **49**(5): 548-553.
- Hoegl, S., K. A. Boost, et al. (2009). "Inhaled IL-10 reduces biotrauma and mortality in a model of ventilator-induced lung injury." *Respir Med* **103**(3): 463-470.
- Hoegl, S., K. A. Boost, et al. (2008). "Short-term exposure to high-pressure ventilation leads to pulmonary biotrauma and systemic inflammation in the rat." *Int J Mol Med* **21**(4): 513-519.
- Hofstetter, C., M. Flondor, et al. (2005). "Interleukin-10 aerosol reduces proinflammatory mediators in bronchoalveolar fluid of endotoxemic rat." *Crit Care Med* **33**(10): 2317-2322.
- Hogg, J. C. (1994). "Felix Fleischner Lecture. The traffic of polymorphonuclear leukocytes through pulmonary microvessels in health and disease." *AJR Am J Roentgenol* **163**(4): 769-775.
- Honda, S., Y. Sasaki, et al. (2001). "Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors." *J Neurosci* **21**(6): 1975-1982.
- Hong, C. M., D. Z. Xu, et al. (2012). "Systemic inflammatory response does not correlate with acute lung injury associated with mechanical ventilation strategies in normal lungs." *Anesth Analg* **115**(1): 118-121.
- Horn, K. P., S. A. Busch, et al. (2008). "Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions." *J Neurosci* **28**(38): 9330-9341.

- Imanaka, H., M. Shimaoka, et al. (2001). "Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF-beta 1 mRNA upregulation in rat lungs." Anesth Analg **92**(2): 428-436.
- Imlay, J. A. (2008). "Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide." Annu Rev Biochem **77**: 755-776.
- Imrich, A., Y. Ning, et al. (2007). "Alveolar macrophage cytokine response to air pollution particles: oxidant mechanisms." Toxicol Appl Pharmacol **218**(3): 256-264.
- Jaber, S., M. Sebbane, et al. (2005). "Effects of short vs. prolonged mechanical ventilation on antioxidant systems in piglet diaphragm." Intensive Care Med **31**(10): 1427-1433.
- Jandrot-Perrus, M., S. Busfield, et al. (2000). "Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily." Blood **96**(5): 1798-1807.
- Jansen, T. and A. Daiber (2012). "Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase?" Front Pharmacol **3**: 30.
- Janssen, L. J. and T. Tazzeo (2002). "Involvement of TP and EP3 receptors in vasoconstrictor responses to isoprostanes in pulmonary vasculature." J Pharmacol Exp Ther **301**(3): 1060-1066.
- Jean-Bernard Michotte, L. V., Anne Battisti, Thierry Sottiaux, Caroline Dresse, Jean Roeseler (2009). "Les bases de la ventilation mécanique." Kinésithérapie Respiratoire **2**: 305-314.
- John, M., S. Lim, et al. (1998). "Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma." Am J Respir Crit Care Med **157**(1): 256-262.
- Jones, T. B., R. P. Hart, et al. (2005). "Molecular control of physiological and pathological T-cell recruitment after mouse spinal cord injury." J Neurosci **25**(28): 6576-6583.
- Kakinohana, M., K. Kida, et al. (2011). "Delayed paraplegia after spinal cord ischemic injury requires caspase-3 activation in mice." Stroke **42**(8): 2302-2307.
- Kalina, M., D. Levi, et al. (1990). "Modulation of alkaline phosphatase activity in alveolar type II like cells." Histochemistry **95**(1): 97-103.
- Kaminska, M., S. Foley, et al. (2009). "Airway remodeling in subjects with severe asthma with or without chronic persistent airflow obstruction." J Allergy Clin Immunol **124**(1): 45-51 e41-44.
- Kang, J. and S. Pervaiz (2012). "Mitochondria: redox metabolism and dysfunction." Biochem Res Int **2012**: 896751.
- Kariagina, A., D. Romanenko, et al. (2004). "Hypothalamic-pituitary cytokine network." Endocrinology **145**(1): 104-112.
- Kaushansky, K. (2006). "Hematopoietic growth factors, signaling and the chronic myeloproliferative disorders." Cytokine Growth Factor Rev **17**(6): 423-430.
- Kelly, F. J. (2003). "Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects." Occup Environ Med **60**(8): 612-616.

- Kernie, S. G., T. M. Erwin, et al. (2001). "Brain remodeling due to neuronal and astrocytic proliferation after controlled cortical injury in mice." J Neurosci Res **66**(3): 317-326.
- Khan, W. I., M. Richard, et al. (2003). "Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections." Infect Immun **71**(5): 2430-2438.
- Kigerl, K. A., J. C. Gensel, et al. (2009). "Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord." J Neurosci **29**(43): 13435-13444.
- Kigerl, K. A., V. M. McGaughy, et al. (2006). "Comparative analysis of lesion development and intraspinal inflammation in four strains of mice following spinal contusion injury." J Comp Neurol **494**(4): 578-594.
- Klehmet, J., H. Harms, et al. (2009). "Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial." Neuroscience **158**(3): 1184-1193.
- Kleinert, H., T. Wallerath, et al. (1998). "Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways." Br J Pharmacol **125**(1): 193-201.
- Kleinman, L. I. and E. P. Radford, Jr. (1964). "Ventilation Standards for Small Mammals." J Appl Physiol **19**: 360-362.
- Knoller, N., G. Auerbach, et al. (2005). "Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: phase I study results." J Neurosurg Spine **3**(3): 173-181.
- Koch, N., M. Jung, et al. (2009). "IL-10 protects monocytes and macrophages from complement-mediated lysis." J Leukoc Biol **86**(1): 155-166.
- Kolackova, M., M. Kudlova, et al. (2008). "Early expression of FcgammaRI (CD64) on monocytes of cardiac surgical patients and higher density of monocyte anti-inflammatory scavenger CD163 receptor in "on-pump" patients." Mediators Inflamm **2008**: 235461.
- Koopman, F. A., S. P. Stoof, et al. (2011). "Restoring the balance of the autonomic nervous system as an innovative approach to the treatment of rheumatoid arthritis." Mol Med **17**(9-10): 937-948.
- Krause, J. S. and J. L. Coker (2006). "Aging after spinal cord injury: A 30-year longitudinal study." J Spinal Cord Med **29**(4): 371-376.
- Kwon, B. K., W. Tetzlaff, et al. (2004). "Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury." Spine J **4**(4): 451-464.
- Kwon, O. J., B. T. Au, et al. (1994). "Inhibition of interleukin-8 expression by dexamethasone in human cultured airway epithelial cells." Immunology **81**(3): 389-394.
- Labrousse, A. M., E. Meunier, et al. (2011). "Frustrated phagocytosis on micro-patterned immune complexes to characterize lysosome movements in live macrophages." Front Immunol **2**: 51.

- Lacy, P. and J. L. Stow (2011). "Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways." *Blood* **118**(1): 9-18.
- Lee, T. S. and L. Y. Chau (2002). "Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice." *Nat Med* **8**(3): 240-246.
- Leon, L. R. and B. G. Helwig (2010). "Heat stroke: role of the systemic inflammatory response." *J Appl Physiol* **109**(6): 1980-1988.
- Levine, S., T. Nguyen, et al. (2008). "Rapid disuse atrophy of diaphragm fibers in mechanically ventilated humans." *N Engl J Med* **358**(13): 1327-1335.
- Li, L. F., L. Yu, et al. (2004). "Ventilation-induced neutrophil infiltration depends on c-Jun N-terminal kinase." *Am J Respir Crit Care Med* **169**(4): 518-524.
- Li, N., T. Xia, et al. (2008). "The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles." *Free Radic Biol Med* **44**(9): 1689-1699.
- Lim, L. H. and E. M. Wagner (2003). "Airway distension promotes leukocyte recruitment in rat tracheal circulation." *Am J Respir Crit Care Med* **168**(9): 1068-1074.
- Lin, H. H., G. L. Zhang, et al. (2008). "Evaluation of MHC-II peptide binding prediction servers: applications for vaccine research." *BMC Bioinformatics* **9 Suppl 12**: S22.
- Linn, W. S., R. H. Adkins, et al. (2000). "Pulmonary function in chronic spinal cord injury: a cross-sectional survey of 222 southern California adult outpatients." *Arch Phys Med Rehabil* **81**(6): 757-763.
- Linn, W. S., A. M. Spungen, et al. (2001). "Forced vital capacity in two large outpatient populations with chronic spinal cord injury." *Spinal Cord* **39**(5): 263-268.
- Lipton, P. (1999). "Ischemic cell death in brain neurons." *Physiol Rev* **79**(4): 1431-1568.
- Liu, Y., J. M. Cousin, et al. (1999). "Glucocorticoids promote nonphagocytic phagocytosis of apoptotic leukocytes." *J Immunol* **162**(6): 3639-3646.
- Loane, D. J. and K. R. Byrnes (2010). "Role of microglia in neurotrauma." *Neurotherapeutics* **7**(4): 366-377.
- Lowenstein, C. J., E. W. Alley, et al. (1993). "Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20): 9730-9734.
- Lucin, K. M., V. M. Sanders, et al. (2007). "Impaired antibody synthesis after spinal cord injury is level dependent and is due to sympathetic nervous system dysregulation." *Exp Neurol* **207**(1): 75-84.
- Maccagno, A. L. (1965). "La kinésiologie respiratoire." *Masson et Cie Éditeurs. Académie de Médecine*: 61-63.
- Maghni, K., R. Taha, et al. (2000). "Dichotomy between neurokinin receptor actions in modulating allergic airway responses in an animal model of helper T cell type 2 cytokine-associated inflammation." *Am J Respir Crit Care Med* **162**(3 Pt 1): 1068-1074.
- Mahalingam, S. and G. Karupiah (1999). "Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases." *Immunol Cell Biol* **77**(6): 469-475.

- Mantovani, A. (2006). "Macrophage diversity and polarization: In vivo veritas." Journal of the American Society of Hematology **108**: 408-409.
- Mantovani, A., A. Sica, et al. (2007). "New vistas on macrophage differentiation and activation." Eur J Immunol **37**(1): 14-16.
- Mantovani, A., A. Sica, et al. (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-686.
- Martinez-Kinader, B., G. B. Lipford, et al. (1995). "Sensitization of MHC class I-restricted T cells to exogenous proteins: evidence for an alternative class I-restricted antigen presentation pathway." Immunology **86**(2): 287-295.
- Martinez, F. O. (2011). "Regulators of macrophage activation." Eur J Immunol **41**(6): 1531-1534.
- Martinez, F. O., L. Helming, et al. (2009). "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective." Annu Rev Immunol **27**: 451-483.
- Martinez, F. O., A. Sica, et al. (2008). "Macrophage activation and polarization." Front Biosci **13**: 453-461.
- Masanori Yoneyama , T. S., Shigeru Hasebe, and Kiyokazu Ogita (2011). "Adult Neurogenesis Is Regulated by Endogenous Factors Produced During Neurodegeneration." J Pharmacol Sci **115**: 425 – 432
- Maxeiner, J. H., R. Karwot, et al. (2007). "A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators." Nat Protoc **2**(1): 105-112.
- McTigue, D. M. and F. R. Sahinkaya (2011). "The fate of proliferating cells in the injured adult spinal cord." Stem Cell Res Ther **2**(1): 7.
- Meduri, G. U., G. Kohler, et al. (1995). "Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome." Chest **108**(5): 1303-1314.
- Meduri, G. U., E. A. Tolley, et al. (2002). "Prolonged methylprednisolone treatment suppresses systemic inflammation in patients with unresolving acute respiratory distress syndrome: evidence for inadequate endogenous glucocorticoid secretion and inflammation-induced immune cell resistance to glucocorticoids." Am J Respir Crit Care Med **165**(7): 983-991.
- Mege, J. L., S. Meghari, et al. (2006). "The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases." Lancet Infect Dis **6**(9): 557-569.
- Mege, J. L., V. Mehraj, et al. (2011). "Macrophage polarization and bacterial infections." Curr Opin Infect Dis **24**(3): 230-234.
- Meier, T., A. Lange, et al. (2008). "Pulmonary cytokine responses during mechanical ventilation of noninjured lungs with and without end-expiratory pressure." Anesth Analg **107**(4): 1265-1275.
- Meisel, C., J. M. Schwab, et al. (2005). "Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome." Nat Rev Neurosci **6**(10): 775-786.
- Min, B., M. Prout, et al. (2004). "Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite." J Exp Med **200**(4): 507-517.

- Moalic V, M. B., Ferec C. (2004). "Luminex Technology: technical approach, applications and future prospects." Immuno-analyse & Biologie spécialisée **19, no4.** : 181-187.
- Mogensen, T. H. (2009). "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses." Clin Microbiol Rev **22(2)**: 240-273, Table of Contents.
- Montuschi, P., M. Corradi, et al. (1999). "Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients." Am J Respir Crit Care Med **160(1)**: 216-220.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol **19**: 683-765.
- Morrow, J. D. and L. J. Roberts (2002). "The isoprostanes: their role as an index of oxidant stress status in human pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **166(12 Pt 2)**: S25-30.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136(7)**: 2348-2357.
- Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." J Leukoc Biol **73(2)**: 209-212.
- Mosser, D. M. and J. P. Edwards (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nat Rev Immunol **8(12)**: 958-969.
- Mourgeon, E., N. Isowa, et al. (2000). "Mechanical stretch stimulates macrophage inflammatory protein-2 secretion from fetal rat lung cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279(4)**: L699-706.
- Mucke, L. and M. Eddleston (1993). "Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system." FASEB J **7(13)**: 1226-1232.
- Mukaida, N. (2003). "Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **284(4)**: L566-577.
- Munder, M. (2009). "Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system." Br J Pharmacol **158(3)**: 638-651.
- Munder, M., F. Mollinedo, et al. (2005). "Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity." Blood **105(6)**: 2549-2556.
- Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization." J Leukoc Biol **89(4)**: 557-563.
- Muscadere, J. G., J. B. Mullen, et al. (1994). "Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury." Am J Respir Crit Care Med **149(5)**: 1327-1334.
- N.Eng.J.Med, T. A. R. D. S. N.-. (2000). "Ventilation With Lower Tidal Volumes As Compared With Traditional Tidal Volumes For Acute Lung Injury And The Acute Respiratory Distress Syndrome." The New England Journal of Medicine **342**(Number 18).
- Nakajima, H., K. Uchida, et al. (2012). "Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury." J Neurotrauma **29(8)**: 1614-1625.

- Nance, D. M. and V. M. Sanders (2007). "Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007)." Brain Behav Immun **21**(6): 736-745.
- Netter, F. H. (Deuxième édition). "Anatomie Humaine. Circulation sanguine pulmonaire." Novartis, Maloigne: 190-192.
- Nikolic, D., L. Calderon, et al. (2011). "SR-A ligand and M-CSF dynamically regulate SR-A expression and function in primary macrophages via p38 MAPK activation." BMC Immunol **12**: 37.
- Noble, L. J., F. Donovan, et al. (2002). "Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events." J Neurosci **22**(17): 7526-7535.
- Noel, A., K. Maghni, et al. (2012). "Effects of inhaled nano-TiO₂ aerosols showing two distinct agglomeration states on rat lungs." Toxicol Lett **214**(2): 109-119.
- O'Farrell, A. M., Y. Liu, et al. (1998). "IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways." EMBO J **17**(4): 1006-1018.
- Onofre, G., M. Kolackova, et al. (2009). "Scavenger receptor CD163 and its biological functions." Acta Medica (Hradec Kralove) **52**(2): 57-61.
- Otterbein, L. E., F. H. Bach, et al. (2000). "Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway." Nat Med **6**(4): 422-428.
- Otterbein, L. E. and A. M. Choi (2000). "Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1029-1037.
- Pannu, R., E. Barbosa, et al. (2005). "Attenuation of acute inflammatory response by atorvastatin after spinal cord injury in rats." J Neurosci Res **79**(3): 340-350.
- Pannu, R., D. K. Christie, et al. (2007). "Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury." J Neurochem **101**(1): 182-200.
- Parham Peter, A. C., Masson Perre L. (2003). "Le système immunitaire." De Boeck, Paris, Bruxelles: 7.
- Park, W. Y., R. B. Goodman, et al. (2001). "Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome." Am J Respir Crit Care Med **164**(10 Pt 1): 1896-1903.
- Parsons, P. E., M. D. Eisner, et al. (2005). "Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury." Crit Care Med **33**(1): 1-6; discussion 230-232.
- Parsons, P. E., M. A. Matthay, et al. (2005). "Elevated plasma levels of soluble TNF receptors are associated with morbidity and mortality in patients with acute lung injury." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **288**(3): L426-431.
- Pavlov, V. A., H. Wang, et al. (2003). "The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation." Mol Med **9**(5-8): 125-134.
- Pervin, S., R. Singh, et al. (2001). "Nitric oxide-induced cytostasis and cell cycle arrest of a human breast cancer cell line (MDA-MB-231): potential role of cyclin D1." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3583-3588.

- Peterson, W., W. Charlifue, et al. (1994). "Two methods of weaning persons with quadriplegia from mechanical ventilators." *Paraplegia* **32**(2): 98-103.
- Peterson, W. P., L. Barbalata, et al. (1999). "The effect of tidal volumes on the time to wean persons with high tetraplegia from ventilators." *Spinal Cord* **37**(4): 284-288.
- Philippidis, P., J. C. Mason, et al. (2004). "Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery." *Circ Res* **94**(1): 119-126.
- Pickett, G. E., M. Campos-Benitez, et al. (2006). "Epidemiology of traumatic spinal cord injury in Canada." *Spine (Phila Pa 1976)* **31**(7): 799-805.
- Pineau, I. and S. Lacroix (2007). "Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved." *J Comp Neurol* **500**(2): 267-285.
- Popa, C., F. Popa, et al. (2010). "Vascular dysfunctions following spinal cord injury." *J Med Life* **3**(3): 275-285.
- Popovich, P. a. D. M. (2009). "Beware the immune system in spinal cord injury." *Nature Medicine* **15**: 736-737.
- Popovich, P. G., P. Wei, et al. (1997). "Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats." *J Comp Neurol* **377**(3): 443-464.
- Poss, K. D. and S. Tonegawa (1997). "Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 10919-10924.
- Pratico, D., L. Iuliano, et al. (1997). "Localization of distinct F2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions." *J Clin Invest* **100**(8): 2028-2034.
- Pugin, J., I. Dunn, et al. (1998). "Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro." *Am J Physiol* **275**(6 Pt 1): L1040-1050.
- Puneet, P., S. Moochhala, et al. (2005). "Chemokines in acute respiratory distress syndrome." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**(1): L3-15.
- Qiao, F., C. Atkinson, et al. (2010). "The alternative and terminal pathways of complement mediate post-traumatic spinal cord inflammation and injury." *Am J Pathol* **177**(6): 3061-3070.
- Quinn, D. A., R. K. Moufarrej, et al. (2002). "Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury." *J Appl Physiol* **93**(2): 517-525.
- Racioppi, L., F. Ronchese, et al. (1993). "Peptide-major histocompatibility complex class II complexes with mixed agonist/antagonist properties provide evidence for ligand-related differences in T cell receptor-dependent intracellular signaling." *J Exp Med* **177**(4): 1047-1060.
- Ranieri, V. M., P. M. Suter, et al. (1999). "Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial." *JAMA* **282**(1): 54-61.
- Rasouli, J., R. Lekhraj, et al. (2011). "Brain-Spleen Inflammatory Coupling: A Literature Review." *Einstein J Biol Med* **27**(2): 74-77.

- Razavi, H. M., F. Wang le, et al. (2004). "Pulmonary neutrophil infiltration in murine sepsis: role of inducible nitric oxide synthase." Am J Respir Crit Care Med **170**(3): 227-233.
- Revillard, J. P. (2001). "Immunologie." De Boeck Supérieur 4ième édition: 124-126.
- Ricard, J. D., D. Dreyfuss, et al. (2001). "Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal." Am J Respir Crit Care Med **163**(5): 1176-1180.
- Rick Hansen Institute, A. F., David Baxter. (2010). "The Incidence and Prevalence of Spinal Cord Injury in Canada." Urban Futures: Strategic Reseach to Manage Change.
- Riegger, T., S. Conrad, et al. (2007). "Spinal cord injury-induced immune depression syndrome (SCI-IDS)." Eur J Neurosci **25**(6): 1743-1747.
- Riegger, T., S. Conrad, et al. (2009). "Immune depression syndrome following human spinal cord injury (SCI): a pilot study." Neuroscience **158**(3): 1194-1199.
- Rinner, I., P. Felsner, et al. (1998). "Adrenergic/cholinergic immunomodulation in the rat model--in vivo veritas?" Dev Immunol **6**(3-4): 245-252.
- Ryter, S. W., J. Alam, et al. (2006). "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications." Physiol Rev **86**(2): 583-650.
- Sato, A., H. Ohtaki, et al. (2012). "Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury." J Neuroinflammation **9**: 65.
- Saunders, E., Inc. (2003). "Interleukine definition." Miller-Keane Encyclopedia and Dictionary of Medicine, Nursing, and Allied Health, Seventh Edition.
- Scharton, T. M. and P. Scott (1993). "Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice." J Exp Med **178**(2): 567-577.
- Schultz, M. J., J. J. Haitsma, et al. (2007). "What tidal volumes should be used in patients without acute lung injury?" Anesthesiology **106**(6): 1226-1231.
- Segal, J. W. G. E. V. a. S. S. (2003). "Interaction between sympathetic nerve activation and muscle fibre contraction in resistance vessels of hamster retractor muscle." J Physiol **550 (Pt 2)**: 563-574.
- Sharma, H. S. (2011). "Early microvascular reactions and blood-spinal cord barrier disruption are instrumental in pathophysiology of spinal cord injury and repair: novel therapeutic strategies including nanowired drug delivery to enhance neuroprotection." J Neural Transm **118**(1): 155-176.
- Sheel AW, R. W., Townson AF, Ayas N, Teasell RW, Miller WC, Wolfe DL, Townson AF, Aubut J, Abramson C, Hsieh JTC, Connolly S. (2006). "Respiratory Management Following Spinal Cord Injury. ." Spinal Cord Injury Rehabilitation Evidence, Vancouver.: p 8.1-8.30.
- Sica, A. and A. Mantovani (2012). "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas." J Clin Invest **122**(3): 787-795.

- Sierra-Filardi, E., M. A. Vega, et al. (2010). "Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release." Immunobiology **215**(9-10): 788-795.
- Slonimski, M. and E. J. Aguilera (2001). "Atelectasis and mucus plugging in spinal cord injury: case report and therapeutic approaches." J Spinal Cord Med **24**(4): 284-288.
- Slutsky, A. S. and L. N. Tremblay (1998). "Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor?" Am J Respir Crit Care Med **157**(6 Pt 1): 1721-1725.
- Sodergren, E., B. Vessby, et al. (2000). "Radioimmunological measurement of F(2)-isoprostanes after hydrolysis of lipids in tissues." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **63**(3): 149-152.
- Sofroniew, M. V. (2009). "Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation." Trends Neurosci **32**(12): 638-647.
- Soni, N. and P. Williams (2008). "Positive pressure ventilation: what is the real cost?" Br J Anaesth **101**(4): 446-457.
- Soutiere, S. E. and W. Mitzner (2004). "On defining total lung capacity in the mouse." J Appl Physiol **96**(5): 1658-1664.
- Stout, R. D., C. Jiang, et al. (2005). "Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences." J Immunol **175**(1): 342-349.
- Strieter, R. M., J. A. Belperio, et al. (2002). "Cytokines in innate host defense in the lung." J Clin Invest **109**(6): 699-705.
- Sundstedt, A., E. J. O'Neill, et al. (2003). "Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo." J Immunol **170**(3): 1240-1248.
- Sunil, V. R., A. J. Connor, et al. (2002). "Activation of adherent vascular neutrophils in the lung during acute endotoxemia." Respir Res **3**: 21.
- Syrkina, O., B. Jafari, et al. (2008). "Oxidant stress mediates inflammation and apoptosis in ventilator-induced lung injury." Respirology **13**(3): 333-340.
- Szabo, C., C. Thiemermann, et al. (1994). "Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(1): 271-275.
- Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1005-1028.
- Thomas A. Wynn, L. B., Robert W. Thompson, Satish K. Madala, Mark S. Wilson, Allen W. Cheever, and Thirumalai Ramalingam (2012). "Quantitative Assessment of Macrophage Functions in Repair and Fibrosis." Current Protocols in Immunology: 1-15.
- Tilg, H., E. Trehu, et al. (1994). "Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55." Blood **83**(1): 113-118.
- Tobin, M. J. (2001). "Advances in mechanical ventilation." N Engl J Med **344**(26): 1986-1996.

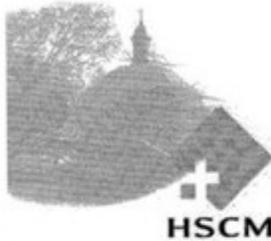
- Toews, G. B. (2001). "Cytokines and the lung." Eur Respir J Suppl **34**: 3s-17s.
- Tomicic, F. V. and H. M. Andresen (2011). "[Mechanical ventilation in patients with acute brain injury]." Rev Med Chil **139**(3): 382-390.
- Torre, D., R. Tambini, et al. (2000). "Anti-inflammatory response of IL-4, IL-10 and TGF-beta in patients with systemic inflammatory response syndrome." Mediators Inflamm **9**(3-4): 193-195.
- Town, T., V. Nikolic, et al. (2005). "The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses." J Neuroinflammation **2**: 24.
- Tremblay, L., F. Valenza, et al. (1997). "Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model." J Clin Invest **99**(5): 944-952.
- Trivedi, A., A. D. Olivas, et al. (2006). "Inflammation and Spinal Cord Injury: Infiltrating Leukocytes as Determinants of Injury and Repair Processes." Clin Neurosci Res **6**(5): 283-292.
- Uematsu, S., D. Engelberts, et al. (2013). "Dissociation of inflammatory mediators and function: experimental lung injury in nonpulmonary sepsis." Crit Care Med **41**(1): 151-158.
- Van Wagoner, N. J., J. W. Oh, et al. (1999). "Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor." J Neurosci **19**(13): 5236-5244.
- Vaneker, M., F. J. Halbertsma, et al. (2007). "Mechanical ventilation in healthy mice induces reversible pulmonary and systemic cytokine elevation with preserved alveolar integrity: an in vivo model using clinical relevant ventilation settings." Anesthesiology **107**(3): 419-426.
- Verbrugge, S. J., S. Uhlig, et al. (1999). "Different ventilation strategies affect lung function but do not increase tumor necrosis factor-alpha and prostacyclin production in lavaged rat lungs in vivo." Anesthesiology **91**(6): 1834-1843.
- Vinik, A. I. (2012). "The conductor of the autonomic orchestra." Front Endocrinol (Lausanne) **3**: 71.
- Vlahakis, N. E. and R. D. Hubmayr (2003). "Response of alveolar cells to mechanical stress." Curr Opin Crit Care **9**(1): 2-8.
- Vlahakis, N. E., M. A. Schroeder, et al. (1999). "Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro." Am J Physiol **277**(1 Pt 1): L167-173.
- von Bethmann, A. N., F. Brasch, et al. (1998). "Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung." Am J Respir Crit Care Med **157**(1): 263-272.
- Vreugdenhil, H. A., C. J. Heijnen, et al. (2004). "Mechanical ventilation of healthy rats suppresses peripheral immune function." Eur Respir J **23**(1): 122-128.
- Wagener, F. A., H. E. van Beurden, et al. (2003). "The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing." Blood **102**(2): 521-528.
- Wake, H., A. J. Moorhouse, et al. (2009). "Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals." J Neurosci **29**(13): 3974-3980.

- Waters, R. L., R. H. Adkins, et al. (1991). "Definition of complete spinal cord injury." Paraplegia **29**(9): 573-581.
- Werling, D., J. C. Hope, et al. (2004). "Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists." Immunology **111**(1): 41-52.
- West, J. B. (2000). "Respiratory physiology. The essentials, 6th Edition. Chapter 2. Ventilation." Lippincott Williams & Wilkins, USA: pp13-22.
- Whitehead, T. C., H. Zhang, et al. (2004). "Effect of mechanical ventilation on cytokine response to intratracheal lipopolysaccharide." Anesthesiology **101**(1): 52-58.
- Wilson, M. R., S. Choudhury, et al. (2003). "High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury." J Appl Physiol **95**(4): 1385-1393.
- Wilson, M. R., S. Choudhury, et al. (2005). "Pulmonary inflammation induced by high-stretch ventilation is mediated by tumor necrosis factor signaling in mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **288**(4): L599-607.
- Wong, S., Kazuko S and Crew J. (2012). "Specialized Respiratory Management for Acute Cervical Spinal Cord Injury: A Retrospective Analysis." Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation **18**(4): 283-290.
- Wrathall, J. R., R. K. Pettegrew, et al. (1985). "Spinal cord contusion in the rat: production of graded, reproducible, injury groups." Exp Neurol **88**(1): 108-122.
- Wrigge, H., U. Uhlig, et al. (2004). "The effects of different ventilatory settings on pulmonary and systemic inflammatory responses during major surgery." Anesth Analg **98**(3): 775-781, table of contents.
- Wrigge, H., J. Zinserling, et al. (2000). "Effects of mechanical ventilation on release of cytokines into systemic circulation in patients with normal pulmonary function." Anesthesiology **93**(6): 1413-1417.
- Wu, J., Z. Yan, et al. (2013). "Activation of NLRP3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury." J Immunol **190**(7): 3590-3599.
- Xia, J., B. Sun, et al. (2011). "Effect of spontaneous breathing on ventilator-induced lung injury in mechanically ventilated healthy rabbits: a randomized, controlled, experimental study." Crit Care **15**(5): R244.
- Xia, Z. W., L. Q. Xu, et al. (2007). "Heme oxygenase-1 attenuates ovalbumin-induced airway inflammation by up-regulation of foxp3 T-regulatory cells, interleukin-10, and membrane-bound transforming growth factor- 1." Am J Pathol **171**(6): 1904-1914.
- Y. Skar, J.-V. (2005). "The Importance of Acute Respiratory Failure in the ICU." Mechanical Ventilation. Arthur S. Slutsky. Springer: 3-10.
- Yachie, A., Y. Niida, et al. (1999). "Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency." J Clin Invest **103**(1): 129-135.
- Yan, J., A. M. Welsh, et al. (2004). "Differentiation and tropic/trophic effects of exogenous neural precursors in the adult spinal cord." J Comp Neurol **480**(1): 101-114.

- Yet, S. F., A. Pellacani, et al. (1997). "Induction of heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells. A link to endotoxic shock." J Biol Chem **272**(7): 4295-4301.
- Yeziarski, R. P. (2006). "Chapter 21 Pain following spinal cord injury: central mechanisms." Handb Clin Neurol **81**: 293-V.
- Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-127.

Chapitre 9. Annexes

9.1. Certificats comité d'éthiques



**HÔPITAL DU SACRÉ-CŒUR
DE MONTRÉAL**

Montréal, 8 octobre 2009

Dr Éric Beaumont
Centre de Recherche
Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal
5400 Boul. Gouin Ouest
Montréal Québec
H4J 1C5

Objet: Évaluation du projet intitulé "Effet d'une lésion médullaire sur l'inflammation et sur l'optimisation de la ventilation chez le rat"

Docteur,

Au nom du comité de protection des animaux (CPA) du centre de recherche de l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal il me fait plaisir de vous annoncer que votre protocole intitulé " Effet d'une lésion médullaire sur l'inflammation et sur l'optimisation de la ventilation chez le rat " a été accepté par les membres du comité. Le protocole portera le # BEAM04-0809-2

Quelques semaines après le début des expériences, deux membres du CPA iront vous rencontrer pour s'assurer qu'aucun changement au protocole n'a été fait, vérification qui s'inscrit dans le cadre du suivi post-approbation institutionnel. Dans le cas contraire, un amendement au protocole vous sera demandé. Si vous avez des questions, il nous fera plaisir d'y répondre.
En vous souhaitant la meilleure des chances dans vos recherches,

Sincèrement,

Centre affilié
universitaire suprarégional

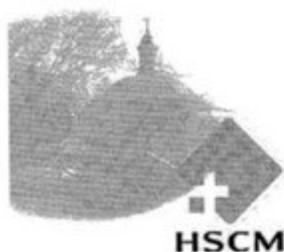
PAVILLON PRINCIPAL
5400, boul. Gouin Ouest
Montréal (Québec) H4J 1C5

PAVILLON ALBERT-PRÉVOST
6555, boul. Gouin Ouest
Montréal (Québec) H4K 1B3

Téléphone: (514) 338-2222
www.hscm.ca

UNIVERSITÉ
Université
de Montréal

Guy Rousseau
Président du CPA



**HÔPITAL DU SACRÉ-COEUR
DE MONTRÉAL**

Montréal, 21 avril 2011

Dr Jadranka Spahija, M. Eric Beaumont Dr Karim Maghni
Centre de Recherche
Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal
5400 Boul. Gouin Ouest
Montréal Québec
H4J 1C5

Objet: Évaluation du projet intitulé " Effets de l'infection sur le dommage de la blessure médullaire créé préalablement chez le rat."

Docteur,

Au nom du comité de protection des animaux (CPA) du centre de recherche de l'hôpital du Sacré-Cœur de Montréal il me fait plaisir de vous annoncer que votre protocole intitulé " Effets de l'infection sur le dommage de la blessure médullaire créé préalablement chez le rat." a été accepté par les membres du comité. Par contre une rencontre avec Manon St-Germain mv. et Caroline Bouchard vous aidera à mieux définir les points limites. Il faudra changer le mot surdose pour dose (kétamine), ainsi que lampe chauffante par tapis chauffant. Il portera le # SPAA.01.

Quelques semaines après le début des expériences, deux membres du CPA iront vous rencontrer pour s'assurer qu'aucun changement au protocole n'a été fait, vérification qui s'inscrit dans le cadre du suivi post-approbation institutionnel. Dans le cas contraire, un amendement au protocole vous sera demandé. Si vous avez des questions, il nous fera plaisir d'y répondre.

En vous souhaitant la meilleure des chances dans vos recherches,

Sincèrement,

Centre affilié
universitaire suprarégional

PAVILLON PRINCIPAL
5400, boul. Gouin Ouest
Montréal (Québec) H4J 1C5

PAVILLON ALBERT-PRÉVOST
6555, boul. Gouin Ouest
Montréal (Québec) H4K 1B3

Téléphone: (514) 338-2222
www.hscm.ca

Université
de Montréal

Guy Rousseau, Ph.D.
Président du CPA

9.2. Curriculum Vitae

Karine-Marie Truflandier

Physiothérapeute, MSc

Physiologie respiratoire / Santé/ Traumatisme / Inflammation

Formation académique

Étudiante au Doctorat en Sciences Biomédicales, Faculté de Médecine, Université De Montréal, (QC) Canada.	<i>Oct. 2008 - aujourd'hui</i>
Attestation de la Profession de Masseur-Kinésithérapeute (Paris). Ministère de la Santé, Commission du Conseil Supérieur des Professions Paramédicales de la République Française.	<i>2004</i>
Diplôme de Licencié en Kinésithérapie et Réadaptation Baccalauréat et Maîtrise en Physiothérapie. Mémoire obtenu avec <u>distinction</u> . «Administration d'Ipratropium chez des patients intubés et ventilés mécaniquement: Effet de la position du nébuliseur». Université Libre de Bruxelles, Belgique.	<i>1998 – 2003</i>
Année de prép. aux concours d'admission de Kinésithérapie (Physiothérapie) Rennes (35), France, Kinémédia.	<i>1998</i>
Année de préparation de Physique et Chimie , Rennes, France	<i>1997</i>
Baccalauréat Français, série Scientifique , (Mathématiques), Lycée A.R. Lesage, Vannes	<i>1996</i>

Langues

Français	Langue maternelle
Anglais	Courant
Allemand	Scolaire (6 ans)
Latin	Scolaire (6 ans)

Prix et Bourses

Concours de Bourse J.A. DeSève Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal.	2009
Concours de Bourse de Doctorat Faculté de Médecine, Université de Montréal	2010
Concours de Bourse de Doctorat Faculté de Médecine, Université de Montréal	2011
Concours de Bourse à l'Excellence au Doctorat Faculté des Études Supérieures, Université de Montréal	2011
Concours de Bourse de Doctorat Faculté de Médecine, Université de Montréal	2012

Expériences – Perfectionnement Académique

Office National de la Recherche et d'Enseignement en Kinésithérapie 15 rue de l'épée de Bois – 75005 PARIS, France. Formation : Kinésithérapie respiratoire guidée par l'auscultation pulmonaire- Monsieur Guy Postiaux.	Sept. 2014
Département Soins Intensifs Pédiatrique et Pneumologie CHU Sainte-Justine, centre hospitalier Universitaire mère-enfant. Service interne de Physiothérapie. Nadia Marquis et Lucie Farmer (Chargée de l'enseignement clinique), Montréal (Qc).	Mar. 2014
Encadrement de stages Étudiants au Baccalauréat en Sciences Biomédicales, Centre de Recherche de l'Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal (QC).	Mai à Sep. 2011
Modératrice XIème Journée de La Recherche Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal	20 Jun. 2011
Assistante Professeur McGill University (Dre Jadranka Spahija) École de Physiothérapie et Ergothérapie. Montréal (QC).	Hivers 2009-2010
Formation Secouriste- Croix Rouge	Avr. – Mai 2007
Participation organisation Symposium AIDS Canada	Fév. – Mar. 2006

Annexes

Bénévolat & Humanitaire Handicap International Bruxelles-Capital.	<i>2003-2004</i>
Département de Chirurgie Infantile – Pédiatrie Hôpital Universitaire Erasme, Bruxelles, Belgique.	<i>Mai 2003</i>
Département de Pneumologie - Kinésithérapie Respiratoire Hôpital Universitaire Erasme, Bruxelles, Belgique.	<i>Avr. 2003</i>
Réhabilitation Cardio-vasculaire - Dép. de Chirurgie Cardiaque. Hôpital Universitaire Erasme, Bruxelles, Belgique.	<i>Mar. 2003</i>
Unité de Soins Intensifs - Kinésithérapie Respiratoire Hôpital Universitaire Erasme, Bruxelles, Belgique.	<i>Fév. 2003</i>
Oncologie et Unité de Soins Intensifs - Kinésithérapie Respiratoire Institut de Cancérologie Jules Bordet, Bruxelles, Belgique	<i>Jan. 2003</i>
Centre Rééducation- Physiothérapie orthopédique Mondörf. Grand Duché. Luxembourg.	<i>Déc. 2002</i>
Rééducation Orthopédique et Traumatologique Département de chirurgie Orthopédique, Hôpital Universitaire Brugmann, Bruxelles, Belgique.	<i>Oct.-Nov. 2002</i>
Département de Neurologie - Réhabilitation Centre Hospitalier Etterbeek-Ixelles, Belgique.	<i>Sep. 2002</i>

Expériences Professionnelles

Assistante de Recherche - Soins Intensifs Centre de Recherche. Hôpital du Sacré-Cœur de Montréal.	<i>2008 - 2012</i>
Physiothérapeute Clinique Privée Jacques Coiffard. Vannes (56), France.	<i>2006 - 2007</i>
Équivalence de diplôme Ordre de Physiothérapie du Québec, Montréal. Canada.	<i>Août. 2005 – Jun. 2006</i>
Physiothérapeute Clinique Privée. Jacques Coiffard. Vannes (56), France.	<i>Jan. 2005 – Jun. 2005</i>

Physiothérapeute Centre de Thalassothérapie, Quiberon, France	Nov. 2004
Physiothérapeute Centre de Rééducation Fonctionnel, Montrodat, France.	Aoû. 2004 – Oct. 2004
Physiothérapeute Clinique de kinésithérapie A. Beck, Basse-Terre, Guadeloupe. Antilles Françaises.	Mar. 2004 – Aoû. 2004
Physiothérapeute Harrison Center, Centre de Rééducation du Membre Supérieur & Chirurgie de la Main, Syracuse NT, USA.	Oct. 2003 – Mar. 2004
Physiothérapeute Centre de Rééducation, Mondörf, Grand Duché du Luxembourg.	Nov. 2002 - Déc. 2002

Publications- Recherche

Publications:

- Jean-Jacques Moraine, Karine Truflandier, Nicolas Vandenberg, Jacques Berré, Christian Mélot, Jean-Louis Vincent. Placement of the nebulizer before the humidifier during mechanical ventilation: Effect on aerosol delivery. *Heart & Lung: Journal of Acute and Critical Care*. Elsevier. Volume 38, Issue 5, Pages 435-439, Septembre 2009.

Communications libres :

- Hôpital Erasme, Unité des Soins Intensifs, Bruxelles. Octobre 2003.
- Congrès de la Société de Kinésithérapie Respiratoire, Paris, 2005.
- Conférence et communications libres, Type d'évènement scientifique : XVIII Congrès de Réanimation, Paris, La Défense, 20 et 21 janvier 2005
- Centre De Recherche Hôpital Du Sacré-Cœur, Montréal (QC). 20 Mai 2010.
- Xème Journée de La Recherche, Hôpital Du Sacré-Cœur De Montréal, Université de Montréal. 28 Mai 2010.
- XIème Journée de La Recherche, Hôpital Du Sacré-Cœur de Montréal, Université de Montréal. 20 Juin 2011

Posters/ Abrégés publiés:

- J Spahija; M De Marchie ; K Truflandier ; A Moga ; P Bellemare ; S Delisle ; M Albert. Effects of conventional and closed-loop neurally adjusted ventilatory assist (NAVA) in intubated spinal cord injured patients. *Critical Care* 2010, 14 (Suppl 1):P207 doi: 10.1186/cc8439.
- Karine Truflandier, Éric Beaumont, Karim Maghni, Jadranka Spahija. Effet du niveau de la lésion médullaire sur l'inflammation. Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Axe de recherche en santé respiratoire, Montréal, Canada.

Assistante de Recherche/ projets de recherche:

- Administration d'Ipratropium chez les patients intubés et ventilés mécaniquement. Dr Moraine JJ, Nicolas Vandenberg, Dr Berré J, Dr Mélot C, Prof Vincent JL. Département des Soins Intensifs, Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, 2002 à 2004.
- Effets neuro-mécaniques et ventilatoires du mode ventilation assistée contrôlée conventionnel et le NAVA en circuit fermé chez les sujets intubés avec lésions médullaires aiguës traumatiques. Dr Spahija, Dr Albert M, Dr Bellemare P, Dr Michel de Marchie. Service de soins Intensifs, Hôpital Sacré-Coeur de Montréal. De juillet 2008 à 2012.

- Évaluation des facteurs contribuant à l'insuffisance respiratoire et l'effet des stratégies ventilatoires et autres thérapies sur les complications respiratoires et le pronostic: Étude évaluative rétrospective chez les traumatisés médullaires. Jadranka Spahija PhD et Dr Martin Albert MD. Service de soins intensifs, Hôpital Sacré-Cœur de Montréal. De juillet 2008 à 2012.

9.3. Article 1: Modulation of lung inflammatory mechanisms in ventilated rats in response to spinal cord injury

Karine Truflandier¹; Jadranka Spahija^{1,2,3}; Eric Beaumont¹; Karim Maghni¹

1. Research Centre, Sacré-Cœur Hospital of Montreal, Department of Medicine, Université de Montréal, 5400 boulevard Gouin West, Montreal, Quebec, H4J 1C5, Canada.
2. School of Physical and Occupational Therapy, McGill University, 3654 Promenade Sir William Osler, Montreal, Quebec, H3G 1Y5, Canada.
3. Center for Interdisciplinary Research in Rehabilitation in Montreal, Jewish Rehabilitation Hospital, 3205, Place Alton-Goldbloom, Laval, Quebec, H7V 1J1, Canada

Running head: Inflammation in mechanical ventilation and spinal cord injury

Contributor statement

- Karine Truflandier: Study design, ethics committee submission, planning, conducting the study, data and statistical analysis, reporting, interpretation and writing of the article.
- Éric Beaumont: Participation in conducting the study, interpretation and article review prior to submission.
- Jadranka Spahija: Conception, hypothesis delineation, study design, data and statistical analysis, interpretation, article writing and review.
- Karim Maghni: Hypothesis delineation, study design, conducting the study methodology, data analysis, results interpretation, and article writing and review.

Clinical and basic science relevance

Spinal cord injury (SCI) and mechanical ventilation (MV) induce inflammatory responses through different mechanisms. However, whether interplay between inflammatory responses to SCI and MV may amplify or reduce biotrauma and lung injury development, is currently unknown. Our study revealed a new concept of a role of SCI for modulating specific immune and oxidative responses, but not inflammatory cell influx or injury, in the lung of mechanically ventilated animals. These findings are likely to be relevant for therapeutic approaches used in acute care of mechanically ventilated patients with high cervical injury.

Funding Statement

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research # MOP-57742¹ and the J.A DeSèves Foundation and the Faculty of Medicine of University of Montréal.

Study approval

All procedures were approved by the Animals Committee of the Research Center of Sacré-Coeur Hospital of Montreal.

Word count of manuscript (without Abstract): 3531

Keywords: Mechanical ventilation, Spinal cord injury, Airway inflammation, Alveolar macrophages, Oxidative stress.

ABSTRACT

Rationale: Mechanical ventilation is widely used in cervical injured patients to compensate for respiratory muscle failure. This procedure also induces lung inflammation, while spinal cord injury is already known to contribute to local inflammatory response. Whether mechanical ventilation and spinal cord injury interact in modulating airway inflammatory responses is unknown.

Objectives: To test the hypothesis that spinal cord injury influences mechanical ventilation-induced lung inflammation and macrophages phenotypes.

Methods: Rats were anesthetised for 24 hours and divided in two groups; with and without mechanical ventilation. The ventilated group included subgroups without injury, cervical (C4-C5) and thoracic injury (T10). The non-ventilated group included uninjured and T10 injured animals. Comparative inflammatory responses were determined in bronchoalveolar fluids and alveolar macrophages.

Measurements and main Results: The cytokine profile in the uninjured non-ventilated rats was IL-10^{high}, IL-1 β ^{low}, TNF^{low}, IL-6^{low} versus IL-10^{low}, IL-1 β ^{high}, TNF^{high}, IL-6^{high} in uninjured ventilated rats. These findings strongly suggest ventilation promotes a pro-inflammatory environment in the lung related to M1 phenotype. Induction of this activation is also supported by the selective increase of MIP-1 α , a specific marker of the M1 phenotype. Interestingly, cervical injury in ventilated animals changed the profile to IL-10^{low}, IL-1 β ^{low}, TNF^{high}, IL-6^{high}. It also reduced mechanical ventilation-induced pulmonary oxidative stress responses. T10 injury in non-ventilated animals increased M-CSF response expression, an inducer of M2 phenotype, and promoted an anti-inflammatory pulmonary response.

Conclusions: These data provide the first evidence that mechanical ventilation induces a more predominant pulmonary M1 phenotype, and that spinal cord injury modulates specific lung immune and oxidative stress responses.

State the number of words in the abstract: 252

INTRODUCTION

Spinal cord injury (SCI) has serious consequences on morbidity and mortality (1). Respiratory muscle weakness and paralysis, especially with cervical SCI, can lead to respiratory insufficiency and a need for mechanical ventilatory support. However, there is accumulated evidence that mechanical ventilation (MV) can contribute to the development of tissue injury (*e.g.* barotrauma or volutrauma) through alteration of surfactant production, increased capillary and alveolar permeability, lung oedema and pulmonary inflammation (2) thus augmenting damage in previously injured lung (3-5). Prolonged MV using conventional tidal volumes (V_T) or airway pressures, can also evoke biotrauma characterized by a release of inflammatory cytokines (6-8), even when applied to healthy lungs. Both clinical and experimental studies have reported that MV induces lung neutrophilia and increased levels of interleukin IL-1 β and IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and of specific chemokines (8, 9). Cyclic stretching of lung tissue (10-12), has been shown to result in an increased cytokine production associated with epithelial cell (13), and alveolar macrophage activity (14). Whether or not MV may modulate immune response remains mostly unknown; however, since higher levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α have been reported in ventilated animals in contrast to higher levels of anti-inflammatory cytokine IL-10 in non-ventilated animals (15, 16), specific patterns of cytokine expression induced by MV may be expected. Alveolar macrophages are the main cellular source of cytokines for pulmonary defence. Interestingly, macrophages can exhibit different and specific phenotypes for cytokine and chemokine expression during immune infection, tissue development and repair (17). In fact, macrophages populations have been classified into at least two different subtypes based on their phenotypes, referred to as macrophage polarization. Classically activated macrophages (CAM) or M1 are GM-CSF-driven and induced or primed by interferon- γ (IFN- γ) and lipopolysaccharide (LPS) (18, 19). In contrast, alternatively activated macrophages (AAM) or M2 are M-CSF-driven and induced by IL-4 and IL-13 or IL-21 (20). M1 release mainly IL-1 β , IL-6, TNF- α , and the macrophage inflammatory protein-1

alpha (MIP-1 α) (21), whereas M2 produce mainly IL-10 and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) (22, 23).

The central nervous system plays a significant role in regulating immunity both in humans and animals (24, 25). SCI has been shown to trigger local and systemic inflammatory responses which may affect distal organs (26). For instance, SCI induces massive neutrophil infiltration at the site of injury (27), as well as lung with the migration of the circulating neutrophils, increase of pro-inflammatory enzymes (*e.g.* myeloperoxidase and matrix metalloproteinase-9) and pulmonary oxidative stress responses (*e.g.* lipid peroxidation) (28). Pulmonary damage can also occur even in the absence of prior lung inflammation (29, 30). However, whether interplay between inflammatory responses to SCI and MV may amplify or reduce biotrauma and lung injury development, is currently unknown. This could be of crucial importance in cervical injured patients under mechanical ventilation because of the use of appropriate therapeutic interventions to control harmful inflammatory responses.

Here, in an animal model, we show that mechanical ventilation induces a more predominant pulmonary M1 phenotype, and that SCI modulates this phenotype by selectively decreasing pulmonary IL-1 β expression. We further demonstrate that SCI has no effect on mechanical ventilation-induced lung neutrophilia but markedly and selectively decreased oxidative stress responses. Our study highlights the importance of macrophage phenotypes in relation to lung conditions, and reveals an unexpected role of SCI in protecting mechanically ventilated lungs to exacerbated oxidative stress responses.

MATERIAL AND METHODS

Animal Preparation

Thirty-three adult female Sprague-Dawley rats were divided into two groups and anesthetised for 24 hours; one was mechanically ventilated whereas the other was not. The ventilated group included rats with cervical SCI (N=7, C4-C5), thoracic SCI (N=7, T10) and without injury (N=7). The non-ventilated group included thoracic SCI rat (N=6, T10) and uninjured rats (N=6).

Mechanical ventilation

In ventilated animals, ventilator settings (Kent Scientific, Topo) were set and maintained for 24 hours to deliver an appropriate tidal volume (6 mL/kg) (31), with a constant: 1) peak inspiratory airway pressure (PIP) 10 cm H₂O, 2) Positive end-expiratory pressure (PEEP) 0 cm H₂O, 3) respiratory rate (RR) 60 breaths per minute, 4) an inspiration-to-expiration ratio of 1:3, and 5) expired end-tidal CO₂ between 2.5-3.6% (Capstar-100 CO₂, analyser).

Spinal cord injury

A laminectomy was performed at C4 or T9 vertebrae, exposing the C5 or T10 spinal cord segment as previously described (32). To produce a moderate SCI, a weight of 5 g was dropped from 6 cm of height directly on the spinal cord (30g/cm impact). For uninjured animals, surgical procedures were performed except for the impact to the spine.

Bronchoalveolar lavage (BAL)

Twenty-four hours post-injury, anesthetized rats were euthanized by exsanguination. A tracheotomy was performed; an endotracheal tube was inserted into the trachea and secured in place in animals which did not receive any MV. Five consecutive lavages through the tracheal tube were performed for measurements of total cell counts,

inflammatory mediators and oxidative stress status as previously described (33). Analyses of collected samples were performed by blinded laboratory technicians. The material obtained from the first wash was centrifuged, supernatant divided into Eppendorf tubes and frozen at -80°C for subsequent analysis of lung inflammatory markers and oxidative stress responses. Percentages of neutrophils, macrophages and lymphocytes were determined from the remaining pellet.

Determination of cellular phenotype factors and markers

IL-6, IL-10, IL-1 β and TNF- α concentrations were determined from the BAL fluid as markers for M1 and M2 phenotypes using a commercial Bio-Plex cytokine assay (Bio-Rad Laboratories). Specific M1 phenotype factors were profiled by detection of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and phenotype markers with macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1 α), interleukin 12p70 (IL-12p70) and interferon-inducible protein 10 (IP-10). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was determined as cellular marker specificity to M2 phenotype.

Determination of lung injury markers

Alkaline phosphatase (AP) and lactate dehydrogenase (LDH) were assessed in BAL fluids as markers of lung injury.

Determination of oxidative stress responses

Isoprostane levels and heme oxygenase-1 (HO-1) were quantified in BAL fluids using a Cayman Chemical Company kit and ImmunoSet[™] H0-1 ELISA development set, respectively.

Statistical Analysis

Comparisons of mean values of pulmonary cell counts, inflammatory and oxidative stress mediators for the three ventilated groups were made using a one-way analysis of

variance (ANOVA) followed by Tukey's post-hoc test. A two-way ANOVA followed by unpaired t-tests for post-hoc contrasts of significant effects evaluated MV and thoracic lesion effect). Data were analyzed using SPSS version 18 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). Statistical differences were considered significant at $P < 0$. All data are presented as means \pm standard error of means (SEM).

RESULTS

Vital parameters in mechanically ventilated (MV) and non-ventilated (NV) animals

Mean values of vital parameters for all groups are summarized in Table 1. There were no differences in the expired end-tidal CO₂, peak inspiratory pressure, respiratory rate, heart rate and temperature between all groups.

Effects of SCI on MV-induced BAL neutrophilia and lung damage

MV induced significantly higher neutrophil levels and total cell counts in BAL, but did not affect the number of alveolar macrophages or lymphocytes (Table 2). Levels of alkaline phosphatase activity (AP) in BAL fluids measured as a marker of lung tissue damage were significantly higher in ventilated animals for both no lesion (NL) and thoracic lesion (TL) groups when compared to respective controls (Table 2). There was no significant change in BAL fluid LDH levels among all groups of animals (Table 2). Presence of a cervical or thoracic SCI in ventilated rats had no effect on the total and differential BAL cells counts or the biochemical markers monitored as compared to the NL group (Table 2).

Effects of MV and SCI on BAL cytokines expression

The BAL cytokine profile in uninjured and non-ventilated rats was IL-10^{high}, IL-1 β ^{low}, TNF^{low}, IL-6^{low} versus IL-10^{low}, IL-1 β ^{high}, TNF^{high}, IL-6^{high} in uninjured MV rats (Figure 1). T10 injury in the NV animals had no effect on BAL cytokine expression as

compared to the NL group (Figure 1). However, cervical injury changed the cytokine profile in ventilated animals to IL-10^{low}, IL-1 β ^{low}, TNF^{high}, IL-6^{high}. Given that the cytokine profiles for the NV-NL and MV-NL animals seemed to reflect M2 and M1 phenotype, respectively, specific markers of each phenotype were subsequently assessed in the BAL fluids.

Determination of M1 and M2 phenotypes in respective animal groups

Firstly, we address the expression of MIP-1 α , a chemokine previously identified in *in vitro* studies as a marker of the M1 phenotype (34). BAL mediator analysis revealed that mechanical ventilation had a significant effect on MIP-1 α levels, such that both MV-NL and MV-TL groups were significantly higher than the NV-NL and NV-TL groups, respectively (Table 3). In contrast, mechanical ventilation had no effect on the BAL levels of GM-CSF, IL-12p70 and IP-10, mediators previously identified in *in vitro* studies as specific markers of the M1 phenotype (35), (Table 3). Our data also indicate that the MIP-1 α levels were not altered by SCI or by the level of the lesion whether or not the animal was being ventilated. Furthermore, there is no difference in level of GM-CSF, IL-12p70 and IP-10 among these groups (Table 3). In regard to markers related to the M2 phenotype, M-CSF levels were higher in the group with thoracic lesion compared to no lesion, but only in the non-ventilated animals (Table 3). Next, we assessed in the BAL fluid, the level of MCP-1, a chemokine also previously identified in *in vitro* studies as a specific marker of M2 phenotype. Our data indicate that MCP-1 levels were significantly higher in the groups receiving mechanical ventilation whereas there was no difference between groups with or without SCI or with different levels of SCI (Table 3).

MV and SCI-induced oxidative stress responses

BAL fluids levels of 8-isoprostane, a marker of lipid peroxidation in response to oxidative burst (36), were first examined to evaluate the oxidative stress response. As illustrated in Figure 2, the level of 8-Isoprostane was significantly higher in the ventilated

compared to non-ventilated animals. Moreover, significantly lower levels of 8-isoprostane were observed in the presence of a T10 spinal cord injury both in the ventilated and non-ventilated animals (Figure 2). Interestingly, animals with a cervical lesion (MV-CL) also exhibited a significantly lower level of BAL 8-isoprostane when compared to the MV-NL group (Figure 2).

To further evaluate lung oxidative stress modulation in response to mechanical ventilation and SCI, we additionally examined in the pulmonary cellular extracts of total BAL cells, the expression of the heme oxygenase-1 (HO-1) protein, an intracellular enzyme involved in pulmonary defence by protecting lung cells and tissues against stress and injury (37). Total BAL cells of the NV-NL group showed a tendency towards an increased expression of HO-1 in comparison to the MV-NL group (Figure 3) although the difference did not achieve statistical significance. Interestingly, a T10 spinal lesion in non-ventilated animals resulted in a significantly higher level of HO-1 in total BAL cells compared to no SCI (NV-TL and NV-NL groups); HO-1 was not significantly different in ventilated animals with and without a T10 lesion (MV-TL and MV-NL) (Figure 3). Finally, the cervical lesion had no effect on the basal expression of HO-1 (as measured in NV-NL group) but HO-1 expression in MV-CL group was significantly higher when compared to MV-NL and MV-TL groups (Figure 3).

DISCUSSION

In this study, we provide the first evidence that normal airways express a more predominant M2 phenotype, whereas mechanical ventilation contributes mainly to an M1 phenotypic expression. Furthermore, we demonstrated for the first time that SCI, particularly a T10 injury promotes an M2 phenotype in non-ventilated animals, as well as antioxidant responses in the airways and alveolar macrophages. Very interestingly, these antioxidant responses were maintained in ventilated animals despite the oxidative stress response induced by the mechanical ventilation. Furthermore, irrespective of the type of

SCI, we show that cervical lesions reduced specifically the expression of IL-1 β over the other cytokines assessed in BAL fluids of mechanically ventilated animals.

Mechanical ventilation is well-known as an inducer of pulmonary injury mainly characterized by massive neutrophils infiltration and elevated levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α (8, 15). Herein, we first established the degree of lung inflammation and injury occurring when animals were ventilated with the selected mechanical ventilation parameters. We found that compared to NV animals, lungs of MV rats showed mainly influx of neutrophils and increased levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6 and the marker of lipid peroxidation 8-isoprostane. However, there was no evidence of major lung tissue injury when levels of LDH and alkaline phosphatase were assessed. Furthermore, vital parameters were no different between MV and NV animals. Therefore, animals ventilated with the selected parameters for mechanical ventilation developed pulmonary inflammatory responses similar to other reported experimental animal models (3). The inflammatory responses determined in our animal model also closely reflect the lung inflammation observed in mechanically ventilated patients with acute respiratory distress syndrome (38).

There are multiple lines of evidence that macrophages, as key cells in the innate immune response in the lung, are the first immune mononuclear cells to encounter environmental allergens and pathogens. Importantly, macrophages can switch from pro- to anti-inflammatory cells for destroying or repairing tissue. Recently, these versatile properties of macrophages have been attributed to different macrophage phenotypes with distinct functions; the induction of either classically M1 or alternatively activated M2 macrophages being under the control of distinct immune responses. M1 polarized macrophages exhibit anti-microbial properties and promote strong IL-12-mediated Th1 responses, whereas M2 mainly reduce pro-inflammatory cytokines expression and participate in the resolution of inflammation through high endocytic clearance capacities (18, 20-23, 39). To the best of our knowledge, whether mechanical ventilation-induced pulmonary inflammation causes switching in alveolar macrophages phenotype is unknown.

We currently provide evidence of the existence of specific macrophage phenotypes by assessing the expression of selective cytokines in the BAL fluids. We found that the cytokine profile in NV-NL rats was IL-10^{high}, IL-1 β ^{low}, TNF^{low}, IL-6^{low}, a profile consistent with an M2 phenotype. In contrast, in MV-NL animals, the cytokine profile was IL-10^{low}, IL-1 β ^{high}, TNF^{high}, IL-6^{high} which suggests phenotype polarization to M1. The predominant expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 over the other measured cytokines in NV-NL animals may be relevant to the lung immune innate system protection against pulmonary infection and injury. In a rat model of experimental endotoxemia, IL-10 nebulisation prior to endotoxin intravenous injection caused a marked decrease in BAL fluids levels of IL-1 β , TNF- α and IL-6 (40). Interestingly, increased levels of IL-10 have been previously reported in the airways of healthy ventilated animals and in patients under mechanical ventilation with early adult respiratory distress syndrome (41-43). Furthermore, inhaled IL-10 reduces BAL inflammatory mediator levels, biotrauma and mortality in a rat model of ventilator-induced lung injury (44).

Although we demonstrated predominant expression of the M2 phenotype in NV-NL animals versus phenotype polarization to M1 in MV-NL rats, we cannot rule out that cytokines recovered in BAL fluids are not exclusively produced by macrophages, and thus, may also be derived from airway epithelial cells or other structural cells. Therefore, the expression of other selective markers of the classical and alternative macrophage phenotypes was also addressed. M1 polarized macrophages are GM-CSF-driven (17), and cells selectively produce IL-12p70, IP-10 and MIP-1 α (45). We found no increase in GM-CSF, IL-12p70 and IP-10 levels in MV-NL animals when compared to NV-NL rats. However, levels of MIP-1 α were significantly increased in MV-NL rats and totally absent in NV-NL animals. M2 polarized macrophages are M-CSF-driven (18), and cells preferentially release IL-10 and MCP-1 (23), and the anti-oxidative enzyme HO-1 (37). BAL fluid analysis revealed an increase in the M-CSF levels in NV-NL animals, but not significantly different to levels recovered in BAL fluids of MV-NL rats. Surprisingly, MCP-1 levels were very low in NV-NL rats but markedly increased in MV-NL animals.

Although not statistically significant, HO-1 levels were higher in NV-NL rats in comparison to MV-NL animals. Irrespective of variations in levels of inflammatory and anti-inflammatory mediators, we provided the first evidence that the airways of healthy animals express a more predominant M2 phenotype whereas mechanical ventilation provokes a preferential switching to M1. The importance of macrophage phenotypes in lung pathogenesis was very recently addressed in a mouse model of experimental asthma. This study revealed that the balance between macrophage phenotypes is a function of asthma severity; the expression of the M1 phenotype being increased in mice with less allergic airway inflammation (46). In our study, the determination of markers of M1 and M2 phenotypes in BAL fluids also revealed mixed phenotypes for chemokines expression. This finding is in agreement with other *in vivo* reports showing the coexistence of multiple phenotypes reflecting the complex of cellular dynamic changes in tissues and organs (20).

We subsequently examined whether SCI by itself or when combined with MV may modulate influx of inflammatory cells in airways, lung damage and macrophage polarization in the lungs. We first addressed the effect of T10 injury alone. We found that animals having thoracic spinal injury had no evidence of airway inflammation or lung injury, and showed similar profile of expression for IL-10, IL-1 β , TNF and IL-6 when compared to NV-NL rats. Interestingly, T10 injury alone caused a significant increase in BAL M-CSF levels. This novel finding might suggest that thoracic spinal injury promotes an M2 phenotype in NV-TL animals, and thus increases the protective immune defense of the lungs. However, our data revealed that T10 injury may also induce M1 phenotype as shown by the significant increase in MIP-1 α . Therefore, we postulated that T10 injury may drive both M1 and M2 phenotype in the lung of NV-NL animals. Consequently, we examined whether a specific phenotype polarization is induced when animals with T10 injury were also ventilated. In line with our hypothesis, we found that T10 injury modulates both M1 and M2 phenotypes, as illustrated by the decrease in IL-1 β and IL-10 levels but not IL-6 in MV-TL animals. However, there was no modulation of BAL neutrophilia or lung injury in MV-TL animals. We then examined whether the localization of the SCI may

modulate differently mechanical ventilation-induced pulmonary inflammation and predominant switching to M1 phenotype. We found that the cervical C4-C5 spinal injury in ventilated animals provoked a similar modulation of cytokine expression as did the thoracic spinal injury with also no change in BAL neutrophilia or the degree of lung injury. Taken together, our results support a new concept of a role of SCI for modulating specific immune responses, but not inflammatory cells influx or injury, in the lung of mechanically ventilated animals.

Finally, we examined the incidence of SCI on lung oxidative stress responses. To address this issue, we examined BAL fluids levels of 8-Isoprostane, a marker of oxidative stress response. HO-1 is one of three forms of heme oxygenase expressed in various cell types including alveolar macrophages (23, 47). Previous experimental studies have highlighted the role of HO-1 in lung injury by showing that the administration of this enzyme reduces the level of such pro-inflammatory cytokines as TNF- α and IL-8, but up-regulates levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in an experimental model of ventilator-induced lung injury (48). HO-1 expression is also rapidly induced in response to oxidative stress and by pro-inflammatory cytokines, thereby providing a significant pulmonary defense mechanism (37, 49). Interestingly, HO-1 expression in M-CSF-driven M2 macrophages polarization contributes to LPS-induced IL-10 production (50). Therefore, intracellular levels of HO-1 in total BAL cells were determined as a marker of anti-oxidative response. We found that mechanical ventilation modulates the oxidative response by increasing basal levels of 8-isoprostane but decreasing basal levels of HO-1. Our new concept of a role for SCI as a positive promoter of lung defense is reinforced by our experiments showing that T10 injury alone is able to reduce levels of 8-isoprostane while increasing HO-1 levels at baseline in NV-NL animals. In addition, we found that both thoracic and cervical spinal injury attempts to restore an anti-oxidative state in lungs of mechanically ventilated rats by decreasing oxidative burst stress and promoting anti-oxidative responses. Furthermore, thoracic and cervical spinal injury triggering HO-1 up-regulation in ventilated animals strongly suggests that SCI may promote a more

predominant M2 phenotype over the M1 in ventilated animals. This new concept is supported by our experiments showing that SCI in NV-NL and MV-NL reduced levels of IL-1 β while increasing HO-1 levels. This new concept is also supported by a very recent study indicating that IL-1 β down regulates HO-1 levels while the induction of HO-1 expression reverses the effects of IL-1 β (51).

In summary, our study provides further evidence that mechanical ventilation induces a more predominant pulmonary M1 phenotype over the M2 expressed in healthy animals. Furthermore, our study provides the first evidence that SCI modulates specific lung immune and oxidative stress responses for attempting to restore normal conditions in lung. Our results have clinical implications because they strongly suggest that effective treatment of ventilated patients with SCI, regardless of severity of the biotrauma, might depend on promoting an M2 macrophage phenotype over M1 in the lung.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the generous support and excellent training and technical assistance of Lucero Castellanos and Mélanie Welman, PhD (Dr. Karim Maghni's Laboratory, Sacré-Coeur Hospital of Montreal) and Caroline Bouchard for her help with veterinary care.

References

1. Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, Wing PC. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: Update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord* 2013.
2. Slutsky AS, Ranieri VM. Ventilator-induced lung injury. *N Engl J Med* 2013;369:2126-2136.
3. Chiumello D, Pristine G, Slutsky AS. Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:109-116.
4. Network TARDS. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *The New England Journal of Medicine* 2000; 342.
5. Hess DR, Thompson BT, Slutsky AS. Update in acute respiratory distress syndrome and mechanical ventilation 2012. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:285-292.
6. Determann RM, Royakkers A, Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, Paulus F, Hofstra JJ, de Graaff MJ, Korevaar JC, Schultz MJ. Ventilation with lower tidal volumes as compared with conventional tidal volumes for patients without acute lung injury: A preventive randomized controlled trial. *Crit Care* 2010;14:R1.
7. Vaneker M, Halbertsma FJ, van Egmond J, Netea MG, Dijkman HB, Snijdelaar DG, Joosten LA, van der Hoeven JG, Scheffer GJ. Mechanical ventilation in healthy mice induces reversible pulmonary and systemic cytokine elevation

- with preserved alveolar integrity: An in vivo model using clinical relevant ventilation settings. *Anesthesiology* 2007;107:419-426.
8. Bailey TC, Maruscak AA, Martin EL, Forbes AR, Petersen A, McCaig LA, Yao LJ, Lewis JF, Veldhuizen RA. The effects of long-term conventional mechanical ventilation on the lungs of adult rats. *Crit Care Med* 2008;36:2381-2387.
 9. Syrkina O, Jafari B, Hales CA, Quinn DA. Oxidant stress mediates inflammation and apoptosis in ventilator-induced lung injury. *Respirology* 2008;13:333-340.
 10. Mourgeon E, Isowa N, Keshavjee S, Zhang X, Slutsky AS, Liu M. Mechanical stretch stimulates macrophage inflammatory protein-2 secretion from fetal rat lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L699-706.
 11. Halbertsma FJ, Vaneker M, Scheffer GJ, van der Hoeven JG. Cytokines and bio-trauma in ventilator-induced lung injury: A critical review of the literature. *Neth J Med* 2005;63:382-392.
 12. von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R, Vogt K, Volk HD, Muller KM, Wendel A, Uhlig S. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:263-272.
 13. Vlahakis NE, Schroeder MA, Limper AH, Hubmayr RD. Stretch induces cytokine release by alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 1999;277:L167-173.

14. Wu J, Yan Z, Schwartz DE, Yu J, Malik AB, Hu G. Activation of nlrp3 inflammasome in alveolar macrophages contributes to mechanical stretch-induced lung inflammation and injury. *J Immunol* 2013;190:3590-3599.
15. Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-rna expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997;99:944-952.
16. Lee HS, Wang Y, Maciejewski BS, Esho K, Fulton C, Sharma S, Sanchez-Esteban J. Interleukin-10 protects cultured fetal rat type ii epithelial cells from injury induced by mechanical stretch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L225-232.
17. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958-969.
18. Mantovani A, Sica A, Locati M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 2007;37:14-16.
19. Meghari S, Berruyer C, Lepidi H, Galland F, Naquet P, Mege JL. Vanin-1 controls granuloma formation and macrophage polarization in coxiella burnetii infection. *Eur J Immunol* 2007;37:24-32.
20. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: In vivo veritas. *J Clin Invest* 2012;122:787-795.
21. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008;13:453-461.
22. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity* 2010;32:593-604.

23. Murray PJ, Wynn TA. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J Leukoc Biol* 2011;89:557-563.
24. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:775-786.
25. Lucin KM, Sanders VM, Jones TB, Malarkey WB, Popovich PG. Impaired antibody synthesis after spinal cord injury is level dependent and is due to sympathetic nervous system dysregulation. *Exp Neurol* 2007;207:75-84.
26. Popovich PaDM. Beware the immune system in spinal cord injury. *Nature Medicine* 2009;15:736-737.
27. Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, Marcillo AE, Saenz AD, Pasquale-Styles M, Dietrich WD, Weaver LC. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain* 2006;129:3249-3269.
28. Gris D, Hamilton EF, Weaver LC. The systemic inflammatory response after spinal cord injury damages lungs and kidneys. *Exp Neurol* 2008;211:259-270.
29. Altemeier WA, Matute-Bello G, Frevert CW, Kawata Y, Kajikawa O, Martin TR, Glenny RW. Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L533-542.

30. Uematsu S, Engelberts D, Peltekova V, Otulakowski G, Post M, Kavanagh BP. Dissociation of inflammatory mediators and function: Experimental lung injury in nonpulmonary sepsis. *Crit Care Med* 2013;41:151-158.
31. Kleinman LI, Radford EP, Jr. Ventilation standards for small mammals. *J Appl Physiol* 1964;19:360-362.
32. Dery MA, Rousseau G, Benderdour M, Beaumont E. Atorvastatin prevents early apoptosis after thoracic spinal cord contusion injury and promotes locomotion recovery. *Neurosci Lett* 2009;453:73-76.
33. Maghni K, Taha R, Afif W, Hamid Q, Martin JG. Dichotomy between neurokinin receptor actions in modulating allergic airway responses in an animal model of helper t cell type 2 cytokine-associated inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1068-1074.
34. Goerdts S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Klemke CD, Dippel E, Kodelja V, Orfanos CE. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology* 1999;67:222-226.
35. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009;27:451-483.
36. Fritsch-Decker S, Both T, Mulhopt S, Paur HR, Weiss C, Diabate S. Regulation of the arachidonic acid mobilization in macrophages by combustion-derived particles. *Part Fibre Toxicol* 2011;8:23.
37. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: From basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006;86:583-650.

38. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: A randomized controlled trial. *JAMA* 1999;282:54-61.
39. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* 2005;175:342-349.
40. Hofstetter C, Flondor M, Hoegl S, Muhl H, Zwissler B. Interleukin-10 aerosol reduces proinflammatory mediators in bronchoalveolar fluid of endotoxemic rat. *Crit Care Med* 2005;33:2317-2322.
41. Donnelly SC, Strieter RM, Reid PT, Kunkel SL, Burdick MD, Armstrong I, Mackenzie A, Haslett C. The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med* 1996;125:191-196.
42. Xia J, Sun B, He H, Zhang H, Wang C, Zhan Q. Effect of spontaneous breathing on ventilator-induced lung injury in mechanically ventilated healthy rabbits: A randomized, controlled, experimental study. *Crit Care* 2011;15:R244.
43. Armstrong L, Millar AB. Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 1997;52:442-446.

44. Hoegl S, Boost KA, Czerwonka H, Dolfen A, Scheiermann P, Muhl H, Zwissler B, Hofstetter C. Inhaled il-10 reduces biotrauma and mortality in a model of ventilator-induced lung injury. *Respir Med* 2009;103:463-470.
45. Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003;73:209-212.
46. Draijer C, Robbe P, Boorsma CE, Hylkema MN, Melgert BN. Characterization of macrophage phenotypes in three murine models of house-dust-mite-induced asthma. *Mediators Inflamm* 2013;2013:632049.
47. Mege JL, Mehraj V, Capo C. Macrophage polarization and bacterial infections. *Curr Opin Infect Dis* 2011;24:230-234.
48. An L, Liu CT, Qin XB, Liu QH, Liu Y, Yu SY. Protective effects of hemin in an experimental model of ventilator-induced lung injury. *Eur J Pharmacol* 2011;661:102-108.
49. Yet SF, Pellacani A, Patterson C, Tan L, Folta SC, Foster L, Lee WS, Hsieh CM, Perrella MA. Induction of heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells. A link to endotoxic shock. *J Biol Chem* 1997;272:4295-4301.
50. Sierra-Filardi E, Vega MA, Sanchez-Mateos P, Corbi AL, Puig-Kroger A. Heme oxygenase-1 expression in m-csf-polarized m2 macrophages contributes to lps-induced il-10 release. *Immunobiology* 2010;215:788-795.
51. Clerigues V, Murphy CL, Guillen MI, Alcaraz MJ. Haem oxygenase-1 induction reverses the actions of interleukin-1beta on hypoxia-inducible transcription factors and human chondrocyte metabolism in hypoxia. *Clin Sci (Lond)* 2013;125:99-108.

TABLES

Table 1. Summary of vital parameters in mechanically ventilated and non-ventilated rats.

	Groups				
	MV-NL	MV-CL	MV-TL	NV-NL	NV-TL
CO2 Exp (%)	3.0 (0.3)	2.9 (0.3)	3.6 (0.5)	-	-
Peak insp pressure (cm H ₂ O)	11.1 (0.1)	11.6 (0.3)	10.9 (0.2)	-	-
Respiratory rate (breaths / min)	63.1 (1.4)	62.9 (1.0)	61.0 (0.4)	72.9 (6.8)	74.5 (4.9)
Heart rate (bpm)	248.2 (17.8)	239.6 (13.0)	229.1 (9.5)	248.0 (9.6)	224.5 (6.0)
Temperature (°C)	36.8 (0.1)	36.8 (0.1)	36.8 (0.1)	36.6 (0.1)	36.8 (0.2)

Values are means \pm (SEM) of individual rats per group. Exp: expiratory; Insp: inspiratory; MV: mechanical ventilation; NL: no lesion; CL: cervical lesion; TL: thoracic lesion; NV: no ventilation.

Table 2. BAL total and differential cells counts and BAL markers of lung cells damage

	Groups								
	MV-NL	MV-CL	MV-TL	<i>P</i> ANOVA (lesion)	1-way NV-NL	NV-TL	<i>P</i> ANOVA (lesion)	2-way <i>P</i> ANOVA (MV)	2-way
Total	3.7 (0.7)	5.2 (0.9)	4.2 (0.6)	0.400	2.0 (0.3)	2.6 (0.6)	0.331	0.011	
Macro	1.5 (0.4)	3.0 (0.6)	1.8 (0.5)	0.172	1.7 (0.3)	1.9 (0.3)	0.505	0.749	
Neutro	2.5 (0.4)	2.6 (0.4)	3.4 (0.1)	0.926	0.1 (0.0)*	0.2 (0.2)‡	0.982	<0.001	
Lympho	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.1 (0.0)	0.345	0.1 (0.0)	0.3 (0.2)	0.322	0.123	
AP (pg/ml)	36.0 (9.3)	22.6 (3.6)	38.8 (7.0)	0.293	8.2 (1.3)*	10.2 (0.6)†	0.720	<0.001	
LDH (AU)	3.1 (2.7)	0.3 (0.2)	0.6 (0.4)	0.432	5.5 (3.5)	0.1 (0.0)	0.081	0.656	

Mean values (\pm SEM) of individual rats per group. Total and differential cell counts are expressed as millions of cells. MV: mechanical ventilation; NL: no lesion; CL: cervical lesion; TL: thoracic lesion; NV: no ventilation. Macro: macrophages; Neutro: neutrophils; Lympho: lymphocytes; AP: alkaline phosphatase; LDH: lactate dehydrogenase; AU: arbitrary units.

*, $P < 0.05$ for post-hoc contrasts vs. MV-NL.

†, $P < 0.05$ and ‡ $P < 0.001$ for post-hoc contrasts vs. MV-TL.

Table 3: BAL Cytokines and chemokines-related to specific M1 and M2 polarization

	Groups							
	MV-NL	MV-CL	MV-TL	<i>P</i> ANOVA (lesion)	1-way NV-NL	NV-TL	<i>P</i> 2-way ANOVA (lesion)	<i>P</i> 2-way ANOVA (MV)
M1 phenotype								
GM-CSF	1.2 (0.9)	5.3 (3.3)	0.5 (0.5)	0.133	1.2 (1.2)	2.9 (1.8)	0.659	0.303
MIP-1 α	136.1 (12.9)	110.7 (17.2)	114.5 (18.9)	0.514	0.0 (0.0) [†]	27.1 (20.5) [‡]	0.863	<0.001
IL-12p70	3.8 (1.8)	0.7 (0.5)	7.1 (2.3)	0.098	5.2 (2.2)	4.3 (1.2)	0.545	0.710
IP-10	0.0 (0.0)	3.9 (3.9)	1.0 (1.0)	0.373	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.368	0.368
M2 phenotype								
M-CSF	2.7 (1.8)	8.0 (7.9)	13.7 (8.4)	0.516	6.3 (1.8)	25.7 (2.8)	0.009	0.160
MCP-1	498.4 (115.8)	202.5 (48.7)	420.6 (82.0)	0.126	5.8 (4.5) [*]	11.6 (8.7) [§]	0.646	<0.001

Mean values (\pm SEM). BAL cytokines and chemokines are expressed as pg/ml. MV: mechanical ventilation; NL: no lesion; CL: cervical lesion; TL: thoracic lesion; NV: no ventilation; GM-CSF: granulocyte macrophage colony-stimulating factor; M-CSF: macrophage colony-stimulating factor; MIP-1 α : macrophage inflammatory protein-1; IL-12p70: interleukin-12p70; MCP-1: monocyte chemotactic protein-1; IP-10: interferon gamma-induced protein 10.

^{*}, $P < 0.05$ and [†], $P < 0.001$ for post-hoc contrasts vs. MV-NL.

[‡], $P < 0.05$ and [§], $P < 0.001$ for post-hoc contrasts vs. MV-TL.

^{||}, $P < 0.001$ for post-hoc contrasts vs. NV-NL.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effects of MV and SCI in total BAL cytokines expression. Mean values (\pm SEM). (A) Interleukin-10 in pg/ml, (B) TNF- α in pg/ml, (C) Interleukin-1 β in pg/ml, (D) Interleukin-6 in μ g/ml; MV: mechanical ventilation; NL: no lesion; CL: cervical lesion; TL: thoracic lesion; NV: no ventilation.

*, $P < 0.05$ for post-hoc contrasts (1-way ANOVA).

†, $P < 0.05$ and ‡, $P < 0.001$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA).

Figure 2. MV-induced oxidative stress responses. Mean values (\pm SEM) of 8-Isoprostane in pg/ml; MV: mechanical ventilation; NL: no lesion; CL: cervical lesion; TL: thoracic lesion; NV: no ventilation.

*, $P < 0.05$ for post hoc contrasts (1-way ANOVA).

†, $P < 0.05$ and ‡, $P < 0.001$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA).

Figure 3. Hem oxygenase-1 in pulmonary cell extracts. Mean values (\pm SEM) of HO-1 in ng/ml; MV: mechanical ventilation; NL: no lesion; CL: cervical lesion; TL: thoracic lesion; NV: no ventilation.

*, $P < 0.05$ for post hoc contrasts (1-way ANOVA).

†, $P < 0.05$ and ‡, $P < 0.001$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA).

FIGURES

Figure 1. Effects of MV and SCI in total BAL cytokines expression

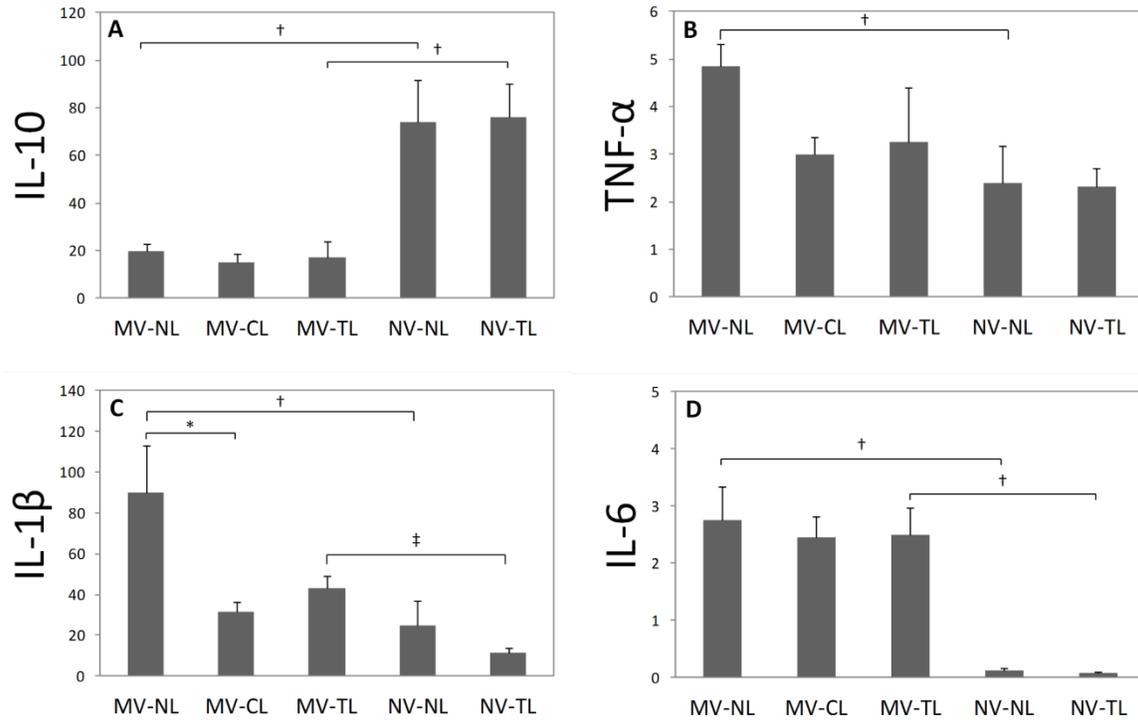


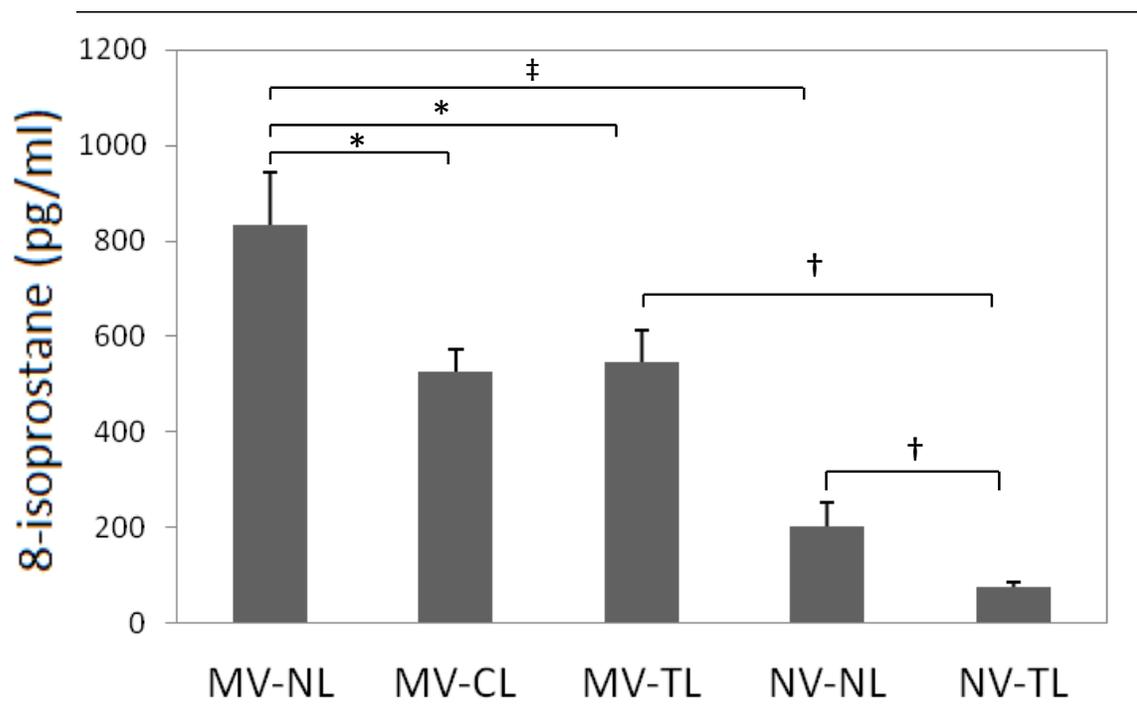
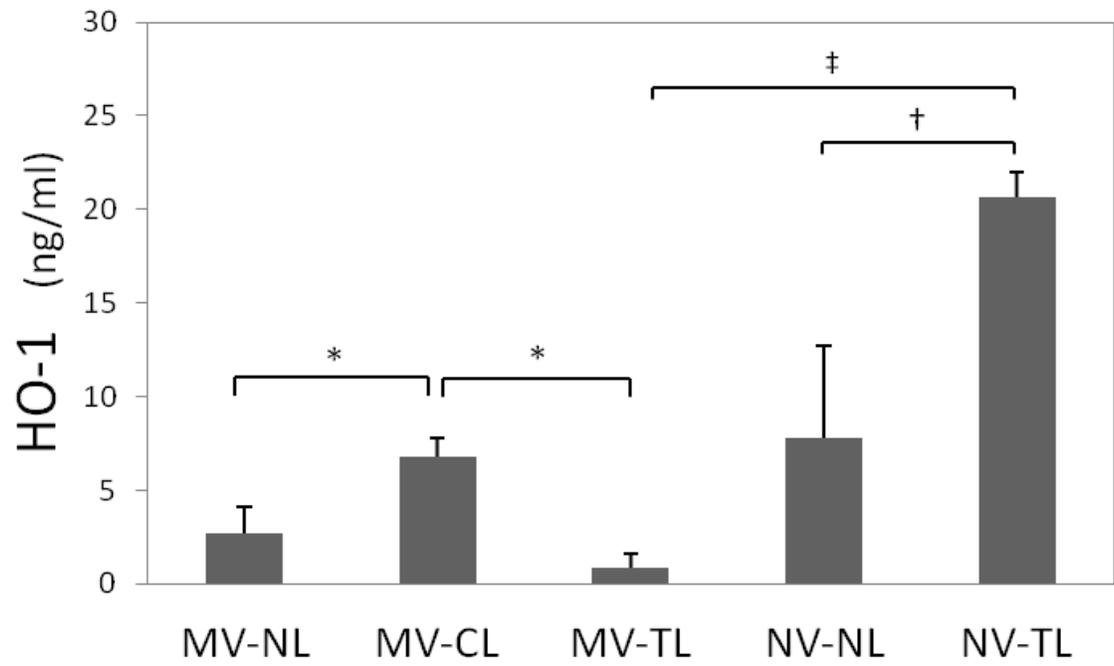
Figure 2. MV-induced oxidative stress responses

Figure 3. Hem oxygenase-1 in pulmonary cell extracts

9.4. Mechanical ventilation in healthy lung can modulate inflammatory cytokines expression in spinal cord tissue

K Truflandier¹; K Maghni¹; E Beaumont¹; J Spahija^{1,2,3}

1. Research Center, Sacré-Coeur Hospital, Department of Medicine, Université de Montréal, 5400 boul. Gouin Ouest, Montréal, Quebec, H4J 1C5, Canada.
2. School of Physical and Occupational Therapy, McGill University, 3654 Promenade Sir William Osler, Montreal, Quebec, H3G 1Y5, Canada;
3. Center for Interdisciplinary Research in Rehabilitation in Montreal, Jewish Rehabilitation Hospital, 3205, Place Alton-Goldbloom, Laval, Quebec, H7V 1J1, Canada.

Running head: Inflammatory responses during mechanical ventilation following spinal cord injury

Contributor statement

- Karine Trufflandier: Study design, hypotheses delineation, ethics committee submission, conducting the study, statistical analyses, interpretation and writing of the article.
- Éric Beaumont: Participation in conducting the study, interpretation and article review prior to submission.
- Karim Maghni: Participation in the design and development of the study methodology, data analysis, results interpretation and article review prior to submission.
- Jadranka Spahija: Participation in the conception, hypotheses delineation and design of the study, statistical analysis, interpretation and article review prior to submission.

Clinical and basic science relevance

Spinal cord injury (SCI) and mechanical ventilation (MV) induce inflammatory responses through different mechanisms. However, whether interplay between inflammatory responses to SCI and MV may amplify or reduce biotrauma and lung injury development, is currently unknown. Our study revealed a new concept of a role of SCI for modulating specific immune response in the spine of mechanically ventilated animals. These findings are likely to be relevant for therapeutic approaches used in acute care of mechanically ventilated patients with high cervical injury.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the generous support, excellent training and technical assistance of Lucero Castellanos and Mélanie Welman, PhD (Dr. Karim Maghni's Laboratory, Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal, Montreal), Dr. Guy Rousseau, Marc-André Déry and Caroline Bouchard for her help with veterinary care.

Funding Statement

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research # MOP-57742¹ and the J.A DeSèves Foundation and the Faculty of Medicine of University of Montréal.

Study approval

All procedures were conducted according to the recommendations of the Canadian Council for Animal Care, and were approved by the Animals Committee of the Research Center of Sacré-Coeur Hospital of Montreal.

Keywords: Spinal cord injury, mechanical ventilation, interaction, inflammation, healthy lung.

ABSTRACT

Rationale: Spinal cord injury may induce significant respiratory muscle weakness and paralysis which in turn may cause a patient to require ventilator support. Central nervous system alterations can also exacerbate local inflammatory responses with immune cell infiltration leading to additional risk of inflammation at the injury site. Although mechanical ventilation is the traditional treatment for respiratory insufficiency, evidence has shown that it may directly affect distal organs through systemic inflammation.

Objectives: This report is a part of a previous study and aimed at a better understanding of the inflammatory response in the spine following cervical and thoracic injury and at determining whether or not conventional mechanical ventilation may alter spinal cord tissue.

Methods: Five groups of rats were anaesthetised for 24 hours: (1) 7 ventilated rats without spinal cord injury; (2) 7 ventilated rats with cervical injury (C4-C5); (3) 7 ventilated rats with thoracic injury (T10); (4) 6 non ventilated and uninjured rats; and (5) 6 non ventilated rats with thoracic injury (T10). Changes in inflammatory responses were determined in spinal cord tissues collected at the local site of injury.

Measurements and main Results: Spinal cord injury induced pro-inflammatory cytokines IL-6 expression for all groups. Mechanical ventilation had also effects on pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) with IL-10^{low}, IL-1 β ^{low}, TNF^{high}, IL-6^{low} in uninjured ventilated animals versus IL-10^{low}, IL-1 β ^{high}, TNF^{low}, IL-6^{low} in uninjured non-ventilated animals.

Conclusion: These data provide the first evidence that mechanical ventilation contributes to local inflammation in previously injured tissue but also in healthy spinal cord tissues.

State the number of words in the abstract: 247

INTRODUCTION

A spinal cord injury (SCI) is a devastating neurological insult that can incur lifelong disability, accompanied by increased morbidity and mortality [1, 2]. Patients with higher cervical injuries often develop respiratory insufficiency and require mechanical ventilation (MV) to compensate for respiratory muscles weakness or paralysis [3]. There is evidence that MV can contribute to the development of ventilator induced lung damage not only in previously injured lungs but also in healthy lungs in both animals and humans [4-6]. In addition to direct lung damage, studies have also demonstrated MV to trigger the local release of such inflammatory cytokines as tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6 and -1 β [7] as well as elicit a systemic inflammatory response [8-13], although differing findings have been reported [14-16] and controversy exists as to whether or not systemic inflammation occurs in response to MV of healthy lungs [14, 17, 18].

Acute SCI provokes massive immune cell recruitment associated to inflammatory cellular response resulting in damaged tissue at the injury site [19, 20]. When the spinal cord is injured, neutrophils and macrophages (also known as microglia) as components of the first line of immune defense, are mobilized and activated in large numbers early post-trauma in order to clean up the injured tissue zone of cell debris [21]. These immune cells release pro-inflammatory mediators such as reactive oxygen species and oxidative enzymes [22]. Although macrophages are a source of pro-inflammatory cytokines, *e.g.* IL-1 β , IL-6, TNF- α , oxidative stress [23] and as such may intensify early local inflammatory responses leading to the secondary spinal tissue damage [24], they can also have anti-inflammatory properties which can promote possible tissue repair and axonal regeneration [25, 26]. The capacity of macrophage to promote reparative or secondary damaging events is based on its two dichotomised phenotypes; M1 or M2, that lead to a pro- or anti-inflammatory environment, with high levels of pro- or anti-inflammatory cytokine production, respectively [24, 27]. By increasing inflammatory responses with cytokine release, activated macrophages contribute to the proliferation of resident cells (astrocytes and microgliaocytes) at the local junction between healthy and damaged tissues, thus contributing to astroglial scarring [28]. On the one hand, these activated microglia cell are believed to perform detrimental roles during inflammatory response after SCI with the

inhibition of tissue repair and axonal neuroregeneration [29, 30]. On the other hand, recent studies have shown that the anti-inflammatory environment of M2 phenotype could promote functional recovery after SCI [31-33]. Macrophage state are related to the environment where they evolve and how they differentiate into active cell that may exacerbate initial tissue damage or promote repair in central nervous system (CNS) will depend preferentially from the type of cytokine induction [34, 35].

Many factors influence the cellular phenotype and are able to induce damage in the cord. How the inflammatory responses induced by the application of MV therapy in the context of an acute spinal cord injury affects inflammation at the spine is currently unknown. We hypothesized that MV would contribute to a pro-inflammatory environment and modify inflammation at the level of injured spinal cord tissue. The purpose of the present study was to determine the impact of 24 hours of MV on local spinal cord inflammatory responses.

MATERIAL AND METHODS

Animal Preparation

Thirty-three adult female Sprague-Dawley rats (225-250 g. Charles River, St Constant, Quebec, Canada) were divided into five separate groups. Two groups received no MV whereas the three others did. For the rats without MV support, one group had no SCI (N=6) and the other had a thoracic SCI (N=6, T10). For the ventilated rats, one group had cervical SCI (N=7, C4-C5), the second group had thoracic SCI (N=7, T10) and the third group had no SCI (sham, N=7). The rats were first anesthetized with ketamine/xylazine (90/10 mg/kg, i.m) after which each animal received an adjusted dosage of the same two agents continually over 24 hours delivered via a catheter placed in the jugular vein. All animals were placed on a heating blanket for 24 hours to prevent a drop in body temperature. Body temperature was continuously monitored and maintained between 37°C and 39°C. Heart rate was monitored using subcutaneous electrodes (Nihon Kohden) in the paw of the animals. All animals received these procedures every 4-hrs: 1) a mobilization of

the extremities to compensate for the loss of venous return, and 2) a manual massaging of the bladder to prevent renal stases.

Mechanical ventilation

For mechanically ventilated animals, respiratory support (Kent Scientific, Topo) was set to provide an appropriate tidal volume ($V_t=6$ mL/kg) for the animal's body weight according to the nomogram of Kleiman and Radford [36] with a constant: 1) peak inspiratory airway pressure (PIP) 10 cm H₂O, 2) Positive end-expiratory pressure (PEEP) 0 cm H₂O, 3) respiratory rate (RR) 60 breaths per minute, 4) an inspiration-to-expiration ratio of 1:3 achieved by setting the inspiration % at 35%, and 5) expired end-tidal CO₂ between 2.5-3.6% placed 1 minute at the air exhaled exit of the ventilator (Capstar-100 CO₂ analyser). For non-ventilated animals, supplemental oxygen was given (0.1 L/min). These settings were maintained for 24 hours.

Spinal cord injury

The SCI procedure was performed as described in [37]. A laminectomy was performed at C4 or T9 vertebrae, exposing the C5 or T10 spinal cord segment. The stereotactic clamps were installed on both sides of the laminectomy to stabilize the spine of injured animals. Then, to produce a moderate SCI, a weight of 5 g from 6 cm of height was dropped directly on the spinal cord (30g·cm impact). For animals with no SCI, the same surgical procedures were performed except for the laminectomy or the impact to the spinal cord. The muscles and skin were then sutured. Finally, an eye gel containing white Vaseline and mineral oil respectively (80% and 30%, Duo Lube, Bausch & Lomb, Markham, Canada) was used to prevent xerophthalmia due to anesthesia.

Collection of spinal cord tissues samples

Twenty-four hours post-injury, all rats previously anesthetized were euthanized by exsanguinations. A tracheotomy was performed to insert an endotracheal tube secured in place using surgical thread into the trachea of rats which did not receive MV. Then, the

bronchus of the right lung was clamped and the left lung was subjected to five successive lung washes through the tracheal tube [38] for further pulmonary analysis (results unpublished yet). Finally, spinal cord injured tissues, diaphragm and right lung were removed and kept intact, immersed in liquid nitrogen before being frozen at -80°C for future analyzes.

Protein Assay and determination of inflammatory cytokines concentrations

Spinal cord tissues which were collected at the injury site were thawed before measuring inflammatory mediators. First, a protein assay was done by standard Bradford Assay Method [37]. To obtain the mass of spinal cord samples, spinal tissues (30-40 mg) were transferred into pre-weighted and empty Eppendorf tubes and kept on ice. The mass of each sample was obtained by subtracting the mass of empty container from the total mass and 1 ml of lysis buffer was added to all tubes. Then, each tube was sonicated once for 5 to 10 seconds (Ultra Sonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, USA) to extract proteins. Tubes were incubated at 4°C for 30 minutes on a plate shaker and subjected to three cycles of freezing and thawing by alternatively dipping in liquid nitrogen and hot water at 37°C . Subsequently, each tube was mixed by vortexing for 5 seconds and centrifuged at 4°C for 10 minutes at maximum speed (13,000 rpm, Heraeus Biofuge Pico, Mandel Scientific Co, Ltd) to obtain a supernatant. Supernatants were then carefully removed and transferred to a new identified tube. Finally, for each lysate, dilutions were prepared in triplicate (795 μl H_2O , 5 μl of sample, 200 μl of Bradford reagent). Protein concentration of each supernatant from spinal cord tissue was measured by colorimetric assay as previously described in the Bradford Assay Method using a spectrophotometer (Varian Cary 50 Bio UV-Visible spectrophotometer, Varian Inc.). Concentrations were measured three times for each sample and the average was taken for calculations. The concentrations of inflammatory cytokines such as IL-6, IL-10, IL-1 β and TNF- α were determined using spinal cord tissues homogenates obtained from the Bradford Protein Assay with a commercial Bio-Plex cytokine assay according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories, Inc., Mississauga, ON, CA).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using PASW Statistics [39]. Comparisons of mean values of inflammatory mediators in sample spinal cord tissue for the three mechanically ventilated groups were made using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test post-hoc. A two-way ANOVA followed by unpaired t-tests for post-hoc contrasts of significant effects evaluated MV and thoracic lesion effect. Statistical differences were considered significant at $P < 0.05$ and extremely significant at $P < 0.001$. All data are presented as means \pm standard error of means (SEM).

RESULTS

Effects of SCI and MV on spine tissue cytokines expression

SCI did not change spinal cord cytokine expression in both ventilated and non-ventilated animals except for the pro-inflammatory IL-6 profile. Specifically, the induction of a cervical or a thoracic SCI significantly increased the cytokine IL-6 level at the lesion site in ventilated animals compared to the MV-NL group ($P = 0.002$). We also performed a 2-way ANOVA to discriminate between the effect of thoracic SCI and MV on the spinal tissue. Analysis revealed that for non-ventilated animals, a T10 SCI significantly increased the IL-6 concentration level as compared to the NV-NL group ($P < 0.001$; Figure 1).

Tissue analysis also revealed that the cytokine profile in uninjured non-ventilated animals was IL-10^{low}, IL-1 β ^{high}, TNF^{low}, IL-6^{low} versus IL-10^{low}, IL-1 β ^{low}, TNF^{high}, IL-6^{low} in uninjured ventilated animals (Figure 1). Interestingly, MV significantly decreased local spinal IL-1 β expression as compared to the uninjured group without respiratory support ($P < 0.05$). In regard to the expression of TNF, this pro-inflammatory cytokine level was significantly increased in uninjured spine of animals when MV was applied (NV-NL vs. MV-NL). Furthermore, MV increased the TNF- α concentration at the injury site in animals which had a thoracic injury ($P < 0.05$). Although not significant, NV-TL group showed an increase level of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in comparison to MV-TL ($P = 0.088$).

Finally, our data indicate that the spinal tissue levels of IL-6 were lower in MV-TL compared to NV-TL group, although the difference did not reach statistical significance level ($P=0.082$).

DISCUSSION

It is currently well recognized that SCI induces an inflammatory response at the level of the lesion which involves infiltration of a variety of immune cells [19]. Individuals with SCI, especially those with high cervical injury, often require MV to support their breathing. There is evidence that MV can directly contribute to damage of previously injured but also healthy lung [4] and to a systemic inflammatory response [11, 40]. The current study, which examined the cytokine profile of the spinal tissue 24 hours following SCI, provides evidence that MV applied to healthy lung results in an alteration of the local inflammatory response that is created by the SCI.

Previous studies have revealed that SCI results in an up regulation of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the spinal cord tissue [41, 42]. Our data support these finding, confirming the increase of the pro-inflammatory cytokine IL-6 at the level of the spinal cord tissue after a cervical or thoracic injury whether or not MV was applied. Similar changes in cytokine profiles were observed whether the animals sustained a cervical or thoracic injury. Following SCI, resident macrophages (microglia) have been reported to be primarily activated in the immune response in order to promote axonal regeneration [43, 44]. Using monoclonal antibodies for temporal blockage of IL-6, Guerrero et al, had demonstrated a reduction in the acute inflammatory response and enhanced spinal cord repair secondary to M1 phenotype inactivation, promoting an alternative pathway of macrophage M2 activation [31].

Recently, functional recovery has also been shown to correlate with preserved axons, less scar tissue formation and increased myelin sparing following transplantation of mesenchymal cells [32]. These cells derived from bone marrow are known to alter macrophage activation within the injured spinal cord. Indeed, the transplantation of these cells reduced significantly the levels of IL-6 and TNF- α in the spinal cord tissue expressing

preferentially a M2 phenotype to the detriment of M1 phenotype. Horn et al, reported that macrophages are a source of beneficial, *i.e.* healing tissue processes, or excessive damaging inflammation in the spine [30]. These contradictory effects of macrophages in the inflammatory response in spinal tissue have been attributed to two different macrophage populations and the activation of specific cellular signals [29]. It was also reported that the imbalance between inflammatory mediators can either promote either a pro-inflammatory environment M1 with the production of TNF- α and IL-1 β , preventing axonal regeneration or an M2 anti-inflammatory environment leads mainly IL-10 leading to tissue repair [23, 35]. Furthermore, some evidence have shown that the loss of effectiveness of the blood-brain spinal cord barrier (BBSCB) increase the permeability to inflammatory cells present in the blood stream [45]. It can contribute to local inflammation following a spinal cord injury [22]. This inflammatory response can then dramatically aggravate the initial damage or in contrast improve tissue regeneration in local spine [46]. In regards to MV, our findings have clearly showed that TNF- α levels were upregulated whereas IL-1 β levels were downregulated by the ventilatory support provided.

In contrast to the study of Hong et al,[47] who did not report any changes in systemic markers in ventilated and healthy animals, others have observed increased inflammatory cytokines in both BAL and plasma of animals ventilated with similar strategies [9, 14, 48]. Moreover, the development of lung damage has been shown to partly depend on the duration of MV as recently reported by Hegeman et al, [49] whereby neutrophils and macrophage cell counts were reportedly increased after 12 hours compared to 5 hours of MV, and this even using lower tidal volumes. However, inflammatory mediators measured in BAL such as IL-1 β and IL-6 were increased regardless the time duration and strategy of MV. In previously injured lungs, studies reported that VM considerably increased the inflammatory cytokines concentration in the blood suggesting that ventilatory support may play a role in distance on vital organs of the system [11, 50, 51]. Indeed, our results may be explained by the fact that MV- induced inflammation prior to the lungs was probably propagated throughout the bloodstream to finally reach the spinal

cord tissue, even if inflammatory profiles observed in spinal cord tissue were different from those observed in the lungs (results unpublished yet).

Accumulated evidences also report that macrophages population activate the IL-1 β expression in order to promote inflammation or improve neuronal regeneration [23, 52]. Another study recently reported that IL-1 β had contributed to both a classical and alternative activation of macrophages *in vitro* using primary culture [53]. They had determined if IL-1 β had an impact in an experimental spinal cord injured model (T9-T10 transection). To determine a macrophage activating phenotype, they monitored the levels of TNF- α and exposed a primary culture of macrophage from adult mice with IL-4 in the presence or absence of IL-1 β . Therefore, the production of TNF- α was significantly suppressed in the injured tissues of mice treated with IL-1 β , and their locomotor activity was improved. An alternative activation of phenotype characterized by a significant expression of YM1 and arginase-1 markers was also observed after the exposure to the co-treatment with IL-4 and IL-1 β . In the end, they concluded that IL-1 β reduced inflammatory response induced by SCI and has participated in classical and alternative activation of macrophages *in vitro* system. In our *in vivo* model, neither cervical nor thoracic lesion did affect the level of IL-1 β in the spinal cord tissues. However, our findings clearly show that MV induced a significant IL-1 β inhibition (MV-NV versus NL-NL) despite low levels of the cytokine. Further research is required to elucidate this underlying mechanism.

Because inflammation induced by MV is often related to the parameters of respiratory support (Greenfield et al. 1964), we carefully avoided mechanical factors such as excessive stretching of alveoli that might influence changes in inflammatory responses. Peak inspiratory pressure was adjusted constantly between 10 and 12 cm H₂O over 24 hours to obtain a normal expired CO₂ level of 3%. However, the present study knows several limitations including the fact that it should be taken into account that small models of animals may respond differently and have different respiratory mechanisms than humans [54] as well as less resistance to lung injury induced by MV [55]. It may also be possible that experimental design such as duration of ventilation and a relevant range of V_T are restricted to animal situation.

In summary, the present study was able to show for the first time that prolonged MV can upregulate the pro-inflammatory TNF- α cytokine expression in distal tissue of healthy or previously thoracic injured spine, but can also reduce IL-1 β expression in spine of ventilated animals without injury. SCI can also induce pro-inflammatory IL-6 production whereas respiratory support seems to reverse its expression.

Table 1. Effects of SCI and MV on Spine Tissue Cytokines Expression

	Groups							
	MV-NL	MV-CL	MV-TL	1-way ANOVA	NV-NL	NV-TL	2-way ANOVA (lesion)	2-way ANOVA (MV)
IL-10	0.048 (0.012)	0.052 (0.011)	0.054 (0.015)	0.948	0.067 (0.019)	0.098 (0.028)	0.308	0.088
TNF-α	0.033 (0.011)	0.039 (0.007)	0.033 (0.009)	0.853	0.005§ (0.001)	0.002**(0.000)	0.848	0.002
IL-1β	0.006 (0.003)	0.007 (0.002)	0.007 (0.002)	0.940	0.022 § (0.004)	0.011 (0.004)	0.172	0.008
IL-6	0.103 (0.020)	2.110* (0.570)	2.740* (0.520)	0.002	0.023 (0.007)	4.390 (0.660)	<0.001	0.082

Mean values (\pm SEM) of individual rats per group in pg/ug. (A) Interleukin-1 β , (B) TNF- α , (C) Interleukin-10, (D) Interleukin-6; NV: no ventilation; NL: no lesion; MV: mechanical ventilation; TL: thoracic lesion and CL: cervical lesion. *, $P < 0.05$ for post-hoc contrasts (1-way ANOVA) vs. MV-NL; §, $P < 0.05$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA) vs. MV-NL; ||, $P < 0.001$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA) vs. NV-NL and, **, $P < 0.05$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA) vs. MV-TL.

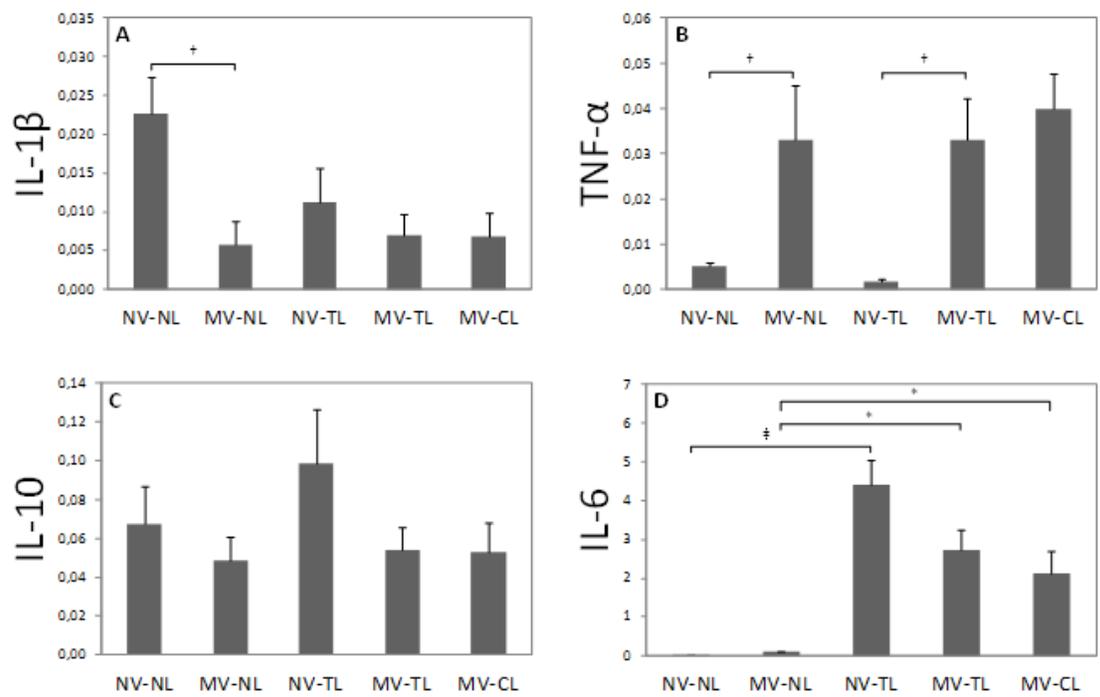


Figure 1. Effects of SCI and MV on Spine Tissue Cytokines Expression. Mean values (\pm SEM) of individual rats per group in pg/ μ g. (A) Interleukin-1 β , (B) TNF- α , (C) Interleukin-10, (D) Interleukin-6; NV: no ventilation; NL: no lesion; MV: mechanical ventilation; TL: thoracic lesion and CL: cervical lesion. *, $P < 0.05$ for post-hoc contrasts (1-way ANOVA); †, $P < 0.05$ and ‡, $P < 0.001$ for post-hoc contrasts (2-way ANOVA).

REFERENCES

1. Krause, J.S. and J.L. Coker, *Aging after spinal cord injury: A 30-year longitudinal study*. J Spinal Cord Med, 2006. **29**(4): p. 371-6.
2. Lee, B.B., et al., *The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate*. Spinal Cord, 2013.
3. Wong, S., Kazuko S and Crew J., *Specialized Respiratory Management for Acute Cervical Spinal Cord Injury: A Retrospective Analysis*. Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation, 2012. **18**(4): p. 283-290.
4. Tremblay, L., et al., *Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model*. J Clin Invest, 1997. **99**(5): p. 944-52.
5. Wolthuis, E.K., et al., *Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice*. Crit Care, 2009. **13**(1): p. R1.
6. Tremblay, L.N. and A.S. Slutsky, *Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside*. Intensive Care Med, 2006. **32**(1): p. 24-33.
7. Caruso, P., et al., *Low tidal volume ventilation induces proinflammatory and profibrogenic response in lungs of rats*. Intensive Care Med, 2003. **29**(10): p. 1808-11.
8. Haitzma, J.J., et al., *Ventilator-induced lung injury leads to loss of alveolar and systemic compartmentalization of tumor necrosis factor-alpha*. Intensive Care Med, 2000. **26**(10): p. 1515-22.
9. Pugin, J., et al., *Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro*. Am J Physiol, 1998. **275**(6 Pt 1): p. L1040-50.
10. Ranieri, V.M., et al., *Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial*. JAMA, 1999. **282**(1): p. 54-61.

11. Slutsky, A.S. and L.N. Tremblay, *Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor?* Am J Respir Crit Care Med, 1998. **157**(6 Pt 1): p. 1721-5.
12. Chiumello, D., G. Pristine, and A.S. Slutsky, *Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome.* Am J Respir Crit Care Med, 1999. **160**(1): p. 109-16.
13. Meduri, G.U., et al., *Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time.* Chest, 1995. **107**(4): p. 1062-73.
14. Ricard, J.D., D. Dreyfuss, and G. Saumon, *Production of inflammatory cytokines in ventilator-induced lung injury: a reappraisal.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(5): p. 1176-80.
15. Copland, I.B., et al., *Early changes in lung gene expression due to high tidal volume.* Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(9): p. 1051-9.
16. Wrigge, H., et al., *Effects of mechanical ventilation on release of cytokines into systemic circulation in patients with normal pulmonary function.* Anesthesiology, 2000. **93**(6): p. 1413-7.
17. Verbrugge, S.J., et al., *Different ventilation strategies affect lung function but do not increase tumor necrosis factor-alpha and prostacyclin production in lavaged rat lungs in vivo.* Anesthesiology, 1999. **91**(6): p. 1834-43.
18. Dreyfuss, D. and J.J. Rouby, *Mechanical ventilation-induced lung release of cytokines: a key for the future or pandora's box?* Anesthesiology, 2004. **101**(1): p. 1-3.
19. Fleming, J.C., et al., *The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury.* Brain, 2006. **129**(Pt 12): p. 3249-69.
20. Gris, D., et al., *Transient blockade of the CD11d/CD18 integrin reduces secondary damage after spinal cord injury, improving sensory, autonomic, and motor function.* J Neurosci, 2004. **24**(16): p. 4043-51.

21. Busch, S.A., et al., *Overcoming macrophage-mediated axonal dieback following CNS injury*. J Neurosci, 2009. **29**(32): p. 9967-76.
22. Noble, L.J., et al., *Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events*. J Neurosci, 2002. **22**(17): p. 7526-35.
23. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
24. Laskin, D.L., *Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces*. Chem Res Toxicol, 2009. **22**(8): p. 1376-85.
25. Bouhy, D., et al., *Delayed GM-CSF treatment stimulates axonal regeneration and functional recovery in paraplegic rats via an increased BDNF expression by endogenous macrophages*. FASEB J, 2006. **20**(8): p. 1239-41.
26. Batchelor, P.E., et al., *Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor*. J Neurosci, 1999. **19**(5): p. 1708-16.
27. Mantovani, A., *Macrophage diversity and polarization: In vivo veritas*. Journal of the American Society of Hematology, 2006. **108**: p. 408-409.
28. Rolls, A., R. Shechter, and M. Schwartz, *The bright side of the glial scar in CNS repair*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(3): p. 235-41.
29. Kigerl, K.A., et al., *Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord*. J Neurosci, 2009. **29**(43): p. 13435-44.
30. Horn, K.P., et al., *Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions*. J Neurosci, 2008. **28**(38): p. 9330-41.
31. Guerrero, A.R., et al., *Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 40.

32. Nakajima, H., et al., *Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury*. J Neurotrauma, 2012. **29**(8): p. 1614-25.
33. Shechter, R., et al., *Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice*. PLoS Med, 2009. **6**(7): p. e1000113.
34. Mosser, D.M., *The many faces of macrophage activation*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 209-12.
35. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
36. Kleinman, L.I. and E.P. Radford, Jr., *Ventilation Standards for Small Mammals*. J Appl Physiol, 1964. **19**: p. 360-2.
37. Dery, M.A., et al., *Atorvastatin prevents early apoptosis after thoracic spinal cord contusion injury and promotes locomotion recovery*. Neurosci Lett, 2009. **453**(1): p. 73-6.
38. Malloy, J., et al., *Alterations of the endogenous surfactant system in septic adult rats*. Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 1): p. 617-23.
39. SPSS Inc., C.S.I., *PASW Statistics for Windows, Version 18.0*. Released 2009.
40. Meduri, G.U., et al., *Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome*. Chest, 1995. **108**(5): p. 1303-14.
41. Hausmann, O.N., *Post-traumatic inflammation following spinal cord injury*. Spinal Cord, 2003. **41**(7): p. 369-78.
42. Van Wagoner, N.J., et al., *Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor*. J Neurosci, 1999. **19**(13): p. 5236-44.
43. Hansson, E. and L. Ronnback, *Glial neuronal signaling in the central nervous system*. FASEB J, 2003. **17**(3): p. 341-8.

44. Giger, R.J., E.R. Hollis, 2nd, and M.H. Tuszynski, *Guidance molecules in axon regeneration*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(7): p. a001867.
45. Stirling, D.P. and V.W. Yong, *Dynamics of the inflammatory response after murine spinal cord injury revealed by flow cytometry*. J Neurosci Res, 2008. **86**(9): p. 1944-58.
46. Pineau, I. and S. Lacroix, *Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved*. J Comp Neurol, 2007. **500**(2): p. 267-85.
47. Hong, C.M., et al., *Systemic inflammatory response does not correlate with acute lung injury associated with mechanical ventilation strategies in normal lungs*. Anesth Analg, 2012. **115**(1): p. 118-21.
48. Vaneker, M., et al., *Mechanical ventilation in healthy mice induces reversible pulmonary and systemic cytokine elevation with preserved alveolar integrity: an in vivo model using clinical relevant ventilation settings*. Anesthesiology, 2007. **107**(3): p. 419-26.
49. Hegeman, M.A., et al., *The extent of ventilator-induced lung injury in mice partly depends on duration of mechanical ventilation*. Crit Care Res Pract, 2013. **2013**: p. 435236.
50. Parsons, P.E., et al., *Elevated plasma levels of soluble TNF receptors are associated with morbidity and mortality in patients with acute lung injury*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(3): p. L426-31.
51. dos Santos, C.C. and A.S. Slutsky, *Mechanotransduction, ventilator-induced lung injury and multiple organ dysfunction syndrome*. Intensive Care Med, 2000. **26**(5): p. 638-42.
52. Gordon, S., *The macrophage: past, present and future*. Eur J Immunol, 2007. **37** **Suppl 1**: p. S9-17.
53. Sato, A., et al., *Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 65.

54. Soutiere, S.E. and W. Mitzner, *On defining total lung capacity in the mouse*. J Appl Physiol, 2004. **96**(5): p. 1658-64.
55. Caironi, P., et al., *Time to generate ventilator-induced lung injury among mammals with healthy lungs: a unifying hypothesis*. Intensive Care Med, 2011. **37**(12): p. 1913-20.