

Université du Québec  
Institut National de la Recherche Scientifique  
Institut Armand Frappier

# **CARACTÉRISATION DES RÉSEAUX DE CELLULES IMMUNES ET DE CYTOKINES AUX NIVEAUX DES PLAIES DES GRANDS BRULÉS**

Par  
Ilona Gdovinova

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de  
Maître en sciences (M.Sc.)

## **Jury d'évaluation**

Président du jury et examineur interne	Cathy Vaillancourt INRS-IAF
Examineur externe	Laurence Rulleau CTI Life Sciences
Directeur de recherche	Jacques Bernier INRS-IAF



## REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Jacques Bernier, qui m'a accueillie dans son laboratoire ainsi que pour son travail rigoureux et l'accompagnement pendant mon projet bien défini. Il m'a permis d'acquérir une bonne formation dans le domaine de l'immunologie.

Je voudrais remercier mon mari Olivier pour ces conseils, le soutien et l'encouragement qu'il m'a offerts tout au long de ce projet.

Je remercie tous les étudiants qui ont travaillé avec moi dans le laboratoire : Bruno, Marie-Noël, Guillaume et Merve pour leurs conseils et leur agréable présence.

Finalement, je voudrais dire merci à INRS Institut Armand-Frappier pour le soutien financier que j'ai reçue, il m'a permis de me consacrer entièrement à mes études tout au long de ma maîtrise.





## RÉSUMÉ

Le traitement des brûlures graves représente un problème important à travers le monde entier. Les complications dues à des infections sont une cause majeure de mortalité chez les grands brûlés, comprenant approximativement 75 % de tous les décès survenant après avoir reçu des premiers soins. La brûlure est caractérisée par des désorganisations physiologiques telles que métaboliques, hormonaux et par une réponse inflammatoire systémique forte. Suivant cet état de réponse exagérée du système immunitaire, il y a une réponse anti-inflammatoire qui va permettre à l'organisme de compenser et de retrouver un état d'équilibre. Des cytokines et des cellules immunitaires régulatrices seraient les responsables de l'immunoactivation suivie par l'immunosuppression. Cette immunosuppression augmente par la suite la probabilité de risque des infections, non seulement par les pathogènes, mais aussi par des organismes qui ne sont normalement pas dangereux pour des hôtes en bonne santé.

La majorité des études sur les cellules immunitaires ou sur les cytokines ont porté sur les cellules ou cytokines circulant dans le sang. L'objectif de ce projet est d'analyser les perturbations au niveau de plaie, plus particulièrement au niveau du derme profond.

Dans un premier temps, des biopsies ont été prélevées chez des grands brûlés au niveau de la plaie. Les populations de cellules immunes ont été analysées afin de déterminer la proportion de cellules régulatrices et suppressives. Dans un deuxième temps, une analyse des gènes exprimés par ces cellules immunes au niveau de la plaie a permis d'établir leur fonctionnalité et le type de cytokines qu'elles produisent. Dans un troisième temps, la présence de cytokines inflammatoires a été déterminée à l'aide de micropuces d'anticorps à partir d'extraction protéique de peaux brûlées ainsi que dans les plasmas des patients.

L'analyse de nos résultats de PCR démontre une expression importante de plusieurs gènes impliqués dans la modulation de l'immunité inflammatoire et dans l'induction de l'apoptose. Nous avons également observé l'expression des gènes impliqués dans l'immunosuppression. L'analyse de 20 cytokines dans le sang et 40 cytokines dans la peau humaine issus de nos 6 patients brûlés a globalement démontré un fort profil inflammatoire. Il a été également démontré dans ce projet que les concentrations de certaines cytokines sont très importantes au niveau de la plaie immédiatement après la brûlure, tandis que les concentrations de ces cytokines au niveau de la circulation sanguine augmentent graduellement à partir de jour 4 ou 7. Ces résultats nous suggèrent la migration de ces cytokines de la plaie vers la circulation sanguine. Nos résultats supportent l'hypothèse que le développement du syndrome de la réponse inflammatoire systémique prend naissance au niveau de la plaie brûlée.

Une meilleure connaissance des changements immunitaires au niveau de la plaie permettra de développer de nouvelles thérapies ciblées afin de diminuer les séquelles de brûlures graves sur le système immunitaire.



# TABLE DES MATIÈRES

<b>1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVUE DE LA LITTERATURE ET PROJET D'ETUDE.....</b>	<b>3</b>
2.1	LA PEAU HUMAINE ET LA DEFENSE IMMUNITAIRE .....	3
2.2	LA REPONSE IMMUNITAIRE AU NIVEAU DE LA PEAU .....	4
2.3	LA REPONSE INFLAMMATOIRE AU NIVEAU DE LA PEAU.....	5
2.4	LA PHYSIOLOGIE DE LA BRULURE .....	6
2.4.1	<i>Le SRIS et CARS</i> .....	6
2.5	LA BRULURE ET LA REPONSE IMMUNITAIRE .....	8
2.5.1	<i>L'effet de la brûlure sur la réponse non spécifique.</i> .....	9
2.5.2	<i>L'effet de la brûlure sur la réponse spécifique</i> .....	21
2.6	PROJET D'ETUDE .....	36
<b>3</b>	<b>ARTICLE SCIENTIFIQUE .....</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>REFERENCES.....</b>	<b>71</b>



## **LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU 1 : TOLL-LIKE RÉCEPTEUR EXPRIMÉ SUR LA CELLULE IMMUNITAIRE (CHEN & DIPIETRO, 2017)..... 18



## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : SCHÉMA DE LA STRUCTURE DE LA PEAU HUMAINE ET DES TYPES DE CELLULES. ....	4
FIGURE 2 : LE SRIS ET LE CARS .....	8
FIGURE 3: L'ACTIVATION DU SYSTÈME DU COMPLÉMENT .....	11
FIGURE 4 : LE RECEPTEUR TLR4.....	19
FIGURE 5 : ACTIVATION DE LA VOIE CANONIQUE DE SIGNALISATION DE NF-KB (ASEHNOUNE <i>ET AL.</i> , 2012) .....	21
FIGURE 6 : LA CELLULE PRÉSENTATRICE ANTIGÈNE (CPA) ET LA CELLULE T CD4+ .....	22
FIGURE 7 : LES PROGÉNITURES DE CELLULES DENDRITIQUES .....	23
FIGURE 8 : LES DIFFÉRENTES SOUS-CLASSES D'IMMUNOGLOBULINE .....	25
FIGURE 9 : LE RECEPTEUR TCR .....	28
FIGURE 10 : LA RENCONTRE ENTRE LE LYMPHOCYTE T ET LA CELLULE PRÉSENTATRICE ANTIGÈNE (CPA). .....	29
FIGURE 11 : SOUS-TYPES DE LYMPHOCYTES T CD4+ MATURES.....	31
FIGURE 12 : LE RÉSUMÉ DE L'ACTIVATION COMPLEXE DU SYSTÈME IMMUNITAIRE SUITE À L'AGRESSION TISSULAIRE (LA BRÛLURE) ET SES EFFETS SUR LA RÉPONSE IMMUNITAIRE INNÉE, SPÉCIFIQUE, LA RÉPONSE CELLULAIRE ET HUMORALE (O'SULLIVAN & O'CONNOR, 1997).....	35





## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac :	Anticorps
ADN :	Acide désoxyribonucléique
Ag :	Antigène
ARN :	Acide ribonucléique
BCR :	Récepteurs des cellules B
CARS :	Réaction anti-inflammatoire compensatoire
Caspase :	Cystéine aspartate protéase
CCR :	Récepteur cellulaire à chimiokines
CD :	Classe de différenciation cell.
. CD4+	cell. exprimant la molécule CD4
. CD8+	cell. exprimant la molécule CD8
CCL5 :	Chemokine (C-C motif) ligand 5
CCL20 :	Chemokine (C-C motif) ligand 20
CLR :	C-type Lectine Receptor
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX :	Cyclo-oxygénase
CPA :	Cellule Présentatrice d'Ag
CR :	Récepteur aux protéines du complément
CRP :	La protéine C-réactive
CXCL1 :	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
DAMP :	Motif moléculaire associé aux dégâts cellulaires
DN :	Double négatif
DP :	Double positif
DPT :	Des brûlures profondes de la plaie
GATA3 :	Facteur de transcription reconnaissant la séquence tétranucléotide GATA
GM-CSF :	Facteur de stimulation de colonies des granulocytes et macrophages
GSH :	Glutathion
HLA :	Antigènes des leucocytes humains
ICAM-1 :	Molécule d'adhésion intracellulaire
IFN :	Interféron
Ig :	Immunoglobuline
IKK :	Inhibiteur kinase de facteur nucléaire $\kappa$ B
IL —:	Interleukine (cytokine)
IL —R :	Récepteur à l'IL-
ITAM :	Motif d'activation de tyrosines
ITIM :	Motif d'inhibition de tyrosines
JAK1 :	Janus kinase 1
LPC :	Complexe lipidique protéique
LPS :	Lipopolysaccharides
MAPK :	Protéine kinase activée par des mitogènes
MASP :	Mannan- associated serine protease
MBL:	Mannan binding lectin
MIP-2:	Macrophage inflammatory protein 2
MODS :	Dysfonctionnement multiple des organes
MyD88 :	Myéloïde différenciation primary-response protein 88
NF- $\kappa$ B :	Facteur nucléaire $\kappa$ B
NK :	Natural killer

NOD :	Nucleotide oligomerization domain
PAMS :	Récepteur de reconnaissance de pathogène
PCR :	Réaction d'amplification en chaîne par la polymérase
PLA :	Phospholipase A
PLC :	Phospholipase C
PMN :	Leucocytes polymorphonucléaires
PNN :	Polymorphonucléaires neutrophile
SAA :	Protéine sérique amyloïde
SPT :	Des brûlures superficielles de la plaie
SRIS :	Syndrome d'une réponse inflammatoire systémique
STAT :	Signal transducteur et activateur de transcription-1
T :	Lymphocyte T
TCR :	Récepteurs d'Ag des cellules T
TGF :	Facteur de croissance transformant
TIR :	Toll IL-1 récepteur
TLR :	Récepteur à Toll (Toll-like receptor)
Th :	T auxiliaires
TNF :	Facteur de nécrose des tumeurs
T rég :	Lymphocytes T régulateurs

# 1 INTRODUCTION

Près de 85 % des décès chez les grands brûlés sont attribués à une septicémie ou au syndrome de dysfonction d'organe multiple (MODS). Les traumatismes reliés aux brûlures déséquilibrent les mécanismes de défense de l'hôte contre les microorganismes. L'immunosuppression qui survient après la brûlure augmente la sensibilité aux infections opportunistes.

En effet, les brûlures sévères causent des perturbations hormonales, métaboliques, circulatoires et immunologiques (Wolfe, 1996). On considère un patient comme un grand brûlé lorsque TBSA (*Total Body Surface Area*) de la brûlure dépasse 20 %. Les brûlures de la peau peuvent être provoquées par des agents thermiques, des agents chimiques ou de type électrique. La sévérité pour l'organisme dépend de la profondeur de la brûlure déterminée par le temps d'exposition et aussi de son étendue. Les brûlures dont l'étendue ne dépasse pas les 20 % de TSA produisent essentiellement une réaction inflammatoire locale. Cependant, les brûlures dont l'étendue dépasse les 20 % de la surface corporelle totale produisent à la fois une réaction inflammatoire locale et une réaction inflammatoire systémique. La réponse inflammatoire après la brûlure est très intense et prolongée (Kearns *et al.*, 2013).

Une brûlure de 1<sup>er</sup> degré comprend une atteinte de l'épiderme superficiel caractérisée par la douleur, la rougeur et la chaleur. Une brûlure de 2<sup>e</sup> degré superficiel comprend la destruction de l'épiderme avec une grande sensibilité et une couleur très rouge. Une brûlure de 2<sup>e</sup> degré profond comprend la destruction de l'épiderme basal et une partie du derme. La sensibilité est perdue et la couleur caractéristique pour ce tissu est plutôt blanche. La brûlure de 3<sup>e</sup> degré est caractérisée par la destruction complète de la peau et de tissus sous-cutanés avec une absence de la sensibilité et la présence de la nécrose (Kearns *et al.*, 2013). Chez les grands brûlés, les trois degrés de brûlure existent bien que la brûlure au troisième degré soit prédominante. Les brûlures sont associées à des déséquilibres importants au niveau physiologique, immunologique, anatomique ainsi qu'au niveau des fonctions endocrinologiques. Les plaies causées par brûlure sévère sont caractérisées par une perte importante de fluides suivis par le relâchement fort de médiateurs inflammatoires (Kearns *et al.*, 2013).



## 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE ET PROJET D'ÉTUDE

Dans ce chapitre, une revue sera effectuée sur les connaissances actuelles des effets impliqués dans des brûlures sévères au niveau de la réponse immunitaire, de la réponse inflammatoire et des cellules qui jouent le rôle majeur dans ses évènements.

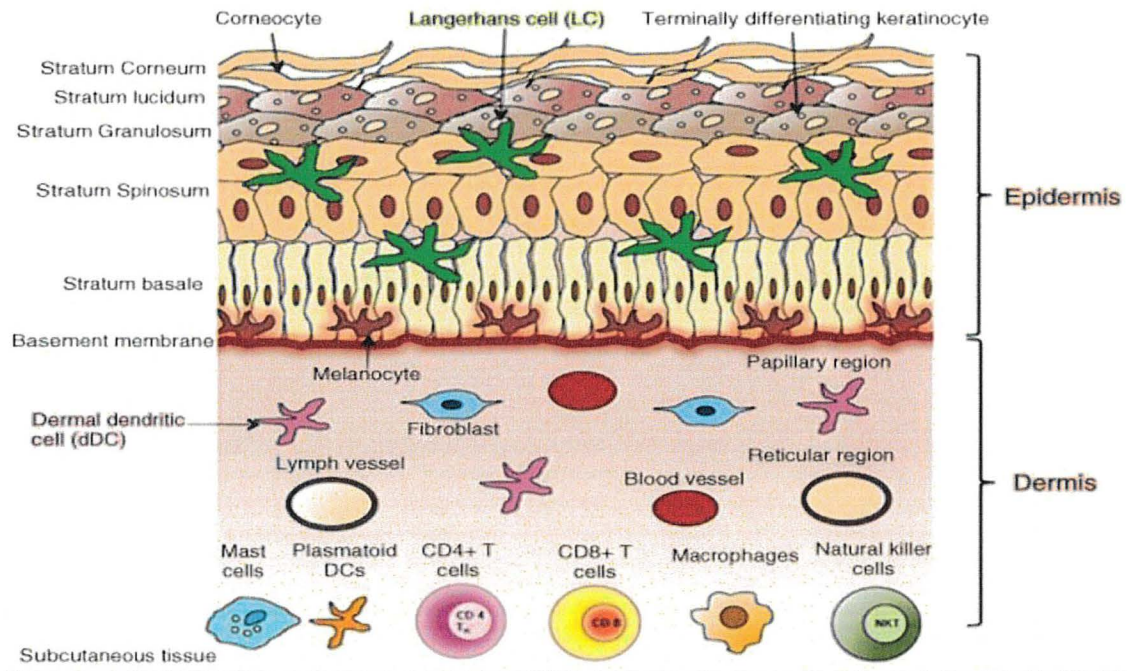
### 2.1 La peau humaine et la défense immunitaire

La peau humaine est un épithélium stratifié qui est composé de l'épiderme et du derme. La partie supérieure, l'épiderme, est principalement composée de kératinocytes. Les kératinocytes subissent une différenciation pour former la couche de stratum spinosum, stratum granulosum et stratum corneum. Dans l'épiderme, on trouve également des mélanocytes, responsable de produire la mélatonine. On y trouve également de nombreuses cellules immunitaires de la famille de monocytes, par exemple les cellules de Langerhans (Shimada & Katz, 1988). Au niveau de l'épiderme, les cellules de Langerhans représentent les principaux acteurs pouvant capter un corps étranger afin de stimuler ou inhiber la réponse immunitaire (Romani *et al.*, 2012).

Le derme est une couche très riche en tissu conjonctif et il est divisé en région papillaire et réticulaire. Les cellules résidentes sont majoritairement des fibroblastes qui élaborent et sécrètent du collagène et d'autres molécules de matrice extracellulaire qui fournissent une résistance mécanique importante de la peau. Dans le derme, on trouve également les adipocytes qui jouent un rôle de la protection ainsi que de l'isolation thermique. Parmi des cellules immunitaires, on trouve les macrophages, les mastocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4+, les lymphocytes T CD8+, les cellules T régulatrices (Trég) et les lymphocytes tueurs naturels (NK). Des glandes sudoripares, des nefs et des vaisseaux sanguins et lymphatiques font aussi une partie indispensable et vitale du derme (Nestle *et al.*, 2009) (voir **Figure 1**).



Figure 1 : Schéma de la structure de la peau humaine et des types de cellules.



Dans l'épiderme, on y trouve des cellules kératinocytes puis les cellules de Langerhans qui jouent un rôle important dans la réponse immunitaire. Le derme est constitué majoritairement par les fibroblastes, mais c'est aussi le lieu abritant de nombreuses cellules immunitaires comme des cellules dendritiques, les mastocytes, les macrophages, les lymphocytes T et les cellules NK (Nestle et al., 2009).

## 2.2 La réponse immunitaire au niveau de la peau

La peau est l'un des plus grands organes du corps et possède des fonctions très diversifiées, comme par exemple, être une ligne de défense contre l'environnement externe et les tissus internes, et l'un des rôles de la peau est d'assurer une fonction immunitaire (Valladeau & Saeland, 2005).

Le système immunitaire joue un rôle dans la défense d'un organisme contre des agents étrangers qui sont susceptibles de menacer le bon fonctionnement de l'organisme vivant ou sa survie. La réponse immunitaire est un mécanisme de défense de l'organisme qui est capable de discriminer le soi du non-soi. Ces mécanismes sont devenus de plus en plus complexes au cours de l'évolution des espèces pour pouvoir combattre des agents pathogènes évoluant également. Parmi ces agents pathogènes, on compte les parasites, les bactéries, les virus, mais aussi les cellules tumorales. Deux types de réponses immunitaires sont en jeu. La réponse immunitaire innée qui est immédiate et la réponse immunitaire

adaptative qui est tardive. La défense de l'organisme vivant est basée sur un principe d'une action de collaboration mutuelle entre l'immunité innée non spécifique et l'immunité adaptative spécifique (Fearon & Locksley, 1996).

La couche la plus superficielle de la peau, l'épiderme, forme la première barrière immunitaire contre l'invasion des pathogènes. Au cours des 30 dernières années, de nombreuses études ont démontré l'importance de l'épiderme comme un organe immunitaire (Sauder, 1983). Il s'agit d'un tissu hétérogène qui contient des cellules qui jouent un rôle très important dans la régulation des réponses immunitaires. Aujourd'hui on considère l'épiderme en tant qu'organe immunologiquement actif. Le derme, séparé de l'épiderme par la membrane basale, soutient le réseau vasculaire qui apporte à l'épiderme non vascularisé des nutriments nécessaires (Valladeau & Saeland, 2005).

Les cellules immunitaires dans la peau sont réparties sur les deux côtés de la membrane basale et jouent un rôle important dans la défense contre les agents pathogènes à travers des cellules présentant des antigènes (Bogunovic *et al.*, 2006). La peau humaine saine est caractérisée par une très grande diversité de cellules immunitaires. Les cellules dendritiques et les macrophages résidant dans la peau détectent les agents pathogènes envahissants et servent de sentinelles, ce qui modifie par la suite les activités du système immunitaire inné et adaptatif en danger potentiel pour l'homme (Nestle & Nickoloff, 2007).

### **2.3 La réponse inflammatoire au niveau de la peau**

La réponse inflammatoire est activée suite à une blessure telle que la brûlure sévère pour restaurer les dommages causés par le traumatisme. Suite à la brûlure, on observe l'apparition de la réponse inflammatoire aiguë qui déclenche une orchestration complexe d'événements impliquant la perte d'eau, de sel et de protéines du compartiment vasculaire et l'activation des cellules endothéliales. La réponse inflammatoire aiguë est définie comme une série des réactions qui peuvent survenir dans les premières heures suivant la blessure. La première caractéristique de cette réponse est l'adhérence des neutrophiles (leucocytes polymorphonucléaires, PMN) à l'endothélium vasculaire (margination). Par la suite, les cellules endothéliales commencent à exprimer sur leur surface des molécules d'adhésion de survie des interactions adhésives entre les leucocytes et l'endothélium vasculaire. Les cellules endothéliales activées participent également à la génération et à la libération de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines qui attirent et activent des cellules



immunitaires. Il y a également une activation de nombreux facteurs anti-inflammatoires naturels tels que les cytokines l'interleukine 4 (IL-4), l'interleukine 10 (IL-10) et l'interleukine 12 (IL-12) qui bloquent la réponse inflammatoire en inhibant l'activation de facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Roumen *et al.*, 1995). Toutes ces réactions sont orchestrées par un réseau de cytokines, les molécules protéiques qui agissent de façon paracrine ou autocrine avec des effets multiples dans la communication et la coordination entre les cellules de système immunitaire. Le facteur de nécrose tumorale (TNF $\alpha$ ) est considéré comme l'une des cytokines essentielles de la réaction inflammatoire, avec l'interleukine 1 (IL-1) et l'interleukine 8 (IL-8, CXCL8). Les kératinocytes présents dans la peau sont également capables de sécréter une grande variété de cytokines (Griswold, 1993).

## 2.4 La physiologie de la brûlure

### 2.4.1 Le SRIS et CARS

Les décès immédiats dus aux traumatismes sont en général attribuables à une perte de sang importante, tandis que la mortalité tardive est causée par l'échec de la défense de l'organisme (Keel & Trentz, 2005). Tout d'abord, on observe l'hypoxie et la fracture dans les organes internes, par la suite l'ischémie et la mise en place des infections induites par la réponse de défense du patient. Cette étape est caractérisée par la sécrétion locale et systémique des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des métabolites d'acides arachidoniques, des protéines de système de coagulation et des facteurs de complément et aussi les médiateurs hormonaux. Cette étape est définie comme le syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SRIS). Pendant cette phase, la région du traumatisme représente un environnement favorable à l'activation non spécifique de plusieurs types cellulaires du système immunitaire. Ce SRIS est un problème grave chez les grands brûlés. En parallèle, des médiateurs anti-inflammatoires sont produits. Il s'agit d'une réaction anti-inflammatoire compensatoire (CARS) pour maintenir l'équilibre immunologique (voir **Figure 2**). Cette réaction anti-inflammatoire compensatoire peut devenir exagérée et rendre le patient vulnérable aux infections nosocomiales ou secondaires. Un déséquilibre de ces deux réponses semble être responsable d'un dysfonctionnement des organes et d'une susceptibilité importante aux infections nosocomiales. Les dommages des cellules endothéliales ainsi que l'accumulation des leucocytes et la perturbation de la microcirculation mènent à l'apoptose cellulaire ainsi qu'à la nécrose de cellules. Par conséquent, on observe



chez les patients le développement de syndrome qui est caractérisé par dysfonctionnements multiples des organes (MODS) (Bone, 1996a).

Les dommages tissulaires suite au traumatisme déclenchent la production importante de cytokines pro-inflammatoires ainsi que des phospholipides dans la circulation locale et systémique. Il y a plusieurs cellules immunitaires qui sont impliquées comme les monocytes, les macrophages, les leucocytes (PMN), macrophages tissulaires et les lymphocytes NK (Keel & Trentz, 2005).

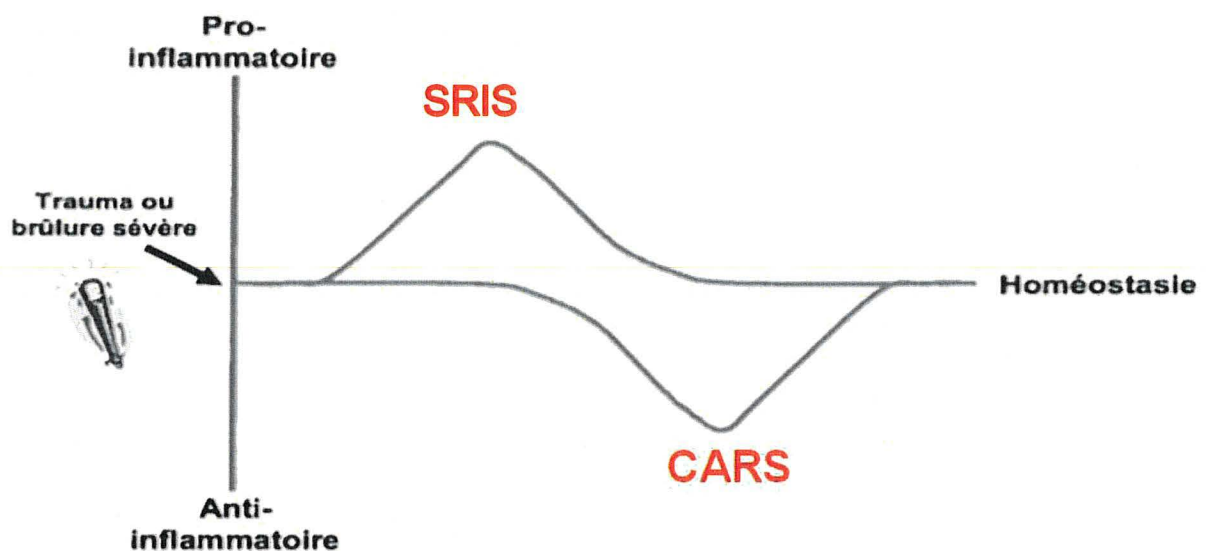
Les premières cytokines pro-inflammatoires produites sont le TNF $\alpha$  et l'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ ). Il y a aussi des cytokines pro-inflammatoires dites tardives telles que l'interleukine 6 (IL-6) ou l'IL-8 ainsi que l'IL-12, l'interleukine 18 (IL-18) et l'interféron gamma (INF- $\gamma$ ) (Bone, 1991a). Les cytokines pro-inflammatoires activent le recrutement de PMN, les cellules immunitaires de la première lignée de défense. Ces cellules PMN relâchent les protéases ainsi que radicaux libres dans le milieu. De plus, ces cellules sont sous l'influence de colony-stimulating factor tels que les granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) ou les macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) qui ont pour le but d'activer la fonction de monocytes ainsi que de granulocytes et en même temps réduire l'apoptose cellulaire pendant la septicémie (Brach *et al.*, 1992).

L'hypoxie et les dommages mécaniques cellulaires suite au traumatisme sont responsables de l'augmentation de niveau de calcium intracellulaire avec l'activation des enzymes telles que les phospholipases A et C (PLA2 et PLC) (Bone, 1991b). Ces enzymes sont responsables de la catalyse des membranes phospholipidiques cellulaires. Le résultat de ces catalyses est le relâchement de l'acide arachidonique à partir de membrane cellulaire. Ces métabolites relâchés recrutent par la suite les cellules immunitaires impliquées dans la réponse inflammatoire (Rose & Marzi, 1996).

La forte production des cytokines inflammatoires conduit à la production des médiateurs anti-inflammatoires. Les lymphocytes T et les macrophages produisent les interleukines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13 ou transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) (Collighan *et al.*, 2004). Les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou l'IL-13 agissent en diminuant la production des autres cytokines et du TNF- $\alpha$ . Cette contre-régulation met aussi en jeu des protéines comme l'ubiquitine, produite après traumatisme ou brûlure qui vise également à limiter l'action des cytokines pro-inflammatoires (Majetschak *et al.*, 2008). Le niveau très élevé de l'IL-10 est lié aux complications post-traumatiques telle que la septicémie ou MODS (Hensler *et al.*, 2002). Il semble que l'interleukine 10 diminue l'activité de facteur

de transcription nucléaire factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) qui est essentiel pour la synthèse des cytokines pro-inflammatoires (Cassatella *et al.*, 1993). Il a été également observé un niveau très élevé de TNF- $\alpha$ , responsable de l'activation de l'apoptose (Alderson *et al.*, 1995). Cette réaction anti-inflammatoire est responsable de l'immunosuppression post-traumatique et l'augmentation de la probabilité de l'apparition de septicémie. Pour pouvoir réduire le taux de mortalité pendant la phase post-traumatique du CARS, il est nécessaire d'intervenir très rapidement après le traumatisme pour empêcher l'effondrement du système immunitaire. Cependant, il faut prendre en considération que le système immunitaire et les cytokines qu'il libère forment un réseau complexe et spécifique qui est à la fois propre à chaque individu en raison du polymorphisme génétique (Bone, 1996a).

Figure 2 : Le SRIS et le CARS



Syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SRIS) est la réaction anti-inflammatoire compensatoire (CARS) après la brûlure sévère.

## 2.5 La brûlure et la réponse immunitaire

La brûlure sévère a des conséquences très intenses et prolongées sur la réponse immunitaire. Suite à la brûlure, la barrière protectrice de la peau est perdue. Cet état favorise le surgissement des infections suivi par la dépression immunitaire (O'Sullivan & O'Connor, 1997). Comme mentionné plus haut, on peut observer un déséquilibre entre la réponse pro-

inflammatoire et l'inflammatoire qui est associée à l'apparition des maladies nosocomiales et la septicémie. La réaction anti-inflammatoire compensatoire mène vers cette immunosuppression qui contribue aussi à l'apparition des infections. L'immunosuppression suite à la brûlure est caractérisée par la diminution de la capacité de cellules immunitaires à produire des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8 et les interférons en réponse aux endotoxines (Kondo *et al.*, 2012). Les effets néfastes de la brûlure modifient la mise en place de la réponse immunitaire non spécifique ainsi que la réponse immunitaire spécifique dans l'ensemble de ses fonctions

### 2.5.1 L'effet de la brûlure sur la réponse non spécifique.

Le système du complément est l'un des éléments du système immunitaire non spécifique et fait partie de la réponse humorale. Il complémente l'action des anticorps. Il s'agit de mécanisme de défense qui intervient dans la destruction des agents pathogènes, dans l'élimination des complexes immuns, dans la modulation des réponses immunitaires spécifiques et aussi dans le contrôle des réponses inflammatoires. Le système de complément est un ensemble de 35 protéines qui circulent dans le plasma sanguin (Haeney, 1998).

Le complément peut s'activer par la reconnaissance d'anticorps, on parle de la voie classique. Il peut aussi s'activer en l'absence d'anticorps et on parle de la voie alterne ou des lectines. La mise en place de ses voies entraîne des cascades d'activation par les protéolyses successives de protéines plasmatiques. L'activation par la voie classique est initiée par la fixation de la première protéine du complément, C1q à un de ses ligands. Cette activation fait intervenir un complexe macromoléculaire qui est composé de trois protéines : C1q (la protéine de reconnaissance) qui est associée à deux serines estérases C1r et C1s. Cette fixation déclenche l'autoactivation de C1r, qui clive et active C1s. Le C1s une fois activé clive ensuite le composant C4 qui est présent dans le plasma en un petit fragment C4a, qui est libéré en phase fluide, et un fragment C4b, qui se fixe à la surface de cible de l'activation. Le composant C2 qui circule dans le plasma, peut s'associer au C4b clivé par C1s en un fragment C2a. Le fragment C2a reste associé à C4b tandis qu'un fragment C2b est libéré en phase fluide. Toute cette cascade résulte la formation du complexe C4b2a, appelé C3 convertase classique qui possède la capacité de cliver C3.



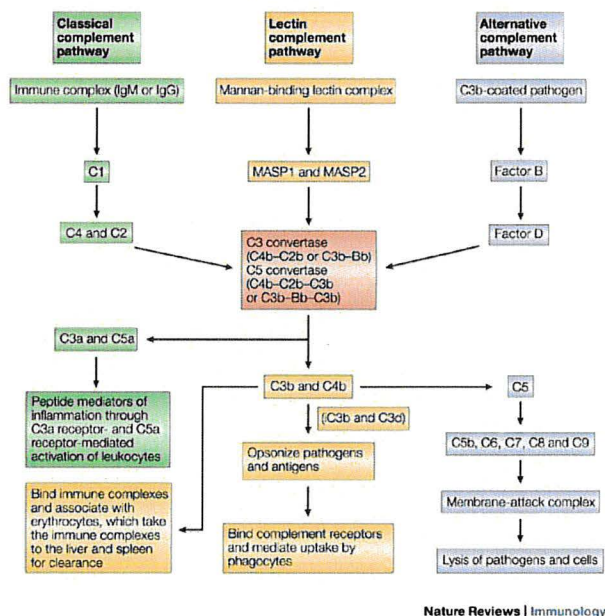
La voie des lectines est activée par les structures carbohydrates des micro-organismes. La protéine de reconnaissance est la protéine MBL (Mannan Binding Lectin) et est associée à des serines estérase MASP 1, 2, 3 (Mannan-Associated serine Protease) qui présentent une homologie avec C1s et C1r. Une fois activées, les MASP sont capables de cliver les protéines C4 et C2 et participent ainsi à la formation d'une C3 convertase qui est identique à celle formée par la voie classique.

La voie alterne est activée par des substances d'origine bactérienne comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives, mais aussi par des substances issues des bactéries Gram positives ou des virus. Les interactions des protéines de cette voie alterne aboutissent également à la formation de la C3 convertase (Haeney, 1998).

À l'issue des 3 voies d'activation, on peut former deux C3 convertases. La C3 convertase classique et la C3 convertase alterne. Ces deux complexes moléculaires ont une même activité enzymatique qui clive de la protéine C3 en C3a et C3b. La protéine C3a est une petite molécule qui se fixe aux mastocytes. Cette molécule possède des activités biologiques importantes dans la réaction inflammatoire. Elle fait partie des anaphylatoxines. La molécule C3b adhère à la cible (la cellule pathogène). Ainsi recouverte, la cellule cible peut être fixée aux cellules qui possèdent le récepteur pour C3b (C3bR), ce qui facilite la phagocytose de cette cellule cible. L'association des C3 convertases avec des molécules de C3b peut changer leur affinité pour le substrat et leur attribuer ainsi une activité C5 convertase. La C3 convertase clive ensuite C5 en un petit fragment C5a qui se fixe aux mastocytes et les active et en un fragment C5b qui adhère à la cellule cible et permet ainsi l'activation successive des facteurs C6, C7 et C8. Le complexe ainsi formé catalyse la polymérisation du facteur C9 dans la membrane de la cellule cible. Ce complexe lytique forme un trou qui permet l'entrée d'eau et de sodium responsable de la lyse osmotique de cette cellule cible pathogène (Haeney, 1998) (voir **Figure 3**).

Suite à la présence de cellule pathogène dans l'organisme le système du complément s'active. Par la suite, il y a également une augmentation de la perméabilité de vaisseaux sanguins. Cette perméabilité résulte par la suite une attirance pour des leucocytes et leur mobilisation au site de l'inflammation pour augmenter la phagocytose et la lyse des cellules étrangères (Haeney, 1998).

Figure 3: L'activation du système du complément



### Conséquences biologiques de l'activation du système du complément

Suite à la brûlure, il a été observé une diminution de l'expression des récepteurs pour l'anaphylatoxine C5a présents à la surface des cellules immunitaires (Nelson *et al.*, 1987). Le C5a est un puissant agent chimiotactique pour les neutrophiles, mais aussi pour les monocytes. Quand le C5a est relâché au niveau du tissu agressé, cela provoque la libération d'histamine par les mastocytes et la libération d'enzymes hydrolitiques par les neutrophiles et favorise la phagocytose. Les propriétés de l'anaphylatoxine peuvent être partiellement inhibées après le clivage de l'arginine carboxy-terminal par une carboxypeptidase sérique. L'anaphylatoxine C5a exerce ses effets biologiques par liaison à un récepteur spécifique, le C5aR, présents à la surface des polynucléaires et des monocytes (Haeney, 1998). L'activation de la cascade du complément suite à la brûlure est probablement le facteur primaire dans la régulation négative des récepteurs C5a (Nelson *et al.*, 1987).

L'immunité innée a été longtemps considérée comme un système capable de fournir une défense rapide antimicrobienne et incomplète jusqu'à ce que la réponse immunitaire adaptative plus lente soit mise en place. Il est maintenant admis que l'immunité innée peut avoir un rôle plus spécifique et synergique dans la détermination des antigènes auxquels le système immunitaire adaptatif donne par la suite sa réponse (Fearon & Locksley, 1996). L'immunité innée implique plusieurs types de cellules tels que les neutrophiles, les

éosinophiles, les monocytes et les cellules dendritiques afin d'assurer la première ligne de défense de l'organisme.

Les neutrophiles sont des cellules qu'on trouve en grand nombre dans la circulation sanguine pendant une infection. Ils possèdent la capacité de répondre rapidement aux différents stimulateurs chimiotactiques. Les neutrophiles contiennent dans le cytoplasme des granules qui jouent un rôle fondamental dans la phagocytose. Pendant la phagocytose, la membrane du neutrophile englobe la particule étrangère qui peut être recouverte d'anticorps ou de composantes du système du complément et la vacuole va se former (phagosome) (Revillard, 1995). La phagocytose est un processus d'ingestion de particule étrangère par l'invagination de la membrane plasmique et elle se produit lorsque les pathogènes se lient aux récepteurs à la surface des phagocytes. Cette étape induit le changement de la structure tridimensionnelle en induisant l'inclusion pathogène dans la cellule. Chaque cellule comporte un compartiment de phagocytose (phagosome), dans lequel la particule phagocytée est stockée. Ensuite, il y a une fusion cellulaire avec un lysosome pour former un phagolysosome. Dans ce phagolysosome les enzymes contenues dans les granules se déversent pour s'attaquer au pathogène. Ces enzymes possèdent l'action bactéricide et digestive pour éliminer la particule étrangère (Revillard, 1995). Les neutrophiles sécrètent aussi les chimiokines qui sont responsables de l'attraction des autres cellules immunitaires au site d'infection. Selon le type de stimulation, les neutrophiles peuvent produire de l'IL-1, du TNF- $\alpha$ , de l'IL-8. L'interleukine 1 affecte presque tous les types cellulaires (Griswold, 1993). Le facteur de nécrose tumorale alpha permet d'initier une cascade d'événements qui sont responsables de recrutement ainsi que de l'activation de cellules inflammatoires grâce à l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium et par la production de médiateurs inflammatoires tels que les prostaglandines (PGE2) (Revillard, 1995). L'interleukine 8 (CXCL8) est une chimiokine produite par les neutrophiles qui induit chez ces cellules un changement de forme ainsi que la migration et la dégranulation (Baggiolini *et al.*, 1994).

Chez les patients brûlés, on observe un déséquilibre important au niveau de la réponse immunitaire non spécifique causée par la perturbation de la fonction des neutrophiles. Il s'agit d'une augmentation forte et rapide du nombre de neutrophiles dans la circulation sanguine suite à la brûlure sévère (Griswold, 1993). On observe aussi la modification des récepteurs à la surface des neutrophiles pour les molécules chimioattractrices ce qui résulte l'augmentation d'adhérence endothéliale de ces cellules bien avant d'arriver dans la plaie de la brûlure. De plus, on observe la formation d'amas de cellules et l'obstruction de vaisseaux sanguins ce qui



va générer une diminution de la quantité de neutrophiles disponibles pour la défense immunitaire non spécifique (Griswold, 1993). Il a été démontré qu'il y a une perturbation de la fonction de neutrophiles périphériques du sang non seulement juste après la brûlure, mais aussi plusieurs mois après ce traumatisme (Griswold, 1993). Au moment d'une brûlure sévère, il a été observé une augmentation significative de l'activité hydrolytique des enzymes de neutrophiles qui est suivie par la diminution de cette activité. Cet état rend les neutrophiles inaptes à éliminer les organismes phagocytés (Griswold, 1993). Des études ont démontré que les neutrophiles ont la capacité de produire une variété de cytokines suite à la brûlure. Les médiateurs lipidiques produits par les neutrophiles sont issus du métabolisme de l'acide arachidonique provenant des membranes cellulaires. C'est grâce à l'enzyme la phospholipase A2 (PLA2) qui est activée via la stimulation par le TNF $\alpha$ , que les acides gras de la membrane plasmique sont transformés en prostaglandines et d'autres composés lipidiques (Revillard, 1995). Ces composés sont chimiotactiques pour les neutrophiles et les macrophages, et induisent l'augmentation de la dilatation des vaisseaux ainsi que leur perméabilité pour faciliter l'arrivée des leucocytes sur le site de l'inflammation (Revillard, 1995). La voie métabolique de la COX (cyclo-oxygénase inductible) aboutit à la formation de PGE2 et de thromboxanes (TXA2) (St-Onge *et al.*, 2007). Il a été constaté que les neutrophiles de souris saines expriment un faible taux de protéine COX, tandis que chez les souris brûlées l'expression de COX a d'abord significativement augmenté après 4 heures suivant la brûlure. Ensuite, il y a une diminution significative de l'expression de cette protéine COX 36 heures plus tard suivant la brûlure. Compte tenu des effets immunomodulateurs de la PGE2, soit l'inhibition de la production d'anions superoxydes, la dégranulation et la synthèse de cytokines, la diminution de l'expression de protéine COX dans le neutrophile a pour conséquence l'effet d'immunosuppresseur suite à la brûlure (He *et al.*, 2001).

Dans d'autres études sur les fonctions de neutrophiles, il a été observé que l'expression des récepteurs du complément de surface pour C3b (CR1) et CBi (CR3) a été significativement augmentée pendant les 10 premiers jours suivant la brûlure, tandis que l'expression du récepteur Fc III (FcRIII) a été fortement diminuée (Bjerknes *et al.*, 1990). Ces récepteurs Fc sont des protéines membranaires qui reconnaissent la portion Fc des anticorps (Revillard, 1995). Les récepteurs CR1 et CR3 sont impliqués dans l'attachement et l'ingestion de particules opsonisées de molécules du complément (Revillard, 1995). La capacité de phagocytose des neutrophiles a été augmentée juste après la brûlure, tandis que l'ingestion de pathogène ainsi que la cinétique de l'acidification phagolysosomale ont été diminués au cours des 20 premiers jours suivant la brûlure. De plus, la production du peroxyde par les

neutrophiles a été diminuée progressivement au cours des deux premières semaines. Les résultats montrent des altérations métaboliques et fonctionnelles significatives chez les neutrophiles des patients brûlés menant à des complications infectieuses suite à la brûlure sévère (Bjerknes *et al.*, 1990).

Les éosinophiles représentent 1 % à 3 % des globules blancs en circulation sanguine. Leur rôle principal est de s'attaquer aux parasites sans les phagocyter. Les éosinophiles sont très importants dans la défense contre les infections parasitaires (Revillard, 1995). Il contient des granules qui sont déversés sur les parasites pour les détruire. Ces cellules immunitaires non spécifiques jouent un rôle important également pendant l'inflammation allergique. Les éosinophiles modulent les réactions d'hypersensibilité en dégradant des médiateurs libérés par les mastocytes, tels que les leucotriènes, l'héparine et l'histamine. À la surface de leur membrane on trouve des récepteurs pour ces molécules qui possèdent des effets vasoactives capables augmenter la perméabilité vasculaire (Revillard, 1995). Chez les patients gravement brûlés, il a été observé un afflux important des éosinophiles dans les tissus brûlés par l'action de chimiokines tel que l'IL-8. Ces chimiokines recrutent par la suite les monocytes et les macrophages qui vont produire des cytokines pro-inflammatoires (Weber-Matthiesen & Sterry, 1990).

Les monocytes sont des leucocytes les plus grands de tous les monocytes. Ils circulent dans le sang et quand ils quittent la circulation sanguine, ils évoluent en différents types cellulaires tels que les macrophages dans le tissu ou les ostéoclastes dans l'os ou encore les microgliocytes dans le système nerveux central (Griswold, 1993). Chez les grands brûlés, il a été observé que les fonctions des monocytes et des macrophages sont fortement perturbées. Il a été démontré chez les patients brûlés que la perturbation énergétique de cellules mononucléaires sanguines pourrait contribuer à la dérégulation de la réponse immunitaire (Yarovinsky *et al.*, 2005). Le récepteur CD14 est un marqueur spécifique des monocytes et il existe soit sous une forme soluble, soit sous une forme ancrée à la membrane directement sur les phospholipides membranaires (Yin *et al.*, 2014). Ce récepteur CD14 est un corécepteur qui interagit avec TLR4 pour transmettre le signal à travers la membrane pour activer la voie de signalisation, a été fortement diminué après la brûlure sévère, accompagnée par l'augmentation de CD14 libre dans le sérum de patients brûlés (Weber-Matthiesen & Sterry, 1990). Dans une étude antérieure, il a été démontré que les monocytes circulants CD11b+ ont été significativement augmentés 24 heures après la brûlure avec une



augmentation de l'expression de TLR-2. Le niveau élevé des signaux de danger (DAMPs) circulant est en partie responsable de l'activation des monocytes (Rani *et al.*, 2017).

Les macrophages se différencient à partir des monocytes. Les macrophages et les mastocytes sont les premières cellules activées par des signaux de dangers et ils sont ensuite attirés vers le lieu d'inflammation par le chimiotactisme. Elles s'activent par les signaux dérivés des cellules endommagées par l'apoptose ou par la nécrose ou elles s'activent également par la reconnaissance de la présence de DAMP ou de motifs pathogénique (PAMP) ou par les anaphylatoxines C3a et C5a. Parmi des signaux d'appel, on compte également des produits libérés par les cellules déjà présentes au site d'inflammation telles que l'histamine libérée par les granulocytes et les mastocytes et aussi des chimiokines et des cytokines libérées par des macrophages (Schwacha, 2003).

Les brûlures entraînent des altérations de la fonction des macrophages. L'activation de protéine kinase C (PKC) est une étape essentielle dans l'ingestion de particules opsonisées par le macrophage (Revillard, 1995). Il a été démontré chez les souris brûlées qu'il y a une augmentation de 2 fois de la production de superoxyde par les macrophages. En revanche, l'activité de la protéine kinase C et la phosphorylation des protéines n'ont pas été modifiées suite à la brûlure (Schwacha, 2003). Ces résultats indiquent que l'amélioration du métabolisme oxydatif des macrophages suite à la brûlure est indépendante des changements de l'activité de protéine kinase C (Schwacha, 2003).

Il a été également démontré que les macrophages élaborent spontanément des GM-CFC, car ils ont fortement augmenté après la brûlure. Il est probable que la PGE<sub>2</sub>, un régulateur négatif de la croissance des macrophages granulocytaires, soit largement responsable de cet effet suppressif (Gamelli *et al.*, 1994).

Les cellules NK ou les cellules tueuses naturelles sont des cellules de l'immunité innée et font partie de la première ligne de défense de l'organisme. Ce sont des lymphocytes de grande taille dont le cytoplasme contient des granules. Ces cellules immunitaires sont capables de détruire spontanément, sans reconnaissance spécifique, des cellules infectées ou des cellules cancéreuses par la lyse qui s'effectue par une synapse immunologique. Les cellules NK ne sont pas capables d'adhérer, de phagocyter et ne possèdent pas des récepteurs pour l'antigène, mais possèdent des récepteurs pour l'INF- $\gamma$ , l'IL-1 et l'IL-2 (Revillard, 1995). Les cellules NK ont également sur leur membrane des récepteurs activateurs qui portent des séquences ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) ou des récepteurs inhibiteurs qui portent des séquences ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif).

Pour que la lyse de la cellule cible se produise, il est nécessaire que les signaux d'activation surpassent les signaux d'inhibition. La cytokine libérée par les cellules NK est majoritairement le TNF- $\beta$ , responsable de l'activation des voies de l'apoptose cellulaire, et l'IFN- $\gamma$  qui active par la suite des macrophages (Banchereau & Steinman, 1998). Il a été observé chez les patients brûlés la diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK (Boismenu *et al.*, 1996). Les patients gravement brûlés ont une activité NK significativement diminuée pendant une période de 40 jours suivant la brûlure sévère (Blazar *et al.*, 1986).

Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques qui présentent l'antigène ou les cellules présentatrices d'antigène (CPA). Ces cellules se trouvent entre les kératinocytes et l'épiderme et elles sont responsables de la première défense immunitaire dans la peau (Romani *et al.*, 2012). L'antigène est d'abord reconnu par ces cellules grâce au récepteur CLR (C-type Lectin Receptor). Ensuite elles migrent vers les tissus lymphoïdes secondaires pour présenter cet antigène aux lymphocytes T à l'aide de leur récepteur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité CMH de classe II (Romani *et al.*, 2012). Chez les patients brûlés, il a été observé que les cellules de Langerhans ont une capacité réduite d'induire l'activation des cellules T suite à la brûlure. En revanche, le niveau d'expression de différentes molécules de co-stimulation telles que le HLA-DR et le CMH de classe II restent constante dans les conditions brûlées et non brûlées (van den Berg *et al.*, 2011).

Il a été observé chez les patients brûlés que les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) exprimaient l'ARNm spécifique de cytokine l'interleukine 6 (IL-6) *in vivo* à des taux très élevés, contrairement aux PBMC des donneurs sains (Schluter *et al.*, 1991a). Il s'agit de cellules NK et monocytes de l'immunité innée, mais on y compte également des cellules de l'immunité adaptative telles que les lymphocytes T et B (Weber-Matthiesen & Sterry, 1990). Chez les patients survivants, le niveau de l'IL-6 a été maximal pendant les 3 premiers jours après la brûlure, qui est ensuite revenue à des valeurs normales. Chez les patients non-survivants, les concentrations d'IL-6 ont augmenté de façon permanente jusqu'à la mort résultant d'une septicémie. Ces résultats suggèrent que l'IL-6 est un médiateur potentiel de la septicémie suite à la brûlure sévère (Schluter *et al.*, 1991a).

Le système d'immunité innée est capable de reconnaître la structure commune conservée au cours d'évolution qui caractérise un groupe de certains pathogènes (Asehnoune *et al.*, 2012). La réponse immunitaire innée est induite par un signal de danger qui est émis suite à l'interaction spécifique entre des récepteurs du soi PRR (Pattern Recognition Receptor) et des molécules du non-soi PAMP présent au niveau des microorganismes qui sont un motif



associé aux pathogènes. Le récepteur de reconnaissance de pathogène peut être composé de LPS, le peptidoglycane, la lipoprotéine, l'ADN ou l'ARN bactérien (Asehnoune *et al.*, 2012). Les « Pattern Recognition Receptor » sont des groupes de récepteurs qui sont exprimés au niveau de différentes cellules telles que les macrophages, les cellules dendritiques, les polynucléaires, les mastocytes, les cellules NK, les cellules épithéliales et les fibroblastes. Les gènes de ce groupe de récepteurs ne sont pas polymorphes donc ils sont tous les mêmes au sein d'une espèce. La reconnaissance de ses motifs moléculaires par ces récepteurs donne la possibilité au système immunitaire de se différencier et par la suite discriminer les agents infectieux (Janeway & Medzhitov, 2002).

Des études récentes ont montré que le système immunitaire inné possède une spécificité beaucoup plus importante qu'on ne le pensait auparavant et qu'il est très étendu dans sa capacité à distinguer entre les particules de soi et les agents pathogènes étrangers (Janeway & Medzhitov, 2002). Cette capacité à distinguer le soi de non-soi est basée principalement sur la présence d'une famille de récepteur qui est bien conservée au cours de l'évolution, connue sous le nom de Toll-like récepteurs (TLR). Ces récepteurs jouent un rôle clé dans la défense immunitaire de l'hôte contre les agents pathogènes envahissants (Beutler & Rietschel, 2003). Les Toll-like récepteurs reconnaissent des motifs moléculaires associés aux pathogènes tels que les LPS ou les PAMP ou le motif DAMPs. Les motifs moléculaires associés au danger sont dérivés de composants cellulaires, y compris le noyau, la membrane plasmique, le réticulum endoplasmique, la mitochondrie, le cytochrome C, l'ADN mitochondrial et l'ATP (Krysko *et al.*, 2011). Ces motifs moléculaires associés au danger sont reconnus par nombre de types de récepteurs, y compris les TLR. L'activation de TLR stimule le système immunitaire inné et peut conduire à l'inflammation. Ils appartiennent à la superfamille des récepteurs de l'interleukine-1(IL-1R). Le Toll-like récepteur et l'IL-1R ont une région conservée de 200 acides aminés dans leur queue cytoplasmique, appelée le domaine Toll-IL-1R (TIR) (Slack *et al.*, 2000). Dans ce domaine TIR, la région homologue comprend les trois régions conservées qui sont essentielles pour la signalisation (Akira & Takeda, 2004). À ce jour il a été identifié 13 TLR chez l'humain et ils diffèrent par la reconnaissance de leurs ligands (Janeway, 2002). Les Toll-like récepteurs sont des glycoprotéines membranaires intégrées de type I et ils sont exprimés par plusieurs types de cellules immunitaires telles que les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les cellules de Langerhans, les lymphocytes ainsi que les cellules endothéliales, les kératinocytes et les fibroblastes (Chen & DiPietro, 2017) (voir **Tableau 1**). TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 et 11 sont présentés à la surface de membrane cellulaire tandis que TLR3, 7, 8, 9, 12 et

13 sont présentes à la membrane de compartiments intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique, l'endosome et le lysosome ou ils reconnaissent les acides nucléiques microbiens (O'Neill *et al.*, 2013). Les cellules qui expriment TLR stimulent l'activation des voies de signalisation qui entraînent l'expression de gènes impliqués dans la lutte antimicrobienne ainsi que l'induction des gènes de cytokines inflammatoires (Janeway & Medzhitov, 2002).

**Tableau 1 : Toll-like récepteur exprimé sur la cellule immunitaire (Chen & DiPietro, 2017).**

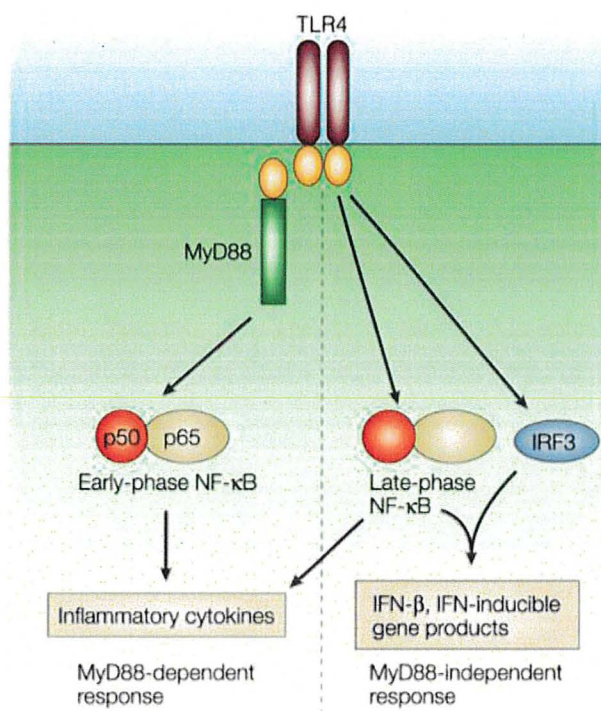
TLR	Type de cellule immunitaire
TLR1	macrophage, cellule dendritique, mastocytes, lymphocytes B, kératinocytes, fibroblastes
TLR2	neutrophile, macrophage, cellule dendritique, cellule de Langerhans, mastocytes, lymphocyte T, lymphocyte B, kératinocyte, fibroblaste, cellule endothéliale
TLR3	cellule dendritique, cellule de Langerhans, mastocyte, lymphocyte T, lymphocyte B, kératinocyte, fibroblaste
TLR4	neutrophile, macrophage, cellule de Langerhans, mastocyte, lymphocyte T, lymphocyte B, kératinocyte, fibroblaste, cellule endothéliale
TLR5	neutrophile, macrophage, mastocyte, lymphocyte T, lymphocyte B, kératinocyte, fibroblaste
TLR6	neutrophile, mastocyte, lymphocyte B, keratinocyte, fibroblaste
TLR7	neutrophile, cellule dendritique, cellule de Langerhans, mastocyte, lymphocyte T, lymphocyte B, fibroblaste,
TLR8	neutrophile, macrophage, cellule de Langerhans, mastocyte, lymphocyte T, lymphocyte B, fibroblaste
TLR9	neutrophile, cellule dendritique, mastocyte, lymphocyte T, lymphocyte B, kératinocyte, fibroblaste
TLR10	neutrophile, lymphocyte B, fibroblaste
TLR11	inconnu
TLR12	inconnu
TLR13	macrophage, cellule dendritique,

Lors de la liaison du ligand, les TLR dimérisent et subissent un changement conformationnel requis pour le recrutement de molécules de signalisation en aval (Akira & Takeda, 2004). La stimulation du TLR facilite par la suite l'activation de deux voies de signalisation : la voie MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88) dépendante et la voie MyD88 indépendante. La voie dépendante de MyD88 implique la phase précoce de l'activation de NF- $\kappa$ B, ce qui conduit à la production de cytokines inflammatoires. La voie indépendante de MyD88 active le facteur régulateur d'interférons (IFN) et implique la phase tardive de l'activation de NF- $\kappa$ B, ce qui conduit à la production de l'IFN- $\beta$  et à l'expression de gènes inductibles par l'IFN, le TNF- $\alpha$ , l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12 et aussi de la petite cytokine

« Macrophage inflammatory protein 2 » (MIP-2) (CXCL2). (Akira & Takeda, 2004) (voir **Figure 4**).

Une augmentation de la réactivité de TLR a été impliquée dans certains nombres d'aspects immunopathologiques suite à la brûlure sévère (Schwacha, 2003). Il a été également observé que l'expression de récepteur TLR4 à la surface de CPA telles que les cellules dendritiques a été significativement diminuée chez les patients brûlés (Zhang & Schluesener, 2006).

**Figure 4 : Le récepteur TLR4**



Nature Reviews | Immunology

**Stimulation du récepteur Toll-like (TLR4) facilite l'activation de deux voies : la voie MyD88 dépendante et la voie MyD88 indépendante (Akira & Takeda, 2004).**

Il existe une autre famille de récepteurs de l'immunité innée impliquée dans la reconnaissance de soi et de non-soi. Il s'agit de la famille de NOD-like récepteur exprimé par les cellules épithéliales. Ces récepteurs possèdent un domaine NOD (nucleotide oligomerization domain) et sont localisés dans le cytoplasme. À ces jours, les récepteurs NOD les plus connus sont

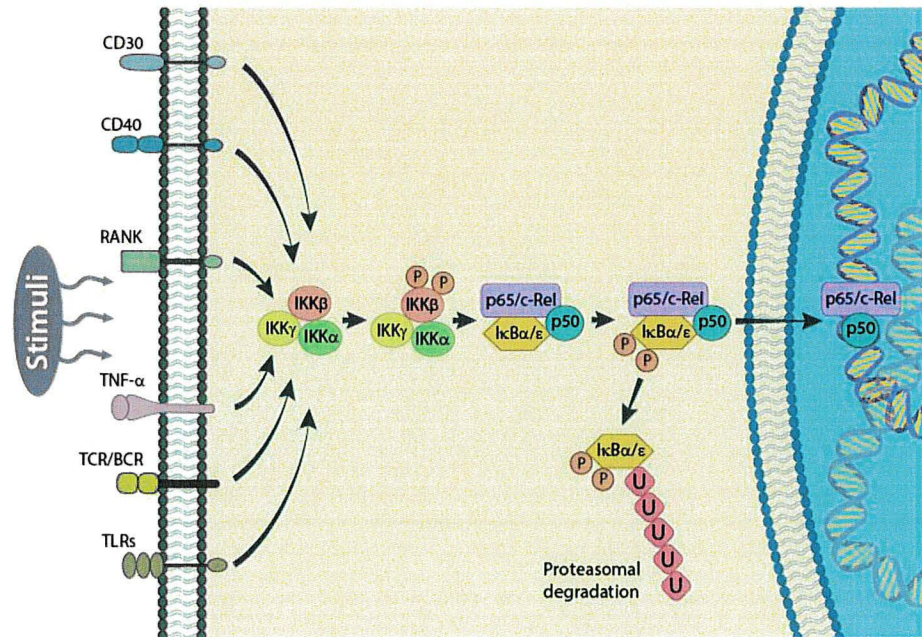


NOD1 et NOD2. Le NOD1 est capable de détecter les fragments de peptidoglycans issus de bactéries Gram négatifs tandis que le récepteur NOD2 reconnaît le muramyl dipeptide provenant de bactéries Gram positifs et négatifs. Les deux récepteurs déclenchent l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans le noyau ce qui mène à la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que des cytokines (Asehnoune *et al.*, 2012).

La voie de signalisation canonique de NF- $\kappa$ B joue un rôle très important dans la réponse inflammatoire. Les protéines NF- $\kappa$ B sont des activateurs transcriptionnels présents dans la cellule sous forme de dimères. Les complexes de dimères retrouvés le plus souvent sont les hétérodimères p50 p65. En l'absence de signaux extracellulaires spécifiques, les hétérodimères de NF- $\kappa$ B sont retenus dans le cytoplasme sous une forme inactive par leur interaction avec les molécules de la famille I $\kappa$ B. À la suite de stimulation de récepteur TLR, par exemple par des cytokines telles qu'IL-1 ou TNF- $\alpha$  ou divers signaux de stress tels que la brûlure sévère, les molécules I $\kappa$ B sont phosphorylés par un complexe de kinase qui est composé de trois sous-unités : deux sous-unités catalytiques (IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ ) et une sous-unité régulatrice NEMO-IKK $\gamma$ . Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitinylation des I $\kappa$ B puis leur dégradation par le protéasome. Cet événement permet aux dimères NF- $\kappa$ B d'être transloquer dans le noyau où ils se fixent sur les promoteurs de leurs gènes cibles (Asehnoune *et al.*, 2012) (voir **Figure 5**).

Suite au traumatisme par la brûlure sévère la régulation de facteur de transcription NF- $\kappa$ B semble être un événement crucial, car la présence de séquence d'activation a été observé de ce facteur dans les promoteurs des gènes pro-inflammatoires tels que le facteur TNF $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-8 à la suite de la brûlure sévère (Asehnoune *et al.*, 2012). La concentration très élevée des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 a également été observé suite à la brûlure sévère ce qui est probablement impliqué dans la diminution de l'activité de certains facteurs de transcription tel que le NF- $\kappa$ B (Ozinsky *et al.*, 2000).

Figure 5 : Activation de la voie canonique de signalisation de NF- $\kappa$ B (Asehnoune *et al.*, 2012)

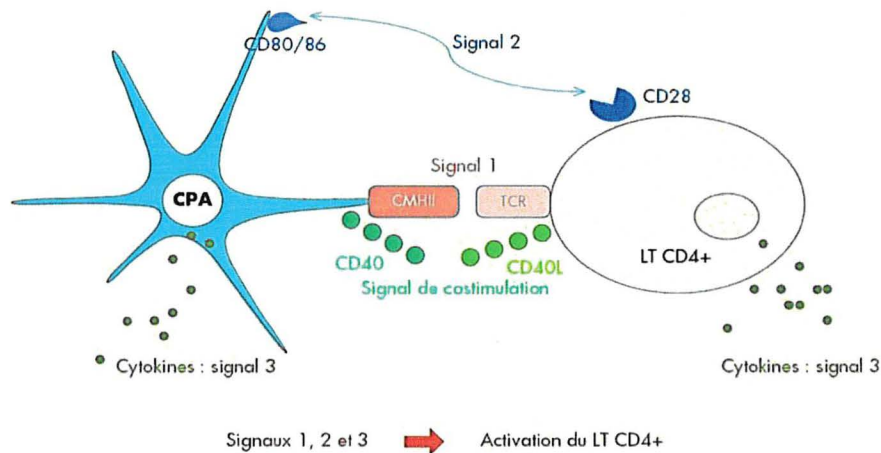


### 2.5.2 L'effet de la brûlure sur la réponse spécifique

L'immunité spécifique ou adaptative est apparue il y a environ 500 millions d'années chez les premiers vertébrés. La réponse spécifique est une réponse tardive qui est spécifique de l'antigène, car ses cellules telles que les lymphocytes portent un seul type de récepteur capable de reconnaître un déterminant antigénique (épitope). Elle repose sur une distinction très fine et spécifique du soi et du non-soi. Les cellules de l'immunité adaptatives sont les lymphocytes B et T. Ils sont responsables de l'immunité humorale et cellulaire. Les lymphocytes B peuvent reconnaître les épitopes dans leur forme native, par contre les lymphocytes T reconnaissent les épitopes sous forme de peptides et à condition qu'ils soient présentés par des molécules du CMH. Les cellules les plus efficaces pour la présentation antigénique sont les cellules dendritiques (Revillard, 1995).

Les cellules dendritiques sont des phagocytes qui jouent le rôle de cellules présentatrices l'antigène (CPA), c'est-à-dire les cellules capables d'activer des cellules immunitaires naïves. Elles contrôlent la fonction des lymphocytes B et T (Banchereau & Steinman, 1998). Les cellules dendritiques sont très importantes non seulement pour l'induction de la réponse immunitaire primaire, mais elles jouent également un rôle important dans la régulation de la réponse médiée par les cellules T (Banchereau *et al.*, 2000).

**Figure 6 : La cellule présentatrice antigène (CPA) et la cellule T CD4+**



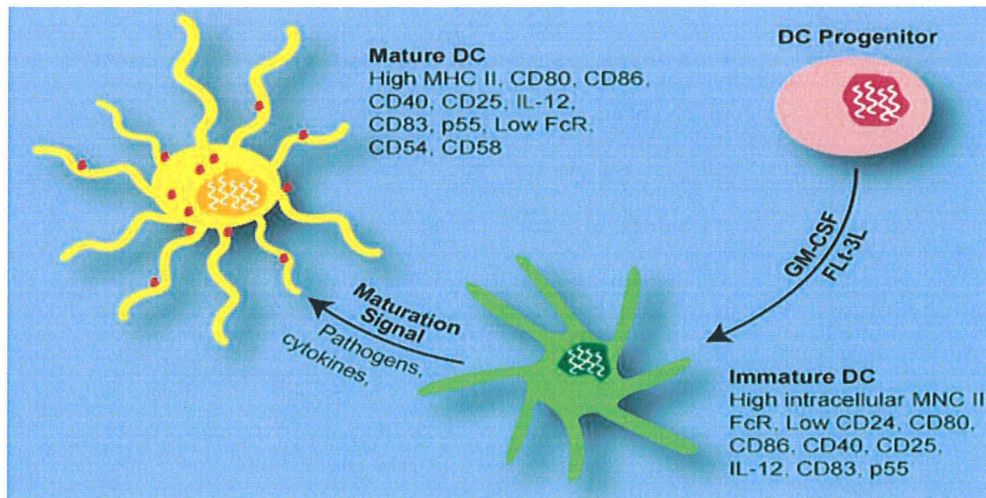
Les cellules dendritiques présentent l'antigène spécifique aux cellules T CD4+ par leur récepteur CMH II au récepteur TCR présent sur la membrane de cellules T. Les cellules T peuvent par la suite aussi activer les cellules dendritiques via la signalisation du ligand CD40 conduisant à une expression accrue de molécules de costimulations CD80-CD86 et de la libération de cytokines (Sallusto & Lanzavecchia, 1994).

Les cellules T peuvent aussi à leur tour activer les cellules dendritiques via la signalisation du ligand CD40. Ce ligand est par la suite responsable de l'activation d'expression de molécules de costimulations CD80-CD86 et de la libération de cytokines telles que l'IL-1, le TNF et l'IL-12 (Sallusto & Lanzavecchia, 1994) (voir **Figure 6**).

La maturation de cellules dendritiques est accompagnée par les modifications morphologiques telles qu'une perte de structure adhésive, une réorganisation du cytosquelette et l'acquisition d'une motilité cellulaire élevée (Winzler *et al.*, 1997). De nombreux facteurs induisent et régulent la maturation de cellules dendritiques. Par exemple, les molécules liées aux pathogènes telles que le LPS, l'ADN bactérien et l'ARN bicaténaire (Larsen *et al.*, 1990). Plusieurs molécules incluant le CD40, le TNF-R et l'IL-1R ont été également identifiées comme les activateurs de l'état de transition de cellules dendritiques immatures vers l'état mature (voir **Figure 7**). Un autre facteur important dans la maturation de cellules dendritiques est une balance entre les signaux pro-inflammatoires et anti-inflammatoires dans le micro-environnement local, y compris le TNF, l'IL-1, l'IL-6, l'IL-10, le TGF- $\beta$  et les prostaglandines (Banchereau *et al.*, 2000).



**Figure 7 : Les progénitures de cellules dendritiques**



Les progénitures de cellules dendritiques se déplacent de la moelle osseuse vers les tissus lymphoïdes. Les signaux de maturation ou de danger ainsi que des cytokines, GM-CSF sont relâchés dans le tissu endommagé (brûlé). En captant ces signaux, les CD immatures se transforment en CD matures. Une fois CD mature, elle possède un récepteur MHC classe II chargé par des peptides ainsi que les molécules de costimulation CD80 et CD86 pour pouvoir interagir de façon efficace avec les cellules T (Banchereau *et al.*, 2000).

Les cellules dendritiques sont capables de présenter l'antigène aux cellules T par les molécules du CMH de classe I et de classe II (Banchereau *et al.*, 2000). La majorité des antigènes reconnus par les cellules T sont des protéines qui doivent être fragmentées avant d'être reconnues en association avec les molécules du CMH à la surface des cellules CPA. Les cellules T cytotoxiques reconnaissent les peptides associés aux molécules du CMH de classe I. Les cellules T auxiliaires reconnaissent les peptides associés aux molécules du CMH de classe II. Les molécules du CMH de classe I présentent des produits de dégradation de protéines intracellulaires générés dans le cytosol. Tandis que les molécules du CMH de classe II présentent des fragments dérivés de protéines extracellulaires qui sont générés dans un compartiment intracellulaire (Banchereau *et al.*, 2000).

Il a été démontré dans un modèle *ex vivo* de brûlure de la peau humaine une altération des fonctions de cellules dendritiques (van den Berg *et al.*, 2011). Il a été également établi que la capacité de migration et le niveau de molécules de costimulations de cellules dendritiques dans la peau brûlée ne sont pas affectés par la brûlure par rapport à la peau saine (van den Berg *et al.*, 2011). Il a été observé que les cellules dendritiques sont activées en présence de cellules nécrotiques, et ce même en absence de pathogène (Gallucci *et al.*, 1999). Cette situation peut potentiellement se produire à la suite d'une brûlure, car il a été établi, au site

de la brûlure et au niveau systémique, qu'il y a une augmentation importante de plusieurs ligands du TLR4 (Okamura *et al.*, 2001). Des travaux effectués dans notre laboratoire ont permis de caractériser le rôle des cellules dendritiques dans l'induction de l'état d'immunosuppression suivant une brûlure sévère (Patenaude *et al.*, 2010). Ces résultats ont démontré une apparition de tolérance chez les cellules dendritiques au 10<sup>e</sup> jour suivant la brûlure. L'état de tolérance est caractérisé par une diminution de la capacité des cellules dendritiques à maturer à la suite de la stimulation par du TLR4 (Patenaude *et al.*, 2010). Ces résultats ont également démontré une baisse de l'expression et de l'activité intracellulaires du TLR4, une diminution des marqueurs de maturation et une atténuation dans la production de cytokines l'IL-12. L'interleukine 12 est essentielle à l'activation de lymphocyte Th1. Cet état de tolérance est donc impliqué aux infections rencontrées à la suite d'une brûlure grave (Patenaude *et al.*, 2010). La réduction de l'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques à partir de la peau brûlée pourrait être impliquée dans la suppression de la réponse immunitaire adaptative observée chez les patients gravement brûlés, entraînant ainsi une septicémie et une défaillance d'organes multiples (van den Berg *et al.*, 2011). L'altération de la fonction de ces cellules suggère des hypothèses que ces cellules pourraient être des cibles thérapeutiques pour améliorer la régénération tissulaire ainsi que le traitement potentiel contre l'effondrement du système immunitaire chez les patients gravement brûlés (van den Berg *et al.*, 2011). Il a également été observé que des cellules dendritiques, suite à la brûlure, sécrètent les facteurs tels que TGFβ-1 qui sont responsables de la prolifération des cellules impliquées dans la cicatrisation de la plaie brûlée ce qui nous suggère que les cellules dendritiques pourraient être la cible thérapeutique dans la guérison suite à la brûlure (Vinish *et al.*, 2016). D'autres travaux sur les cellules dendritiques ont démontré une augmentation de l'expression de plusieurs TLR, 28 jours après la brûlure. Chez les patients qui ont survécu à une brûlure sévère, a été observé une augmentation de l'expression du TLR2 et TLR4 sur les cellules dendritiques contrairement à l'expression du TLR9. Par contre, chez les patients décédés suite à la brûlure il a été noté une faible expression du TLR2 sur les cellules dendritiques et pas de différence significative dans l'expression du TLR4 et du TLR9 (Zhang *et al.*, 2016)

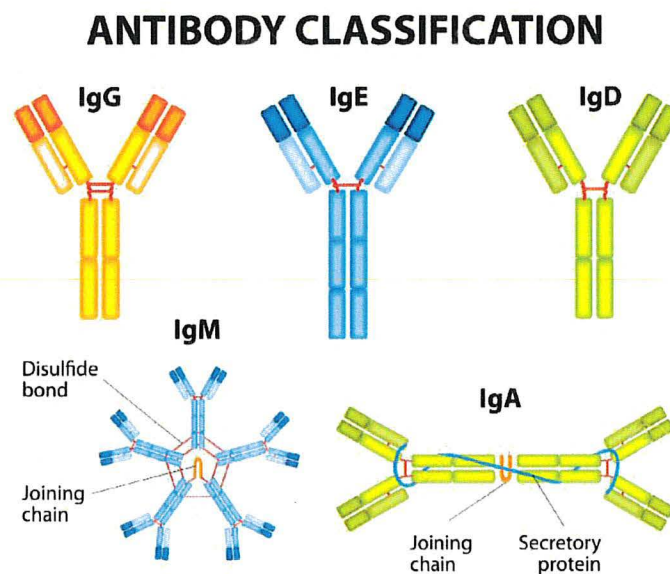
L'immunité humorale spécifique permet de distinguer les éléments étrangers et les éliminer grâce à la production d'anticorps spécifiques (Griswold, 1993). Ce sont uniquement des lymphocytes B une fois différenciés en plasmocytes qui sont capables de produire des anticorps. Les lymphocytes B sont des globules blancs qui font partie des leucocytes. Ces cellules sont issues de progénitures hématopoïétiques et se différencient dans la moelle



osseuse (Dubois *et al.*, 1998). Il existe plusieurs types de cellules B : les cellules B naïves, les mémoires, les plasmocytes et les cellules B régulatrices. L'activation des lymphocytes B qui sont responsables de la production des anticorps spécifiques en réponse à des antigènes est le résultat d'interaction complexe et mutuelle entre les lymphocytes B avec des macrophages ou des lymphocytes T.

Les anticorps sont des glycoprotéines de la famille des immunoglobulines, composées de deux chaînes lourdes (H) identiques et deux chaînes légères (L) identiques. Différentes chaînes lourdes déterminent des classes d'immunoglobulines. On décrit ainsi cinq types de chaînes lourdes subdivisées en neuf sous-classes : IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgE et IgM (voir **Figure 8**).

**Figure 8 : Les différentes sous-classes d'immunoglobuline**



La première étape de l'activation des lymphocytes B passe par la stimulation par l'antigène qui se lie au récepteur spécifique BCR, présent à la surface membranaire de ces cellules. Par la suite, il y a l'endocytose du pathogène pour être digéré par les enzymes protéolytiques et être associé à la surface de lymphocyte B sur les molécules du CMH de classe II (Janeway, 1992). La cellule B ira ensuite à son tour stimuler les cellules T collaboratrices par le récepteur des cellules T (TCR) (Janeway, 1992). Les lymphocytes T une fois activés sécrètent les cytokines et les interleukines spécifiques par exemple l'IL-2, qui vont donner le signal

d'activation nécessaire aux lymphocytes B. Cette activation stimule la prolifération et la différenciation de lymphocytes B en plasmocyte qui sera capable de sécréter des anticorps spécifiques contre l'antigène de départ (Griswold, 1993). Au cours de cette phase de différenciation, la réponse immunitaire est aussi mémorisée dans les lymphocytes B mémoires, dont la durée de vie varie entre plusieurs mois jusqu'à plusieurs années, cette durée dépend de la nature de signe d'activation (Janeway, 1992). C'est grâce à cette capacité de la mémorisation de la réponse immunitaire qu'on va pouvoir obtenir la réponse immunitaire spécifique très rapide lorsqu'une substance étrangère s'introduit de nouveau dans l'organisme même plusieurs années plus tard (Janeway, 1992).

La brûlure sévère perturbe certaines fonctions des lymphocytes B telles que la sécrétion des anticorps (Griswold, 1993). Chez les patients gravement brûlés, on observe une diminution importante d'immunoglobulines IgA, IgD, IgG et IgM, une semaine après la brûlure. À la fin de la deuxième semaine, les chercheurs ont observé le retour de niveau d'immunoglobulines vers le normal. La perturbation et surtout la décroissance importantes de la production de toutes les sous-classes d'IgG sont en partie responsables de la mortalité à cause de la septicémie (O'Sullivan & O'Connor, 1997). Dans une étude antérieure, il a été observé chez les patients brûlés que l'activation des lymphocytes B est fortement diminuée, car l'expression spontanée et induite de molécule CD23 par les cytokines (l'IL-2 et l'IL-4), qui est un marqueur d'activation des lymphocytes B, a été significativement réduite au cours de la deuxième à la cinquième semaine post-brûlure comparativement aux donneurs sains (Schluter *et al.*, 1991b).

Au niveau de la réponse spécifique cellulaire, il existe deux populations de lymphocyte T : les cellules T auxiliaires et les cellules T cytotoxiques, qui se distinguent par leur expression des co-récepteurs CD4 et CD8. La réponse des lymphocytes T CD4+ est une réponse régulatrice et la réponse T CD8+ est une réponse effectrice (O'Sullivan *et al.*, 1995).

Les précurseurs des lymphocytes T doivent subir lors de leur maturation des étapes de différenciation et de sélection pour devenir les lymphocytes T fonctionnels. Ces étapes de maturation des lymphocytes T se déroulent dans le thymus. La maturation implique la régulation de l'expression de certaines protéines membranaires comme le TcR récepteur. Le rôle du thymus dans ces processus complexes est de préparer des cellules T pour être capables de reconnaître les antigènes spécifiques et d'être activées par ces antigènes présentés par les molécules du CMH du soi. Les lymphocytes T auto réactifs sont éliminés dans le thymus. Pendant les étapes de maturation, les cellules T subissent différentes étapes

de contrôle, les sélections négatives et positives selon l'expression des marqueurs de surface. On décrit ainsi le stade double négatif (DN), le double positif (DP) et le simple-positif (SP) (Savino & Dardenne, 2000). Le stade double négatif est caractérisé par l'absence des marqueurs CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. La plupart de ces cellules n'expriment pas un récepteur TcR fonctionnel. Les cellules non fonctionnelles sont par la suite éliminées par l'apoptose. Le stade double-positif est caractérisé par une prolifération des cellules et le processus de réarrangement de la chaîne alpha du récepteur TcR. Il s'agit de processus qui contrôlent et arrêtent la maturation des cellules T non fonctionnelles ou autoréactives qui peuvent être nocives pour l'organisme. Les cellules T sont par la suite sélectionnées en fonction de leur capacité à reconnaître le complexe des peptides qui sont présentés par les molécules du soi exprimées à la surface des cellules corticales de thymus. Les cellules T qui ne sont pas capables de reconnaître ce complexe par son récepteur TcR sont par la suite éliminées par l'apoptose par la voie mitochondriale (Vacchio & Ashwell, 2000).

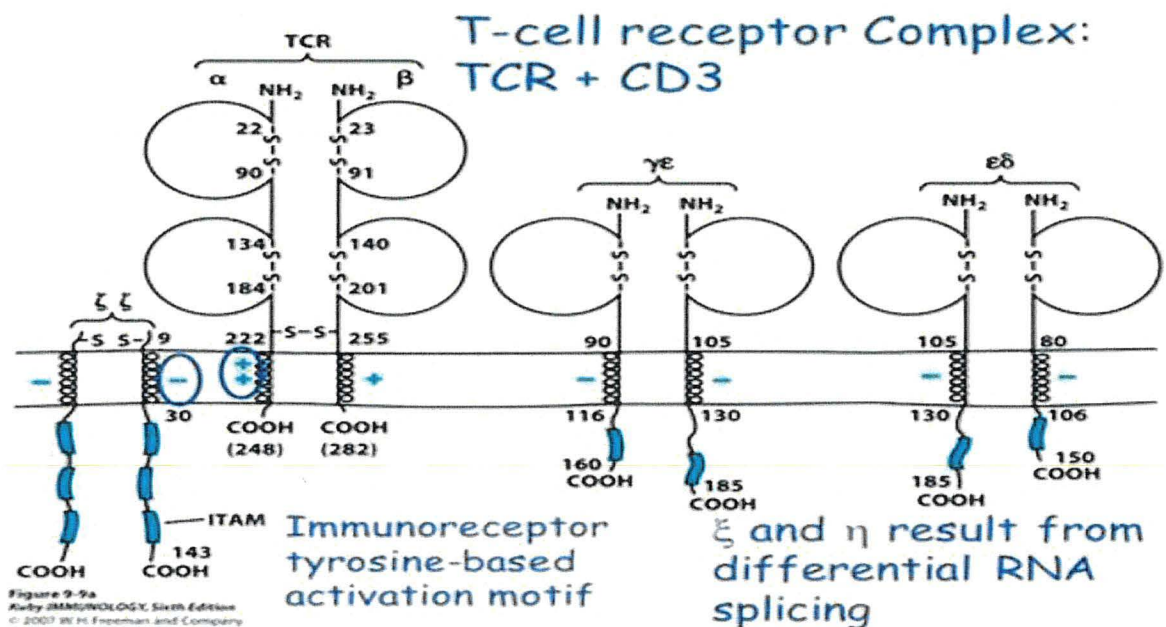
Le récepteur TcR est un complexe d'hétérodimère de 8 protéines transmembranaires formé par des chaînes alpha bêta ( $\alpha / \beta$ ) ou gamma-delta ( $\gamma / \delta$ ). Près de 99 % des lymphocytes T matures expriment un TcR  $\alpha / \beta$  tandis que seulement 1 % de cellules T sont  $\gamma / \delta$  (Savino & Dardenne, 2000). Ce récepteur attribue une propriété de reconnaître des fragments peptidiques antigéniques associés aux molécules CMH de façon hautement spécifique (Groux *et al.*, 1996).

Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de ce récepteur sont responsables de la reconnaissance d'un antigène présenté par le complexe CMH. L'expression de molécules de costimulation CD4, CD8 et CD28 renforce et stabilise l'interaction entre la CPA et la cellule T. L'engagement et l'activation du TcR récepteur déclenchent par la suite la phosphorylation des Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs (ITAMs) dans la partie cytoplasmique des chaînes du CD3 (voir **Figure 9**). Ce récepteur une fois couplé au CD3 molécule, permet une signalisation qui est responsable de l'activation cellulaire. Ces motifs ITAMs, une fois phosphorylés, déclenchent un recrutement des protéines nécessaires pour l'activation des voies de signalisation de l'inositol triphosphate (IP3). Suite à cette activation du TcR, les cellules T subissent l'activation intracellulaire de nombreuses voies de signalisation suivie par la phosphorylation de protéines intracellulaires, l'activation de messagers secondaires, et par conséquent l'activation des protéines MAPKs responsables de l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de nombreux facteurs de transcription, par exemple NF- $\kappa$ B et NF-AT (Kung & Thomas, 1997).



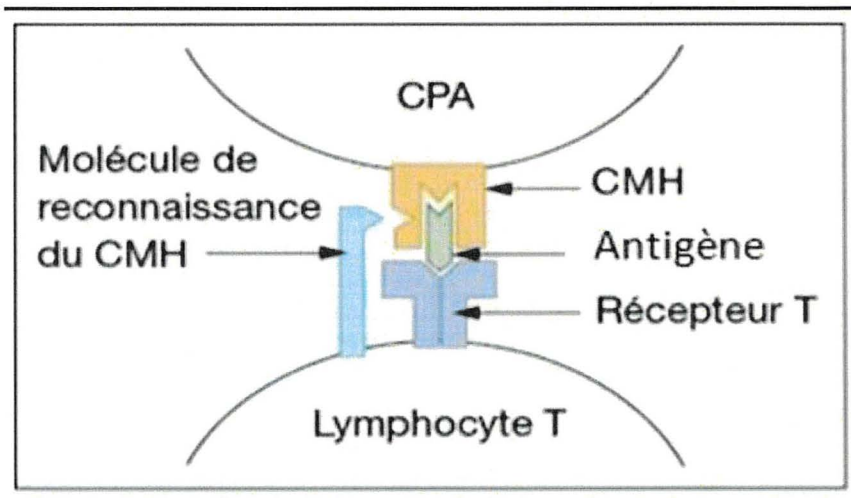
Les lymphocytes T matures s'installent dans les organes périphériques secondaires comme la rate ou les ganglions lymphatiques. Quand les cellules T matures naïves rencontrent une cellule présentatrice antigène activé, comme les cellules dendritiques, il y a une activation de la réponse immunitaire adaptative. Cette activation est déclenchée suite à l'interaction entre le récepteur spécifique de cellule T, le récepteur TcR, avec le CMH. L'interaction est renforcée par des signaux issus des molécules CD4 ou CD8 et par les molécules co-stimulatrices comme le CD28 favorisant l'activation des cellules T (O'Sullivan *et al.*, 1995) (voir **Figure 10**).

Figure 9 : Le récepteur TcR



Le récepteur TcR présent à la surface de cellule T est un complexe de 8 protéines transmembranaires. L'engagement du TcR déclenche la phosphorylation des ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs) dans la partie cytoplasmique des chaînes du CD3 (Kung & Thomas, 1997).

Figure 10 : La rencontre entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice antigène (CPA).



Suite à cette rencontre il y a une activation de la réponse immunitaire adaptative qui est déclenchée grâce à l'activation spécifique entre le récepteur de cellule T, le récepteur TcR, avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (O'Sullivan *et al.*, 1995).

Une fois activés, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> se différencient en différentes sous-populations de lymphocyte T CD4<sup>+</sup> de type Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 ou Trég (voir **Figure 11**). Cette différenciation dépendra de plusieurs facteurs par exemple la nature et la concentration de l'antigène présenté, l'affinité du récepteur TcR pour l'antigène, des interactions entre des molécules de costimulation et leurs corécepteurs ainsi que le type de cytokines libérées dans le micro-environnement suite à ces événements complexes (Revillard, 1995).

Une prédominance de lymphocytes de type Th1 induit une augmentation des lymphocytes cytotoxiques T CD8<sup>+</sup> impliquée dans la réponse cellulaire. Les lymphocytes Th1 sont très efficaces dans l'élimination des bactéries, des virus et des parasites. Elles produisent de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-2. La différenciation des lymphocytes CD4<sup>+</sup> en type Th1 est en grande partie induite par la cytokine l'IL -12 produit par des cellules dendritiques et des macrophages. La liaison de l'IL-12 à la surface de lymphocyte T naïve active la phosphorylation intracellulaire de Signal Transducer and Activator of Transcription-4 (STAT4). Cette phosphorylation résulte la stimulation de la production d'INF- $\gamma$ . En revanche, la liaison de cytokine l'IL-4 à la surface d'un lymphocyte T naïve active la voie de signalisation JAK1-STAT6 et favorise ainsi l'activation de facteur de transcription GATA-3, favorisant le développement du type Th2 (O'Sullivan *et al.*, 1995).

Les lymphocytes de type Th2 sécrètent dans le micro-environnement des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10 et l'IL-13. Ces cytokines activent par la suite des éosinophiles et des mastocytes qui participent à l'élimination de pathogènes. Ces cytokines sont également importantes pour le développement de la réponse humorale qui implique la synthèse d'anticorps spécifiques (Revillard, 1995).

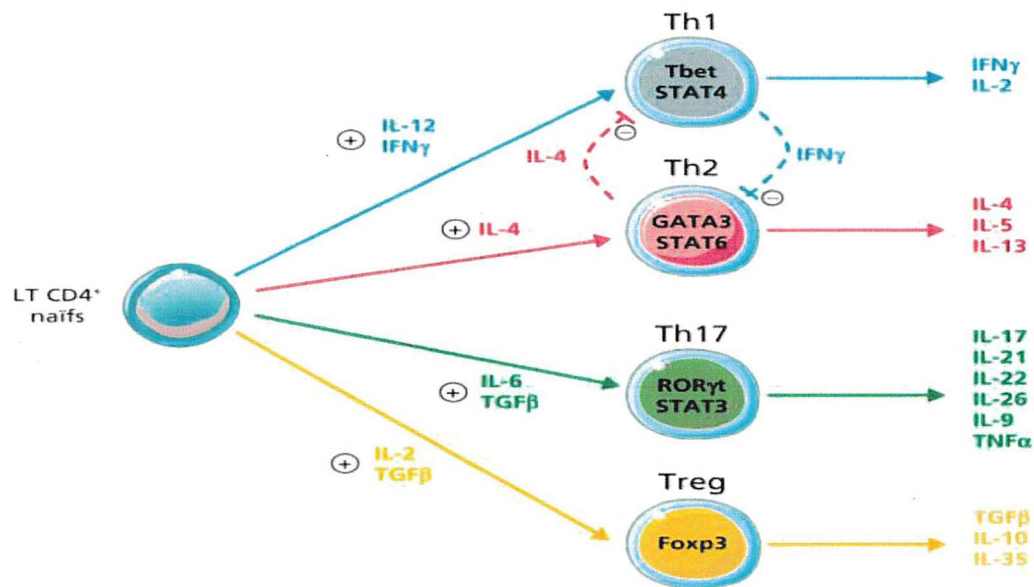
Les lymphocytes de type Trég sont responsables de la suppression de l'activation des lymphocytes T. Ces cellules co-expriment le facteur de transcription Foxp3. L'altération de la fonction de lymphocytes T rég ou leur absence chez la souris s'est révélée très néfaste, ce qui a causé l'échappement ainsi que la surproduction des lymphocytes T auto réactive (Kim *et al.*, 2007). Ces cellules régulent la réponse immunitaire via divers mécanismes, tels que la production des cytokines immunosuppressives l'IL-10 et TGF- $\beta$  (Revillard, 1995).

Les lymphocytes de type Th17 sont de nature pro-inflammatoire. Les cellules Th17 sont des producteurs préférentiels d'IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-22. Ces cellules médient les réponses défensives pour l'hôte contre les agents pathogènes extracellulaires et elles sont également impliquées dans de nombreuses maladies auto-immunitaires (Sasaki *et al.*, 2011). Selon les études les plus récentes, la réponse Th17 peut être divisée en médiateurs précoces et tardifs avec l'IL-6, l'IL-27 et le TGF- $\beta$  régulant la différenciation initiale des lymphocytes T naïfs et l'IL-23, l'IL-17 et l'IL-22 étant associés au phénotype de Th17 matures bien qu'il y ait des cellules produisant que de l'IL-22 (Th22). (Sasaki *et al.*, 2011) (voir **Figure 11**). L'IL-22 est une interleukine unique, car elle n'agit pas sur les cellules immunitaires, mais directement sur les cellules épithéliales. Elle est ainsi impliquée dans la chimiotaxie, dans la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales et aussi dans l'expression peptidique antimicrobienne pour prévenir l'invasion par les bactéries. Ce rôle des cellules Th17 est très important, car les brûlures sévères induisent une atrophie et une apoptose de la muqueuse intestinale, puis une perturbation de l'homéostasie des cellules épithéliales intestinales. Cette fonction de barrière intestinale est rapidement altérée dès 5 minutes après la brûlure grave, ce qui augmente le risque de translocation bactérienne et prédispose à la septicémie (Magnotti & Deitch, 2005).

L'augmentation spécifique de certains groupes de cytokines suggère que le profil de ces dernières puisse fournir des cibles spécifiques pour des interventions thérapeutiques des grands brûlés (Sasaki *et al.*, 2011).



Figure 11 : Sous-types de lymphocytes T CD4+ matures.



Lorsqu'une cellule T naïve est stimulée par une CPA, la cellule s'active, prolifère et produit les cytokines. Dépendant de la nature de l'antigène ainsi que de la force du signal reçu, la cellule T se développe en cellule de type Th1, Th2, Th17 ou T ré (Utsunomiya *et al.*, 2001).

Plusieurs études ont démontré que la brûlure sévère exerce un effet immunosuppresseur sur la réponse adaptative. Cette immunosuppression semble avoir été associée à la fois à une diminution du nombre de cellules T et à une paralysie au niveau de la cellule T individuelle ainsi qu'à la perturbation de la fonction des cellules T (Wood *et al.*, 1978).

Après la brûlure sévère, il a été détecté l'infiltration importante par les lymphocytes T activés au niveau de l'épiderme ainsi que du derme de la plaie agressée en détectant l'expression ectopique de HLA-DR, ICAM-1 et CD36 qui sont les marqueurs moléculaires sur les kératinocytes. Il a été également observé la synthèse importante de certaines cytokines inflammatoires telles que l'INF- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  dans la plaie brûlée (Bernabei *et al.*, 1999).

Un aspect critique de la réponse immunitaire du patient suite à la brûlure est liée à l'hyperproduction de l'acide arachidonique et ses métabolites PGE2 et les leucotriènes qui sont des immunomodulateurs importants (Schwacha *et al.*, 1999). Il a été démontré que les prostaglandines peuvent supprimer la fonction des lymphocytes T par l'inhibition de cytokine IL-2 (Choudhry *et al.*, 2002). Des études antérieures ont démontré que les lymphocytes T chez les patients brûlés sont plus sensibles à l'effet d'inhibiteur de PGE2. De

plus, il a été démontré que les lymphocytes T CD8 sont plus sensibles aux effets inhibiteurs de PGE2 que les lymphocytes T CD4 (Schwacha *et al.*, 1999). La prostaglandine modifie également les interactions entre les antigènes de CPA et des lymphocytes T en inhibant l'expression du CMH de classe II (Stephan *et al.*, 1988). Cette dépression de l'expression du CMH II contribue à la suppression de l'activation des lymphocytes T (Ayala *et al.*, 1996).

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) assure la médiation de la plupart de ses effets via l'activation des kinases telle que la protéine kinase C (PKC) qui conduit à la phosphorylation des protéines intracellulaires. Les études ont démontré que le niveau de AMPc via l'activation de PGE2 est élevé dans les cellules immunitaires suite à la brûlure sévère (Grbic *et al.*, 1991). Il a été observé que cette altération de la sensibilité de AMPc implique une activation dysfonctionnelle du PLC, ce qui entraîne une diminution de la génération de diacylglycérol (DAG) et réduit ainsi l'activation de PKC (Schwacha *et al.*, 1999). Parmi les autres effets de la brûlure sur les lymphocytes T on peut observer l'augmentation du stress oxydatif ainsi que la diminution de niveau de GSH dans le milieu intracellulaire. La brûlure est caractérisée par une carence de cystéine dans le milieu intracellulaire. L'entrée de la cystéine dans la cellule est régulée par l'expression du système de transporteur Xc qui échange un glutamate pour une molécule de cystéine. Il s'agit d'un système antiport des acides aminés pour échanger L-cystéine du milieu extracellulaire avec L-glutamate du milieu extracellulaire à travers d'une cellule. Ce système est essentiel pour la protection de la cellule contre le stress oxydatif. Les travaux de notre laboratoire ont montré que la brûlure sévère est responsable de la perturbation significative du système de Xc transporteur pour la cystine et le glutamate dans les lymphocytes T. Il a été observé l'augmentation importante de l'expression de ce transporteur Xc dans les lymphocytes T suite à la brûlure sévère, probablement pour compenser la carence de cystéine dans le milieu intracellulaire (D'Elia *et al.*, 2009). Il a été également démontré dans notre laboratoire que l'effet de la brûlure sévère affecte l'homéostasie des lymphocytes T naïfs ainsi qu'effecteurs. Dès le premier jour suivant la brûlure il a été observé une diminution importante du nombre de cellules T ainsi que l'augmentation de la capacité des lymphocytes T à proliférer et aussi une augmentation de l'expression des cellules TCD4+ et TCD8+ naïves. Toutes ces données nous suggèrent que l'effet de la brûlure a pour conséquence une surstimulation des fonctions effectrices des lymphocytes T dans le but d'induire une réponse immunitaire qui compenserait cette perte de cellules T (Patenaude *et al.*, 2010). De plus, il a été démontré au jour 10 suivant la brûlure que les cellules T naïves sont incapables d'induire une réponse immunitaire. Il a été également observé que les cellules T naïves activées étaient en apoptose suite à la brûlure



au jour 10 suivant la brûlure (D'Elia *et al.*, 2009). Par conséquent, on observe l'activation suivie par l'immunosuppression chez les patients gravement brûlés (Dalton, 2001). Cet état peut entraîner un défaut de fonctionnement d'organes multiples ou une septicémie. Cela pourrait être dû en partie à l'augmentation de la présence des cellules T-helper 2 (Th2) à cause des niveaux très élevés de TGF- $\beta$  et d'IL-4 (O'Sullivan *et al.*, 1995). Des études ont confirmé que les brûlures graves induisent un changement significatif de la réponse des cytokines dans la direction des lymphocytes Th2, car il y a une production importante des IL-4. Le phénotype CD8<sup>+</sup> est majoritairement présent par rapport de phénotype CD4<sup>+</sup> (Zedler *et al.*, 1999).

Les interactions entre les lymphocytes T et les lymphocytes B sont fortement altérées suite à la brûlure. L'expression de marqueur CD23 à la surface des lymphocytes B qui sert de récepteur pour le facteur de croissance des cellules B et participe à la présentation des antigènes par les lymphocytes B aux lymphocytes T est fortement diminuée suite à la brûlure. Suite à cet événement, on observe la régulation positive de marqueur CD25 présent à la surface des lymphocytes T pour maintenir la réactivité des lymphocytes T. Il a été noté que l'expression de CD25, un marqueur d'activation des lymphocytes T, est fortement augmentée, car CD25 est destiné à maintenir la réactivité des lymphocytes T face aux quantités réduites d'IL-2 disponibles dans le microenvironnement (Schluter *et al.*, 1991b). Malgré cette forte activation des cellules T suite à la brûlure, ces cellules ne parviennent pas à proliférer en réponse aux stimulus mitogènes exogènes à cause de l'expression de récepteurs non fonctionnels pour IL-2 sur les cellules T. (Schluter *et al.*, 1991b).

Il a également été observé chez la souris que la brûlure sévère est responsable de la diminution de l'activation de lymphocytes Th1 en inhibant la transcription du gène l'IL-2 et l'expression du récepteur pour l'interleukine 2 (IL-2R) (Ferrara *et al.*, 1989). Cette activation incomplète cause l'anergie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Cet effet a aussi été démontré pour les lymphocytes Th1 chez les patients brûlés (Teodorczyk-Injeyan *et al.*, 1986). Ainsi, la capacité réduite de la production de IL-2 peut conduire à l'immunosuppression en raison d'une diminution d'expression clonale des lymphocytes Th1 suite à la brûlure sévère (Teodorczyk-Injeyan *et al.*, 1986). L'interleukine 2 ajoutée de façon exogène à des cultures de lymphocytes augmente la prolifération des cellules provenant des patients survivants seulement. Un complexe lipidique protéique (LPC) produit par la peau après la brûlure est possiblement responsable de l'inhibition de la réponse immunitaire *in vivo* ainsi que l'inhibition de la croissance des lymphocytes T dépendants de l'IL-2 en culture (Sparkes, 1993). Une altération

de la réponse de type Th1 contribue à rendre les patients brûlés fortement susceptibles à certains pathogènes (Utsunomiya *et al.*, 2001).

Après la brûlure, il a été observé une dépression précoce de l'activité effectrice de fonction des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Cette suppression précoce des CTL suite à la brûlure peut être due à une diminution de la sous-population de T auxiliaire. Cette dépression est mise en place dès le jour 3 suivant la brûlure et revient à la normale à partir de jour 7 post-brûlures (Hunt *et al.*, 1998). La réduction initiale peut être liée à une diminution des lymphocytes T et peut persister jusqu'au jour 14. Cette réduction de la population CTL est accompagnée par une augmentation de cytokine l'IL-5 et par une diminution de la production d'IL-2 ainsi que d'INF- $\gamma$  chez les patients brûlés (Hunt *et al.*, 1998). Dans une étude antérieure, il a été également démontré que les altérations phénotypiques les plus frappantes observées chez les patients brûlés étaient une diminution du nombre et du pourcentage de cellules T totales et de la sous-population de cellules T auxiliaires. Par contre, aucune augmentation significative n'a été observée dans la sous-population de lymphocytes T suppressives. Un ratio de lymphocytes T/CTL fait de 24 à 48 heures suivant la brûlure pourrait représenter un indice prédictif de décès et/ou de la septicémie. Ce résultat suggère que le syndrome d'immunodéficience suivant la brûlure sévère est principalement caractérisée par une diminution significative du nombre ou de la fonction des lymphocytes T qui sont les productrices importantes de l'IL-2 (Antonacci *et al.*, 1984). Le mécanisme par lequel ces changements dans les cellules T se produisent pendant la brûlure est probablement multifactoriel et lié en partie aux changements induits par les cytokines, les facteurs de croissance et les réponses hématopoïétiques (Rani & Schwacha, 2017). Des lymphocytes T doubles négatifs sont probablement responsables de la répression de la réponse inflammatoire précoce en supprimant la prolifération lymphocytaire. Elles sont également impliquées dans la suppression myéloïde via les cytokines Th2 ou par le recrutement de cellules suppressives myéloïdes (Rani & Schwacha, 2017).

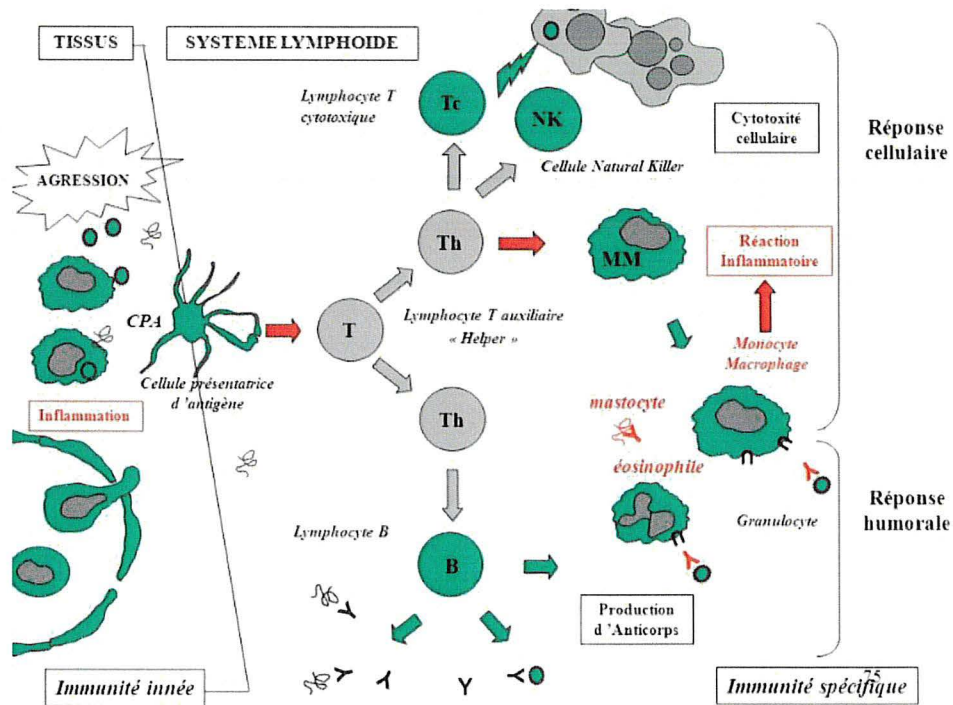
Il a été démontré une diminution importante de la capacité d'activation des lymphocytes T par les cellules de Langerhans (van den Berg *et al.*, 2011). Le niveau de l'expression de différentes molécules de costimulation et de molécule CMH de classe II reste constant dans les conditions brûlées et non brûlées. En utilisant le modèle *ex vivo* de la peau humaine brûlée, il a été démontré que les cellules de Langerhans de la peau migrantes ont une capacité de stimulation et de prolifération des lymphocytes T fortement réduite (van den Berg *et al.*, 2011).



Il a été noté dans une étude chez les patients brûlés que l'expression des gènes impliqués dans la réponse immunitaire est indirectement proportionnelle à la taille de la brûlure. Les petites brûlures (TBSA < 20 %) induisent une augmentation de l'expression des gènes mesurés, tandis que de plus grandes brûlures (TBSA > 20 %) induisent une suppression de l'expression des gènes impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire. Une plus grande brûlure établit les conditions responsables de l'immunosuppression sévère par la diminution de l'expression des gènes clés impliqués dans les voies de signalisation immunitaire telle que la voie de signalisation de facteur de transcription NF-κB. Les patients avec plus de 20 % de TBSA ont montré une diminution de l'expression de chacune des voies de signalisation NF-κB par rapport aux patients brûlés de moins de 20 % TBSA (Moore *et al.*, 2007). La transcription des gènes de l'IL-6 et l'IL-12 était significativement élevée chez les patients brûlés de moins de 20 % TBSA. Chez les patients avec plus de 20 % de TBSA, l'expression de l'IL-6 et l'IL-12 était fortement diminuée (Moore *et al.*, 2007).

Les anomalies des fonctions de la réponse immunitaire sont résumées sur la figure suivante (voir **Figure 12**).

**Figure 12 : Le résumé de l'activation complexe du système immunitaire suite à l'agression tissulaire (la brûlure) et ses effets sur la réponse immunitaire innée, spécifique, la réponse cellulaire et humorale (O'Sullivan & O'Connor, 1997)**



## 2.6 **Projet d'étude**

La majorité des études sur des cellules immunitaires et des cytokines inflammatoires impliquées dans l'élaboration de la réponse immunitaire suite à la brûlure ont été effectuées seulement dans la circulation sanguine. Peu des études ont été faites sur les cellules immunitaires et cytokines potentiellement présentes immédiatement après la brûlure dans le tissu traumatisé.

Notre hypothèse est que les cytokines inflammatoires au niveau de la plaie chez les brûlés se retrouvent dans la circulation sanguine et donnent ainsi la naissance au SRIS et par la suite modifient la réponse immunitaire.

Nos objectifs de ce projet sont suivant :

1. Déterminer au niveau de la plaie des grands brûlés les gènes inflammatoires exprimés ainsi que les chemokines et les cytokines
2. Évaluer la réponse inflammatoire en périphérie chez les grands brûlés
3. Faire une analyse comparative des résultats des deux premiers objectifs pour déterminer le site d'initiation du SRIS

### 3 ARTICLE SCIENTIFIQUE

Contribution à l'article :

Pour ce projet, j'ai effectué les extractions des ARN ainsi que des protéines à partir de plaies brûlées issues de 6 patients. Ensuite, j'ai vérifié la qualité de tous les ARN par Expérian. Avec des ARN totaux extraits de bonne qualité j'ai les faits transformer en ADNc et puis j'ai effectué le RT PCR. J'ai également évalué les niveaux de 20 cytokines humaines dans les plasmas et 40 cytokines dans la peau de 6 patients en utilisant Quantibody Human Th17 Assay. Cette expérience a été réalisé avec la colaboration de Guillaume Ricaud, mon collègue de laboratoire. Toutes les données j'ai analysées à l'aide du programme logiciel Graph Pad InStat. Sous la surveillance de mon directeur de recherche Jacques Bernier, j'ai rédigé cet article.

Résumé de l'article en français :

La peau représente l'une des premières lignes de défense de l'organisme contre les pathogènes. Les brûlures sévères sont caractérisées par le syndrome de la réponse inflammatoire systémique (SRIS). Cet état rend le patient vulnérable aux infections nosocomiales qui peuvent entraîner la mort. L'objectif de notre étude est de déterminer les marqueurs qui identifient les cellules immunitaires et le réseau de cytokines dans les tissus brûlés. Les échantillons de la peau brûlée ont été obtenus chez des patients avec plus de 20 % de TBSA dans les 24 premières heures après leur admission à l'hôpital. Les ARN obtenus à partir des échantillons cutanés de 6 patients, les profils d'expression génétique des cytokines inflammatoires et des chimiokines, ainsi que ceux liés à l'immunité innée et adaptative, ont été déterminés par RT Profiler PCR Assay. Ensuite, la présence de cytokines inflammatoires a été déterminée en utilisant des puces à l'anticorps de 6 échantillons de protéines extraites de la peau brûlée et comparées à celles trouvées dans le plasma des patients brûlés et le plasma des donneurs sains. Nos résultats démontrent une expression importante de plusieurs gènes impliqués dans la modulation de l'immunité inflammatoire et dans l'induction de l'apoptose. Nous avons également observé l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'immunosuppression. L'analyse des cytokines dans le sang et les cytokines dans la peau ont montré un fort profil inflammatoire. Les concentrations de certaines cytokines sont très élevées au niveau de la plaie par rapport au niveau systémique. Ces résultats confirment notre hypothèse que le développement du SRIS prend la naissance dans le site de



l'agression tissulaire. Les populations cellulaires résidentes dans la peau initient cette réponse inflammatoire.

# CHARACTERIZATION OF HUMAN IMMUNE CELLS AND CYTOKINES NETWORK IN EXCISED SKIN FROM THE WOUNDS IN SEVERELY BURN PATIENT

Ilna Gdovinova<sup>1</sup>, Guillaume Ricaud<sup>1</sup>, Isabelle Perreault<sup>2,3</sup> and Jacques Bernier<sup>1,2,3,4</sup>

1 : INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boul. des Prairies, Laval, Qc, Canada, H7V1B7

2 : Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, Canada

3 : Centre des Grands Brûlés, Montréal, Canada

4 : Corresponding author:

Jacques Bernier

531 Boul. des Prairies

INRS-Institut Armand-Frappier

Laval, Qc, Canada

H7V 1B7

[Jacques.bernier@iaf.inrs.ca](mailto:Jacques.bernier@iaf.inrs.ca)

450-687-5010 ext 8813

Fax: 450-686-5510



## ABSTRACT

The skin represents one of the first lines of defense of the organism against pathogens. Severe burns are characterized by the syndrome of the systemic inflammatory response (SRIS). This condition makes the patient vulnerable to nosocomial infections that may lead to death. The objective of our study is to determine markers that identify immune cells and cytokines network in burn excised tissues. The excised burn skin sample were obtained from patient with more 20% TBSA within first 24h after their admission in hospital. RNA obtained from the skin samples of 6 patients, the gene expression profiles of inflammatory cytokines and chemokines, as well as those related to innate and adaptive immunity, were determined by RT Profiler PCR Array. At the same time, the presence of inflammatory cytokines was determined using antibody microarrays from 6 samples of protein extracted from burning skin and compared to those found in the plasma of burn patients and healthy donors. Our results demonstrate an important expression of several genes involved in the modulation of inflammatory immunity and in the induction of apoptosis. We have also observed the expression of several genes involved in immunosuppression. Cytokine analysis in the blood and cytokine in the skin showed a strong inflammatory profile. The concentration of some cytokines is very high at the wound level compared to the systemic level. These results support the hypothesis that the development of SRIS takes the origin place at the site of tissue aggression. Resident cell populations in the skin initiate this inflammatory response.

**Keywords** Debridement, Skin, burn injury, cytokines, SRIS, CARS, RT-profiler, Antibody array, innate immune response, adaptive immune responds





## INTRODUCTION

Almost 85% of fatal deaths of survivors of severe burn trauma are attributed to septicemia or multiple organ dysfunction syndrome (MODS). Burn-related trauma disrupts host defense mechanisms against microorganisms. Immunosuppression that occurs just after the burn increases the susceptibility to infections of common and opportunistic pathogens (1).

Burn injury cause very important hormonal, metabolic, circulatory and immunological disturbance (1) (2). To reduce these later changes, particularly the immunosuppression, burn tissue is excised early in the burn unit. Severe burn could induce of systemic inflammatory response syndrome (SRIS) in the initial phase. It has been suggested that SRIS originate from the burn wound that spill over to the periphery (3).

Several non-immune and immune cells present in the skin have the capacity to produce cytokines after stimulation. Burn injured tissues can contain pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) of bacteria and damage-associated molecular patterns (DAMPs). Consequently, injured tissue represents an environment favorable to the non-specific activation of several cell types of the immune system such as keratinocytes, fibroblast endothelial cells and dendritic cells. Dendritic cells are highly specialized antigen presenting cells. They play a critical role in the development of an adequate response by T lymphocytes as well as in maintaining immune tolerance. Studies have shown that dendritic cells are activated in the presence of necrotic cells (4). This situation can occur after the burning trauma because an increase in several ligands of a receptor expressed by dendritic cells, such as toll-like receptor-4 (TLR4), has been observed at the burn site (5). TLR4 is expressed by dendritic cells as well as by macrophages and keratinocytes (6). This receptor plays a crucial role in the initiation of innate immunity, in the regulation of adaptive immunity and skin wound healing (1). Wound from TLR-4 deficient mice shown a modification at the level of pro-inflammatory cytokines and in infiltrating cells. The activation of TLR4 allowed the maturation and activation of dendritic cells and the link between innate immune response and to activate the path of adaptive immunity (7).

This exaggerated inflammatory response triggers an overproduction of inflammatory cytokines such as an interleukin-1 beta (IL-1 $\alpha$ ), alpha tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) of immune cells. The aggravation of the SIRS led to a compensatory anti-inflammatory reaction

(CARS). These mechanisms are potentially responsible for the state of immunosuppression of the patients (1). The emergence of CARS is the second risk factor in the occurrence of septicemia, as immune depression sets in, making the organism vulnerable to nosocomial infections. The degree of immunosuppression increases with the severity of the burn (1).

It was demonstrated that wound exudates, isolated from eschars obtained 11-21 days post-burn injury contained low numbers of cytokines and a high amount chemokines and growth factors. High to moderated concentration of IL-8, CCL2, CCL5 and CCL18 were observed. Since blister fluid and wound exudate from burn superficial-partial thickness and burn deep partial thickness have different outcomes of immune mediators or immune cells (2). It was suggested that debridement decrease pro-inflammatory conditions and facilitating the healing recovery. Presently, divergent studies have been publishing on the composition in either pro- or anti-inflammatory cytokines in burn wound fluid. The concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-8, MCP-1, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ , and GM-CSF were more important in wound level than plasma when the systemic complication occurs (3). Burn eschar can represent a source of PAMPs and DAMPs which can stimulate immune response. It was established an association of burn patients whose eschar and a reduction of pro-inflammatory cytokines at systemic level (4). Analysis of cultured human epidermal keratinocyte of patients with severe burns showed hypo expressed genes (TNF, HLA-E, Lyz, CCR6, CD86, HLA-A, IRF3, STAT3, TLR2, and IL18) and hyper expressed genes (IL8, IL6, IL1A, SLC11A1, CD8A, IL1B, NOD2, CCR4) (5). These results cannot easy associated to burn since keratinocytes were cultured in vitro before analysis. Thus, innate and adaptive immune components present in excised tissues from burn wound remained elusive.

The objective of this project was to determine the expression of genes and proteins linked to immune response present in excised tissues of human burn patients. It was demonstrated that burn wound contained different zones based on the severity of tissue destruction. Early excision was associated with a decrease of time wound closure and infection (3). Most studies on the sequelae of severe burns on immune cells or cytokines have been focused on the cells or cytokines circulating in the bloodstream (6). Few studies have addressed the immune cells present at the site of burn, in the wound, although the elevation of systemic inflammatory cytokine concentrations is attributed to them.

# 1 MATERIALS AND METHODS

## 1.1 Biopsy of burn skin

Skin biopsy was obtained from patients who had a thermal burn on more than 15% TBSA in CHUM hospital of Montreal. This was an exploratory study with the small number of patients. We realised this project with 6 patients. The samples were taken in the first week following admission. The damaged tissue was removed with a dermatome during surgery, up to the level of the deep tissue, which allowed us to isolate cells from the dermis. The biopsies were made on the periphery of the wound, allowing us to collect cells in the site of the burn and the cells at the peripheral level of the wound. Samples were stored on ice until used or in -80°C in the freezer of our laboratory until further processing. The protocol for this study was approved by Ethics Committee of CRCHUM and written consent was obtained from the patient or closest relative.

## 1.2 Isolation of ARN and proteins

At first days, the burn skin was washed in cold PBS. Then the cells were grinded with liquid nitrogen. Total ARN and total proteins were extracted using chloroform and then precipitated with the Ambion PARIS KIT Protein and RNA Isolation system (Life technologies) following the manufacturer's instructions. The RNA concentration was quantified with the Nanodrop1000 (Thermo Scientific), while purity and integrity were assessed using Experion RNA StdSens Analysis Kit using the Experion™ automated Electrophoresis System (BIO-RAD).

### RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays

The total RNA was converted to cDNA using the First Standard kit (QIAGEN). Random primers and reverse transcriptase already prepared in RT mix (RT First Standard kit QIAGEN) were used for cDNA synthesis. We used 10 µL of RT mix for each sample. To establish the profile of cytokines and immune cells present, the system RT Profiler PCR Array Human Innate and Adaptive Immune Responses (QIAGEN) was used. A pool was made with our samples by taking 50 µL of each and then taking 102 µL of pool of all samples to the new tube. cDNA was amplified using Syber Green RT Mastermix (BIO-RAD) following the manufacturer's instructions. Amplification of the cDNA was performed in a final volume of 25 µL for each of 96 wells. Cycling conditions were 95°C for 20 s, 95°C 15 s, and 60°C for 60 s and the optimum cycle was 40 cycles for amplification. Gene expression was quantified using Bio-Rad CFX manager software.



Standardization was performed with GAPDH as the endogenous control and the expression levels of the genes of interest were normalized to reference genes. This system allowed us to determine the expression of more than 84 genes involved in the Th17 response and inflammation as well as expression of molecules involved in the anti-bacterial defense and septic shock, including chemokines, interleukins, growth factors as well as receptors for these molecules.

### **1.3 Quantibody Array**

An antibody-based cytokine array (Quantibody Human Th17 Array 1, Ray Biotech, Inc.) was used to detect 20 cytokines simultaneously in serum of patients with severe burn injury (n=6) as well as in serum of healthy donors (n=6). Another array (Human Inflammation Array Q3, Ray Biotech, Inc.) was used to detect 40 cytokines simultaneously in the skin of patients with severe burn injury (n=6). The array system utilized the multiplexed sandwich ELISA-based technology to quantitatively measure the concentration of human cytokines. An equal amount of sample diluent was added into each well and incubated for 30 minutes to block slides. Then multiple cytokine-specific capture antibodies together with the positive controls were arrayed onto the glass support in quadruplicate. After incubation for 2h with gentle shaking, the diluted serum samples were incubated with the second biotinlabeled specific detection antibody to recognize a different isotope of the target cytokine. The streptavidin-labeled Cy3 equivalent dye was added to incubate in dark room for 1h, and the signals were subsequently visualized using a laser scanner. Data extraction was done using microarray analysis software GenePix laser scanner (Toronto, Canada), and Quantibody Q-Analyzer software (Ray Biotech, Inc.) was used for quantitative data analysis. By comparing signals from positive controls, the cytokine concentration was determined.

### **1.4 Statistic analysis**

All data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Exception for a pool of plasma because we performed a single pool only. Data were analyzed by using Graph Pad InStat software program. A value of  $p < .05$  was considered statistically significant.



## 2 RESULTS

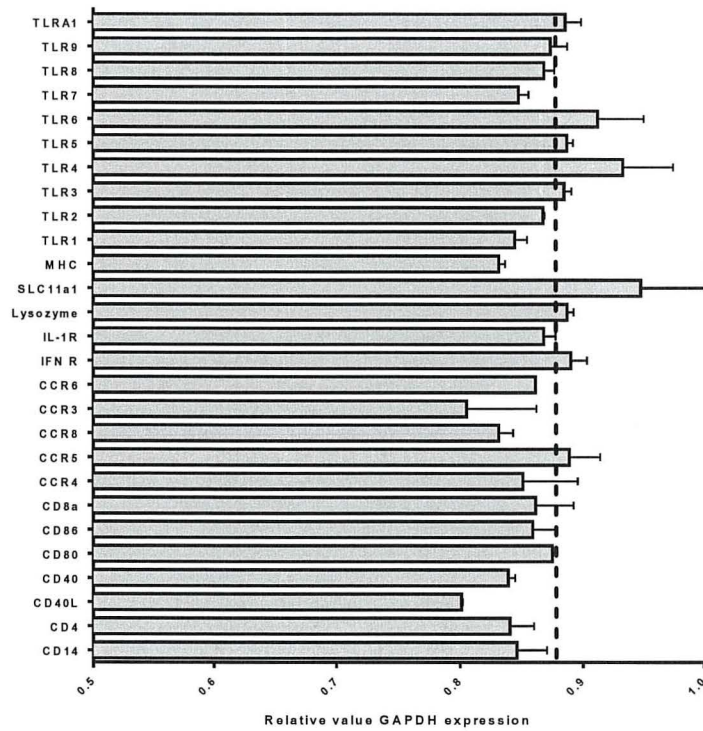
Six male patients were included in our study with an average age of 55 years (38 +- 22) and an average TBSA of 44% (44 +-20.7%). Burn skin excision were performed on the day following their admission in burn center. All sample were kept in -80oC before analysis.

We have used RT2 Profiler PCR Arrays for human innate and adaptive Immune Responses to determine which genes were predominantly expressed in burn excised tissue. Analyse of our results shown an important expression of different genes involved in the modulation of inflammatory immunity and innate and adaptive immunity. Results presented in the form of a graph representing the relative value of expression of most significantly expressed genes as compared to the mean of expression of reference genes namely, GAPDH,  $\beta$ 2-microglobulin and actin  $\beta$ . Regarding innate immunity, pattern recognition receptors were largely expressed (Figure 1) particularly TLR-4 expression. Adaptive immunity genes were also expressed in excised tissues. Genes expressed by T cell (CD4, CD8, CCR4, CCR6) (Figure 1), T-cell activation genes (CD80, CD86, SLC11a) (Figure 1) and T cell transcription factors (GATA3, FoxP3, RORC) (Figure 2). Cytokines such as IL-1a, IL-1b, IL-18, TNF $\alpha$  and IL-8 were also expressed in live cells present in excised tissues (Figure 3). TRAF-6, NLRP3, and IRF3 genes involved in signaling pathways of innate immunity were also expressed (Figure 3). Several of genes of innate immune system were highly expressed such as SLC11a1, and IRF3. Gene controlling inflammatory response such TRAF6 involved in TNF and IL-1 signaling, RORC implicated in IL-17 production were also upregulated. Interestingly, FoxP3 gene which is mainly expressed in CD4+ Treg cells was also strongly expressed demonstrating that both inflammatory response and counter inflammatory response were present in excised tissues early as one day following the burn injury.

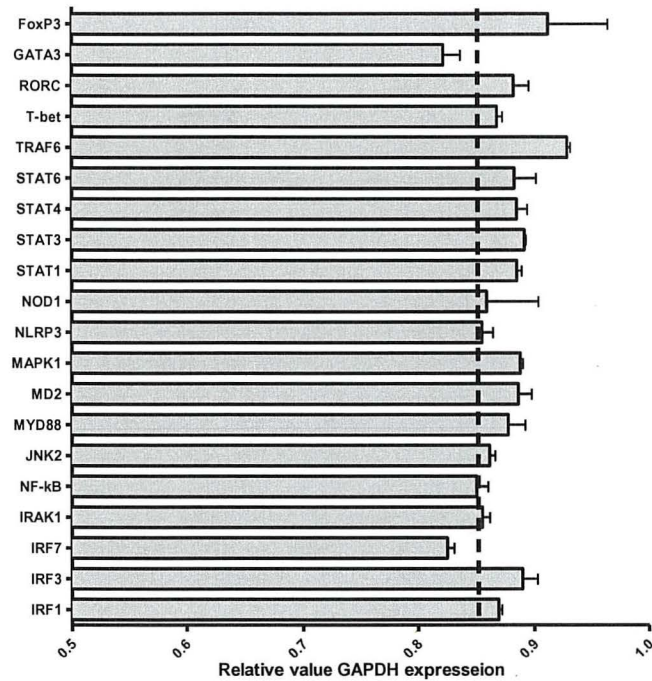
PARIS kit used for RNA isolation gives to us the opportunity to isolate in the same sample native protein. From protein isolated, we have quantified cytokines in the sample. Inflammatory cytokines including IL-6, TNF and IL-17A were elevated in patients' samples. Interestingly, IL-15 and IL-16, two interleukins with chemoattractant propriety and involved in the modulation of T cells were also increased. Some interleukin like IL-2 and IL-11 were extremely variable with a level of 10 to 2000 pg/100 ug protein. Cytokines

such as G-CSF, GM-CSF and M-CSF involved in monocytes and granulocytes division or activation were present at low concentration.

Next, we have evaluated the presence of chemoattractant factors. CXC chemokine family involved in lymphocyte was increased (Figure 3). High concentration of CXCL9 was noted. This CXC chemokine is specific to T cells. CL13 which are involved in B cells recruitment was also increased but less extent. Chemokine sharing C-C motif were differently expressed in excised tissue. Only CCL2 and CCL5, which have chemotactic activity for T cells and to a less extent to monocytes or basophil were markedly raised. Surprisingly, CCL3, CCL4, CCL11, CCL15 and CCL24, which are involved in PMN recruitment are present low concentration. High concentration of ICAM-1, an adhesion molecule expressed by endothelial cells and immune cells was present in sample of excised tissues (10 000 pg/100 ug of protein). As expected, TIMP-1 and TIMP-2, two metalloproteinases inhibitors were expressed at high levels.

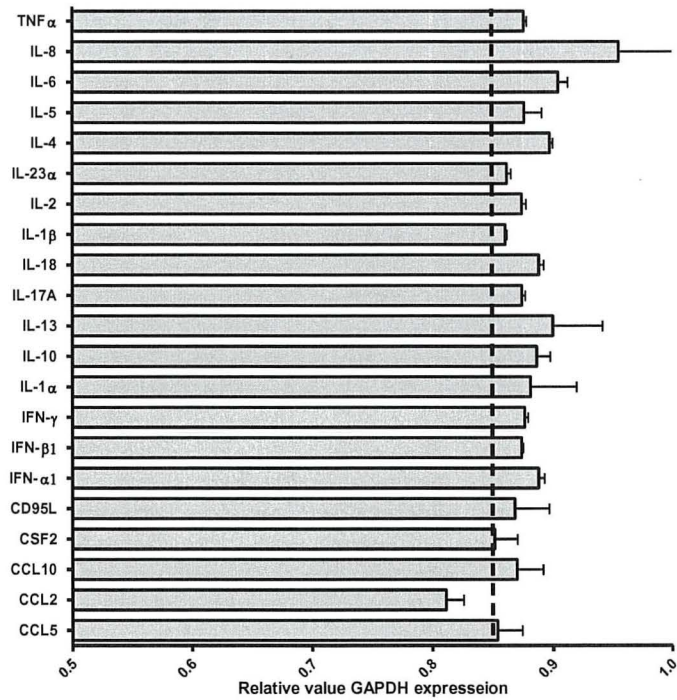


**Figure 1 :** Receptors genes of Human Innate & Adaptive Response. RT Profiler PCR Array Human Inflammatory Cytokines & Receptors & Chemokines. The RNA purified from biopsy of the frozen human burned skin from 6 patients underwent the Reverse Transcription and then the POOL (cDNA cluster of each sample). Then transfer the samples into 96 wells of PCR patch kit (QIAGEN). Expression of genes with inflammatory profile and induction of apoptosis (RT-PCR). Results are presented as mean value  $\pm$  SEM of two independent experiments (n=6 patients/group).



**Figure 2.** Intracellular proteins genes involved in Human Innate & Adaptive Response. RT Profiler PCR Array Human Inflammatory Cytokines & Receptors & Chemokines. The RNA purified from biopsy of the frozen human burned skin from 6 patients underwent the Reverse Transcription and then the POOL (cDNA cluster of each sample). Then transfer the samples into 96 wells of PCR patch kit (QIAGEN). Expression of genes with inflammatory profile and induction of apoptosis (RT-PCR). Results are presented as mean value  $\pm$  SEM of two independent experiments (n=6 patients/group).





**Figure 3.** Cytokines and chemokines genes involved in Human Innate & Adaptive Response. RT Profiler PCR Array Human Inflammatory Cytokines & Receptors & Chemokines. The RNA purified from biopsy of the frozen human burned skin from 6 patients underwent the Reverse Transcription and then the POOL (cDNA cluster of each sample). Then transfer the samples into 96 wells of PCR patch kit (QIAGEN). Expression of genes with inflammatory profile and induction of apoptosis (RT-PCR). Results are presented as mean value  $\pm$  SEM of two independent experiments (n=6 patients/group).

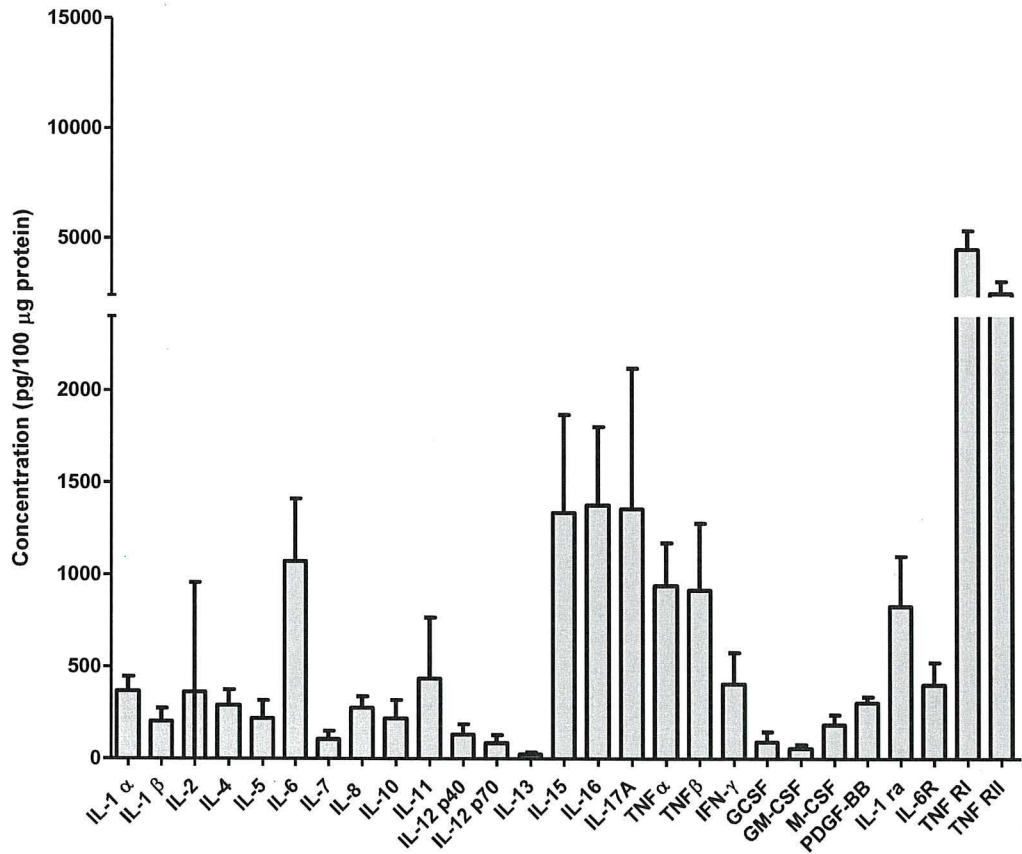
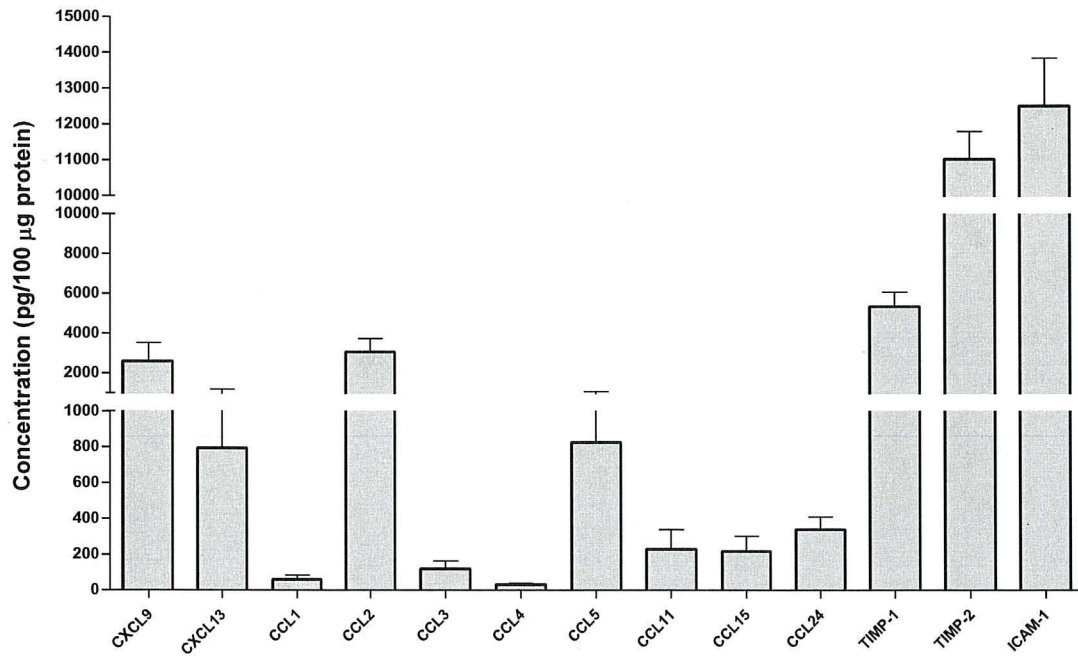


Figure 4. Cytokines profile from excised tissues after burn injury. The presence of inflammatory cytokines was determined by using antibody microarrays from protein samples of the skin as well as from the plasma of burned patients. Then the results of each concentration of proteins were compared to those found in the patient plasma. The commercial kit Quantibody Human Th17 Array 1(Ray Biotech, Inc.) was used. Data are represented as the mean value  $\pm$  SEM (n= 6 patients/group).



**Figure 5. Chemokines profile from excised tissues after burn injury.** The presence of inflammatory cytokines was determined by using antibody microarrays from protein samples of the skin as well as from the plasma of burned patients. Then the results of each concentration of proteins were compared to those found in the patient plasma. The commercial kit Quantibody Human Th17 Array 1 (Ray Biotech, Inc.) was used. Data are represented as the mean value  $\pm$  SEM (n= 6 patients/group).





### 3 DISCUSSION

Over the past 30 years, numerous studies have shown the importance of the epidermis as an immune organ (2). Our results shown of burn tissues excised within 24 hours after injury contained a complex inflammatory immune network. The immune cells in the skin are distributed on both sides of the basal membrane and participate in the defense against pathogens through antigen-presenting cells (5). In burn wound, zone of coagulation contained necrotic cells associated with denatured and degraded proteins (7). These later zones contained numerous DAMPs and PAMPs which can stimulate TLR and upregulation of their expression in bearing cells such as macrophages, dendritic cells and Langerhans cells (8) (9). The stimulation of these receptors by microbial products lead to the activation of signaling pathways and the induction of several genes involved in antimicrobial control as well as the induction of inflammatory cytokine genes (33). It was also observed that dendritic cells are activated in the presence of necrotic cells in the absence of a pathogen (34). Although the majority of TLR were expressed, TLR4 and TLR6 were highly expressed in burn excised skin (Figure 1). Around coagulation zone, a region with predominance of hypoxia and ischemia can also activate innate immune response. Since several cell can also dead by necrosis, it is not surprising that the excised tissues high expression of lysozyme (Figure 1). Our results demonstrated the presence of several immune cells confirming a rapid mobilization of immune response to burn wound. In ischemic zone of burn wound, cells dead by apoptosis and also by necrosis causing an exacerbation of inflammatory response.

Our genes expression analysis on excised burn tissue point out that either innate immunity and adaptive immunity genes were expressed (Figure1-3). Innate immunity exemplified by pattern recognition receptors, cytokines production such as IL-8, IL-6 CCL5 and IL-18 and several signaling molecules (MYD88, NF-kB STAT1 and TRAF6). Innate immune response cells in skin involve keratinocytes, dendritic cells, neutrophils and natural killer cells,  $\gamma\delta$  T cells and innate lymphoid cells (10). Keratinocytes which expresses TLRs and secrete several cytokines (IL-1b, IL-6, IL-10, IL-18) can contribute to the early inflammatory response. Important level of CD80 and CD86 suggests that DCs and Langerhans cells were activated (11). Important concentration of IL-6, TNF $\alpha$  and IL-1 associated with the expression of IL-8 demonstrated an acute inflammatory response and the mobilization of immune cells to infiltrate the wound.

Surprisingly, adaptive immune response genes analysis showed that several marker of Th subsets were expressed. Th1 markers including CCR5, CD80, IL18, IL-2 INF $\gamma$  and SAT4 were expressed demonstrating the inflammatory conditions. Th17 markers were also present such as IL-17A, CCR6, RORC and SAT3. Associated with these Th cells makers governing the inflammatory response, several genes of T cells activation were also expressed such as CD80, CD86 and SLC11A1. Although the inflammatory genes were well expressed, the count inflammatory response was also well established. Indeed, Treg markers CCR4, CCR8, FoxP3 and IL-10 are well expressed suggesting the presence of these cells in the excised tissue. We observed very high levels of many inflammatory cytokines in the skin just after the burn injury. These cytokines are BLC which is a chemokine attractor of B-cells and plays a very important role in activation of B cells function. We also observed high level of interleukin 15, a stimulator of neutrophil produced by keratinocytes as well as Langerhans cells of the skin. Our results have shown also high production of cytokines MCP-1 and RANTES which are the stimulators of monocytes, basophiles and eosinophils produced by Langerhans cells in the skin (Figure 4, 5). The keratinocytes present in the skin can secrete a wide variety of cytokines and can express class II antigens on their surface, so that they are able to amplify the epidermal immune mechanisms. In the burned patients, the perturbation of the secretion of these cytokines can be observed (12). Recently, a new class of T-helper cells, called Th-17, was found to secrete the pro-inflammatory cytokines IL-17 and IL-22. Th-17 response also involves other cytokines, such as IL-6, which has been shown to be associated with inflammation induced by burning. Th17 cells are preferential producers of IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21 and IL-22. These cells mediate inflammatory responses at skin level, particularly against extracellular pathogens (13). Studies in some experimental models suggest a role for IL-17 in the recruitment of immune cells, such as neutrophils and monocytes, and infection control (14). But still more research needs to be done about this topic because the relationship exact between Th-17 response and post-burn inflammation is not very well known (13).

Our results of PCR have also shown a strong expression of some genes implicated in repression of inflammation such as Forkhead box P3 which is the transcription factor of lymphocytes T regulators responsible of decrease of lymphocytes Th1 (Figure 2). We also noted a high level of GATA binding protein3, markers of lymphocytes Th2 as well as endothelial cells, which produce interleukin 10 able to decrease inflammatory reaction (Figure 2). High levels of expressions of gene encoded protein tyrosine kinase 2 was also observed (Figure 2). This protein is implicated



in the modulation of the signaling pathway following the activation of receptor TCR of T lymphocytes. But we can't say whether this signaling pathway subsequently polarizes T lymphocytes towards the Th1-type inflammatory response or the Th2-type anti-inflammatory response. But overall these results suggest the development of anti-inflammatory response early after burn.

In our results, we also observed important concentration of TIMP-1 and TIMP-2 which are the tissues inhibitors of metalloproteinase and they are responsible for decreasing of proliferation of endothelium of cells of the skin as well as an extra cells matrix (Figure 5). A high level of ICAM-1 was also noted. Increase of ICAM-1 was associated with several pathology and can represent an important mechanism by which lymphocyte such of T cells become localized at the site of wound. ICAM-1 can also be expressed in soluble form which can act as antagonist of membrane form, inhibiting the leukocyte adhesion to endothelial cells. Importantly, ICAM-1 null mice showed a delayed wound repair and a decrease of elasticity (15) suggesting a role of this molecule in these processes. Hypertrophic scars and the decrease of elasticity represent two major problem in burn patients. Determination of ICAM-1 form in excised tissue will be indicative of possible complications such as hypertrophic scars associated with T-cell subset infiltration (16).

A second approach to study inflammatory mediators at the level of wounds of burn victims is to use the exudate of this one. This approach has demonstrated the presence of toxic, immunosuppressive and inflammatory factors (17). Wound exudate, following debridement, has been shown to have a high concentration of chemokine attributable to the fibroblast surrounding the wound (18). Concerning cytokines, the presence of its last corresponds to a profile favoring the process of epithelialization, although it may be harmful to this process (3). It has also been shown that cytokine levels at the exudate level are higher than the concentrations found in the blood. Our results correspond to those obtained in the study of Mikhalchik et al (19) on the exudate of wounds of severely burned children. It would therefore be possible to analyze the inflammatory profile of patients in the first 24 hours following the trauma. This analysis could suggest the type of intervention that should be performed on patients to promote faster healing.

Regarding the results obtained by the analysis of the gene expression versus proteins extracted from the burned skin, the extraction of the proteins is simpler, and the results obtained give a good idea of the inflammatory profile of the patients. Further studies will be needed to correlate

our findings with the clinical status of patients. Thus, the use of burned skin excise within the first 24 hours could help establish a better treatment plan and glimpse the possibility of complications.

**Acknowledgments** This work was supported by a grant from the Fondation des Pompiers du Québec pour les Grands-Brulés.



## 4 REFERENCES

1. Chen L, DiPietro LA. Toll-Like Receptor Function in Acute Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2017;6(10):344-55.
2. Banyard DA, GRD E, Widgerow A. Burn Wound Exudate: Depth of Burn Predicts Cellular Recruitment. *Journal of Dermatology and Clinical Research*. 2016;4(3):1073-5.
3. Widgerow AD, King K, Tocco-Tussardi I, Banyard DA, Chiang R, Awad A, et al. The burn wound exudate-an under-utilized resource. *Burns*. 2015;41(1):11-7.
4. Williams FN, Herndon DN, Jeschke MG. The hypermetabolic response to burn injury and interventions to modify this response. *Clin Plast Surg*. 2009;36(4):583-96.
5. Noronha SA, Noronha SM, Lanziani LE, Ferreira LM, Gragnani A. Innate and adaptive immunity gene expression of human keratinocytes cultured of severe burn injury. *Acta Cir Bras*. 2014;29 Suppl 3:60-7.
6. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med*. 1996;125(8):680-7.
7. Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, Burmeister DM, Rose LF, Natesan S, et al. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit Care*. 2015;19:243.
8. Leifer CA, Medvedev AE. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *J Leukoc Biol*. 2016;100(5):927-41.
9. Mitsui H, Watanabe T, Saeki H, Mori K, Fujita H, Tada Y, et al. Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. *J Invest Dermatol*. 2004;122(1):95-102.
10. Bonefeld CM, Geisler C. The role of innate lymphoid cells in healthy and inflamed skin. *Immunol Lett*. 2016;179:25-8.
11. McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DN. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol*. 1995;25(7):2064-8.
12. Aubock J, Niederwieser D, Romani N, Fritsch P, Huber C. Human interferon-gamma induces expression of HLA-DR on keratinocytes and melanocytes. *Arch Dermatol Res*. 1985;277(4):270-5.
13. Sasaki JR, Zhang Q, Schwacha MG. Burn induces a Th-17 inflammatory response at the injury site. *Burns*. 2011;37(4):646-51.
14. Liu J, Feng Y, Yang K, Li Q, Ye L, Han L, et al. Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;61(2):179-88.
15. Gay AN, Mushin OP, Lazar DA, Naik-Mathuria BJ, Yu L, Gobin A, et al. Wound healing characteristics of ICAM-1 null mice devoid of all isoforms of ICAM-1. *J Surg Res*. 2011;171(1):e1-7.

16. Castagnoli C, Trombotto C, Ondei S, Stella M, Calcagni M, Magliacani G, et al. Characterization of T-cell subsets infiltrating post-burn hypertrophic scar tissues. *Burns*. 1997;23(7-8):565-72.
17. Dyess DL, Ferrara JJ, Luterman A, Curreri PW. Subeschar tissue fluid: a source of cell-mediated immune suppression in victims of severe thermal injury. *J Burn Care Rehabil*. 1991;12(2):101-5.
18. Avniel S, Arik Z, Maly A, Sagie A, Basst HB, Yahana MD, et al. Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the recovery of skin following burns. *J Invest Dermatol*. 2006;126(2):468-76.
19. Mikhal'chik EV, Piterskaya JA, Budkevich LY, Pen'kov LY, Facchiano A, De Luca C, et al. Comparative study of cytokine content in the plasma and wound exudate from children with severe burns. *Bull Exp Biol Med*. 2009;148(5):771-5.

## 4 DISCUSSION ET CONCLUSION

L'objectif de cette étude était d'établir le réseau des marqueurs d'inflammation ainsi que l'immunosuppression suite à la brûlure sévère et de déterminer le profil inflammatoire au niveau de la plaie de la peau humaine et de le comparer à celui retrouvé au niveau systémique. Par conséquent, cette étude identifiait le lieu de naissance de cette réponse dévastatrice pour l'homme. Plusieurs études ont établi que les brûlures sévères sont caractérisées par SRIS (Bone, 1996b). Cet état rend le patient vulnérable aux infections nosocomiales pouvant conduire à son décès (Goris, 1996). Notre hypothèse était que les cytokines inflammatoires contenues dans la peau se retrouvaient, suite à la brûlure, dans la circulation sanguine et donnaient la naissance au SRIS et par la suite modifiaient la mise en place de la réponse immunitaire. Chez les patients gravement brûlés on peut observer un déséquilibre entre la réponse pro-inflammatoire, inflammatoire et anti-inflammatoire ce qui est associé à l'apparition de la septicémie (O'Sullivan & O'Connor, 1997). Il a été précédemment bien démontré que l'aggravation du SRIS stimule CARS et ces mécanismes sont potentiellement responsables de l'état d'immunosuppression des patients (Bogunovic *et al.*, 2006). L'activation de cette réaction CARS représente le second facteur de risque dans l'apparition des septicémies (Weiss *et al.*, 1999). Plusieurs études antérieures ont démontré que la brûlure sévère favorise le surgissement des infections suivi par la dépression immunitaire qui est mise en place par cette réaction anti-inflammatoire compensatoire. Cette immunosuppression suivante la brûlure sévère est caractérisée par la diminution importante de la capacité de cellules immunitaires à produire des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8 et les interférons dans la réponse aux endotoxines (Kondo *et al.*, 2012).

La peau est la première ligne de défense contre les pathogènes et l'un de ses principaux rôles est d'assurer une fonction immunitaire (Valladeau & Saeland, 2005). De nombreuses études ont démontré l'importance de l'épiderme comme un organe immunitaire (Sauder, 1983). Dans une étude antérieure, il a été observé que nombreuses cellules immunitaires sont présentes dans l'épiderme ainsi que dans le derme. Dans l'épiderme il s'agit principalement de cellules de Langerhans (Romani *et al.*, 2012). Dans le derme on trouve également des cellules immunitaires telles que les macrophages, les mastocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4+ et T CD8+, les cellules T rég ainsi que Th17 et les cellules NK (Nestle *et al.*, 2009). Les lymphocytes T sont responsables de la réponse immunitaire spécifique cellulaire, qui vise à détruire les pathogènes. Par contre, les lymphocytes T ne possèdent pas le récepteur de reconnaissance directe pour la pathogène donc ils ont besoin d'aide des cellules présentatrices d'antigène (CPA),



par exemple les cellules dendritiques. Suite à cette rencontre, les cellules T s'activent, prolifèrent, se différencient en différentes populations et produisent des cytokines. Les lymphocytes de type Th1 induisent la réponse inflammatoire et elles produisent de l'INF- $\gamma$  et l'IL-2. Ces substances ont pour le but de stimuler la production de cytokines ainsi que l'activité des macrophages (O'Sullivan *et al.*, 1995). Les lymphocytes de type Th2 sécrètent dans leur environnement des cytokines tel que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, l'IL-10 et l'IL-13. Ces cytokines activent par la suite de nombreuses cellules immunitaires telles que des éosinophiles et des mastocytes pour pouvoir éliminer le pathogène. Ces cytokines sont également importantes pour le développement de la réponse humorale impliquant la synthèse d'anticorps spécifiques (Dalton, 2001). Les lymphocytes de type T rég régulent la réponse immunitaire, par exemple par la production des cytokines immunosuppressives telle que l'IL-10 et TGF- $\beta$  (Asseman *et al.*, 1999). Les lymphocytes de type Th17 induisent la réponse pro-inflammatoire et produisent des interleukines tels que l'IL-6, l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 et l'IL-22 (Sasaki *et al.*, 2011). Les élévations spécifiques de groupe de cytokines pourraient suggérer les cibles thérapeutiques spécifiques ou servir de biomarqueurs pour l'évaluation de la guérison des grands brûlés d'où l'importance de ces études sur l'analyse de type et de niveau des cytokines spécifiques dans la plaie brûlée (Sasaki *et al.*, 2011).

La plaie causée par une brûlure sévère est caractérisée par le relâchement fort de médiateurs inflammatoires (Kearns *et al.*, 2013). Dans une étude antérieure, il a été observé que le niveau de certains chemokines inflammatoires tels que CCL3, CCL20 et CXCL1 est très élevé dans la plaie brûlée et une réponse inflammatoire exagérée a été observée suite à la brûlure (Schutyser *et al.*, 2003). Cette réponse inflammatoire exagérée déclenche une surproduction de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-12, TNF- $\alpha$  et une surstimulation de plusieurs populations de cellules immunitaires.

Il a été démontré au cours de ce projet que les concentrations de certaines cytokines sont très importantes au niveau de la plaie de la peau dès le jour 1 post-brûlure. Toutes nos concentrations de cytokines sont présentées en pg/100  $\mu$ g de protéine en fonction de nombre de jours suivant la brûlure et nous présentons ici les cytokines avec le changement majeur. Plus précisément, nous avons observé dans la peau brûlée le niveau très élevé des cytokines telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-17. Les études antérieures suggèrent le rôle de l'IL-17 dans le recrutement de cellules immunitaires telles que les neutrophiles et les monocytes pendant l'infection (Sasaki *et al.*, 2011). Dans le cas des patients gravement brûlés, il a été observé la perturbation de la réponse non spécifique guidée par l'activité des neutrophiles ainsi que l'augmentation de ces cellules immunitaires dans la circulation systémique suivant la brûlure.



Cette augmentation a été significative non seulement immédiatement après la brûlure, mais aussi plusieurs mois post-brûlure. En revanche, il a été démontré dans une étude antérieure que l'activité hydrolytique des enzymes contenues dans les granules cytoplasmiques de neutrophiles a été fortement diminuée et par conséquent la capacité de neutrophiles à phagocyter des pathogènes a été également perturbé (Sasaki *et al.*, 2011). Comme on peut voir sur la figure 4, nous avons aussi observé le niveau de concentration élevé de cytokine l'IL-15 qui est un stimulateur de neutrophiles. Cette cytokine est produite par les cellules de Langerhans ainsi que les keratinocytes. En effet, il a été démontré par plusieurs études que les keratinocytes présents dans la peau sont capables de sécréter une grande variété de cytokines et contribuer ainsi à l'amplification de la réponse immunitaire (Nestle *et al.*, 2009). Nos résultats, présentés sur la figure 5, montrent également le niveau élevé de cytokines MCP-1 et CCL5 (RANTES) qui sont des stimulateurs de monocytes et de basophiles et ils sont majoritairement produits dans la peau par les cellules de Langerhans.

En revanche, nous avons également observé dans la peau brûlée les concentrations élevées de cytokines qui sont impliquées dans l'immunosuppression. Comme on peut voir sur la figure 4, l'interleukine 1 récepteur (IL-1ra), l'agoniste de récepteur de l'IL-1 qui est produit par les cellules de Langerhans, était très élevée dans la plaie brûlée. Son rôle est d'inhiber les effets de l'activation de l'inflammation induits par l'IL-1 $\alpha$  et l'IL1 $\beta$  en bloquant leurs récepteurs. Les récepteurs pour ces interleukines sont situés à la surface de lymphocytes T de type Th1. Dans plusieurs études, il a été déjà constaté que la concentration de TGF- $\beta$ , connu pour ses effets d'immunosuppression, était très élevée après la brûlure (O'Sullivan & O'Connor, 1997). Nos résultats confirment que le niveau de concentration de TGF- $\beta$  est élevé dans la peau brûlée. Le TGF- $\beta$  pourrait être le candidat responsable d'une partie de la réduction de la prolifération des lymphocytes T observée chez les patients brûlés (Dalton, 2001). Nos résultats de la peau, présentés sur la figure 5, ont démontré les concentrations importantes de TIMP-1 et TIMP-2. Il s'agit des inhibiteurs tissulaires de metalloprotéinases responsables de la diminution de la prolifération des cellules endothéliales de la peau. Dans une étude antérieure, il a été observé que certaines substances immunosuppressives sont sécrétées dans la circulation sanguine juste après le stress tel que la brûlure. Par exemple, les prostaglandines, connues pour ses effets d'immunosuppression en diminuant l'activation de cytokine l'IL-12 (O'Sullivan *et al.*, 1995). En effet, dans nos résultats nous n'avons pas observé la concentration élevée de cette cytokine dans la plaie brûlée.

Dans le plasma des patients brûlés, nous avons observé l'augmentation graduelle des concentrations des cytokines suivant le nombre de jours post-brûlure. Ces concentrations ont été

particulièrement élevées pour certaines cytokines telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10, l'INF- $\gamma$  et le TGF- $\beta$ . Toutes ces cytokines sont produites par des cellules de Langerhans, des kératinocytes et certaines cytokines telles que l'IL-6 et le TGF- $\beta$  sont aussi produites par les mélanocytes. Nous avons également observé le niveau de concentration élevé de TNF- $\alpha$  et TNF- $\beta$ . Il s'agit des facteurs de la nécrose tumorale responsables de la stimulation des lymphocytes T de type Trég.

L'analyse de 20 cytokines dans le sang et 40 cytokines dans la peau humaine issus de nos 6 patients brûlés a globalement démontré un fort profil inflammatoire. La concentration de certaines cytokines telles que l'INF- $\gamma$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-2, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-10 est très importante au niveau de la plaie brûlée comparativement au niveau systémique. L'analyse de nos résultats de PCR démontre une expression importante de plusieurs gènes impliqués dans la modulation de l'immunité inflammatoire et dans l'induction de l'apoptose. On a observé une expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire telle que la caspase 1, le Complément component 3 et la C-réactive protéine. Il s'agit de marqueurs d'inflammation. Nous avons également observé l'expression des gènes de la famille des Facteurs de la nécrose tumorale (TNF) qui sont des marqueurs de la morte cellulaire (l'apoptose). Plusieurs gènes codant pour les interleukines et leurs récepteurs ont été également exprimés. Le gène codant pour l'IL-8, présenté sur la figure 3, a été très exprimé. L'IL-8 est un médiateur important de la réponse inflammatoire et il est produit majoritairement par les neutrophiles. Ce résultat suggère que les neutrophiles sont les acteurs principaux de l'induction de l'inflammation suite à la brûlure. Majoritairement, nous avons observé l'expression des interleukines pro-inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-2, l'IL-17, mais également des interleukines anti-inflammatoires telles que l'IL-4, l'IL5 et l'IL-10. Nous avons aussi observé l'expression de plusieurs gènes de la famille de récepteurs TLR. Ces récepteurs jouent un rôle important dans la reconnaissance spécifique de protéines d'origine bactérienne ou virale ou des protéines de soi qui sont normalement éliminées par le système immunitaire (Janeway, 1992). On peut voir sur la figure 1 que l'expression du récepteur TLR4 a été particulièrement importante. Ces récepteurs sont exprimés par les macrophages tels que les cellules dendritiques et leur stimulation induit à la maturation de ces cellules permettant ainsi la collaboration de l'immunité innée avec l'immunité adaptative (Janeway, 1992). On peut supposer que les cellules dendritiques sont fortement impliquées dans ce processus suivant la brûlure.

Sur la figure 2, nous avons également observé l'expression des gènes impliqués dans l'immunosuppression telle que Forkhead box P3, GATA binding protéine 3. Le Forkhead box P3 est un facteur de transcription pour les lymphocytes T de type T rég qui sont responsables de la



diminution de l'activité inflammatoire des lymphocytes T de type Th1 (Dudda *et al.*, 2008). Le GATA binding protein 3 est un marqueur de lymphocytes T de type Th2 ainsi que des cellules endothéliales qui produisent la cytokine l'IL-10 responsable de la diminution de la réaction inflammatoire (Havran & Jameson, 2010). Il a également été observé le niveau élevé de l'expression du gène codant pour la protéine de tyrosine kinase 2. Cette kinase est impliquée dans la modulation de la voie de signalisation suite à l'activation du récepteur TCR de lymphocyte T (Akira & Takeda, 2004). Par contre, on ne peut pas dire si cette voie de signalisation polarise par la suite les lymphocytes T vers la réponse inflammatoire de type Th1 ou la réponse anti-inflammatoire de type Th2. Mais globalement ces résultats suggèrent une diminution de l'infiltration par certaines cellules dont les monocytes et les lymphocytes et par conséquent, une répression de la production de facteurs chimiotactiques ainsi que l'immunosuppression.

La majorité des études sur les cellules immunitaires ou sur les cytokines suite à la brûlure sévère ont été portées sur les cellules ou cytokines circulantes dans le sang (Fivenson *et al.*, 1997). En revanche, aucune étude n'a été focalisée sur la perturbation du réseau immunitaire au niveau de la plaie brûlée, plus particulièrement au niveau du derme profond, pour pouvoir comprendre les changements responsables de l'effondrement de la réponse immunitaire. La majorité des études ont été portées sur les cellules immunitaires circulantes dans le sang telles que les monocytes ou les macrophages impliqués dans la régulation du système immunitaire chez les patients brûlés (Daniel *et al.*, 2007). Par contre, très peu était connu sur le lieu de naissance de cette réponse immunitaire dévastatrice pour l'homme et du syndrome de la réponse inflammatoire systémique. La caractérisation des différentes populations de cellules immunitaires au niveau de la plaie afin d'établir le réseau de cellules immunitaires ainsi que les facteurs solubles produits par ces cellules reste un enjeu clé pour bien comprendre la physiologie de la brûlure. Nos résultats supportent l'hypothèse que le développement du syndrome de la réponse inflammatoire systémique prend naissance au niveau du site de l'agression tissulaire. Les populations cellulaires résidentes au niveau de la peau telle que les keratinocytes, les mélanocytes, les fibroblastes et les cellules de Langerhans, initient cette réponse inflammatoire.

La brûlure sévère entraîne des brûlures superficielles de la plaie (SPT) et des brûlures profondes de la plaie (DPT) (Banyard DA *et al.*, 2016). La plaie brûlée relâche via le derme le liquide exsudat qui est très riche en médiateurs inflammatoires qui recrutent et activent par la suite des cellules qui participent à la guérison et la défense de l'hôte contre les infections bactériennes. L'exsudat est un état de réparation qui représente le microenvironnement de la plaie brûlée. De ce point de vue, l'exsudat pourrait être le premier indicateur de complication possible suite à la brûlure sévère.

Les brûlures dans la partie profonde ne peuvent pas guérir sans le débridement. D'où l'importance de débrider les patients brûlés pour enlever les parties de la peau qui contiennent des toxines suite à la brûlure telle que PAMP et DAMP etc. Tous nos patients brûlés ont été débridés à la salle opératoire de CHUM ce qui a permis d'enlever la peau morte pour diminuer l'intensité de l'inflammation et augmenter ainsi le taux de survie des patients.

Dans une étude, les chercheurs ont examiné ce liquide exsudat des brûlures de SPT et DPT afin de déterminer s'il existe une corrélation entre la sévérité de l'agression et la composition de l'exsudat de la brûlure. Dans cette étude, des lymphocytes ont été identifiés en tant que les régulateurs clés dans la guérison du derme brûlé et leur nombre diminue une fois la plaie est dans le processus de guérison (Banyard DA *et al.*, 2016). Les lymphocytes T cytotoxiques résidents ont été les plus abondants dans la plaie brûlée (Boyce *et al.*, 2000). Dans le liquide provenant de la partie superficielle de la plaie (SPT) on y trouvait majoritairement ces cellules T cytotoxiques qui servent comme la réponse primaire pendant la phase d'inflammation (Banyard DA *et al.*, 2016). En revanche, dans le liquide provenant de la partie profonde de la plaie brûlée (DPT) on y trouvait majoritairement des granulocytes et des monocytes (Banyard DA *et al.*, 2016). Le niveau très élevé de cytokines dans l'exsudat a été identifié. Ces cytokines peuvent potentiellement entrer dans la circulation sanguine et causer ainsi les complications telles que SRIS. Ce syndrome de la réponse inflammatoire systémique ainsi que la dysfonction des organes multiples suite à la brûlure sont considérés d'être la conséquence liée à l'effusion de cytokines de la plaie brûlée dans le flux sanguin (Widgerow *et al.*, 2015). Certaines cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-2, l'IL-6, l'IL-8, TNF- $\alpha$  et TNF- $\gamma$  peuvent activer les neutrophiles qui vont générer les radicaux libres et les protéases. Cependant, la surproduction de radicaux libres mène vers l'oxydation et l'endommagement des tissus ainsi que la dysfonction des organes (Mikhal'chik *et al.*, 2009). Dans notre projet nous n'avons pas eu l'accès à l'exsudat de nos patients. Cependant, les altérations dans l'exsudat de la plaie reflètent l'état de la plaie sous-jacente et peuvent également donner un aperçu de la santé générale du patient. Par conséquent, l'analyse de l'exsudat pourrait fournir des informations précieuses pour les thérapies locales et systémiques (Widgerow *et al.*, 2015). Pour la perspective de notre projet, il serait intéressant d'analyser également l'exsudat de patients.

Dans une autre étude, les chercheurs ont analysé et comparé le profil de cytokines (IL-1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 et TNF- $\alpha$ ), de chimiokines (CCL2, CCL5, CCL17, CCL18, CCL20, CCL27, CXCL1, CXCL12) et de facteurs de croissance dans trois types de blessures : la brûlure sévère, la blessure chronique et la blessure suite à la chirurgie. Dans nos résultats nous avons également identifié le niveau élevé de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10 et



TNF $\gamma$ . Il est intéressant de noter que selon cette étude, dans la plaie brûlée, des niveaux relativement faibles de cytokines pro-inflammatoires et des niveaux plus élevés de chimiokines inflammatoires ont été détectés (Kroeze, 2009). Dans la plaie brûlée, des cytokines entraînent la sécrétion de chimiokines à partir de cellules résidentielles, ce qui entraîne à son tour un afflux massif de cellules infiltrantes dans la plaie. Cet afflux massif de cellules infiltrantes enlève les cytokines de la plaie déjà présentes tout en augmentant leur production de chimiokines et en attirant encore plus de cellules inflammatoires. Par conséquent, dans la plaie brûlée la réponse pro-inflammatoire est plus importante que dans les plaies chirurgicales où le tissu nécrotique est négligeable. Dans cette étude, l'expression de certaines chimiokines semblait être spécifique de la plaie brûlée. Un taux élevé de CCL5 et de CCL27 (CTACK) dans les exsudats de brûlures comparativement aux exsudats chirurgicaux et aux exsudats de plaies chroniques a été détecté (Kroeze, 2009). Comme on peut voir sur la figure 5, dans notre étude nous avons également identifié le niveau important de chimiokine CCL5. Récemment, il a été montré que CCL5 est une molécule chimioattractive puissante pour les cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (Kroeze *et al.*, 2009). Il est donc possible que CCL5 puisse jouer un rôle dans la formation de cicatrices dans la plaie brûlée. En revanche, nous n'avons pas détecté l'augmentation significative de chimiokine CCL27 (CTACK). Des facteurs de croissance sont requis pour la réparation et le remodelage des tissus afin de rétablir l'intégrité de la peau. Il serait donc intéressant de déterminer le profil spécifique de facteurs de croissance tels que HGF et TGF- $\beta$  dans nos plaies brûlées.

Dans une autre étude, des chercheurs se sont intéressés si la peau non blessée située à la proximité de la brûlure peut également sécréter les cytokines pro-inflammatoires suite à ce traumatisme. L'expression des gènes des cytokines (l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL8 et TNF $\alpha$ ) a été régulée à la hausse dans les cas de traumatisme cutané, mais aussi dans le cas de la peau sans blessure (Catania *et al.*, 1999). Ces résultats suggèrent que la peau non blessée peut également contribuer à l'augmentation du nombre de cytokines dans la circulation sanguine suite à la brûlure.

Ce projet se voulait une étude exploratoire, avec un petit nombre de patients. Le petit nombre de patients est l'une des limites de cette étude. Cette étude devrait être refaite dans l'avenir sur plus grand nombre de patients afin de valider l'importance de nos résultats. Les patients brûlés ont été débridés à la salle opératoire de CHUM ce qui a permis d'enlever la peau morte pour augmenter le taux de survie des patients. Ensuite, les échantillons ont été prélevés dans les premiers jours suivant l'admission. Les biopsies ont été faites à la périphérie de la plaie, ce qui nous a permis de collecter des cellules sur le site de la brûlure ainsi que les cellules au niveau périphérique de la

plaie. Il est également nécessaire de valider nos résultats de PCR par le contrôle effectué avec les échantillons de la peau non brûlée pour confirmer les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la modulation de l'immunité inflammatoire. Par contre, il est difficile d'obtenir les échantillons de la peau humaine saine pour la raison éthique. Le site de donneur de peau lorsqu'utilisé chez les grands brûlés devrait servir comme la valeur de référence normale dans l'étude. Cependant, ces cellules de références issues de patients brûlés ne sont toujours pas la référence idéale, car l'inflammation systémique est souvent déjà mise en place suite à la brûlure sévère. Par conséquent, les cellules de références considérées comme saines peuvent déjà contenir des cytokines pro-inflammatoires. De plus, chez les patients gravement brûlés il est rare d'avoir la peau non brûlée. En cas de brûlure du troisième degré, la peau peut entraîner une compression externe qu'il est indispensable d'enlever par la chirurgie (débrider). Par la suite, il est possible d'utiliser comme des cellules de référence cette peau débridée en isolant ses cellules souches. Il s'agit de la thérapie cellulaire. On prélève une petite surface de peau, idéalement en zone pileuse (aisselle, pubis), car les cellules souches y sont en plus grand nombre. Les cellules sont ensuite mises en culture au laboratoire et cela permet d'obtenir des feuillets épidermiques d'une surface totale jusqu'à mille fois plus importante que la surface prélevée. Le progrès dans la technique de cellules souches et dans la médecine régénératrice offre aujourd'hui l'avenir prometteur pour développer diverses cellules souches pour la cicatrisation des brûlures ainsi que pour obtenir des cellules de références saines. Cependant, il y a encore des problèmes techniques et scientifiques qui devraient être résolus pour faciliter le plein potentiel de cette thérapie cellulaire (Li & Maitz, 2018).

Pendant la manipulation de nos échantillons, le problème majeur était l'instabilité des ARN. Cette instabilité des ARN est due au clivage spontané via transestérification intramoléculaire dans les ARN, puis par la présence de l'enzyme RNase, très fortement exprimée par les cellules de la peau. De plus, l'enzyme RNase est très difficile à inactiver. Cette enzyme est relâchée par la cellule juste après le stress cellulaire ce que représente la brûlure, le débridement à la salle opératoire, le transport des échantillons de l'hôpital et puis la lyse cellulaire pendant la manipulation au laboratoire. La probabilité de la dégradation des ARN est alors très importante.

Les analyses des gènes exprimés suite à la brûlure sévère, le type de cytokines dans le derme profond, les médiateurs clés impliqués dans la guérison lors de la brûlure ainsi que la localisation de lieu d'initiation de la réponse immunitaire suite à la brûlure peuvent contribuer au développement de nouvelle thérapie ciblée pour empêcher le décès du patient. Le traitement de la plaie brûlée avec des immunosuppresseurs pourrait permettre de diminuer l'inflammation en

périphérie. L'interleukine 17 favorise l'immunosuppression de cellules souches mésenchymateuses qui ont un potentiel de différenciation multiple (Ma *et al.*, 2018). Dans une étude, il a été démontré que l'IL-17 est capable de prolonger le temps de survie des greffes de la peau (Ma *et al.*, 2018), ce qui nous suggère que l'IL-17 pourrait être un bon candidat dans la thérapie d'immunosuppressive pour augmenter la survie des patients brûlés. Pour le traitement de la thérapie immunosuppressive on peut également envisager d'inhiber certaines cytokines pro-inflammatoires par des anticorps via l'injection systémique. Il est donc nécessaire de prendre en considération que cette inhibition pourrait amener des effets secondaires considérables. Un bloquant une cytokine par la thérapie d'immunosuppression, d'autre cytokine peut prendre le relais ce qui pourrait empêcher le rétablissement de l'équilibre de système immunitaire (Dinarello, 2000). Il est important de prendre en considération toutes ces possibilités. Une meilleure connaissance des changements immunitaires au niveau de la plaie permettra de développer de nouvelles thérapies ciblées afin de diminuer les séquelles des brûlures graves sur le système immunitaire.





## 5 REFERENCES

- Akira S & Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4(7):499-511.
- Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F & Lynch DH (1995) Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181(1):71-77.
- Antonacci AC, Reaves LE, Calvano SE, Amand R, De Riesthal HF & Shires GT (1984) Flow cytometric analysis of lymphocyte subpopulations after thermal injury in human beings. *Surg. Gynecol. Obstet.* 159(1):1-8.
- Asehnoune K, Roquilly A & Abraham E (2012) Innate immune dysfunction in trauma patients: from pathophysiology to treatment. *Anesthesiology* 117(2):411-416.
- Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL & Powrie F (1999) An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 190(7):995-1004.
- Aubock J, Niederwieser D, Romani N, Fritsch P & Huber C (1985) Human interferon-gamma induces expression of HLA-DR on keratinocytes and melanocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 277(4):270-275.
- Avniel S, Arik Z, Maly A, Sagie A, Basst HB, Yahana MD, Weiss ID, Pal B, Wald O, Ad-El D, Fujii N, Arenzana-Seisdedos F, Jung S, Galun E, Gur E & Peled A (2006) Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the recovery of skin following burns. *J. Invest. Dermatol.* 126(2):468-476.
- Ayala A, Ertel W & Chaudry IH (1996) Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. *Shock* 5(2):79-90.
- Baggiolini M, Dewald B & Moser B (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55:97-179.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B & Palucka K (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811.
- Banchereau J & Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673):245-252.
- Banyard DA, GRD E & Widgerow A (2016) Burn Wound Exudate: Depth of Burn Predicts Cellular Recruitment. *Journal of Dermatology and Clinical Research* 4(3):1073-1075.
- Bernabei P, Rigamonti L, Ariotti S, Stella M, Castagnoli C & Novelli F (1999) Functional analysis of T lymphocytes infiltrating the dermis and epidermis of post-burn hypertrophic scar tissues. *Burns* 25(1):43-48.
- Beutler B & Rietschel ET (2003) Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* 3(2):169-176.

- Bjerknes R, Vindenes H & Laerum OD (1990) Altered neutrophil functions in patients with large burns. *Blood Cells* 16(1):127-141; discussion 142-123.
- Blazar BA, Rodrick ML, O'Mahony JB, Wood JJ, Bessey PQ, Wilmore DW & Mannick JA (1986) Suppression of natural killer-cell function in humans following thermal and traumatic injury. *J. Clin. Immunol.* 6(1):26-36.
- Bogunovic M, Ginhoux F, Wagers A, Loubeau M, Isola LM, Lubrano L, Najfeld V, Phelps RG, Grosskreutz C, Scigliano E, Frenette PS & Merad M (2006) Identification of a radio-resistant and cycling dermal dendritic cell population in mice and men. *J. Exp. Med.* 203(12):2627-2638.
- Boismenu R, Feng L, Xia YY, Chang JC & Havran WL (1996) Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J. Immunol.* 157(3):985-992.
- Bone RC (1991a) The pathogenesis of sepsis. *Ann. Intern. Med.* 115(6):457-469.
- Bone RC (1991b) Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions. *Ann. Intern. Med.* 114(4):332-333.
- Bone RC (1996a) Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann. Intern. Med.* 125(8):680-687.
- Bone RC (1996b) Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit. Care Med.* 24(7):1125-1128.
- Bonfeld CM & Geisler C (2016) The role of innate lymphoid cells in healthy and inflamed skin. *Immunol. Lett.* 179:25-28.
- Boyce DE, Jones WD, Ruge F, Harding KG & Moore K (2000) The role of lymphocytes in human dermal wound healing. *Br. J. Dermatol.* 143(1):59-65.
- Brach MA, deVos S, Gruss HJ & Herrmann F (1992) Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood* 80(11):2920-2924.
- Cassatella MA, Meda L, Bonora S, Ceska M & Constantin G (1993) Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 178(6):2207-2211.
- Castagnoli C, Trombotto C, Ondei S, Stella M, Calcagni M, Magliacani G & Alasia ST (1997) Characterization of T-cell subsets infiltrating post-burn hypertrophic scar tissues. *Burns* 23(7-8):565-572.
- Catania RA, Schwacha MG, Cioffi WG, Bland KI & Chaudry IH (1999) Does uninjured skin release proinflammatory cytokines following trauma and hemorrhage? *Arch. Surg.* 134(4):368-373; discussion 373-364.
- Chen L & DiPietro LA (2017) Toll-Like Receptor Function in Acute Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 6(10):344-355.
- Choudhry MA, Mao H, Haque F, Khan M, Fazal N & Sayeed MM (2002) Role of NFAT and AP-1 in PGE2-mediated T cell suppression in burn injury. *Shock* 18(3):212-216.

- Collighan N, Giannoudis PV, Kourgeraki O, Perry SL, Guillou PJ & Bellamy MC (2004) Interleukin 13 and inflammatory markers in human sepsis. *Br. J. Surg.* 91(6):762-768.
- D'Elia M, Patenaude J, Dupras C & Bernier J (2009) Burn injury induces the expression of cystine/glutamate transporter (x(c)(-)) in mouse T cells. *Immunol. Lett.* 125(2):137-144.
- Dalton HJ (2001) T-cell responses in burn infection. *Crit. Care Med.* 29(12):2386-2387.
- Daniel T, Thobe BM, Chaudry IH, Choudhry MA, Hubbard WJ & Schwacha MG (2007) Regulation of the postburn wound inflammatory response by gammadelta T-cells. *Shock* 28(3):278-283.
- Dinarello CA (2000) Proinflammatory cytokines. *Chest* 118(2):503-508.
- Dubois B, Massacrier C, Vanbervliet B, Fayette J, Briere F, Banchereau J & Caux C (1998) Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J. Immunol.* 161(5):2223-2231.
- Dudda JC, Perdue N, Bachtanian E & Campbell DJ (2008) Foxp3+ regulatory T cells maintain immune homeostasis in the skin. *J. Exp. Med.* 205(7):1559-1565.
- Dyess DL, Ferrara JJ, Luterman A & Curreri PW (1991) Subeschar tissue fluid: a source of cell-mediated immune suppression in victims of severe thermal injury. *J. Burn Care Rehabil.* 12(2):101-105.
- Fearon DT & Locksley RM (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272(5258):50-53.
- Ferrara JJ, Peterson RD, Hester R, Luterman A & Curreri PW (1989) Inhibition of lymphocyte blastogenesis caused by suppression of interleukin-2 receptor sites after thermal injury. *J. Burn Care Rehabil.* 10(2):119-124.
- Fivenson DP, Faria DT, Nickoloff BJ, Poverini PJ, Kunkel S, Burdick M & Strieter RM (1997) Chemokine and inflammatory cytokine changes during chronic wound healing. *Wound Repair Regen.* 5(4):310-322.
- Gallucci S, Lolkema M & Matzinger P (1999) Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* 5(11):1249-1255.
- Gamelli RL, He LK & Liu H (1994) Macrophage suppression of granulocyte and macrophage growth following burn wound infection. *J. Trauma* 37(6):888-892.
- Gay AN, Mushin OP, Lazar DA, Naik-Mathuria BJ, Yu L, Gobin A, Smith CW & Olutoye OO (2011) Wound healing characteristics of ICAM-1 null mice devoid of all isoforms of ICAM-1. *J. Surg. Res.* 171(1):e1-7.
- Goris RJ (1996) MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response? *World J. Surg.* 20(4):418-421.
- Grbic JT, Mannick JA, Gough DB & Rodrick ML (1991) The role of prostaglandin E2 in immune suppression following injury. *Ann. Surg.* 214(3):253-262; discussion 262-253.
- Griswold JA (1993) White blood cell response to burn injury. *Semin. Nephrol.* 13(4):409-415.
- Groux H, Bigler M, de Vries JE & Roncarolo MG (1996) Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 184(1):19-29.

- Haeney MR (1998) The role of the complement cascade in sepsis. *J. Antimicrob. Chemother.* 41 Suppl A:41-46.
- Havran WL & Jameson JM (2010) Epidermal T cells and wound healing. *J. Immunol.* 184(10):5423-5428.
- He LK, Liu LH, Hahn E & Gamelli RL (2001) The expression of cyclooxygenase and the production of prostaglandin E2 in neutrophils after burn injury and infection. *J. Burn Care Rehabil.* 22(1):58-64.
- Hensler T, Sauerland S, Bouillon B, Raum M, Rixen D, Helling HJ, Andermahr J & Neugebauer EA (2002) Association between injury pattern of patients with multiple injuries and circulating levels of soluble tumor necrosis factor receptors, interleukin-6 and interleukin-10, and polymorphonuclear neutrophil elastase. *J. Trauma* 52(5):962-970.
- Hunt JP, Hunter CT, Brownstein MR, Giannopoulos A, Hultman CS, deSerres S, Bracey L, Frelinger J & Meyer AA (1998) The effector component of the cytotoxic T-lymphocyte response has a biphasic pattern after burn injury. *J. Surg. Res.* 80(2):243-251.
- Janeway CA, Jr. (1992) The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 10:645-674.
- Janeway CA, Jr. & Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197-216.
- Kearns RD, Holmes JH & Cairns BA (2013) Burn injury: what's in a name? Labels used for burn injury classification: a review of the data from 2000-2012. *Ann Burns Fire Disasters* 26(3):115-120.
- Keel M & Trentz O (2005) Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 36(6):691-709.
- Kim JM, Rasmussen JP & Rudensky AY (2007) Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat. Immunol.* 8(2):191-197.
- Kondo T, Kawai T & Akira S (2012) Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling. *Trends Immunol.* 33(9):449-458.
- Kroeze K (2012) Comparison of cytokine, chemokine and growth factor profiles in burn wounds, chronic wounds and surgical excision wounds. :72-84.
- Kroeze KL, Jurgens WJ, Doulabi BZ, van Milligen FJ, Scheper RJ & Gibbs S (2009) Chemokine-mediated migration of skin-derived stem cells: predominant role for CCL5/RANTES. *J. Invest. Dermatol.* 129(6):1569-1581.
- Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN & Vandenabeele P (2011) Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends Immunol.* 32(4):157-164.
- Kung C & Thomas ML (1997) Recent advances in lymphocyte signaling and regulation. *Front. Biosci.* 2:d207-221.
- Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ & Austyn JM (1990) Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J. Exp. Med.* 172(5):1483-1493.



- Leifer CA & Medvedev AE (2016) Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *J. Leukoc. Biol.* 100(5):927-941.
- Li Z & Maitz P (2018) Cell therapy for severe burn wound healing. *Burns Trauma* 6:13.
- Liu J, Feng Y, Yang K, Li Q, Ye L, Han L & Wan H (2011) Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 61(2):179-188.
- Ma T, Wang X, Jiao Y, Wang H, Qi Y, Gong H, Zhang L & Jiang D (2018) Interleukin 17 (IL-17)-Induced Mesenchymal Stem Cells Prolong the Survival of Allogeneic Skin Grafts. *Ann. Transplant.* 23:615-621.
- Magnotti LJ & Deitch EA (2005) Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure. *J. Burn Care Rehabil.* 26(5):383-391.
- Majetschak M, Zedler S, Hostmann A, Sorell LT, Patel MB, Novar LT, Kraft R, Habib F, de Moya MA, Ertel W, Faist E & Schade U (2008) Systemic ubiquitin release after blunt trauma and burns: association with injury severity, posttraumatic complications, and survival. *J. Trauma* 64(3):586-596; discussion 596-588.
- McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD & Hart DN (1995) Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur. J. Immunol.* 25(7):2064-2068.
- Mikhal'chik EV, Piterskaya JA, Budkevich LY, Pen'kov LY, Facchiano A, De Luca C, Ibragimova GA & Korkina LG (2009) Comparative study of cytokine content in the plasma and wound exudate from children with severe burns. *Bull. Exp. Biol. Med.* 148(5):771-775.
- Mitsui H, Watanabe T, Saeki H, Mori K, Fujita H, Tada Y, Asahina A, Nakamura K & Tamaki K (2004) Differential expression and function of Toll-like receptors in Langerhans cells: comparison with splenic dendritic cells. *J. Invest. Dermatol.* 122(1):95-102.
- Moore CB, Medina MA, van Deventer HW, O'Connor BP, Cameron S, Taxman DJ, Maile R, Ting JP & Cairns BA (2007) Downregulation of immune signaling genes in patients with large surface burn injury. *J Burn Care Res* 28(6):879-887.
- Nelson RD, Hasslen SR, Ahrenholz DH & Solem LD (1987) Mechanisms of loss of human neutrophil chemotaxis following thermal injury. *J. Burn Care Rehabil.* 8(6):496-502.
- Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ & Nickoloff BJ (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9(10):679-691.
- Nestle FO & Nickoloff BJ (2007) Deepening our understanding of immune sentinels in the skin. *J. Clin. Invest.* 117(9):2382-2385.
- Noronha SA, Noronha SM, Lanziani LE, Ferreira LM & Gragnani A (2014) Innate and adaptive immunity gene expression of human keratinocytes cultured of severe burn injury. *Acta Cir. Bras.* 29 Suppl 3:60-67.
- O'Neill LA, Golenbock D & Bowie AG (2013) The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 13(6):453-460.
- O'Sullivan ST, Lederer JA, Horgan AF, Chin DH, Mannick JA & Rodrick ML (1995) Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-

- 12 production associated with decreased resistance to infection. *Ann. Surg.* 222(4):482-490; discussion 490-482.
- O'Sullivan ST & O'Connor TP (1997) Immunosuppression following thermal injury: the pathogenesis of immunodysfunction. *Br. J. Plast. Surg.* 50(8):615-623.
- Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, Chow JC & Strauss JF, 3rd (2001) The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 276(13):10229-10233.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L & Aderem A (2000) The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(25):13766-13771.
- Patenaude J, D'Elia M, Hamelin C & Bernier J (2010) Selective effect of burn injury on splenic CD11c(+) dendritic cells and CD8alpha(+)CD4(-)CD11c(+) dendritic cell subsets. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(8):1315-1329.
- Rani M, Nicholson SE, Zhang Q & Schwacha MG (2017) Damage-associated molecular patterns (DAMPs) released after burn are associated with inflammation and monocyte activation. *Burns* 43(2):297-303.
- Rani M & Schwacha MG (2017) The composition of T-cell subsets are altered in the burn wound early after injury. *PLoS One* 12(6):e0179015.
- Revillard J-P (1995) *Immunologie*. De Boeck-Wesmael, Bruxelles, 2.éd. 367 s. p
- Romani N, Brunner PM & Stingl G (2012) Changing views of the role of Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 132(3 Pt 2):872-881.
- Rose S & Marzi I (1996) [Pathophysiology of polytrauma]. *Zentralbl. Chir.* 121(11):896-913.
- Roumen RM, Redl H, Schlag G, Zilow G, Sandtner W, Koller W, Hendriks T & Goris RJ (1995) Inflammatory mediators in relation to the development of multiple organ failure in patients after severe blunt trauma. *Crit. Care Med.* 23(3):474-480.
- Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, Burmeister DM, Rose LF, Natesan S, Chan RK, Christy RJ & Chung KK (2015) Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit. Care* 19:243.
- Sallusto F & Lanzavecchia A (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179(4):1109-1118.
- Sasaki JR, Zhang Q & Schwacha MG (2011) Burn induces a Th-17 inflammatory response at the injury site. *Burns* 37(4):646-651.
- Sauder DN (1983) Immunology of the epidermis: changing perspectives. *J. Invest. Dermatol.* 81(3):185-186.
- Savino W & Dardenne M (2000) Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocr. Rev.* 21(4):412-443.



- Schluter B, Konig B, Bergmann U, Muller FE & Konig W (1991a) Interleukin 6--a potential mediator of lethal sepsis after major thermal trauma: evidence for increased IL-6 production by peripheral blood mononuclear cells. *J. Trauma* 31(12):1663-1670.
- Schluter B, Konig W, Koller M, Erbs G & Muller FE (1991b) Differential regulation of T- and B-lymphocyte activation in severely burned patients. *J. Trauma* 31(2):239-246.
- Schutysse E, Struyf S & Van Damme J (2003) The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14(5):409-426.
- Schwacha MG (2003) Macrophages and post-burn immune dysfunction. *Burns* 29(1):1-14.
- Schwacha MG, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI & Chaudry IH (1999) Role of protein kinase C in cyclic AMP-mediated suppression of T-lymphocyte activation following burn injury. *Biochim. Biophys. Acta* 1455(1):45-53.
- Shimada S & Katz SI (1988) The skin as an immunologic organ. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 112(3):231-234.
- Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom EE, Sims JE & Dower SK (2000) Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 275(7):4670-4678.
- Sparkes BG (1993) Mechanisms of immune failure in burn injury. *Vaccine* 11(5):504-510.
- St-Onge M, Flamand N, Biarc J, Picard S, Bouchard L, Dussault AA, Laflamme C, James MJ, Caughey GE, Cleland LG, Borgeat P & Pouliot M (2007) Characterization of prostaglandin E2 generation through the cyclooxygenase (COX)-2 pathway in human neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* 1771(9):1235-1245.
- Stephan RN, Conrad PJ, Saizawa M, Dean RE & Chaudry IH (1988) Prostaglandin E2 depresses antigen-presenting cell function of peritoneal macrophages. *J. Surg. Res.* 44(6):733-739.
- Teodorczyk-Injeyan JA, Sparkes BG, Mills GB, Peters WJ & Falk RE (1986) Impairment of T cell activation in burn patients: a possible mechanism of thermal injury-induced immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* 65(3):570-581.
- Utsunomiya T, Kobayashi M, Herndon DN, Pollard RB & Suzuki F (2001) A mechanism of interleukin-12 unresponsiveness associated with thermal injury. *J. Surg. Res.* 96(2):211-217.
- Vacchio MS & Ashwell JD (2000) Glucocorticoids and thymocyte development. *Semin. Immunol.* 12(5):475-485.
- Valladeau J & Saeland S (2005) Cutaneous dendritic cells. *Semin. Immunol.* 17(4):273-283.
- van den Berg LM, de Jong MA, Witte L, Ulrich MM & Geijtenbeek TB (2011) Burn injury suppresses human dermal dendritic cell and Langerhans cell function. *Cell. Immunol.* 268(1):29-36.
- Vinish M, Cui W, Stafford E, Bae L, Hawkins H, Cox R & Toliver-Kinsky T (2016) Dendritic cells modulate burn wound healing by enhancing early proliferation. *Wound Repair Regen.* 24(1):6-13.

- Weber-Matthiesen K & Sterry W (1990) Organization of the monocyte/macrophage system of normal human skin. *J. Invest. Dermatol.* 95(1):83-89.
- Weiss M, Moldawer LL & Schneider EM (1999) Granulocyte colony-stimulating factor to prevent the progression of systemic nonresponsiveness in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Blood* 93(2):425-439.
- Widgerow AD, King K, Tocco-Tussardi I, Banyard DA, Chiang R, Awad A, Afzel H, Bhatnager S, Melkumyan S, Wirth G & Evans GR (2015) The burn wound exudate-an under-utilized resource. *Burns* 41(1):11-17.
- Williams FN, Herndon DN & Jeschke MG (2009) The hypermetabolic response to burn injury and interventions to modify this response. *Clin. Plast. Surg.* 36(4):583-596.
- Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, Zimmermann VS, Davoust J & Ricciardi-Castagnoli P (1997) Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* 185(2):317-328.
- Wolfe RR (1996) Herman Award Lecture, 1996: relation of metabolic studies to clinical nutrition-the example of burn injury. *Am. J. Clin. Nutr.* 64(5):800-808.
- Wood GW, Volenec FJ, Mani MM & Humphrey LJ (1978) Dynamics of T-lymphocyte subpopulations and T-lymphocyte function following thermal injury. *Clin. Exp. Immunol.* 31(2):291-297.
- Yarovinsky F, Zhang D, Andersen JF, Bannenberg GL, Serhan CN, Hayden MS, Hieny S, Sutterwala FS, Flavell RA, Ghosh S & Sher A (2005) TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308(5728):1626-1629.
- Yin J, Peng Y, Wu J, Wang Y & Yao L (2014) Toll-like receptor 2/4 links to free fatty acid-induced inflammation and beta-cell dysfunction. *J. Leukoc. Biol.* 95(1):47-52.
- Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH & Faist E (1999) T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit. Care Med.* 27(1):66-72.
- Zhang X, Li N, Meng Y, Zhang R, Bian J, Yao Y, Li J & Deng X (2016) High-Level Expression of Toll-Like Receptors on Dendritic Cells in Adult Patients with Burns on  $\geq 90\%$  of Total Body Surface Area (TBSA). *Med. Sci. Monit.* 22:3493-3499.
- Zhang Z & Schluesener HJ (2006) Mammalian toll-like receptors: from endogenous ligands to tissue regeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(24):2901-2907.